



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113301903 A

(43) 申请公布日 2021.08.24

(21) 申请号 201980061788.8

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2019.07.19

代理人 李志强 梅黎

(30) 优先权数据

62/701467 2018.07.20 US

(51) Int.Cl.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.19

A61K 31/7016 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/44 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/042597 2019.07.19

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/06 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/023310 EN 2020.01.30

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(71) 申请人 动量制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 张钟利 格雷戈里·圣路易斯

E·威廉斯 N·辛赫 S·帕蒂尔

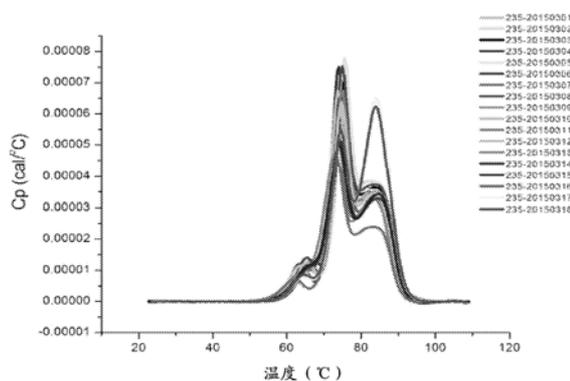
权利要求书2页 说明书23页 附图28页

(54) 发明名称

FcRn抗体的组合物及其使用方法

(57) 摘要

描述且表征了含有抗FcRn抗体的稳定的药物组合物。



1. 一种药物组合物,其包含:10或30 mg/ml的包含重链和轻链的抗体,所述重链包含具有至多5个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:2的氨基酸序列,所述轻链包含具有至多5个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:1的氨基酸序列,20-30 mM磷酸钠,20-30 mM氯化钠,80-100 mg/ml海藻糖和0.10 - 0.005% w/v聚山梨醇酯80,在pH 6.5下缓冲。

2. 权利要求1的药物组合物,其包含25 mM磷酸钠。

3. 权利要求1的药物组合物,其包含25 mM氯化钠。

4. 权利要求1-3中任一项的药物组合物,其包含90-91 mg/ml海藻糖。

5. 权利要求1-3中任一项的药物组合物,其包含90.5 mg/ml海藻糖。

6. 权利要求1-3任一项的药物组合物,其包含0.01% w/v聚山梨醇酯80。

7. 权利要求1的药物组合物,其包含25 mM磷酸钠、25 mM氯化钠、90.5 mg/ml海藻糖和0.01%聚山梨醇酯80。

8. 权利要求1-7中任一项的药物组合物,其中所述组合物不包含任何另外的赋形剂。

9. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述抗体包含重链,所述重链包含具有至多2个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且具有轻链,所述轻链包含具有至多2个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

10. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述抗体包含重链,所述重链包含具有至多2个单氨基酸取代的SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且具有轻链,所述轻链包含具有至多2个单氨基酸取代的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

11. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且具有轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

12. 一种药物组合物,其包含:10或30 mg/ml的包含重链和轻链的抗体,所述重链包含具有至多5个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:2的氨基酸序列,所述轻链包含具有至多5个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:1的氨基酸序列,20-30 mM琥珀酸钠,20-30 mM氯化钠,89-92 mg/ml海藻糖和0.1 - 0.005% w/v聚山梨醇酯80,在pH 6.5下缓冲。

13. 权利要求12的药物组合物,其包含25 mM琥珀酸钠。

14. 权利要求12的药物组合物,其包含25 mM氯化钠。

15. 权利要求12-14中任一项的药物组合物,其包含90-91 mg/ml海藻糖。

16. 权利要求12的药物组合物,其包含90.5 mg/ml海藻糖。

17. 权利要求12-14中任一项的药物组合物,其包含0.01% w/v聚山梨醇酯80。

18. 权利要求12的药物组合物,其包含25 mM琥珀酸钠、25 mM氯化钠、90.5 mg/ml海藻糖和0.01%聚山梨醇酯80。

19. 权利要求12-18中任一项的药物组合物,其中所述组合物不包含任何另外的赋形剂。

20. 权利要求12的药物组合物,其中所述抗体包含重链,所述重链包含具有至多2个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且具有轻链,所述轻链包含具有至多2个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

21. 权利要求12的药物组合物,其中所述抗体包含重链,所述重链包含具有至多2个单氨基酸取代的SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且具有轻链,所述轻链包含具有至多2个单氨基酸取代的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

22. 权利要求12的药物组合物,其中所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且具有轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

23. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述抗体包含重链,所述重链由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成,并且具有轻链,所述轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。

24. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述组合物不包含除聚山梨醇酯80外的任何聚山梨醇酯。

25. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述组合物不包含除聚山梨醇酯外的任何聚合物。

26. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述组合物不包含除聚山梨醇酯80外的任何聚合物。

## FcRn抗体的组合物及其使用方法

### 背景技术

[0001] 众多自身免疫疾病和同种免疫疾病由致病性抗体介导。致病性抗体的稳定性、活性和转运取决于Fc受体(FcRn),其为充当IgG和血清白蛋白结合的细胞内囊泡运输蛋白的I型跨膜蛋白。例如,许多胎儿和新生儿免疫疾病起因于母体抗体通过胎盘中的人新生儿Fc受体(FcRn),从妊娠受试者(尤其是患有免疫性疾病的妊娠受试者)到胎儿的转移。

### 发明内容

[0002] 本公开内容涉及包含抗FcRn抗体的组合物(M281组合物),以及使用此类组合物治疗自身免疫疾病的方法。

[0003] 本文描述的是包含以下的药物组合物:10或30 mg/ml的包含重链和轻链的抗体,所述重链包含具有至多5个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:2的氨基酸序列,所述轻链包含具有至多5个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:1的氨基酸序列,20-30 mM磷酸钠,20-30 mM氯化钠,80-100(例如,90-91 mg/ml海藻糖和0.1 - 0.005% w/v聚山梨醇酯80,在pH 6.5下缓冲)。

[0004] 在各种情况下,该组合物:包含25 mM磷酸钠;包含25 mM氯化钠;包含90-91 mg/ml海藻糖;包含90.5 mg/ml海藻糖;包含0.01% w/v聚山梨醇酯80;包含25 mM磷酸钠、25 mM氯化钠、90.5 mg/ml海藻糖和0.01%聚山梨醇酯80;该组合物不包含任何另外的赋形剂;该组合物不包含除聚山梨醇酯80外的任何聚山梨醇酯,该组合物不包含除聚山梨醇酯外的任何聚合物,该组合物不包含除聚山梨醇酯80外的任何聚合物,该抗体包含重链,所述重链包含具有至多2个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且具有轻链,所述轻链包含具有至多2个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:1的氨基酸序列;该抗体包含重链,所述重链包含具有至多2个单氨基酸取代的SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且具有轻链,所述轻链包含具有至多2个单氨基酸取代的SEQ ID NO:1的氨基酸序列;该抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0005] 还描述的是包含以下的药物组合物:10或30 mg/ml的包含重链和轻链的抗体,所述重链包含具有至多5个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:24的氨基酸序列,所述轻链包含具有至多5个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:19的氨基酸序列,20-30 mM琥珀酸钠,20-30 mM氯化钠,89-92 mg/ml海藻糖和0.02 - 0.005% w/v聚山梨醇酯80,在pH 6.5下缓冲。

[0006] 在各种情况下,该组合物:包含25 mM琥珀酸钠;包含25 mM氯化钠;包含90-91 mg/ml海藻糖;包含90.5 mg/ml海藻糖;包含0.01% w/v聚山梨醇酯80;包含25 mM琥珀酸钠、25 mM氯化钠、90.5 mg/ml海藻糖和0.01%聚山梨醇酯80;该组合物不包含任何另外的赋形剂;该抗体包含重链,所述重链包含具有至多2个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且具有轻链,所述轻链包含具有至多2个单氨基酸插入、取代或缺失的SEQ ID NO:1的氨基酸序列;该抗体包含重链,所述重链包含具有至多2个单氨基酸取代的SEQ

ID NO:2的氨基酸序列,并且具有轻链,所述轻链包含具有至多2个单氨基酸取代的SEQ ID NO:19的氨基酸序列;该抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且具有轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0007] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。本文描述了用于本发明中的方法和材料;也可以使用本领域已知的其它的合适方法和材料。材料、方法和实例仅是说明性的,而不预期是限制性的。本文提到的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其它参考文献整体引入作为参考。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0008] 根据下述详细描述和附图以及权利要求,本发明的其它特点和优点将是显而易见的。

### 附图说明

[0009] 图1显示了对于表1中的制剂,如通过DSC测量的热转变数据。

[0010] 图2显示了对于表1中的制剂,在加速条件下,如通过SEC测量的尺寸纯度数据。

[0011] 图3显示了对于表1中的制剂,在加速条件下,如通过cIEF测量的电荷异质性数据。

[0012] 图4显示了对于表1中的制剂,在加速条件下,如通过CE-SDS Caliper(非还原)测量的纯度数据。

[0013] 图5显示了对于表1中的制剂,在加速条件下,如通过CE-SDS Caliper(还原)测量的纯度数据。

[0014] 图6显示了对于表2中的制剂,在加速条件下,如通过SEC测量的尺寸纯度数据。

[0015] 图7显示了对于表2中的制剂,在加速条件下,如通过cIEF测量的电荷异质性数据。

[0016] 图8显示了对于表2中的制剂,如通过动态光散射(DLS)测量的尺寸分布数据。

[0017] 图9显示了对于表2中的制剂,在加速条件下,如通过CE-SDS Caliper(非还原)测量的纯度数据。

[0018] 图10显示了对于表2中的制剂,在加速条件下,如通过CE-SDS Caliper(还原)测量的纯度数据。

[0019] 图11显示了对于表2中的制剂,对于各种缓冲液pH,如通过DSC测量的热转变数据。较高的 $T_m$ 起始指示了蛋白质在特定pH下更好的热稳定性。在pH筛选研究中鉴定了三个转变: $T_{m1}$ 、 $T_{m2}$ 和 $T_{m3}$ 。

[0020] 图12显示了在温度应力下,通过cIEF的抗体%主要种类水平的比较。在2 - 8°C的长期贮存条件下的抗体稳定性结果显示为实线,并且25°C/60%RH的加速贮存条件显示为虚线。关于批次D的30 mg/mL的抗体以红色显示。关于批次E的10 mg/mL抗体以黑色显示,关于批次F以紫色显示,并且关于批次B以蓝色显示。注意:绿色规格线仅适用于在2 - 8°C下的实时条件。

[0021] 图13显示了在温度应力下,通过SEC-HPLC的抗体%主要种类水平的比较。在2 - 8°C的长期贮存条件下的抗体稳定性结果显示为实线,并且25°C/60%RH的加速贮存条件显示为虚线。关于批次D的30 mg/mL的抗体以红色显示。关于批次E的10 mg/mL抗体以黑色显示,关于批次F以紫色显示,并且关于批次B以蓝色显示。绿色规格线仅适用于在2 - 8°C下的实时条件。

[0022] 图14A-14D显示了在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,10 mg/mL DP开发批次E到30个月、批次F到24个月、GMP批次A到24个月、GMP批次B到18个月的蛋白质浓度数据(A),以及关于所有10 mg/mL DP批次的回归研究图(B);在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,30 mg/mL开发DP批次D到12个月和GMP批次C到3个月的浓度(C),以及关于DP批次D的回归研究图(D)。USL:规格上限; LSL:规格下限。

[0023] 图15A-15D显示了在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,10 mg/mL DP开发批次E到30个月、批次F到24个月、GMP批次A到24个月、批次B到18个月的pH(A),以及关于所有10 mg/mL DP批次的回归研究图(B);在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,开发DP批次D到12个月和GMP批次C到3个月的pH(C),以及关于DP批次D的回归研究图(D)。USL:规格上限; LSL:规格下限。

[0024] 图16A-16D显示了在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,10 mg/mL DP开发批次E到30个月、批次F到24个月、GMP批次A到24个月、批次B到18个月的尺寸纯度数据(A),以及关于所有10 mg/mL DP批次的回归研究图(B);在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,开发DP批次D到12个月和GMP批次C到3个月的通过SEC的尺寸纯度(C),以及关于DP批次D的回归研究图(D)。LSL:规格下限。

[0025] 图17A-17D显示了在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,10 mg/mL DP开发批次E到30个月、批次F到24个月、GMP批次A到24个月、批次B到18个月的通过还原CE-SDS的纯度数据(A),以及关于所有10 mg/mL DP批次的回归研究图(B);在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,开发DP批次D到12个月和GMP批次C到3个月的通过还原CE-SDS的HC+LC纯度(C),以及关于DP批次D的回归研究图(D)。LSL:规格下限。

[0026] 图18A-18D显示了在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,10 mg/mL DP开发批次E到30个月、批次F到24个月、GMP批次A到24个月、批次B到18个月的通过非还原CE-SDS的尺寸纯度数据(A),以及关于所有10 mg/mL DP批次的回归研究图(B);在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,开发DP批次D到12个月和GMP批次C到3个月的通过非还原CE-SDS的尺寸纯度(C),以及关于DP批次D的回归研究图(D)。LSL:规格下限。

[0027] 图19A-D显示了在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,10 mg/mL DP开发批次E到30个月、批次F到24个月、GMP批次A到24个月、批次B到18个月的通过非还原CE-SDS的峰值A水平数据(A),以及关于所有10 mg/mL DP批次的回归研究图(B);在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,开发DP批次D到12个月和GMP批次C到3个月的通过非还原CE-SDS的峰值A水平(C),以及关于DP批次D的回归研究图(D)。USL:规格上限。

[0028] 图20 A-D显示了在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,10 mg/mL DP开发批次E到30个月、批次F到24个月、GMP批次A到24个月、批次B到18个月的来自cIEF的主峰数据(A),以及关于所有10 mg/mL DP批次的回归研究图(B);在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,开发DP批次D到12个月和GMP批次C到3个月的来自cIEF的主峰(C),以及关于DP批次D的回归研究图(D)。LSL:规格下限。

[0029] 图21A-21D显示了在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,10 mg/mL DP开发批次E到30个月、批次F到24个月、GMP批次A到24个月、批次B到18个月的来自cIEF的酸性峰数据(A),以及关于所有10 mg/mL DP批次的回归研究图(B);在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8℃下,开发DP批次D到12个月和GMP批次C到3个月的来自cIEF的酸性峰(C),以及

关于DP批次D的回归研究图(D)。USL:规格上限。

[0030] 图22A-22D显示了在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8°C下,10 mg/mL DP开发批次E到30个月、批次F到24个月、GMP批次A到24个月、批次B到18个月的来自cIEF的碱性峰数据(A),以及关于所有10 mg/mL DP批次的回归研究图(B);在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8°C下,开发DP批次D到12个月和GMP批次C到3个月的来自cIEF的碱性峰(C),以及回归研究图(D)。USL:规格上限。

[0031] 图23A-23D显示了在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8°C下,10 mg/mL DP GMP批次A到24个月、批次B到18个月的效力数据(A),以及关于两个10 mg/mL DP批次的回归研究图(B);在稳定性研究中,在长期贮存条件2 - 8°C下,开发DP批次D到12个月和GMP批次C到3个月的效力(C),以及回归研究图(D)。USL:规格上限;LSL:规格下限。

### 具体实施方式

[0032] 本公开内容的特点在于包含针对人新生儿Fc受体(FcRn)的抗体的组合物。这些组合物可用于例如促进受试者中的自身抗体清除,压制受试者中的抗原呈递,阻断免疫应答,例如阻断受试者中的基于免疫复合物的免疫应答激活,或治疗受试者中的免疫性疾病(例如自身免疫疾病)。

[0033] 在初步研究之后,制备了具有不同浓度的氯化钠、海藻糖和表面活性剂聚山梨醇酯(PS)80、缓冲剂的选定制剂,并且在不同pH(pH 5至8)下进行缓冲。因此,组合物包含离子渗透质(osmolyte)稳定剂(氯化钠)和非离子渗透质稳定剂(海藻糖)两者。通过外观、pH、蛋白质浓度、尺寸纯度、电荷分布和热稳定性,随着时间过去评价上述制剂的稳定性。这些稳定性参数通过分析技术进行测量,所述分析技术包括pH、UV-Vis、尺寸排阻层析、离子交换层析、CE-SDS和差示扫描量热法。

[0034] 如跨越上述度量评价的,两种制剂显示了增强的稳定性,并且该稳定性随着时间过去持续:(1)在pH 6.5下缓冲的25 mM磷酸钠、25 mM氯化钠、90.5 mg ml<sup>-1</sup>海藻糖、0.01%聚山梨醇酯(PS)80、以及10或30 mg ml<sup>-1</sup>的抗体(具有包含序列SEQ ID NO:2的重链和包含SEQ ID NO:1的轻链);以及(2)在pH 6.6下缓冲的25 mM琥珀酸钠、25 mM氯化钠、90.5 mg ml<sup>-1</sup>海藻糖、0.01%聚山梨醇酯(PS)80、以及10或30 mg ml<sup>-1</sup>的抗体(具有包含序列SEQ ID NO:2的重链和包含SEQ ID NO:1的轻链)。在选择机械、热和化学应力的存在下,进一步测试了上述两种制剂的稳定性。随着时间过去,如跨越多重上述度量评价的,两种制剂均未显示出稳定性的显著下降。值得注意的是,关于制剂(1)在pH 6.5下缓冲的25 mM磷酸钠、25 mM氯化钠、90.5 mg ml<sup>-1</sup>海藻糖、0.01%聚山梨醇酯(PS)80、以及10或30 mg ml<sup>-1</sup>的抗体,稳定性维持超过30个月。还测试的是具有不同量的聚山梨醇酯80,在pH 6.5下缓冲的25 mM磷酸钠、25 mM氯化钠、90.5 mg ml<sup>-1</sup>海藻糖、以及抗体(具有包含序列SEQ ID NO:2的重链和包含SEQ ID NO:1的轻链)。

[0035] 抗FcRn抗体

可以如本文所述配制的抗体包含具有SEQ ID NO:1的轻链序列和SEQ ID NO:2的重链序列的抗体(也称为M281;含有该抗体的组合物有时称为M281组合物)。该抗体的变体也可以如本文所述进行配制。此类变体包含:具有SEQ ID NO:1的变体的轻链序列、以及具有SEQ ID NO:2的变体的重链序列的抗体,所述SEQ ID NO:1的变体具有1-5个单氨基酸取

代或缺失(并且优选包含SEQ ID No: 3-5的CDR序列),所述SEQ ID NO:2的变体具有1-5个单氨基酸取代或缺失(并且优选包含SEQ ID No:6-8的CDR序列)。由SEQ ID NO:1的变体和SEQ ID NO:2的变体组成的抗体优选保留以下CDR序列:TGTGSDVGSYNLVS(轻链CDR1; SEQ ID NO: 3);GDSERPS(轻链CDR2; SEQ ID NO: 4);SSYAGSGIYV(轻链CDR3; SEQ ID NO: 5);TYAMG(重链CDR1; SEQ ID NO: 6);SIGASGSQTRYADS(重链CDR2; SEQ ID NO: 7);以及LAIGDSY(重链CDR3; SEQ ID NO: 8)。

[0036] 在一些情况下,轻链具有的序列与以下具有至少90%、95%或98%的同一性:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTGSDVGSYNLVSQYQHPGKAPKLMYGDSEPSGVSNRFSGSK  
SGNTASLTISGLQAEDEADYCYSSYAGSGIYVFGTGTQVTLVLPKAAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY  
PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ  
ID NO: 1)。

[0037] 在一些情况下,重链具有的序列与以下具有至少90%、95%或98%的同一性:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYAMGWVRQAPGKGLEWVSSIGASGSQTRYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARLAIGDSYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD  
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ  
ID NO: 2)。

[0038] 载体、宿主细胞和抗体生产

抗FcRn抗体可以从宿主细胞产生。宿主细胞指这样的媒介物,其包括从其相应的核酸表达本文所述的多肽和构建体所需的必要细胞组分,例如细胞器。核酸可以包括在核酸载体中,所述核酸载体可以通过本领域已知的常规技术(例如,转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射、感染等)引入宿主细胞内。核酸载体的选择部分取决于待使用的宿主细胞。一般地,优选的宿主细胞具有原核(例如细菌)或真核(例如哺乳动物)起源。

[0039] 核酸载体构建和宿主细胞

可以通过本领域已知的各种方法,来制备编码抗FcRn抗体的氨基酸序列的核酸序列。这些方法包括但不限于寡核苷酸介导的(或定点)诱变和PCR诱变。可以使用标准技术,例如基因合成,来获得编码抗FcRn抗体的核酸分子。可替代地,可以使用本领域的标准技术,例如QuikChange™诱变,使编码野生型抗FcRn抗体的核酸分子突变,以含有特定的氨基酸取代。可以使用核苷酸合成仪或PCR技术来合成核酸分子。

[0040] 可以将编码抗FcRn抗体的核酸序列插入载体内,所述载体能够在原核或真核宿主细胞中复制且表达核酸分子。许多载体是本领域可获得的并且可以使用。每种载体可以含有各种组分,其可以对于与特定宿主细胞的相容性进行调整和优化。例如,载体组分可以包括但不限于复制起点、选择标记物基因、启动子、核糖体结合位点、信号序列、编码目的蛋白的核酸序列和转录终止序列。

[0041] 哺乳动物细胞可以用作宿主细胞。哺乳动物细胞类型的实例包括但不限于人胚肾(HEK)(例如,HEK293、HEK 293F)、中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa、COS、PC3、Vero、MC3T3、NS0、Sp2/0、VERY、BHK、MDCK、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、T47D、NS0(并不内源地产生任何免

疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030和HsS78Bst细胞。在其它情况下,大肠杆菌(*E. coli*)细胞可以用作宿主细胞。大肠杆菌菌株的实例包括但不限于大肠杆菌294(ATCC<sup>®</sup> 31, 446)、大肠杆菌λ 1776(ATCC<sup>®</sup> 31, 537)、大肠杆菌BL21(DE3)(ATCC<sup>®</sup> BAA-1025)和大肠杆菌RV308(ATCC<sup>®</sup> 31, 608)。不同的宿主细胞具有关于蛋白质产物的翻译后加工和修饰的特征和特异性机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统,以确保所表达的抗FcRn抗体的正确修饰和加工。可以使用本领域的常规技术,例如转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀和直接显微注射,将上述表达载体引入适当的宿主细胞内。一旦将载体引入用于蛋白质生产的宿主细胞内,就在常规营养培养基中培养宿主细胞,所述营养培养基适当地进行修饰,用于诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因。用于表达治疗性蛋白的方法是本领域已知的,参见例如,Paulina Balbas, Argelia Lorence(编辑)*Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press; 第二版2004年(2004年7月20日),以及Vladimir Voynov和Justin A. Caravella(编辑)*Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* Humana Press; 第二版2012年(2012年6月28日)。

#### [0042] 蛋白质生产、回收和纯化

用于产生抗FcRn抗体的宿主细胞可以在培养基中进行生长,所述培养基是本领域已知的且适合于培养所选择的宿主细胞。用于哺乳动物宿主细胞的合适培养基的实例包括最小必需培养基(MEM),达尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM),Expi293<sup>™</sup> Expression Medium,具有补充的胎牛血清(FBS)的DMEM和RPMI-1640。用于细菌宿主细胞的合适培养基的实例包括Luria肉汤(LB)加上必要的补充物,例如选择试剂,例如氨苄青霉素。在合适的温度,例如约20℃至约39℃,例如25℃至约37℃,优选37℃,以及CO<sub>2</sub>水平例如5至10%(优选8%)下培养宿主细胞。培养基的pH一般为约6.8至7.4,例如7.0,这主要取决于宿主生物。如果在表达载体中使用诱导型启动子,则在适合于启动子激活的条件下诱导蛋白质表达。

[0043] 蛋白质回收通常涉及破坏宿主细胞,一般通过此类手段如渗透压休克、超声处理或裂解。一旦细胞破裂,就可以通过离心或过滤去除细胞碎片。蛋白质可以进行进一步纯化。抗FcRn抗体可以通过蛋白质纯化领域中已知的任何方法进行纯化,例如,通过蛋白A亲和层析、其它层析(例如,离子交换层析、亲和层析和尺寸排阻柱层析)、离心、差别溶解度,或通过用于蛋白质纯化的任何其它标准技术。(参见*Process Scale Purification of Antibodies*, Uwe Gottschalk(编辑) John Wiley & Sons, Inc., 2009)。在一些情况下,抗FcRn抗体可以缀合至标记物序列,例如肽,以促进纯化。标记物氨基酸序列的实例是六组氨酸肽(His-tag),其以微摩尔亲和力与镍官能化的琼脂糖亲和柱结合。可用于纯化的其它肽标签包括但不限于血凝素“HA”标签,其对应于衍生自流感血凝素蛋白的表位。

#### [0044] 治疗方法和适应征

通过本文所述的含有抗FcRn抗体的药物组合物阻断人FcRn,在由IgG自身抗体驱动的疾病中可能具有治疗益处。FcRn阻断以诱导体IgG分解代谢和去除多个种类的自身抗体、少量循环代谢产物或脂蛋白的能力,对于具有自身抗体驱动的自身免疫疾病病理学的患者,提供了扩展自身抗体去除策略的实用性和可及性的方法。不受任何理论的束缚,抗FcRn抗体的主导作用机制可能是增加循环中的致病性自身抗体的分解代谢,并且减少受累组织中的自身抗体和免疫复合物沉积。

[0045] 药物组合物可用于促进受试者中的致病性抗体,例如IgG和IgG自身抗体的分解代谢和清除,以减轻免疫应答,例如,阻断受试者中的基于免疫复合物的免疫应答激活,并且治疗受试者中的免疫学状况或疾病。特别地,药物组合物可用于减轻或治疗基于免疫复合物的急性或慢性免疫应答激活。急性免疫应答可以通过选自以下的医学状况激活:寻常性天疱疮、狼疮肾炎、重症肌无力、格-巴二氏综合征、抗体介导的排斥、灾难性抗磷脂抗体综合征、免疫复合物介导的血管炎、肾小球炎、离子通道病、视神经脊髓炎、自身免疫性听力损失、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、免疫性嗜中性粒细胞减少症、扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy)和血清病。慢性免疫应答可以通过选自以下的医学状况激活:慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、系统性红斑狼疮、建议进行急性治疗的慢性形式的病症、反应性关节炎、原发性胆汁性肝硬化、溃疡性结肠炎和抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关血管炎。

[0046] 在一些情况下,药物组合物可用于减轻或治疗由自身免疫疾病激活的免疫应答。自身免疫疾病可以选自斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、爱迪生氏病、溶血性贫血、自身免疫性肝炎、肝炎、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻性皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、丘-斯二氏综合征、瘢痕性类天疱疮、局限性硬皮病(CREST综合征)、冷凝集素病、克罗恩氏病、皮炎、盘状狼疮、特发性混合性冷球蛋白血症、纤维肌痛、纤维肌炎、格雷夫斯病、桥本氏甲状腺炎、甲状腺机能减退、炎症肠病、自身免疫性淋巴细胞增生综合征、特发性肺纤维化、IgA肾病、胰岛素依赖性糖尿病、青少年关节炎、扁平苔藓、狼疮、梅尼埃病、混合性结缔组织病、多发性硬化、恶性贫血、结节性多发性动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、雷诺现象、赖特氏综合征、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、干燥综合征、僵人综合征、高安动脉炎、颞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、白癜风、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关血管炎、重症肌无力、视神经脊髓炎或韦格纳氏肉芽肿病。

[0047] 在一些情况下,药物组合物可用于减少胎儿中的贫血风险或减少胎儿中发展贫血的风险。在一些情况下,药物组合物可用于减少或消除对于IUT(宫内输血)的需要。在一些情况下,药物组合物和方法可用于减少或消除对于产前PP + IVIg、产后输血、IVIg和/或光疗的需要。

[0048] 在一些情况下,药物组合物可用于减轻或治疗胎儿或新生儿中的免疫应答。在一些情况下,药物组合物和方法可用于减轻或治疗胎儿或新生儿中,由妊娠母亲中的自身免疫疾病激活的免疫应答。

[0049] 特别地,药物组合物可用于减轻或治疗由以下激活的免疫应答:系统性红斑狼疮、抗磷脂综合征、寻常性天疱疮/大疱性类天疱疮、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关血管炎、重症肌无力或视神经脊髓炎。在一些情况下,药物组合物可用于减轻或治疗胎儿或新生儿中的免疫应答。在一些情况下,药物组合物和方法可用于减轻或治疗由妊娠母亲中的系统性红斑狼疮、抗磷脂综合征、寻常性天疱疮/大疱性类天疱疮、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关血管炎、重症肌无力或视神经脊髓炎激活的免疫应答。

[0050] 药物组合物可用于减少跨越妊娠受试者的胎盘的致病性抗体转运(例如,致病性母体IgG抗体转运),增加妊娠受试者中的致病性抗体分解代谢,以及治疗胎儿或新生儿中

的抗体介导的病毒性疾病增强的方法中,所述方法通过向妊娠受试者施用与人FcRn结合的分离抗体。可以受益于通过本文所述的药物组合物的FcRn抑制的疾病和病症包括胎儿和/或新生儿中的疾病和病症,其通过母体致病性抗体(例如,母体致病性IgG抗体)跨越胎盘从妊娠受试者到胎儿和/或新生儿的转移而引起。

[0051] 在一些情况下,可以受益于用本文所述的药物组合物的治疗的疾病和病症是胎儿和新生儿同种免疫和/或自身免疫病症。胎儿和新生儿同种免疫病症是胎儿和/或新生儿中,由妊娠受试者中的致病性抗体引起的病症。妊娠受试者中的致病性抗体可能攻击胎儿的抗原(例如,胎儿从胎儿的父亲遗传的抗原),导致胎儿或新生儿患有胎儿和新生儿同种免疫和/或自身免疫病症。

[0052] 可以治疗的胎儿和新生儿同种免疫和/或自身免疫病症的实例包括但不限于:胎儿和新生儿同种免疫性血小板减少症(FNAIT)、胎儿和新生儿的溶血性疾病(HDFN)、同种免疫性泛血小板减少症、先天性心脏传导阻滞、胎儿关节挛缩、新生儿重症肌无力、新生儿自身免疫性溶血性贫血、新生儿抗磷脂综合征、新生儿多发性肌炎、皮炎、新生儿狼疮、新生儿硬皮病、白塞氏病、新生儿格雷夫斯病、新生儿川崎病、新生儿自身免疫性甲状腺病和新生儿I型糖尿病。

[0053] 在一些情况下,可以受益于用本文所述的药物组合物的治疗的疾病和病症是病毒性疾病,其中抗体促进病毒进入宿主细胞内,导致细胞中增加或增强的感染性,例如抗体介导的病毒性疾病的增强。在一些情况下,抗体可以与病毒表面蛋白结合,并且抗体/病毒复合物可以通过抗体和受体之间的相互作用而与细胞表面上的FcRn结合。随后,抗体/病毒复合物可以变得内化到细胞内。例如,病毒可以通过与母体IgG抗体形成复合物而进入胎儿的细胞和/或组织内。母体IgG抗体可以与病毒表面蛋白结合,并且IgG/病毒复合物可以与胎盘的合体滋养细胞中的FcRn结合,所述FcRn然后将复合物转移到胎儿内。

[0054] 在一些情况下,本文所述的药物组合物可以用于治疗抗体介导的病毒性疾病的增强。在一些情况下,由致病性抗体(例如,致病性IgG抗体)增强的病毒性疾病包括但不限于由以下引起的病毒性疾病:甲病毒感染、黄病毒感染、寨卡病毒感染、基孔肯雅病毒感染、罗斯河病毒感染、严重急性呼吸系统综合征冠状病毒感染、中东呼吸综合征、禽流感感染、流感病毒感染、人呼吸道合胞病毒感染、埃博拉病毒感染、黄热病病毒感染、登革热病毒感染、人免疫缺陷病毒感染、呼吸道合胞病毒感染、汉坦病毒感染、盖塔病毒感染、辛德毕斯病毒感染、布尼亚维拉病毒感染、西尼罗河病毒感染、日本乙型脑炎病毒感染、兔痘病毒感染、乳酸脱氢酶升高病毒感染、呼肠孤病毒感染、狂犬病病毒感染、口蹄疫病毒感染、猪繁殖与呼吸综合征病毒感染、猿猴出血热病毒感染、马传染性贫血病毒感染、山羊关节炎病毒感染、非洲猪瘟病毒感染、慢病毒感染、BK乳多空病毒感染、墨累谷脑炎病毒感染、肠道病毒感染、巨细胞病毒感染、肺炎病毒感染、麻疹病毒属感染和麻疹病毒感染。

[0055] 通过抗FcRn抗体阻断人FcRn,在由致病性抗体(例如,致病性IgG抗体)驱动的疾病中可能具有治疗益处。FcRn阻断以诱导体致病性抗体分解代谢和去除多个种类的致病性抗体而不干扰血清白蛋白、少量循环代谢产物或脂蛋白的能力,对于具有致病性抗体驱动的自身免疫疾病病理学的患者,提供了扩展致病性抗体去除策略的实用性和可及性的方法。尽管不受理论的束缚,但抗FcRn抗体的主导作用机制可能是增加循环中的致病性抗体的分解代谢,并且减少受累组织中的致病性抗体和免疫复合物沉积。

[0056] 本文所述的药物组合物可以施用于患有医学状况或处于患有医学状况的风险中的妊娠受试者,所述医学状况激活妊娠受试者中的免疫应答。在一些情况下,妊娠的受试者过去可能已患有激活妊娠受试者中的免疫应答的医学状况。在一些情况下,妊娠受试者具有曾经有过胎儿或新生儿的病史,所述胎儿或新生儿患有胎儿和新生儿同种免疫和/或自身免疫病症。在一些情况下,如果在得自妊娠受试者的生物样品(例如,血液或尿样品)中检测到与免疫疾病相关的致病性抗体,则可以将本文所述的抗FcRn抗体施用于妊娠受试者。在一些情况下,在妊娠受试者的生物样品中检测到的致病性抗体,已知与来自妊娠受试者中的胎儿的抗原(例如,胎儿从胎儿的父亲遗传的抗原)结合。

[0057] 在一些情况下,药物组合物可以施用于这样的受试者,其计划妊娠,并且患有医学状况或处于患有医学状况的风险中,所述医学状况激活妊娠受试者中的免疫应答,和/或过去已患有激活妊娠受试者中的免疫应答的医学状况。在一些情况下,受试者计划妊娠,并且具有曾经有过胎儿或新生儿的病史,所述胎儿或新生儿患有胎儿和新生儿同种免疫和/或自身免疫病症。在一些情况下,本文所述的抗FcRn抗体可以施用于这样的受试者,其计划妊娠,并且其生物样品含有与免疫疾病相关的致病性抗体。

[0058] 在一些情况下,本文所述的药物组合物可以施用于受试者(例如,妊娠受试者),以减轻或治疗受试者中的基于免疫复合物的急性或慢性免疫应答激活。急性免疫应答可以通过医学状况(例如,寻常性天疱疮、狼疮肾炎、重症肌无力、格-巴二氏综合征、抗体介导的排斥、灾难性抗磷脂抗体综合征、免疫复合物介导的血管炎、肾小球炎、离子通道病、视神经脊髓炎、自身免疫性听力损失、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血性贫血、免疫性嗜中性粒细胞减少症、扩张型心肌病、血清病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、系统性红斑狼疮、反应性关节炎、原发性胆汁性肝硬化、溃疡性结肠炎或抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关血管炎)激活。

[0059] 在一些情况下,本文所述的制剂可以施用于受试者(例如,妊娠受试者),以减轻或治疗由自身免疫疾病激活的免疫应答。自身免疫疾病可以是例如斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、爱迪生氏病、溶血性贫血、温抗体型自身免疫性溶血性贫血(wAIHA)、抗因子抗体、肝素诱发的血小板减少症(HICT)、致敏移植、自身免疫性肝炎、肝炎、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻性皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、丘-斯二氏综合征、瘢痕性类天疱疮、局限性硬皮病(CREST综合征)、冷凝集素病、克罗恩氏病、皮炎、盘状狼疮、特发性混合性冷球蛋白血症、纤维肌痛、纤维肌炎、格雷夫斯病、桥本氏甲状腺炎、甲状腺机能减退、炎症肠病、自身免疫性淋巴细胞增生综合征、特发性肺纤维化、IgA肾病、胰岛素依赖性糖尿病、青少年关节炎、扁平苔藓、狼疮、梅尼埃病、混合性结缔组织病、多发性硬化、恶性贫血、结节性多发性动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、雷诺现象、赖特氏综合征、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、干燥综合征、僵人综合征、高安动脉炎、颞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、白癜风或韦格纳氏肉芽肿病。

## 实施例

[0060] 在本文阐述的实施例中使用下述材料和方法。

[0061] 材料

从商业供应商购买的材料包括磷酸二氢钠一水合物(J.T. Baker),无水磷酸氢二钠(J.T. Baker),琥珀酸(TGI),琥珀酸钠(Macron),氯化钠(J.T. Baker),柠檬酸一水合物(AppliChem),盐酸(J.T. Baker),氢氧化钠(Macron),高纯度(低内毒素) $\alpha$ - $\alpha$ -海藻糖脱水物(Pfanstiehl),超纯聚山梨醇酯80-LQ(MH)(Croda)。

[0062] 本文使用的抗体(包含重链SEQ ID NO:2和轻链SEQ ID NO:1)已被格式化为IgG1 G1m17同种异型重链,即缺少末端Lys的完全 $\lambda$ 轻链(K446:EU编号),并且具有消除了Asn297处的糖基化的Asn297Ala(EU编号)突变。

#### [0063] 外观分析

使用灯箱(Tianda Tianfa,型号YB-2),针对黑色和白色背景检查了所有样品的外观,包括透明度、颜色和可见颗粒。

#### [0064] pH的测量

使用具有Inlab<sup>®</sup> Micro电极的pH计(Mettler Toledo,Model Seven Multi S40),来测量样品pH。在每次使用之前,用商购可得的校准溶液对pH计进行校准。

#### [0065] 蛋白质浓度的测量

使用NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Scientific),通过UV 280 nm读数来确定蛋白质浓度。所有研究中使用的消光系数为 $1.447 \text{ AU ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。

#### [0066] 用于重量克分子渗透压浓度测量的方法

使用渗透压计(Advanced Instruments,Advanced Multi-Sample Osmometer;型号2020),来测量重量克分子渗透压浓度,而无需稀释样品。在测试之前和测试之后,用临床对照290 mOsm/kg参考溶液,来确认渗透压计的测试精度。

#### [0067] 差示扫描量热法

毛细管细胞差示扫描量热法(DSC)通过检测作为温度的函数的增加样品温度和参考的温度所需的热量差异,用于测量蛋白质的热稳定性。具体地,DEC测量热转变中点( $T_m$ ),其为溶液中的蛋白质相对稳定性的指示剂。简言之,用商购可得的参考缓冲液,将样品稀释至约 $1 \text{ mg ml}^{-1}$ 。将400  $\mu\text{l}$ 参考缓冲液的等分试样加入96孔板的每个奇数孔内,同时将400  $\mu\text{l}$ 每种样品的等分试样加入相应的偶数孔内。扫描温度范围为 $10^\circ\text{C}$ 至 $100^\circ\text{C}$ ,具有 $200^\circ\text{C}/\text{小时}$ 的扫描速率。使用MicroCal VP-Capillary DSC Automated数据分析软件2.0,来执行数据分析。

#### [0068] 尺寸排阻层析

使用具有TSKGel G3000SWXL尺寸排阻层析柱( $300 \times 7.8 \text{ mm}$ , $5 \mu\text{M}$ )的Agilent 1260 Infinity系统,在 $25^\circ\text{C}$ 下执行尺寸排阻层析(SEC)。在SEC分析之前,用流动相将样品稀释至 $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ,并且注入含有100  $\mu\text{g}$ 蛋白的样品。以 $1 \text{ ml分钟}^{-1}$ 的流速施加等度梯度20分钟。流动相由 $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$ 的50 mM磷酸钠缓冲液,300 mM NaCl组成。通过检测波长设为280 nm的UV检测器收集数据,并且使用Waters Empower Software分析数据。

#### [0069] 毛细管等电聚焦

使用具有FC包被cIEF柱的Protein Simple iCE3设备,执行毛细管等电聚焦(cIEF),以基于pH梯度中的电荷差异来分离蛋白质。对于单克隆抗体(mAb)样品,将20  $\mu\text{g}$ 每种样品与100  $\mu\text{L}$ 主混合物混合,所述主混合物包含等电点(pI)标记物7.55/9.46,Servalyt 6-9,Servalyt 9-11,甲基纤维素溶液。在混合后,将样品在1500 V下聚焦1分钟,且在3000

V下聚焦8分钟。检测波长设为280 nm,并且在不同的pI范围内评估电荷变体分布。

[0070] 毛细管电泳

使用配备光电二极管阵列检测器的Beckman Coulter PA800 Enhanced或PA800 Plus仪器,来执行毛细管电泳(CE-SDS Caliper),以基于通过筛分聚合物的大小来分离十二烷基硫酸盐包被的蛋白质。对于在还原条件下测量的CE-SDS Caliper,通过稀释溶液(PB-CA)将样品稀释至 $4 \text{ mg ml}^{-1}$ ,然后在75  $\mu\text{l}$  SDS样品缓冲液和5  $\mu\text{l}$  2-巯基乙醇的存在下,在70°C下加热10分钟。对于在非还原条件下测量的CE-SDS Caliper,通过稀释溶液(PB-CA)将样品稀释至 $4 \text{ mg ml}^{-1}$ ,然后在75  $\mu\text{l}$  SDS样品缓冲液和5  $\mu\text{l}$  100 mM NEM的存在下,在70°C下加热10分钟。在还原条件或非还原条件下制备的样品,使用-5 kV用反极性在阴极处注入20秒钟,随后为在-15 kV下的分离,并且检测波长设为220 nm。

[0071] 动态光散射(DLS)

DLS是测量在给定温度下光被溶液散射的程度的技术。散射程度与溶液中的颗粒大小(至六次方)和浓度(线性)成比例。由于粒度对光散射的显著作用,该技术用于监测亚微米颗粒。最低pH(5.0)和最高pH(8.0)显示了尺寸分布的增加。所有其它pH未显示明显差异。

[0072] 实施例1. 液体制剂开发研究,以确定如何选择影响包含抗体的液体制剂的稳定性的制剂组分- 缓冲液种类、pH和赋形剂

制备了以30 mg/ml存在的本文抗体(包含重链SEQ ID NO:2和轻链SEQ ID NO:1)的选定制剂,其具有不同浓度的磷酸钠、琥珀酸钠、NaCl、海藻糖和PS-80,并且随着时间过去测量制剂特性 - 例如外观、pH、蛋白质浓度、重量克分子渗透压浓度、热稳定性、尺寸纯度、电荷异质性,且进行比较。

[0073] 制备如表1中详述的选定制剂。

[0074] 表1. 关于选定制剂的组分和缓冲条件

制剂	pH	缓冲液 (25mM)	张力调节剂、稳定剂、表面活性剂	抗体的浓度 mg/mL
F1	7.5	磷酸钠	25 mM NaCl	30
F2	7.5	磷酸钠	25 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖	30
F3	7.5	磷酸钠	25 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖 + 0.01% w/v PS 80	30
F4	7.5	磷酸钠	150 mM NaCl	30
F5	7.5	磷酸钠	150 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖	30
F6	7.5	磷酸钠	150 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖 + 0.01% w/v PS 80	30
F7	7.0	磷酸钠	25 mM NaCl	30
F8	7.0	磷酸钠	25 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖	30
F9	7.0	磷酸钠	25 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖 + 0.01% w/v PS 80	30
F10	7.0	磷酸钠	150 mM NaCl	30
F11	7.0	磷酸钠	150 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖	30
F12	7.0	磷酸钠	150 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖 + 0.01% w/v PS 80	30
F13	6.5	琥珀酸钠	25 mM NaCl	30
F14	6.5	琥珀酸钠	25 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖	30
F15	6.5	琥珀酸钠	25 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖 + 0.01% w/v PS 80	30
F16	6.5	琥珀酸钠	150 mM NaCl	30
F17	6.5	琥珀酸钠	150 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖	30
F18	6.5	琥珀酸钠	150 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖 + 0.01% w/v PS 80	30

基于外观、pH、蛋白质浓度、重量克分子渗透压浓度、热稳定性、尺寸纯度和电荷异质性,随着时间过去监测制剂。对于研究的持续时间,所有测试的制剂都并未显示出在pH、蛋白质浓度或重量克分子渗透压浓度方面的显著变化。相比之下,制剂的子集显示出通过外观、热稳定性、尺寸纯度和电荷异质性的差异。具体地,在加速条件(50°C)下14天后,所有不含海藻糖的制剂都显示了乳色 - 在具有很少透明度的高度分散的系统中可见的外观。在2-8°C下4周和在加速条件(50°C)下14天后,所有其它制剂都保持无色、透明且不含可见颗粒。这些结果指示了,海藻糖组分对包含M281的液体制剂赋予稳定性。通过差示扫描量热法确定不同制剂的热稳定性(图1)。结果指示了,含有较低氯化钠浓度或含有海藻糖的制剂被赋予增加的稳定性。通过尺寸排阻层析确定不同制剂的尺寸纯度(图2)。结果指示了,随着时间过去,pH 6.5的含有低氯化钠浓度和海藻糖的制剂显示出最高的尺寸纯度稳定性。通过在加速条件(50°C)下的毛细管等电聚焦(cIEF),来确定不同制剂的电荷异质性(图3)。改变不同稳定剂 - 例如氯化钠、海藻糖、PS 80 - 的浓度,随着时间过去并不显著影响制剂的电荷异质性。相比之下,制剂的pH具有显著效应,具体地,与pH 7或pH 7.5的制剂相比,

pH 6.5的制剂显示出在1周和2周后更好的电荷异质性维持。在非还原加速条件(图4)和还原加速条件(50℃)(图5)下,通过CE-SDS Caliper测量不同制剂的纯度。结果指示了,与pH 7或pH 7.5相比,含有海藻糖并在pH 6.5下缓冲的制剂被赋予随着时间过去增加的稳定性。

[0075] 总体而言,具有海藻糖的制剂比不含海藻糖的制剂更稳定。与含有150 mM NaCl的制剂相比,具有25 mM NaCl的制剂更稳定。总之,这种制剂筛选的结果指示了,在测试的制剂中,具有25 mM NaCl和90.5 mg/mL海藻糖的制剂显示出最高的稳定性,并且稳定性经过1周和2周得到充分维持。

[0076] 为了确定制剂pH如何影响制剂的稳定性,在不同的pH下制备了在25 mM柠檬酸和二碱式磷酸盐缓冲液中的抗体(10 mg/ml)的选定制剂,并且测量制剂特性(例如外观、pH、蛋白质浓度、重量克分子渗透压浓度、热稳定性、尺寸纯度和电荷异质性等),且进行比较。制备如表2中详述的选定制剂。

[0077] 表2. 关于选定制剂的缓冲条件

制剂	pH	缓冲液(25mM)	抗体mg/mL
F19	5.0	柠檬酸和二碱式磷酸盐缓冲液	10
F20	5.5	柠檬酸和二碱式磷酸盐缓冲液	10
F21	6.0	柠檬酸和二碱式磷酸盐缓冲液	10
F22	6.5	柠檬酸和二碱式磷酸盐缓冲液	10
F23	7.0	柠檬酸和二碱式磷酸盐缓冲液	10
F24	7.5	柠檬酸和二碱式磷酸盐缓冲液	10
F25	8.0	柠檬酸和二碱式磷酸盐缓冲液	10

基于外观、pH、蛋白质浓度、重量克分子渗透压浓度、热稳定性、尺寸纯度和电荷异质性,随着时间过去监测制剂。对于研究的持续时间,所有制剂都并未显示出在外观、pH、蛋白质浓度或重量克分子渗透压浓度方面的显著变化。相比之下,制剂的子集显示出通过尺寸纯度、电荷异质性和热稳定性的差异。通过尺寸排阻层析确定不同制剂的尺寸纯度(图6)。与pH 6或6.5的制剂相比,pH 5、pH 7、pH 7.5和pH-8的制剂显示出减少量的具有靶大小的分子(称为主峰或靶峰)。这些结果指示了,pH 6和6.5的制剂显示出更高的尺寸纯度。通过在加速条件(50℃)下的毛细管等电聚焦(cIEF),来确定不同制剂的电荷异质性(图7)。与在较高测试pH下缓冲的制剂相比,pH 5.5、6.0和6.5的制剂显示出更好的电荷异质性维持。通过动态光散射确定不同制剂的尺寸分布(图8)。pH 5.5-7.5的制剂并未显示尺寸分布的显著变化。相比之下,pH 5和pH 8的制剂显示了尺寸分布的变化,指示了pH 5或8的制剂是不稳定的,并且随着时间过去可能形成降解产物。在非还原加速条件(50℃)(图9)和还原加速条件(50℃)(图10)下,通过CE-SDS Caliper测量不同制剂的纯度。结果指示了,在pH 5、5.5、6或6.5下缓冲的制剂被赋予增加的稳定性,并且这种稳定性在还原(在β-巯基乙醇的存在下)或非还原(在N-乙基马来酰亚胺的存在下)加速条件下得到保存。通过差示扫描量热法确定不同制剂的热稳定性(图11)。与在pH 7、pH 7.5或pH 8下缓冲的制剂相比,在pH 5.5、pH 6和pH 6.5下缓冲的制剂显示出更高的热稳定性。考虑到制剂22具有最高的T<sub>m</sub>起始和T<sub>m1</sub>值,在pH 6.5下缓冲的制剂被赋予最高的热稳定性。

[0078] 总之,这种液体制剂开发研究的结果指示了,用25 mM NaCl和90.5 mg/mL海藻糖制备,并在pH 6.5下缓冲的抗体的液体制剂被赋予了制剂稳定性。

[0079] 实施例2. 稳定性分析研究,以确定当暴露于机械、化学和热应力时,选定制剂的稳定性。

[0080] 为了检查和比较选定制剂在应力存在下的稳定性,将选定制剂制备并暴露于不同的应力,包括机械搅动、可见光、UV光、高温、多次冻融和氧化剂。

[0081] 结果

制备如表3中详述的选定制剂。

[0082] 表3. 关于选定制剂的组分和缓冲条件

制剂	pH	缓冲液 (25mM)	张力调节剂、稳定剂、表面活性剂	抗体 mg/mL
F26	6.5	磷酸钠	25 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖 + 0.01% w/v PS 80	10
F27	6.5	琥珀酸钠	25 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖 + 0.01% w/v PS 80	10
F28	6.5	磷酸钠	25 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖 + 0.01% w/v PS 80	30
F29	6.5	琥珀酸钠	25 mM NaCl + 90.5 mg/mL 海藻糖 + 0.01% w/v PS 80	30
F30	6.5	磷酸钠	25 mM NaCl + 0.01% w/v PS 80	30
F31	6.5	琥珀酸钠	25 mM NaCl + 0.01% w/v PS 80	30

#### 搅动应力

将制剂暴露于在25°C下250 rpm的机械搅动5或10天。制剂并未显示出在外观、蛋白质浓度、pI、尺寸纯度或电荷纯度方面的显著变化。值得注意的是,与彼此相比并且随着时间过去,制剂显示出相似比例的在cIEF测定中的主峰、酸性峰和碱性峰,通过非还原和还原Caliper测定所测量的尺寸纯度,以及DLS测定的平均粒度和PdI(表4)。在SEC测定中,搅动导致相对于总含量的主峰百分比的略微下降,以及聚集物的含量增加。

[0083] 表4. 制剂组分和缓冲条件

测定	编号	样品 ID	T0	搅动研究		
				5D	10D	
外观	F26	20150401	无色， 透明且 不含可见 颗粒	无色， 透明且 不含可见 颗粒	无色， 透明且 不含可见 颗粒	
	F27	20150402				
浓度, mg/mL	F26	20150401	10.7	10.5	10.5	
	F27	20150402	10.0	9.7	9.7	
pH	F26	20150401	6.42	6.41	6.38	
	F27	20150402	6.55	6.52	6.54	
SEC	主峰%	F26	20150401	98.0	97.9	97.3
		F27	20150402	98.0	97.7	97.2
	HMW 峰%	F26	20150401	2.0	2.1	2.7
		F27	20150402	2.0	2.2	2.8
	LMW 峰%	F26	20150401	ND	ND	ND
		F27	20150402	ND	ND	0.1
cIEF	pI	F26	20150401	8.81	NA	8.82
		F27	20150402	8.82	NA	8.81
	主峰%	F26	20150401	65.9	NA	64.2
		F27	20150402	64.6	NA	65.0
	酸性峰%	F26	20150401	31.7	NA	32.6
		F27	20150402	32.3	NA	32.1
	碱性峰%	F26	20150401	2.4	NA	3.2
		F27	20150402	3.1	NA	2.9
还原 Caliper	纯度%	F26	20150401	97.7	NA	98.3
		F27	20150402	97.5	NA	97.4
	LC 大小, kDa	F26	20150401	43.9	NA	42.3
		F27	20150402	43.6	NA	41.8
	HC 大小, kDa	F26	20150401	56.8	NA	56.0
		F27	20150402	56.8	NA	55.1
非还原 Caliper	纯度%	F26	20150401	98.0	NA	98.3
		F27	20150402	98.0	NA	98.4
	大小, kDa	F26	20150401	169.5	NA	162.7
		F27	20150402	170.8	NA	160.9
DLS	Z-Ave	F26	20150401	15.5	NA	15.4
	(d.nm)	F27	20150402	15.5	NA	15.4
	Pdl	F26	20150401	0.10	NA	0.09
		F27	20150402	0.11	NA	0.11

### 热应力

将制剂暴露于在40°C下的热应力下5或10天。制剂并未显示出在外观、蛋白质浓度、pI、如通过SEC或DLS评价的尺寸纯度或电荷纯度方面的显著变化(表5)。制剂显示出cIEF测定中的主峰下降以及酸性特异性峰百分比的增加,然而,所有测试的制剂(表3)都显示出相似的变化幅度。

[0084] 表5. 在暴露于热应力后,制剂26和27的SEC、cIEF、还原Caliper、非还原Caliper、外观、蛋白质浓度、pH结果

测定	编号	样品 ID	T0	热稳定性研究		
				5D	10D	
外观	F26	20150401	无色， 透明且 不含可见 颗粒	无色， 透明且 不含可见 颗粒	无色， 透明且 不含可见 颗粒	
	F27	20150402				
浓度, mg/mL	F26	20150401	10.7	10.5	10.7	
	F27	20150402	10.0	9.7	9.7	
pH	F26	20150401	6.42	6.40	6.41	
	F27	20150402	6.56	6.51	6.53	
SEC	主峰%	F26	20150401	98.0	98.1	97.8
		F27	20150402	98.0	98.0	97.9
	HMW 峰%	F26	20150401	2.0	1.7	1.9
		F27	20150402	2.0	1.9	1.9
	LMW 峰%	F26	20150401	ND	0.1	0.3
		F27	20150402	ND	0.1	0.2
cIEF	pI	F26	20150401	8.81	NA	8.82
		F27	20150402	8.82	NA	8.81
	主峰%	F26	20150401	65.9	NA	54.3
		F27	20150402	64.6	NA	56.3
	酸性峰%	F26	20150401	31.7	NA	41.2
		F27	20150402	32.3	NA	39.9
	碱性峰%	F26	20150401	2.4	NA	4.4
		F27	20150402	3.1	NA	3.8
还原 Caliper	纯度%	F26	20150401	97.7	NA	97.3
		F27	20150402	97.5	NA	97.4
	LC 大小, kDa	F26	20150401	43.9	NA	42.0
		F27	20150402	43.6	NA	42.6
	HC 大小, kDa	F26	20150401	56.8	NA	55.5
		F27	20150402	56.8	NA	56.6
非还原 Caliper	纯度%	F26	20150401	98.0	NA	97.9
		F27	20150402	98.0	NA	98.1
	大小, kDa	F26	20150401	169.5	NA	160.1
		F27	20150402	170.8	NA	163.5
DLS	Z-Ave (d.nm)	F26	20150401	15.5	NA	15.6
		F27	20150402	15.5	NA	15.3
	PdI	F26	20150401	0.10	NA	0.10
		F27	20150402	0.11	NA	0.10

### 可见光应力

将制剂在25°C下暴露于5000 勒克斯的可见光应力5或10天。制剂并未显示出显著不同的外观、蛋白质浓度、pH、pI、非还原Caliper纯度、通过DLS测定的平均粒度或PdI (表6)。观察到通过SEC、cIEF和还原Caliper,蛋白质纯度的略微下降。

[0085] 表6. 在暴露于可见光应力后,制剂26和27的SEC、cIEF、还原Caliper、非还原Caliper、外观、蛋白质浓度、pH结果

测定	编号	样品 ID	T0	可见光敏感性研究				
				可见光		避光		
				5D	10D	5D	10D	
外观	F26	20150401	无色, 透明且 不含可见 颗粒					
	F27	20150402						
浓度, mg/mL	F26	20150401	10.5	10.5	10.6	10.5	10.5	
	F27	20150402	9.7	9.7	9.7	9.8	9.7	
pH	F26	20150401	6.39	6.40	6.39	6.40	6.39	
	F27	20150402	6.51	6.53	6.51	6.52	6.51	
SEC	主峰%	F26	20150401	98.0	97.3	98.3	98.2	98.2
		F27	20150402	98.0	96.5	98.0	98.2	98.2
	HMW 峰%	F26	20150401	2.0	2.6	3.5	1.8	1.8
		F27	20150402	2.0	3.1	3.8	1.8	1.8
	LMW 峰%	F26	20150401	ND	0.1	0.3	ND	0.1
		F27	20150402	ND	0.1	0.2	ND	ND
cIEF	pI	F26	20150401	8.81	NA	8.82	NA	8.82
		F27	20150402	8.82	NA	8.81	NA	8.81
	主	F26	20150401	65.9	NA	59.7	NA	64.5
还原 Caliper	峰%	F27	20150402	64.6	NA	59.4	NA	64.5
		F26	20150401	31.7	NA	37.2	NA	33.0
	酸性峰%	F27	20150402	32.3	NA	37.3	NA	32.3
		F26	20150401	2.4	NA	3.1	NA	2.5
	碱性峰%	F27	20150402	3.1	NA	3.3	NA	3.2
		F26	20150401	97.7	NA	96.3	NA	98.4
非还原 Caliper	纯度%	F27	20150402	97.5	NA	95.2	NA	95.8
		F26	20150401	43.9	NA	41.7	NA	41.5
	LC 大小, kDa	F27	20150402	43.6	NA	41.9	NA	42.4
		F26	20150401	56.8	NA	55.5	NA	55.1
	HC 大小, kDa	F27	20150402	56.8	NA	55.7	NA	56.3
		F26	20150401	98.0	NA	97.7	NA	98.3
DLS	Z-Ave (d.nm)	F27	20150402	96.0	NA	97.9	NA	96.2
		F26	20150401	169.5	NA	163.9	NA	162.9
	PdI	F27	20150402	170.8	NA	160.9	NA	160.8
		F26	20150401	15.5	NA	15.2	NA	15.4
DLS	PdI	F27	20150402	15.5	NA	15.3	NA	15.2
		F26	20150401	0.10	NA	0.13	NA	0.07
DLS	PdI	F27	20150402	0.11	NA	0.08	NA	0.08

### UV光应力

将制剂在25°C下暴露于200 w/m<sup>2</sup>的UV光应力10小时。制剂并未显示出显著不同的外观、蛋白质浓度、pH、pI、非还原Caliper纯度和通过DLS测定的平均粒度或PdI(表7)。观察到通过SEC、cIEF和还原Caliper,蛋白质纯度的下降。

[0086] 表7. 在暴露于UV光应力后,制剂26和27的SEC、cIEF、还原Caliper、非还原Caliper、外观、蛋白质浓度、pH结果

测定	编号	样品 ID	T0	UV 光敏感性研究		
				UV 光, 10 小时	避光, 10 小时	
外观	F26	20150401	无色, 透明且 不含可见 颗粒	无色, 透明且 不含可见 颗粒	无色, 透明且 不含可见 颗粒	
	F27	20150402				
浓度, mg/ml.	F26	20150401	10.7	10.5	10.5	
	F27	20150402	10.0	9.8	9.7	
pH	F26	20150401	6.42	6.39	6.39	
	F27	20150402	6.55	6.51	6.51	
SEC	主峰%	F26	20150401	98.0	98.7	98.2
		F27	20150402	98.0	98.2	98.2
	HMW 峰%	F26	20150401	2.0	3.2	1.8
		F27	20150402	2.0	3.8	1.8
	LMW 峰%	F26	20150401	ND	0.1	ND
		F27	20150402	ND	0.1	ND
cIEF	pI	F26	20150401	8.81	8.81	8.81
		F27	20150402	8.82	8.81	8.81
	主峰%	F26	20150401	65.9	62.0	65.8
		F27	20150402	64.6	61.7	65.5
	酸性峰%	F26	20150401	31.7	35.3	30.4
		F27	20150402	32.3	35.3	31.5
	碱性峰%	F26	20150401	2.4	2.7	2.8
		F27	20150402	3.1	3.0	3.1
还原 Caliper	纯度%	F26	20150401	97.7	96.5	97.8
		F27	20150402	97.5	96.5	97.7
	LC 大小, kDa	F26	20150401	43.9	43.3	43.1
		F27	20150402	43.6	42.7	42.8
HC 大小, kDa	F26	20150401	56.8	56.4	56.0	
	F27	20150402	56.8	55.5	55.7	
非还原 Caliper	纯度%	F26	20150401	98.0	98.2	98.3
		F27	20150402	98.0	98.2	98.4
	大小, kDa	F26	20150401	169.5	162.1	161.6
		F27	20150402	170.8	163.7	164.5
DLS	Z-Ave (d.nm)	F26	20150401	15.5	15.2	15.6
		F27	20150402	15.5	15.2	15.3
	PDI	F26	20150401	0.10	0.08	0.10
		F27	20150402	0.11	0.09	0.08

### 氧化应力

伴随在2-8℃下暴露于1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>共6小时,将制剂暴露于氧化应力。制剂并未显示出显著不同的外观、蛋白质浓度、pH、pI、SEC纯度、还原和非还原Caliper纯度、或通过DLS测定的平均粒度和PDI(表8)。对于cIEF观察到略微下降。

[0087] 表8. 在暴露于氧化应力后,制剂26和27的SEC、cIEF、还原Caliper、非还原Caliper、外观、蛋白质浓度、pH结果

测定	编号	样品 ID	T0	氧化			
				1小时	3小时	6小时	
外观	F26	20150401	无色, 透明且不含可见颗粒	无色, 透明且不含可见颗粒	无色, 透明且不含可见颗粒	无色, 透明且不含可见颗粒	
	F27	20150402					
浓度, mg/mL	F26	20150401	10.5	11.2	11.3	11.3	
	F27	20150402	9.8	10.5	10.6	10.5	
pH	F26	20150401	6.39	6.28	6.30	6.31	
	F27	20150402	6.51	6.42	6.42	6.43	
SEC	主峰%	F26	20150401	96.1	96.3	96.3	96.4
		F27	20150402	96.1	96.2	96.2	96.2
	HMW 峰%	F26	20150401	1.9	1.6	1.6	1.5
		F27	20150402	1.9	1.7	1.6	1.6
	LMW 峰%	F26	20150401	ND	0.1	0.1	0.2
		F27	20150402	ND	0.1	0.1	0.2
cIEF	pI	F26	20150401	8.82	NA	NA	8.81
		F27	20150402	8.62	NA	NA	8.61
	主峰%	F26	20150401	85.8	NA	NA	82.7
		F27	20150402	64.4	NA	NA	61.4
	酸性峰%	F26	20150401	31.9	NA	NA	34.4
		F27	20150402	32.8	NA	NA	35.7
	碱性峰%	F26	20150401	2.4	NA	NA	2.9
		F27	20150402	2.7	NA	NA	2.9
还原 Caliper	纯度%	F26	20150401	97.6	NA	NA	97.5
		F27	20150402	97.6	NA	NA	97.3
	LC 大小, kDa	F26	20150401	43.9	NA	NA	43.6
		F27	20150402	43.7	NA	NA	43.4
HC 大小, kDa	F26	20150401	57.0	NA	NA	58.1	
	F27	20150402	56.8	NA	NA	57.8	
非还原 Caliper	纯度%	F26	20150401	97.9	NA	NA	97.9
		F27	20150402	96.1	NA	NA	97.6
	大小, kDa	F26	20150401	167.1	NA	NA	167.2
F27		20150402	166.0	NA	NA	167.2	
DLS	Z-Ave (d.nm)	F26	20150401	15.1	15.8	14.7	14.9
		F27	20150402	15.8	14.9	14.6	14.7
	PdI	F26	20150401	0.09	0.15	0.09	0.09
		F27	20150402	0.13	0.09	0.09	0.08

### 冻融应力

将制剂暴露于从-80°C到室温(RT)的冻融至多10个循环。制剂并未显示出显著不同的外观,蛋白质浓度,SEC纯度,pI,cIEF测定的主峰、酸性峰和碱性峰比例,非还原和还原Caliper测定的纯度,或DLS测定的平均粒度和PdI(表9)。

[0088] 表9. 在暴露于氧化应力后,制剂26和27的SEC、cIEF、还原Caliper、非还原Caliper、外观、蛋白质浓度、pH结果

测定	编号	样品 ID	T0	冻融			
外观	F28	20150401-FT	无色，透明且不含可见颗粒	无色，透明且不含可见颗粒	无色，透明且不含可见颗粒	无色，透明且不含可见颗粒	无色，透明且不含可见颗粒
	F29	20150402-FT					
	F30	20150403-FT					
	F31	20150404-FT					
浓度, mg/mL	F28	20150401-FT	33.9	38.0	38.5	39.1	
	F29	20150402-FT	34.4	37.5	41.2	36.8	
	F30	20150403-FT	29.0	34.9	30.4	32.1	
	F31	20150404-FT	29.2	35.1	29.5	29.5	
pH	F28	20150401-FT	6.40	6.38	6.36	6.37	
	F29	20150402-FT	6.48	6.48	6.45	6.46	
	F30	20150403-FT	6.58	6.54	6.53	6.52	
	F31	20150404-FT	6.53	6.51	6.51	6.51	
重量克分子渗透压浓度, mOsm/kg	F28	20150401-FT	482	NA	NA	NA	
	F29	20150402-FT	479	NA	NA	NA	
	F30	20150403-FT	113	NA	NA	NA	
	F31	20150404-FT	86	NA	NA	NA	
SEC	主峰%	F28	20150401-FT	97.7	97.7	97.4	97.3
		F29	20150402-FT	97.6	97.5	97.3	97.3
		F30	20150403-FT	97.6	97.5	97.1	97.0
		F31	20150404-FT	97.6	97.6	97.2	97.1
	HMW峰%	F28	20150401-FT	2.3	2.3	2.6	2.6
		F29	20150402-FT	2.4	2.4	2.6	2.7
		F30	20150403-FT	2.4	2.5	2.8	2.9
		F31	20150404-FT	2.4	2.4	2.8	2.8
LMW峰%	F28	20150401-FT	ND	ND	ND	0.1	
	F29	20150402-FT	ND	ND	ND	ND	
	F30	20150403-FT	ND	ND	ND	ND	
	F31	20150404-FT	ND	ND	0.1	ND	
cIEF	pI	F28	20150401-FT	8.83	NA	NA	8.80
		F29	20150402-FT	8.83	NA	NA	8.79
		F30	20150403-FT	8.82	NA	NA	8.79
		F31	20150404-FT	8.82	NA	NA	8.79
	主峰%	F28	20150401-FT	65.7	NA	NA	66.1
		F29	20150402-FT	65.4	NA	NA	66.2
		F30	20150403-FT	64.2	NA	NA	65.8
		F31	20150404-FT	64.8	NA	NA	66.2
	酸性峰%	F28	20150401-FT	31.7	NA	NA	30.9
		F29	20150402-FT	31.8	NA	NA	30.7
		F30	20150403-FT	32.8	NA	NA	31.1
		F31	20150404-FT	32.3	NA	NA	30.5
	碱性峰%	F28	20150401-FT	2.7	NA	NA	3.0
		F29	20150402-FT	2.8	NA	NA	3.1
		F30	20150403-FT	3.0	NA	NA	3.1
		F31	20150404-FT	2.9	NA	NA	3.2
还原 Caliper	纯度%	F28	20150401-FT	97.7	NA	NA	98.3
		F29	20150402-FT	97.5	NA	NA	97.8
		F30	20150403-FT	97.5	NA	NA	97.6
		F31	20150404-FT	97.6	NA	NA	98.4
	LC大小, kDa	F28	20150401-FT	43.5	NA	NA	42.9
		F29	20150402-FT	43.7	NA	NA	43.4
		F30	20150403-FT	43.7	NA	NA	43.3
		F31	20150404-FT	43.5	NA	NA	42.9
	HC大小, kDa	F28	20150401-FT	56.5	NA	NA	56.5
		F29	20150402-FT	56.7	NA	NA	57.1
		F30	20150403-FT	57.0	NA	NA	57.3
		F31	20150404-FT	57.0	NA	NA	56.8

测定	编号	样品 ID	T0	冻融				
非还原 Caliper	纯度%	F28	20150401-FT	97.9	NA	NA	98.2	
		F29	20150402-FT	97.9	NA	NA	98.3	
		F30	20150403-FT	97.7	NA	NA	98.1	
		F31	20150404-FT	97.7	NA	NA	98.1	
	大小, kDa	F28	20150401-FT	170.1	NA	NA	162.0	
		F29	20150402-FT	169.7	NA	NA	161.4	
		F30	20150403-FT	169.7	NA	NA	162.5	
		F31	20150404-FT	169.9	NA	NA	163.0	
	DLS	Z-Ave (d.nm)	F28	20150401-FT	19.19	NA	NA	19.88
			F29	20150402-FT	19.34	NA	NA	19.96
			F30	20150403-FT	14.49	NA	NA	14.51
			F31	20150404-FT	14.88	NA	NA	14.87
PDI		F28	20150401-FT	0.095	NA	NA	0.098	
		F29	20150402-FT	0.094	NA	NA	0.089	
		F30	20150403-FT	0.096	NA	NA	0.075	
		F31	20150404-FT	0.096	NA	NA	0.077	

当暴露于机械、热和化学应力时，测试的选定制剂维持稳定性。在所有测试的应力条件下，用磷酸钠或琥珀酸钠缓冲的制剂显示出相似稳定性，并且任一缓冲系统将是适当的。

[0089] 实施例3. 确定在pH 6.5下缓冲的含有25 mM磷酸钠、25mM氯化钠、8.7%海藻糖、0.01% PS 80的制剂，是否对于10 mg/ml和30 mg/ml M281注射提供了合适的稳定性

为了确定在pH 6.5下缓冲的含有25 mM磷酸钠、25 mM氯化钠、8.7%海藻糖、0.01% PS80的制剂，是否对于10 mg/ml和30 mg/ml M281注射两者提供了合适的稳定性，在暴露于热和剪切应力之后，通过分析测定来评价制剂的特性。

[0090] 制备了在pH 6.5下缓冲的含有25 mM磷酸钠、25 mM氯化钠、8.7%海藻糖、0.01% w/v PS80和10 mg/ml或30 mg/ml M281的制剂。一系列分析测定用于评价产品质量作为这些研究的一部分。在评估的属性中，在如通过cIEF测量的电荷变体和如通过SEC测量的聚集水平中，观察到在研究过程中最重大的变化。因此，选择cIEF和SEC作为稳定性指示测定。在长期和加速的稳定性研究中，比较了关于10 mg/mL (批次E、批次F和批次B) 和30 mg/mL (批次D) 的药物产品，通过cIEF的电荷变体 (图12) 和通过SEC的可溶性聚集物 (图13)。在10 mg/mL和30 mg/mL下，通过cIEF和SEC关于M281药物产品的主要种类降解速率，在长期贮存条件 (2至8°C) 和加速贮存条件 (25°C) 两者下是可比较的。

[0091] 表10到表13中显示了来自强制降解研究，例如搅动、氧化、热和剪切应力的数据。数据显示了如通过cIEF和SEC测定测量的，在10 mg/mL和30 mg/mL制剂两者中相似的降解。

[0092] 表10: 通过SEC-HPLC和cIEF, 在搅动下的%主要种类水平的比较

搅动 (天)	SEC-HPLC %主要		cIEF %主要	
	10 mg/mL Ab	30 mg/mL Ab	10 mg/mL Ab	30 mg/mL Ab
0	98.0	98.4	65.9	65.6
5	97.9	98.1	NT	NT
10	97.3	98.0	64.2	64.5

<sup>1</sup> cIEF = 毛细管等电聚焦; NT = 未测试; SEC-HPLC = 尺寸排阻高效液相层析

表11: 通过SEC-HPLC和cIEF, 在氧化下的%主要种类水平的比较

氧化 (小时)	SEC-HPLC %主要		cIEF %主要	
	10 mg/mL Ab	30 mg/mL Ab	10 mg/mL Ab	30 mg/mL Ab
0	98.1	98.4	65.8	65.6
1	98.3	98.3	NT	NT
3	98.3	98.4	NT	NT
6	98.4	98.4	62.7	65.0

cIEF = 毛细管等电聚焦; NT = 未测试; SEC-HPLC = 尺寸排阻高效液相层析

表12:通过SEC-HPLC和cIEF,在40°C的热应力下的%主要种类水平的比较。

热 (天)	SEC-HPLC %主要		cIEF %主要	
	10 mg/mL Ab	30 mg/mL Ab	10 mg/mL Ab	30 mg/mL Ab
0	98.0	98.4	65.9	65.6
5	98.1	97.0	NT	NT
10	97.8	96.7	54.3	54.6

<sup>1</sup> cIEF = 毛细管等电聚焦; NT = 未测试; SEC-HPLC = 尺寸排阻高效液相层析

[0093] 表13:通过SEC-HPLC和cIEF,在剪切应力下的%主要种类水平的比较

剪切应力 (循环) <sup>2</sup>	SEC %主要		cIEF %主要	
	10 mg/mL Ab	30 mg/mL Ab	10 mg/mL Ab	30 mg/mL Ab
0	98.4	98.2	68.7	67.2
1	98.4	98.3	68.4	67.2
5	98.3	98.2	67.9	67.4
10	98.3	98.2	68.0	66.6

<sup>1</sup> cIEF = 毛细管等电聚焦; SEC-HPLC = 尺寸排阻高效液相层析  
<sup>2</sup> 循环指 M281 通过灌注泵再循环以模仿最坏情况的次数。

从生成的强制降解和稳定性数据(图14至23)观察到的降解速率结果指示了,对于在pH 6.5下缓冲的含有25 mM磷酸钠、25mM氯化钠、8.7%海藻糖、0.01%聚山梨醇酯80和10或30 mg/ml抗体的制剂相似的降解速率。数据指示了25 mM磷酸钠、25 mM氯化钠、8.7% w/w海藻糖、0.01% w/v聚山梨醇酯80,pH 6.5的制剂,在10 mg/mL和30 mg/mL两者下,提供了分别长达30个月和18个月的稳定性。

[0094] 在pH 6.5下缓冲的含有抗体、25 mM磷酸钠、25mM氯化钠、8.7%海藻糖、0.01% PS 80和10或30 mg/ml抗体的制剂中,检查了较高水平的聚山梨醇酯80对静态和搅动样品两者中的亚可见颗粒的影响。使用FlowCAM颗粒成像系统,就其大小和形态分析制剂样品中的亚可见颗粒。简言之,将制剂的等分试样在75托下脱气30分钟,然后将500 μL的每种样品注入分析仪内。流体中的颗粒在通过流动池时捕获实时图像。收集了计算样品中的所有颗粒的总颗粒计数,并且呈现于表14中。通过对原始数据应用数字过滤器,以消除由于非蛋白质重复和圆形颗粒(例如,可能的气泡)的贡献,来生成关于制剂的减去颗粒计数,并且呈现于表15中。在该分析中,小于5 μm的颗粒被视为对于颗粒成像分析中的精确过滤或减去而言太小。

[0095] 表15:聚山梨醇酯80对亚可见颗粒的影响(原始数据)

尺寸	水	0.01% PS80 静态	0.05% PS80 静态	0.10% PS80 静态	0.01% PS80 搅动	0.05% PS80 搅动	0.10% PS80 搅动
>2 $\mu\text{m}$	18	10154	24210	2588	4658	2521	661
>5 $\mu\text{m}$	0	4787	10688	1053	1630	1270	249
>10 $\mu\text{m}$	0	1492	3563	351	474	298	57
>25 $\mu\text{m}$	0	210	476	110	36	10	10

表16:聚山梨醇酯80对亚可见颗粒的影响(减去的数据)

尺寸	水	0.01% PS80 静态	0.05% PS80 静态	0.10% PS80 静态	0.01% PS80 搅动	0.05% PS80 搅动	0.10% PS80 搅动
>5 $\mu\text{m}$	0	4787	10688	1053	1569	1184	192
>10 $\mu\text{m}$	0	1492	3563	351	474	298	57
>25 $\mu\text{m}$	0	210	476	110	36	10	10

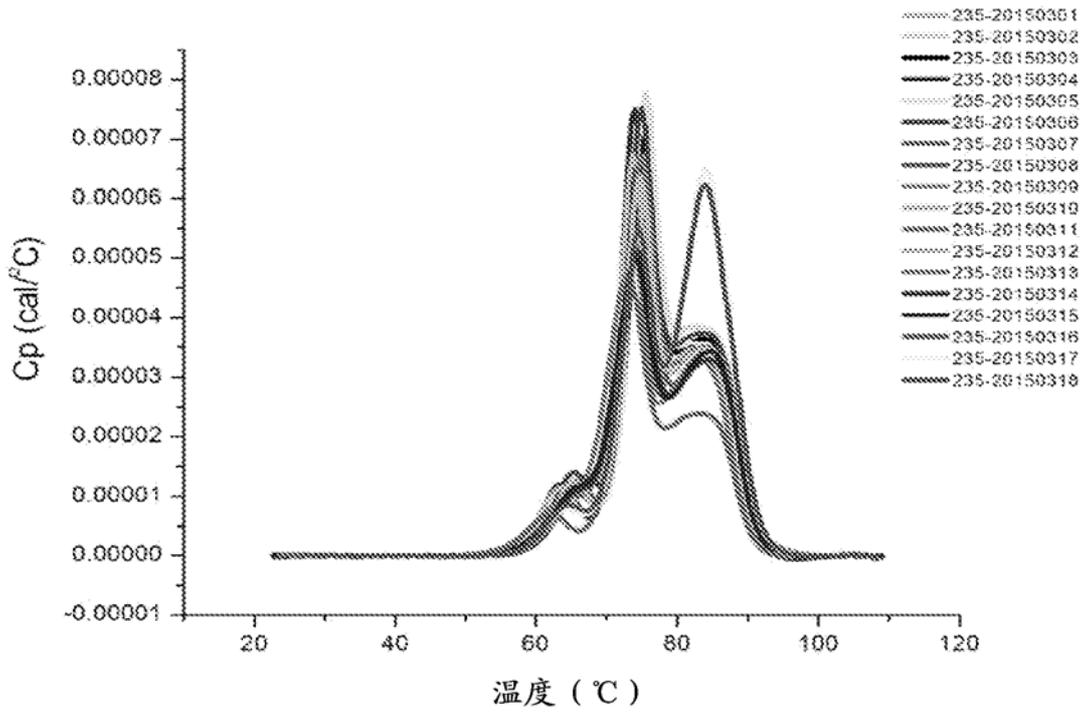


图 1

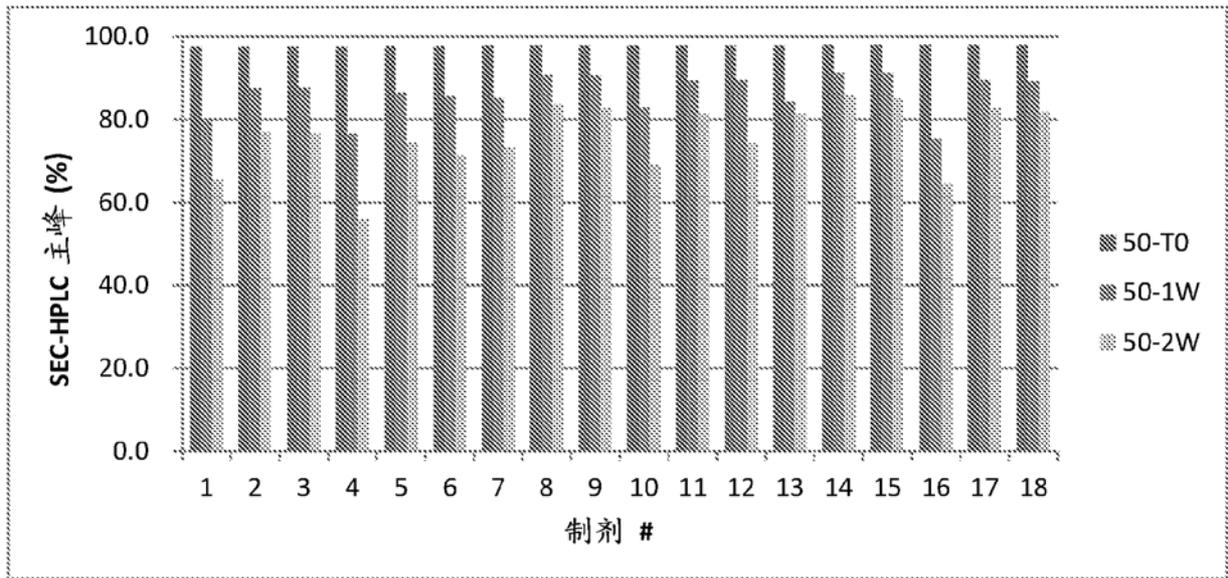


图 2

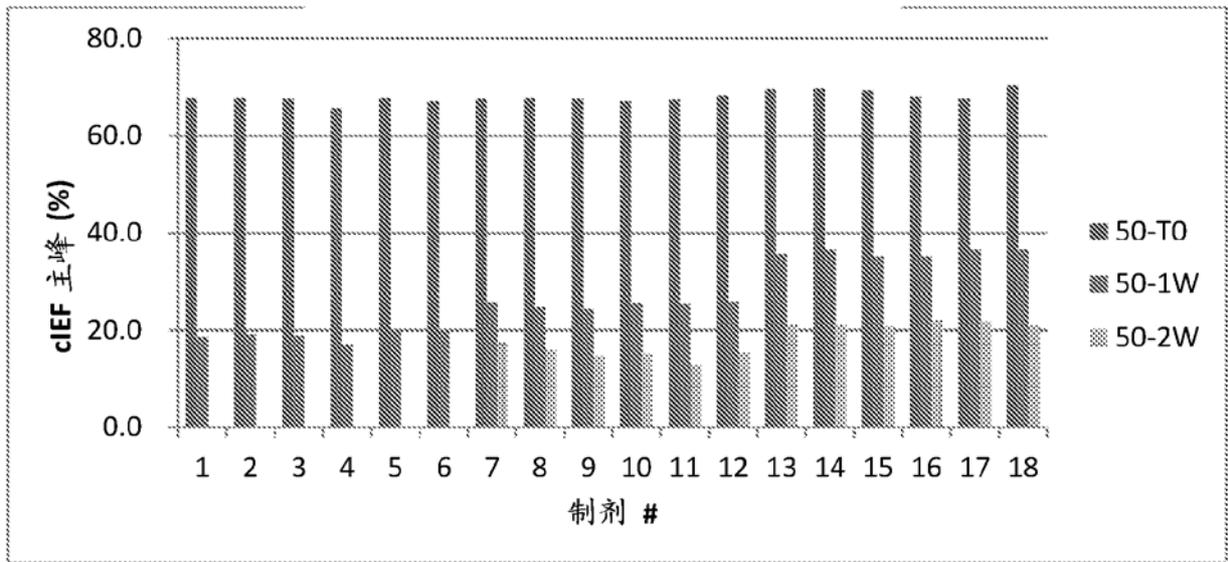


图 3

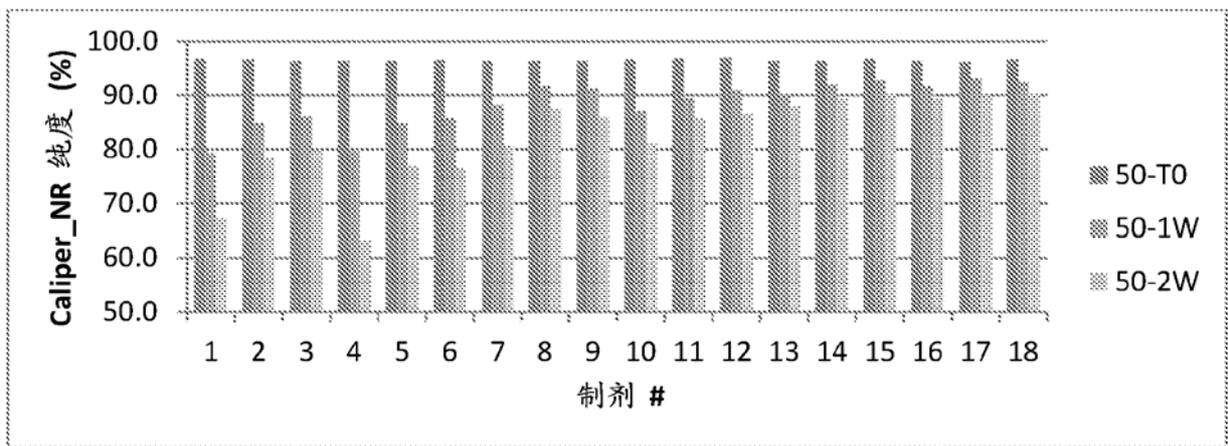


图 4

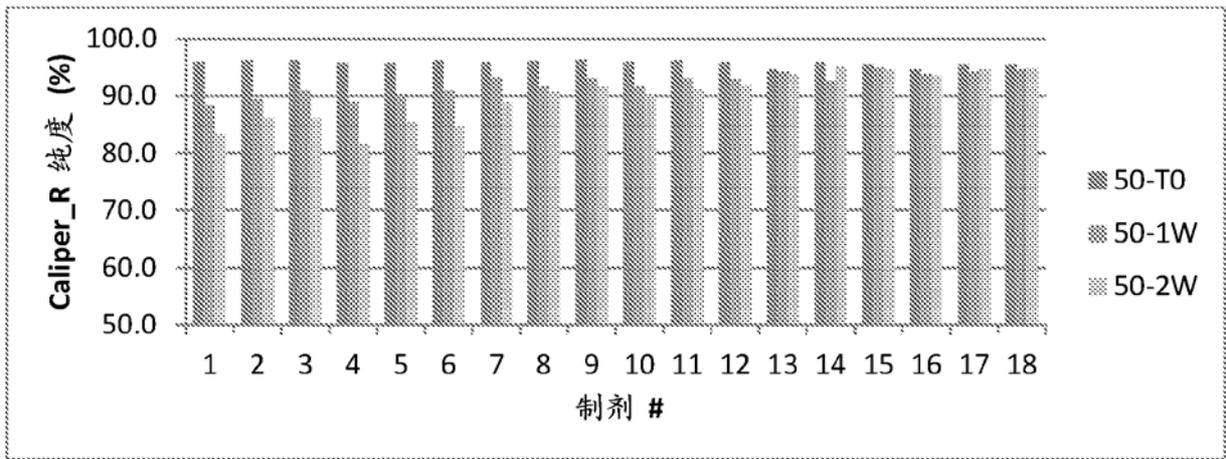


图 5

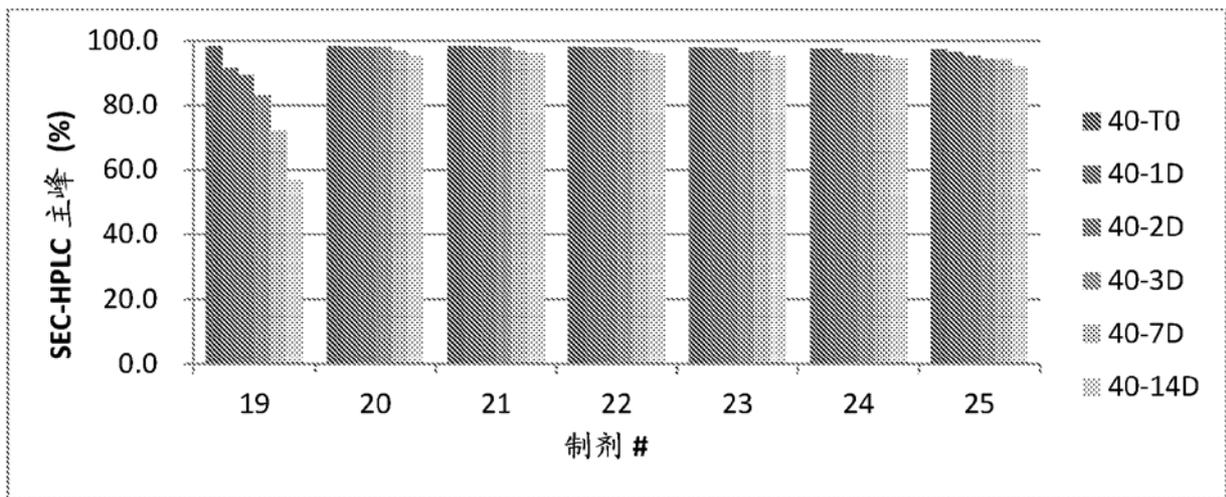


图 6

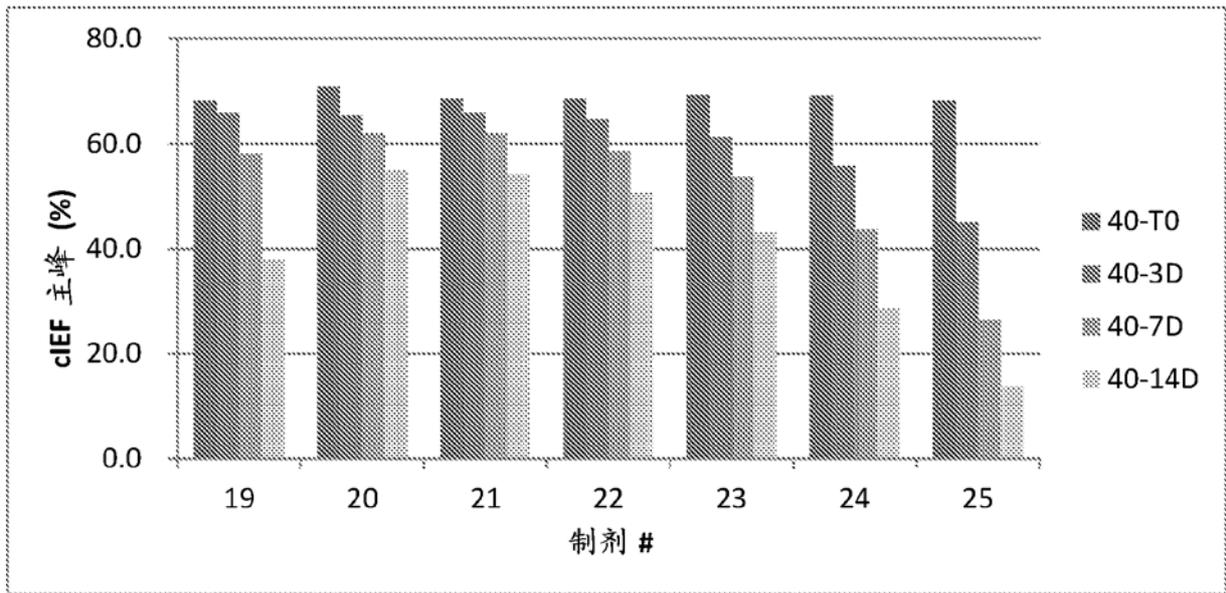


图 7

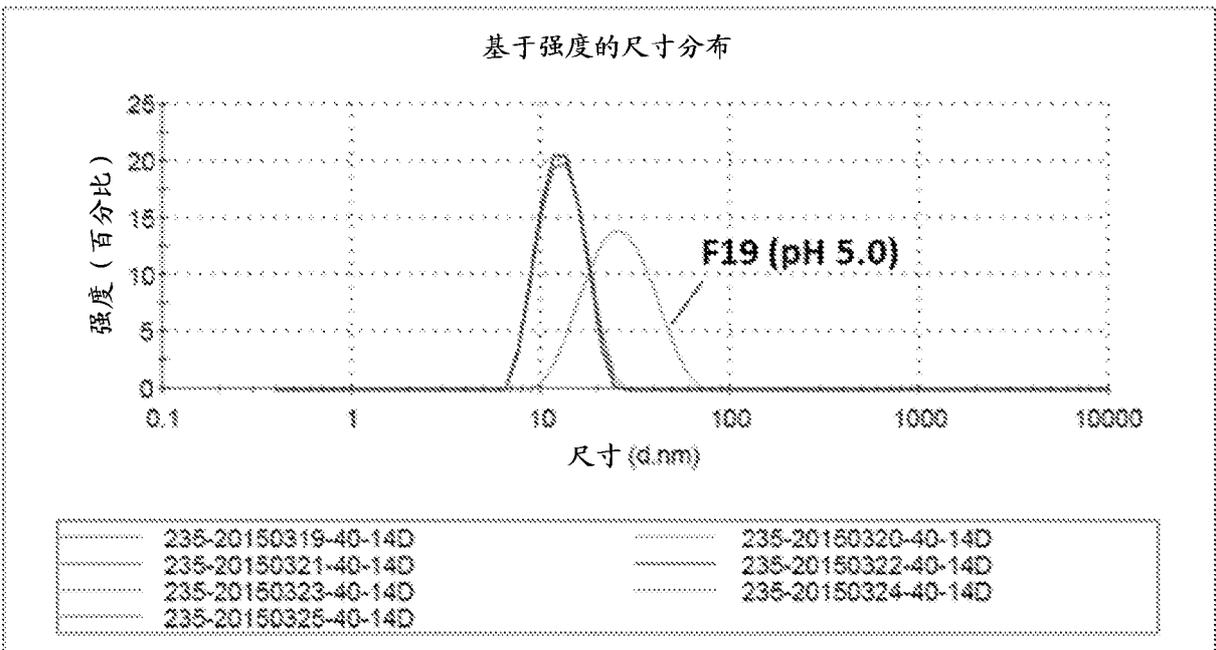
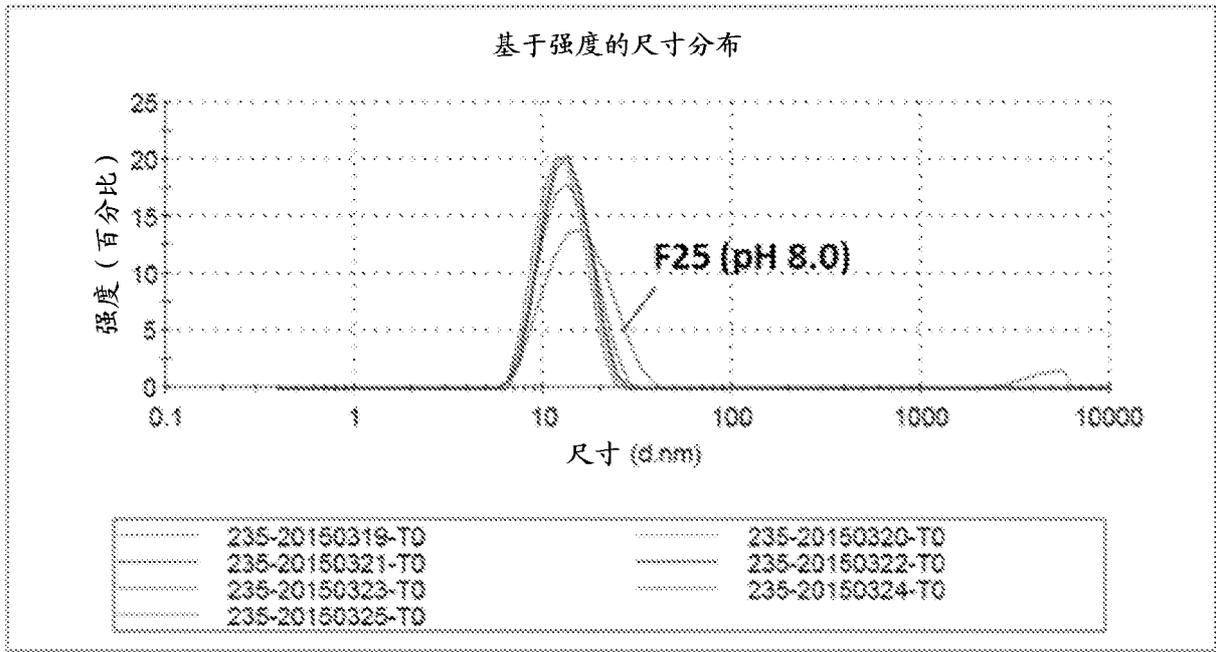


图 8

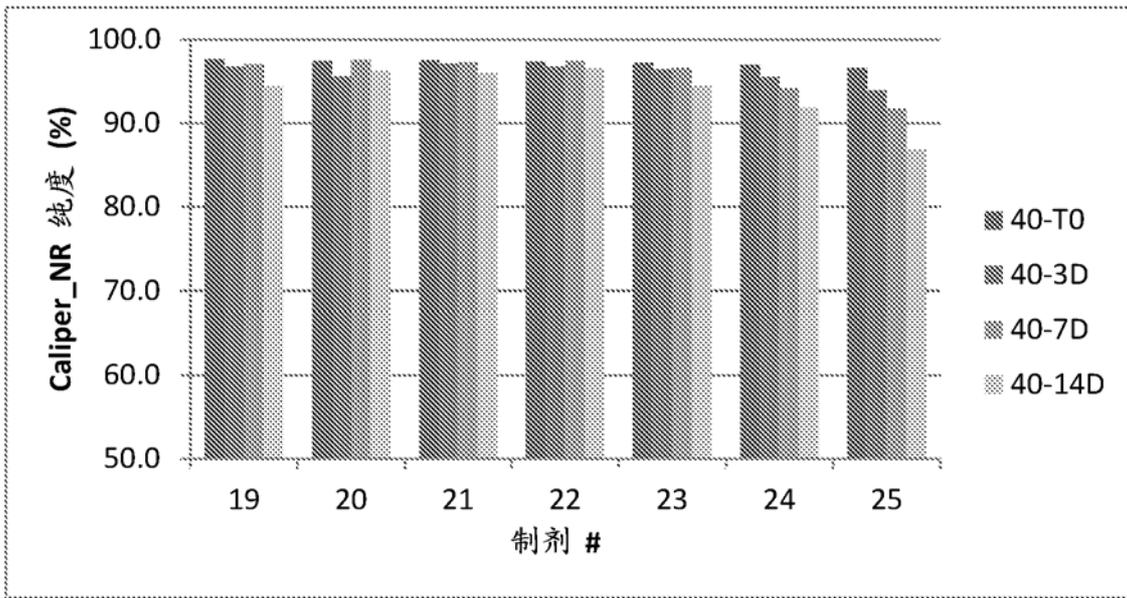


图 9

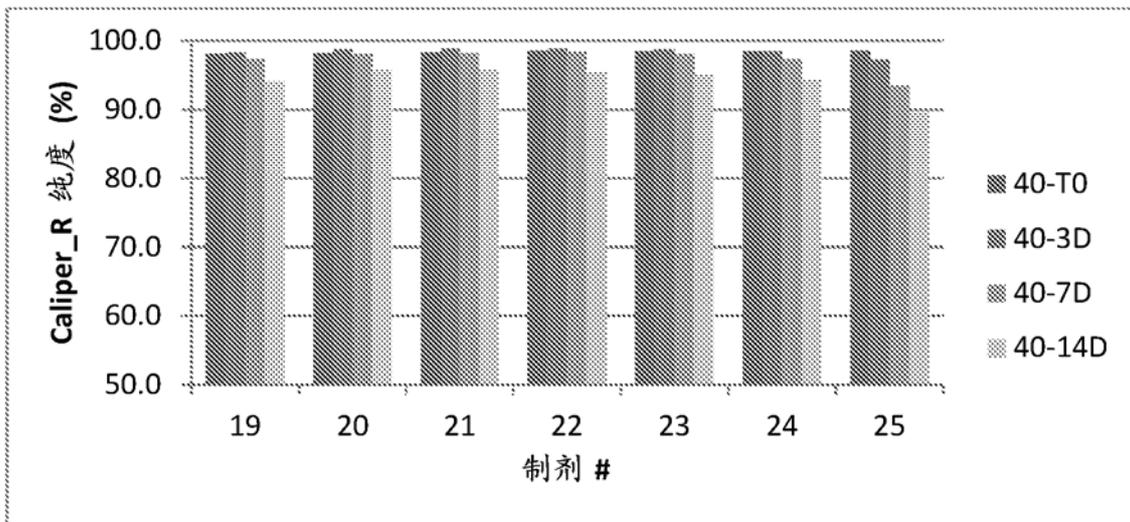


图 10

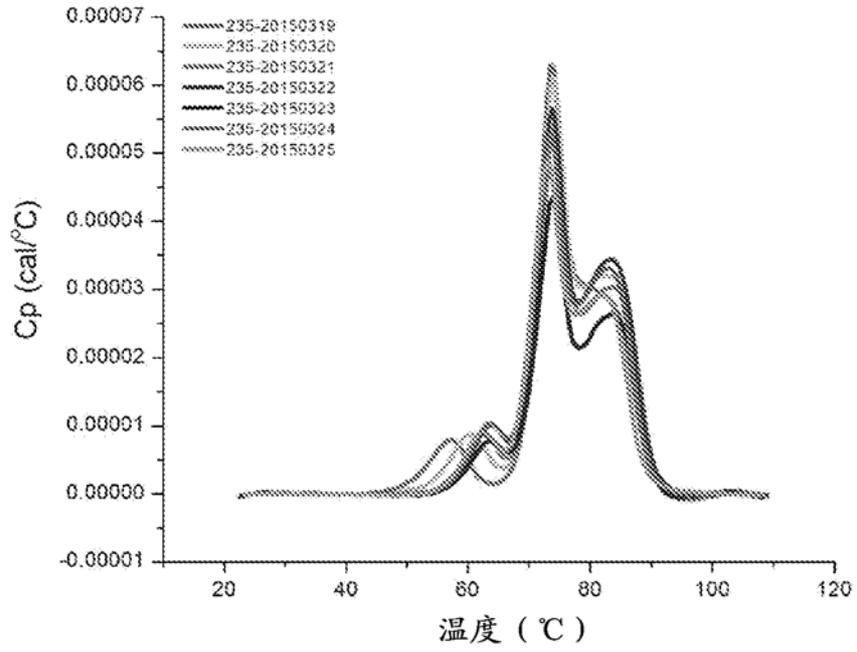


图 11

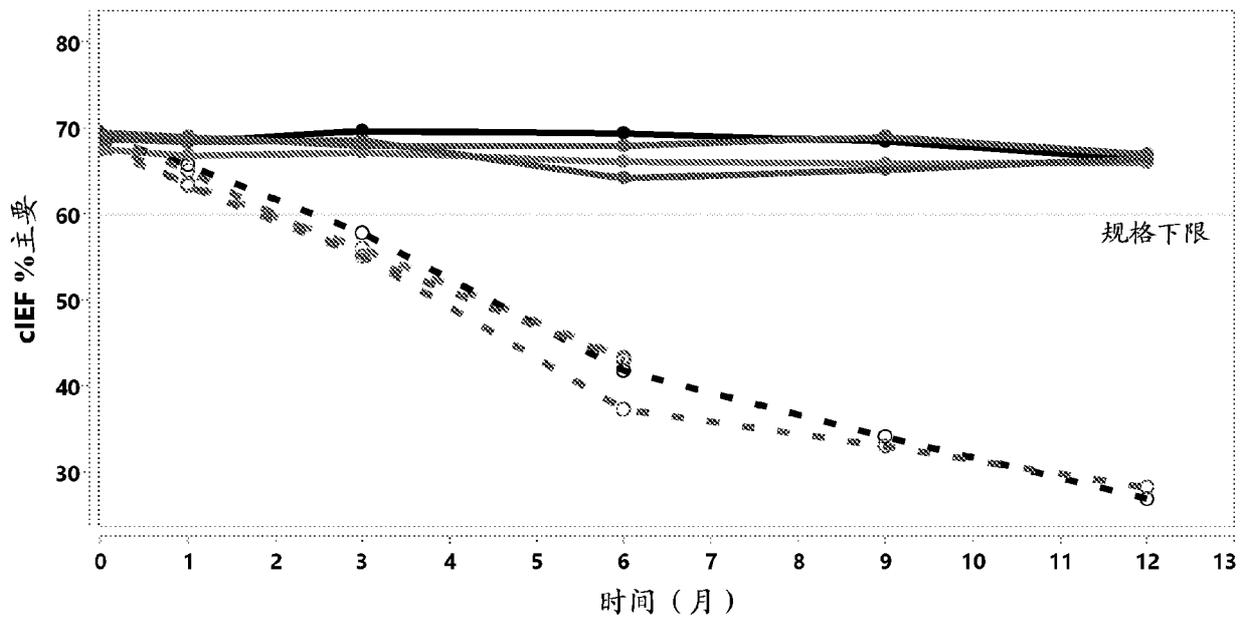


图 12

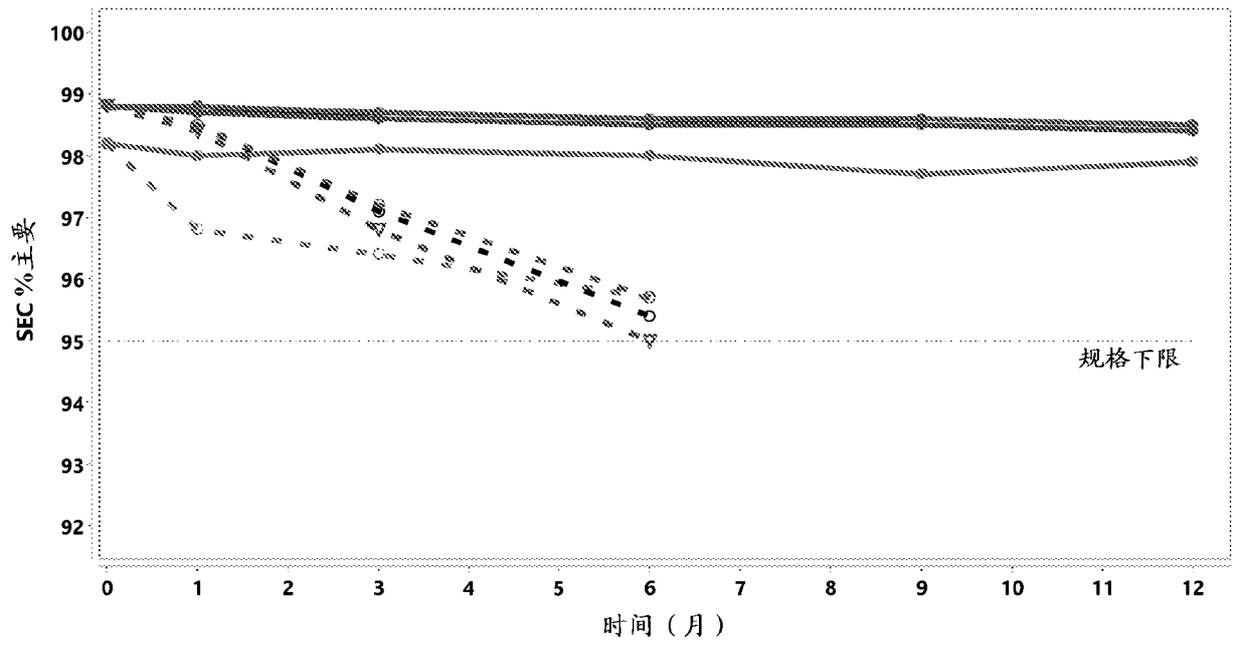


图 13

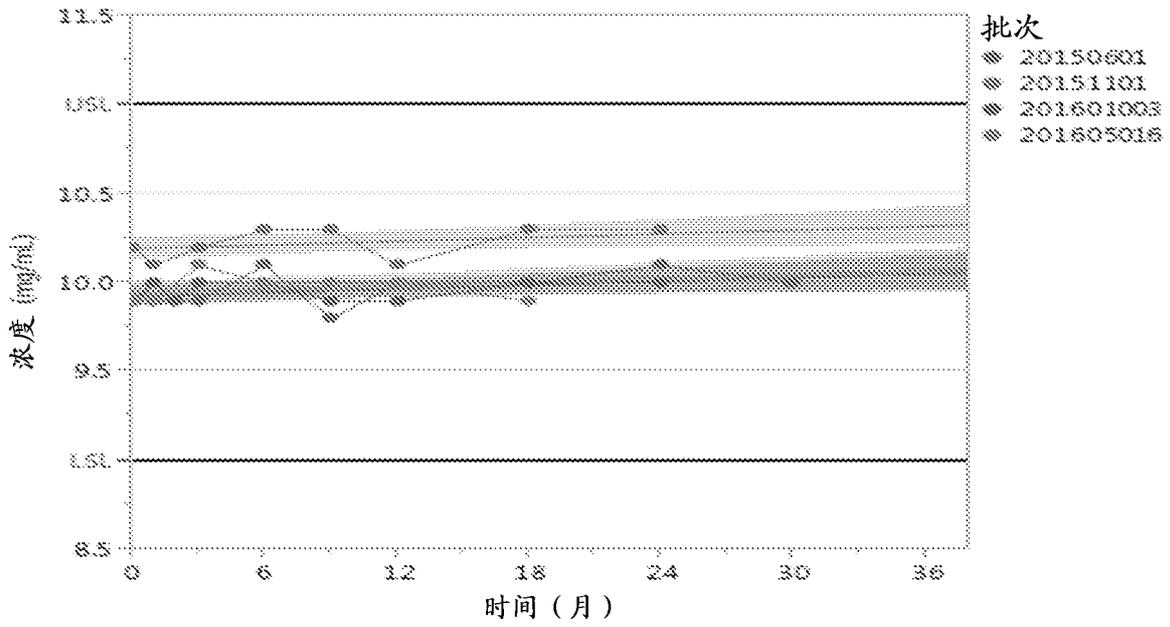
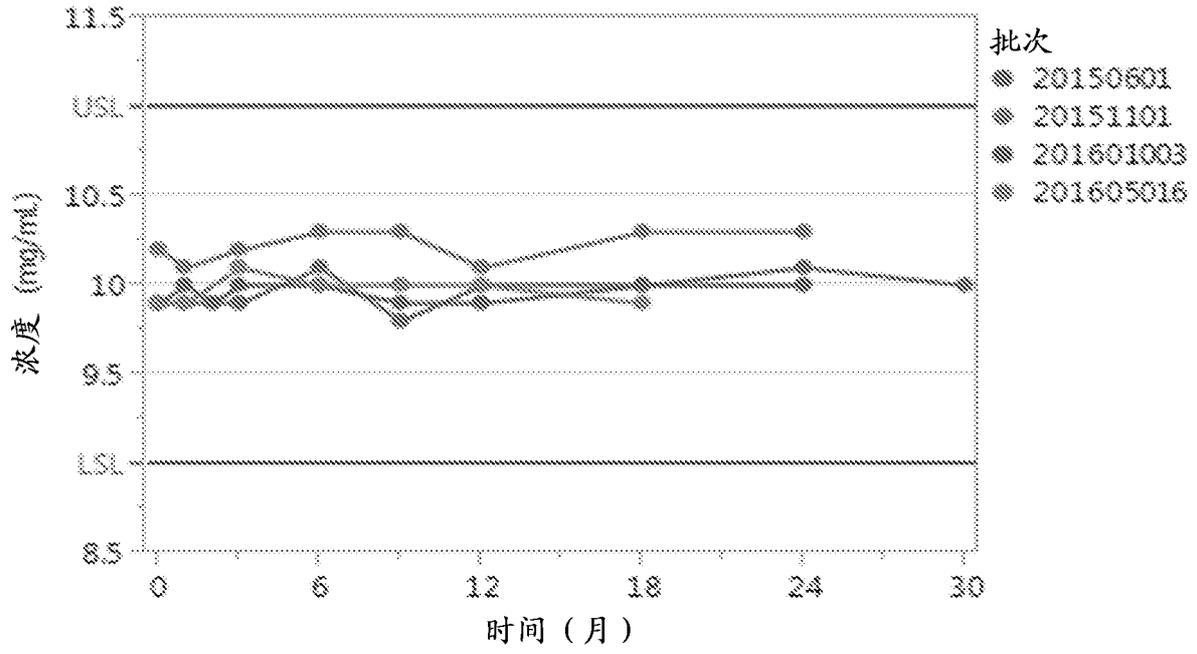


图 14A-14B

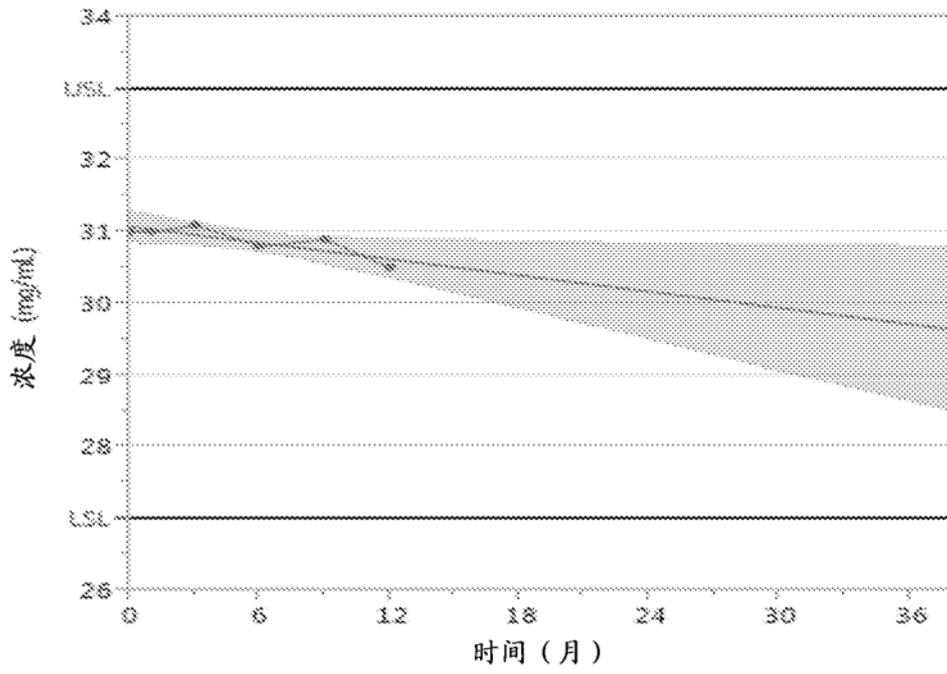
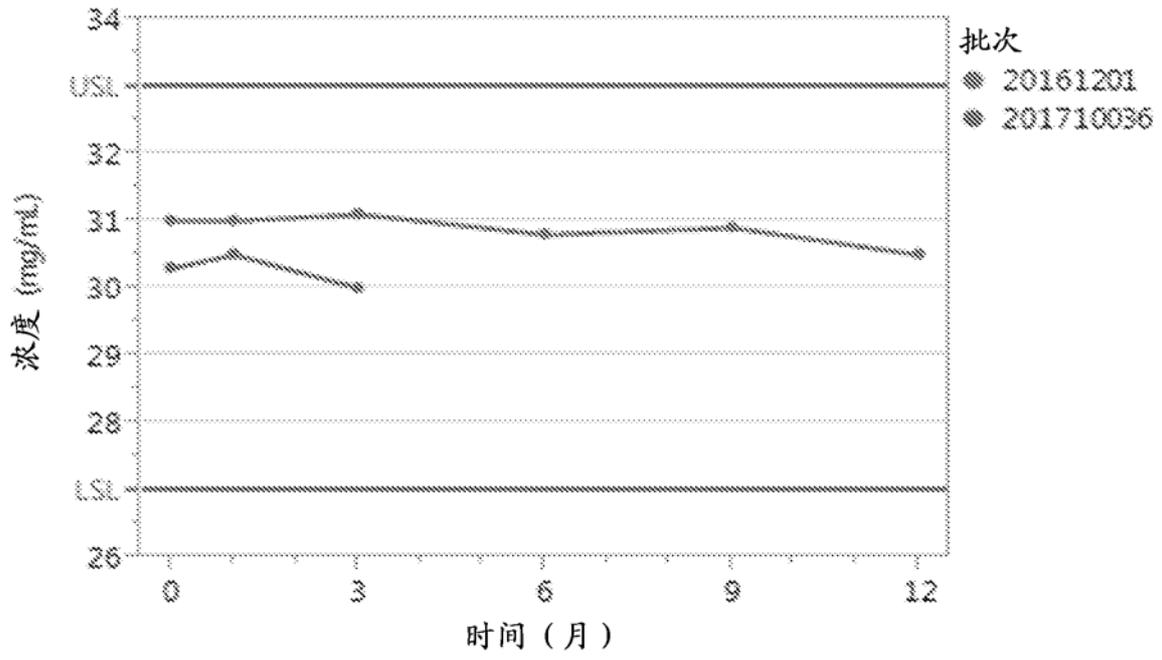


图 14C-14D

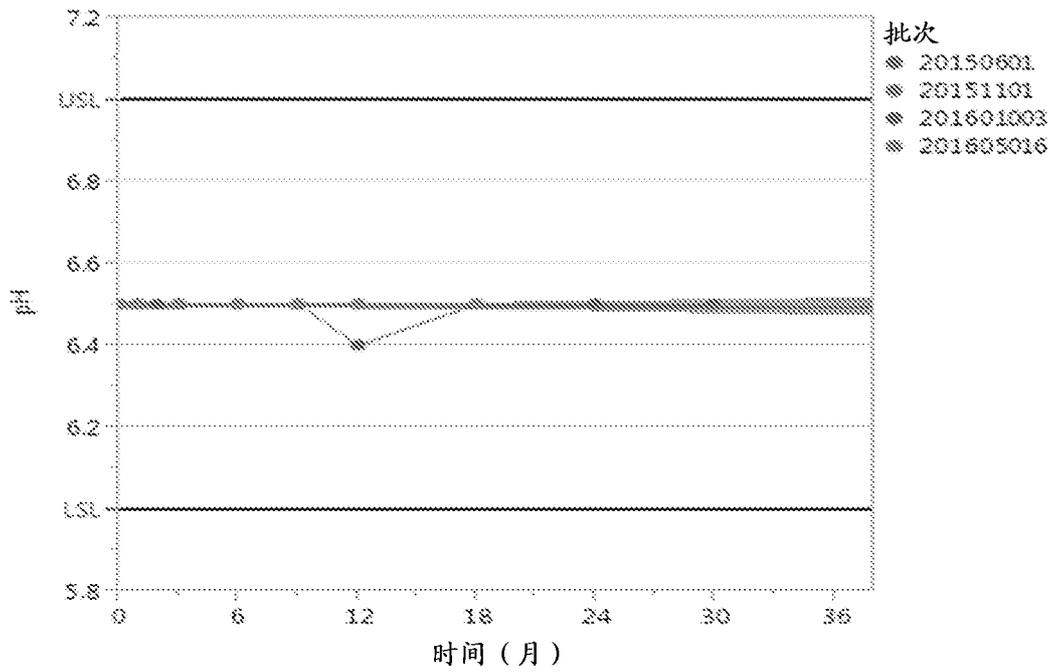
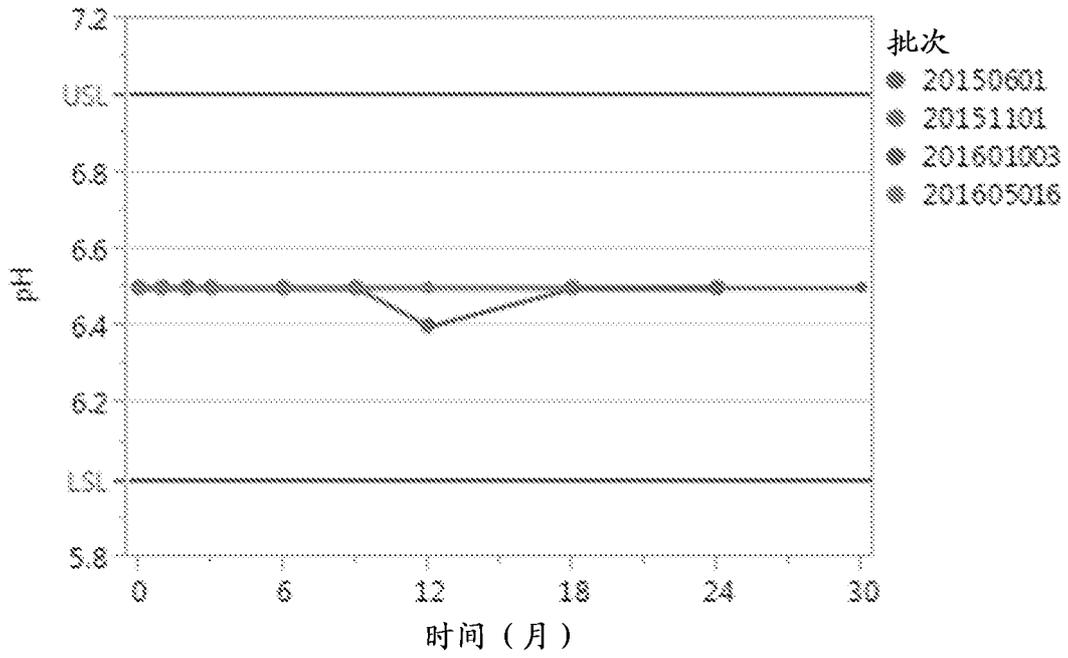


图 15A-15B

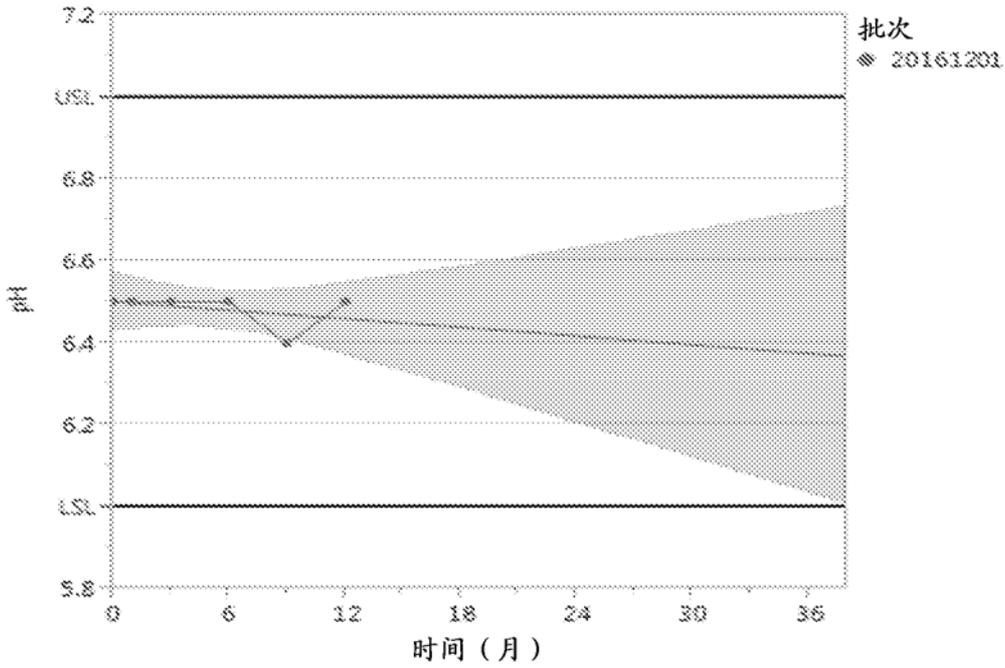
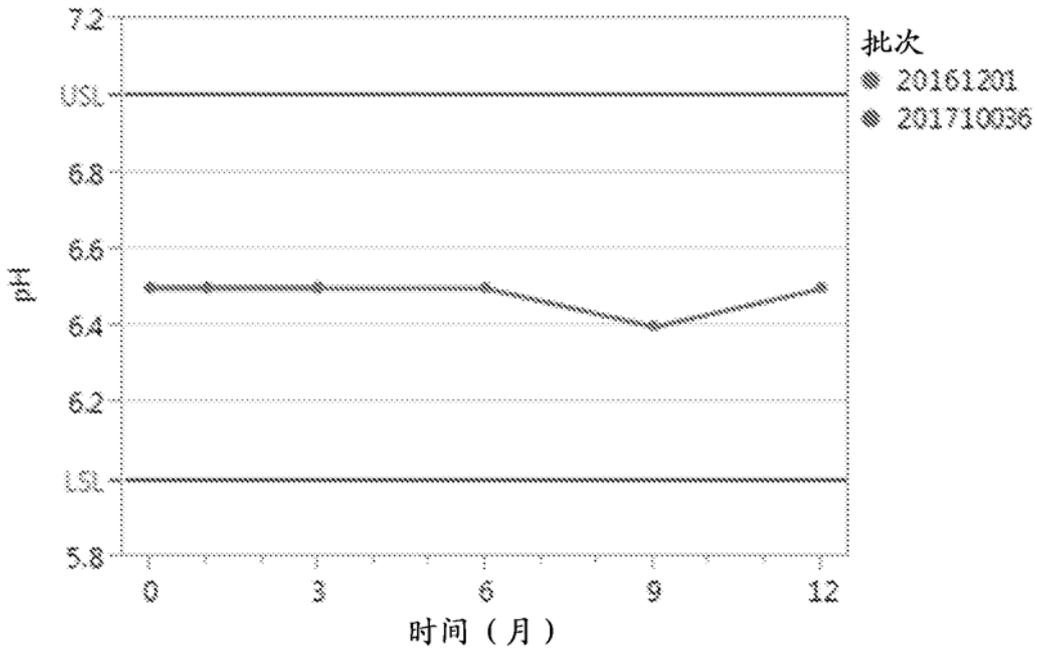


图 15C-15D

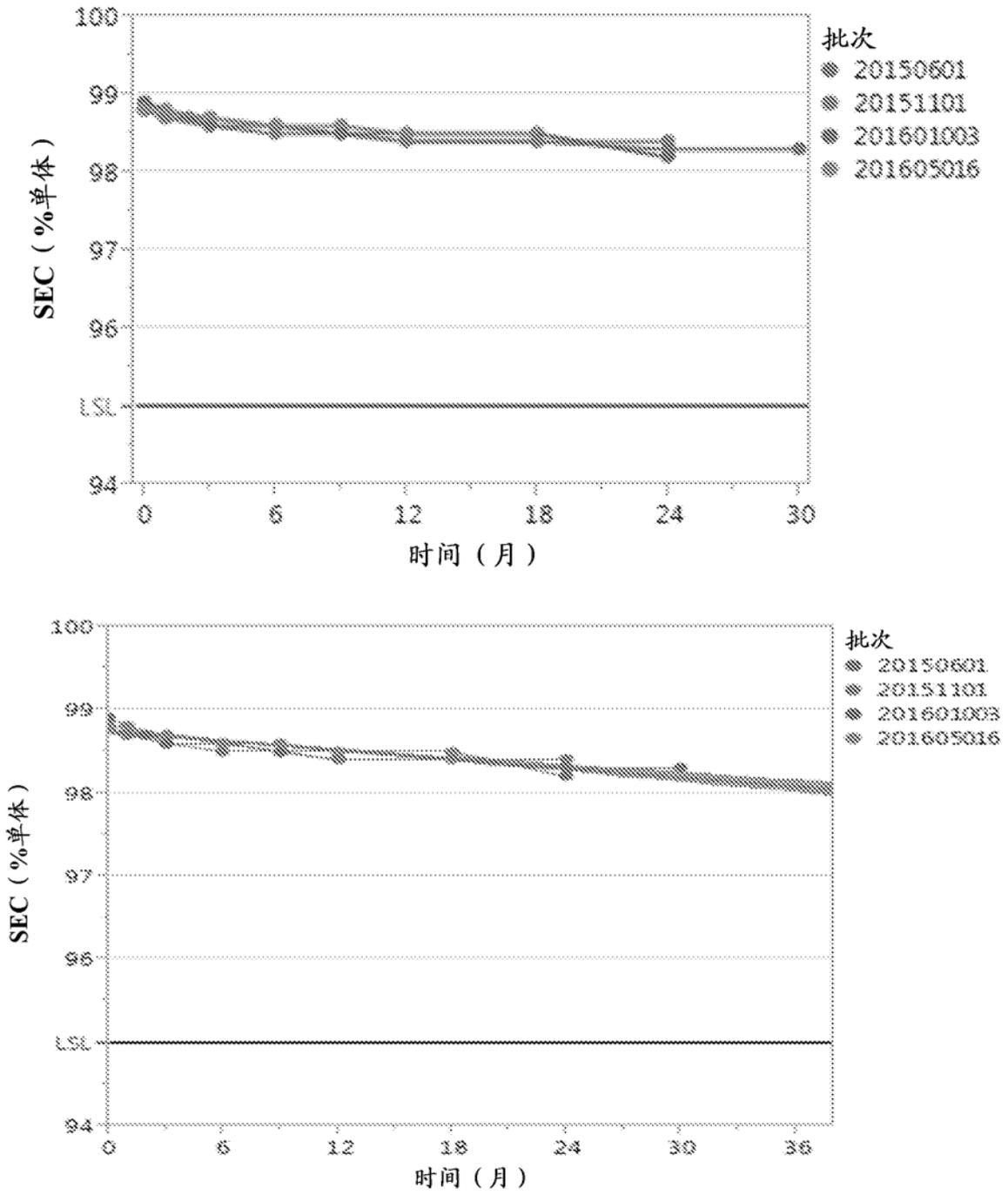


图 16A-16B

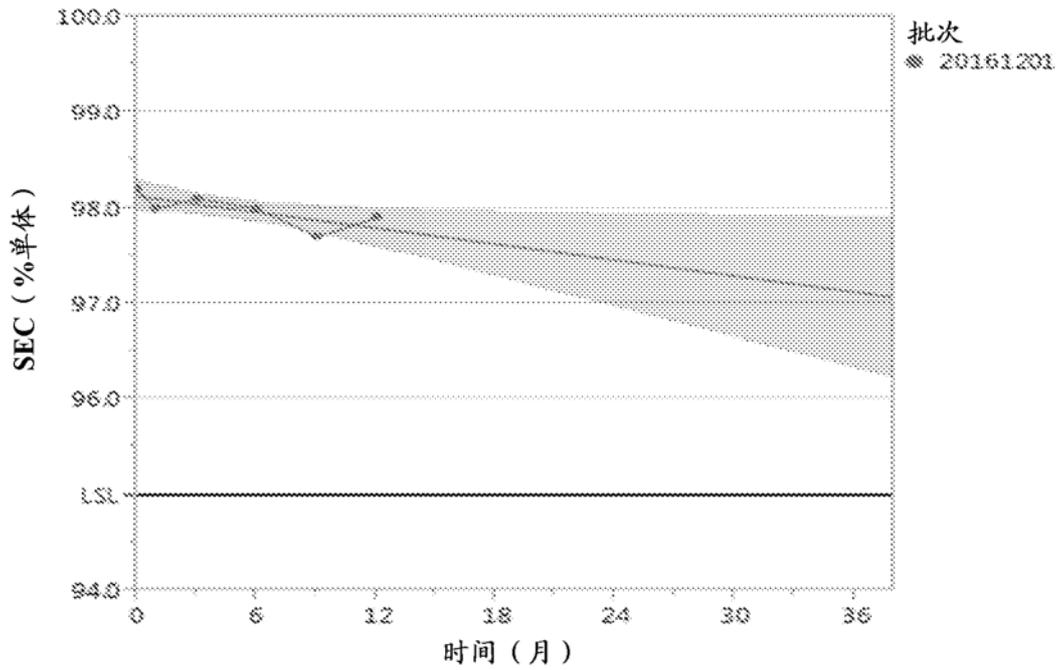
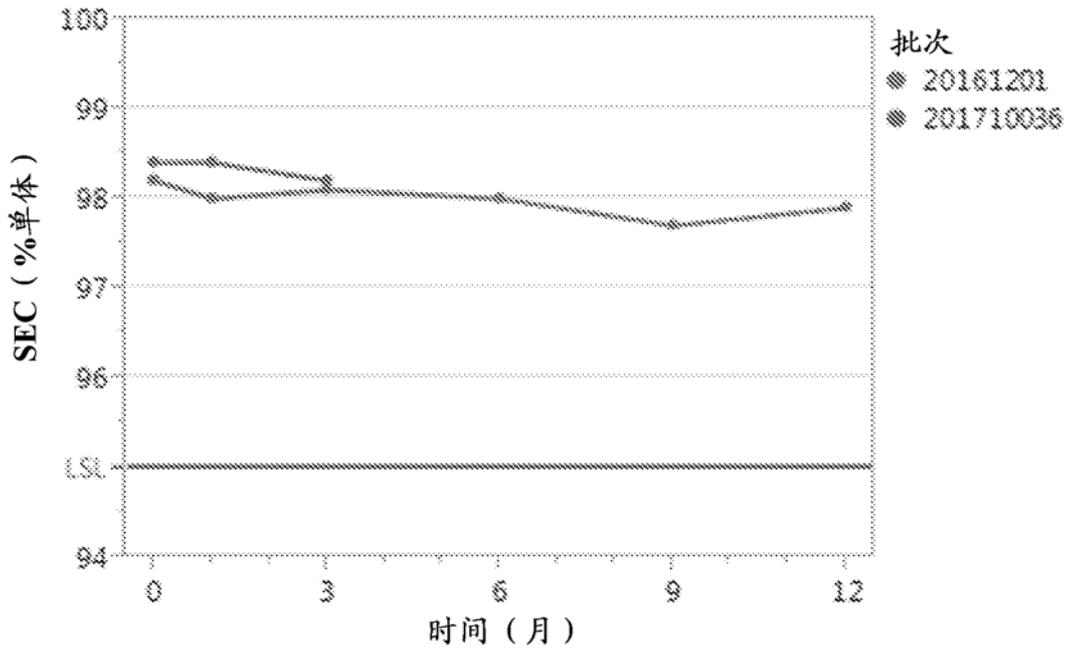


图 16C-16D

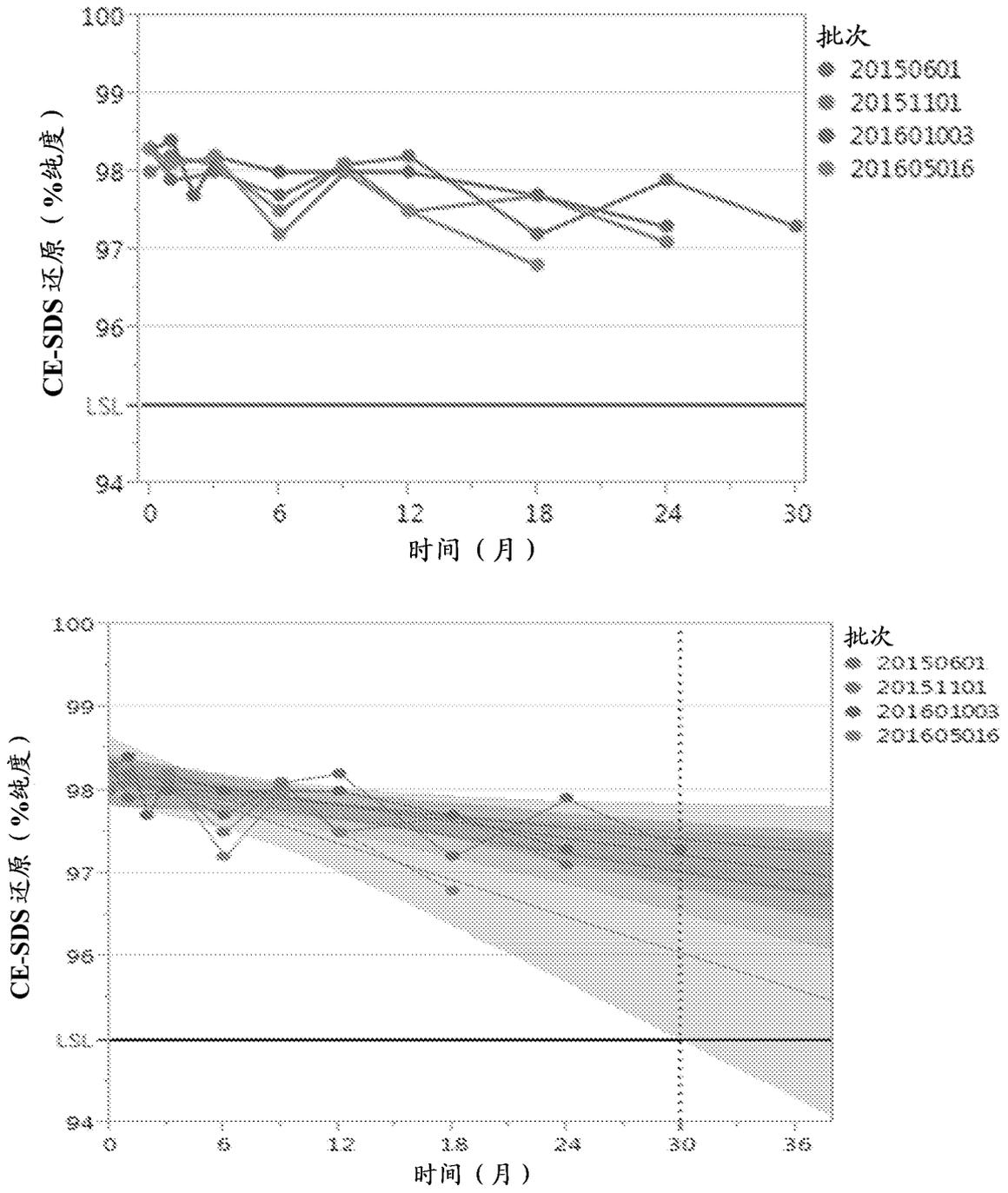


图 17A-17B

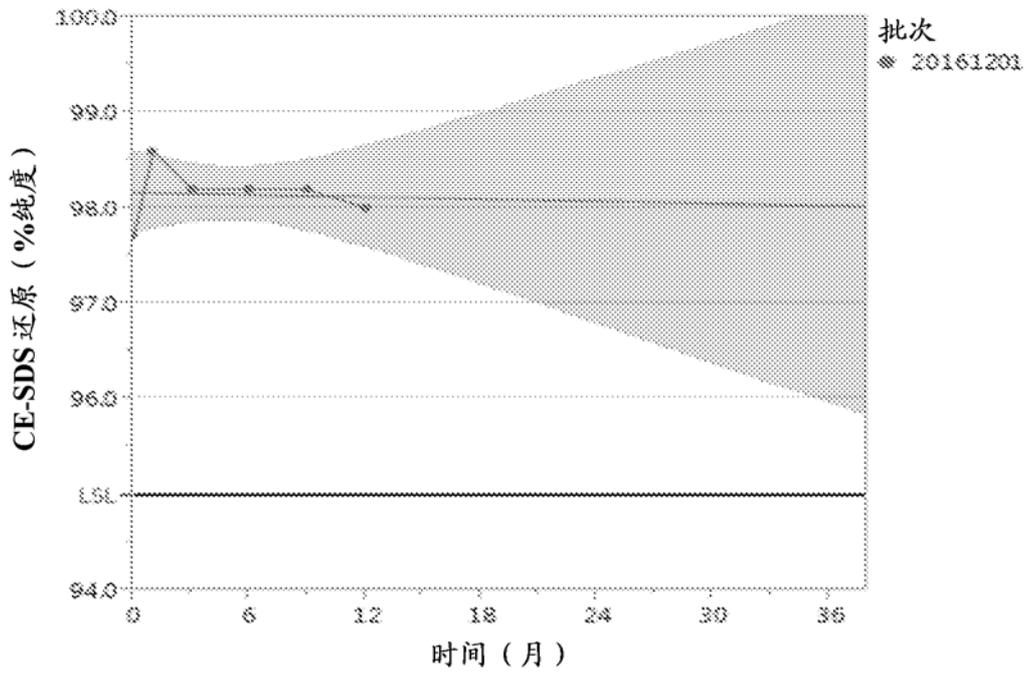
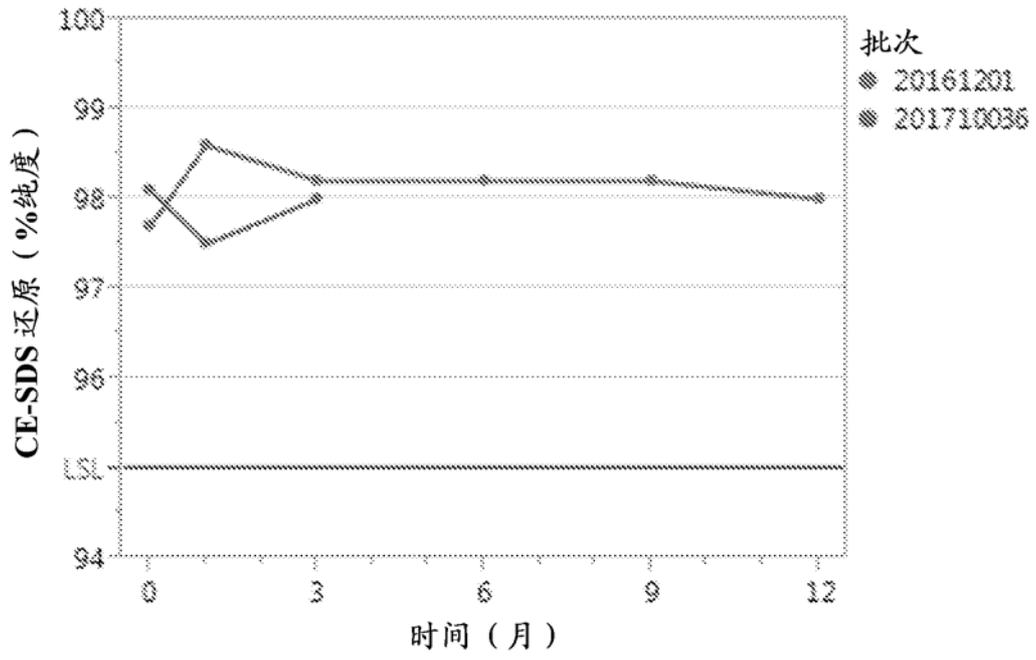


图 17C-17D

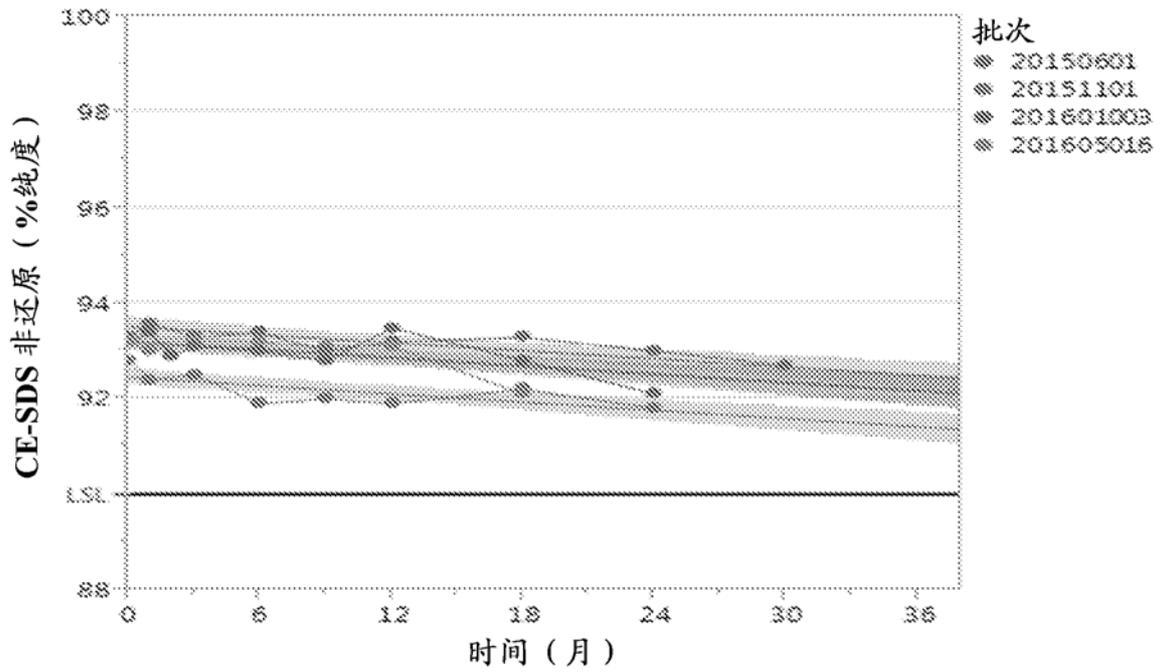
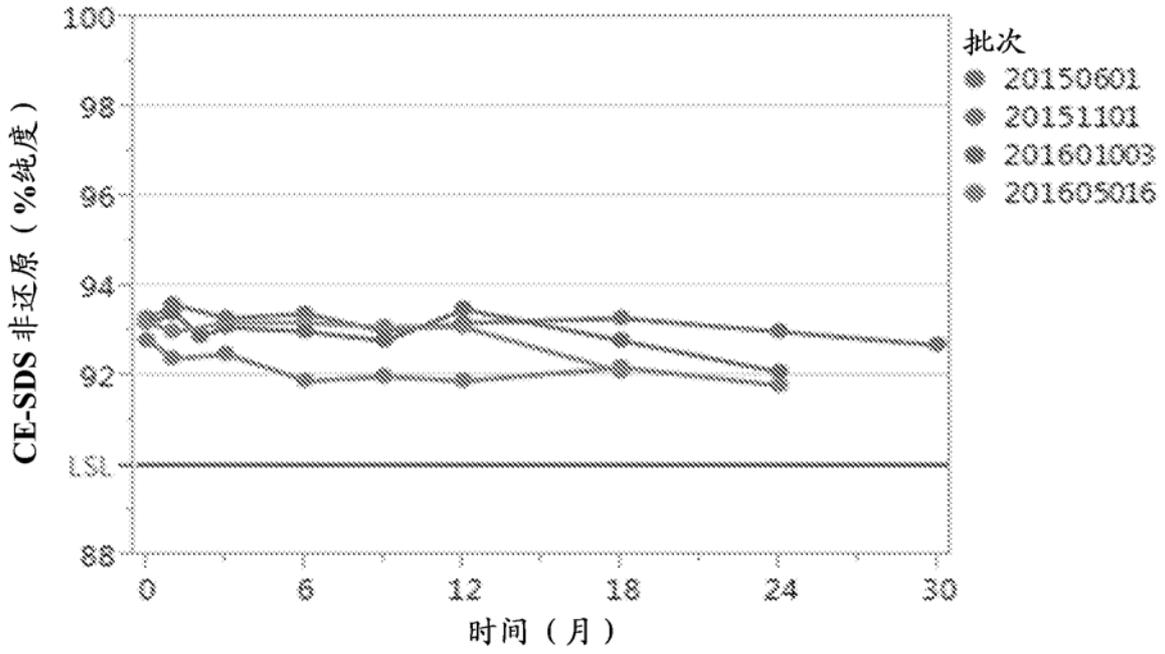


图 18A-18B

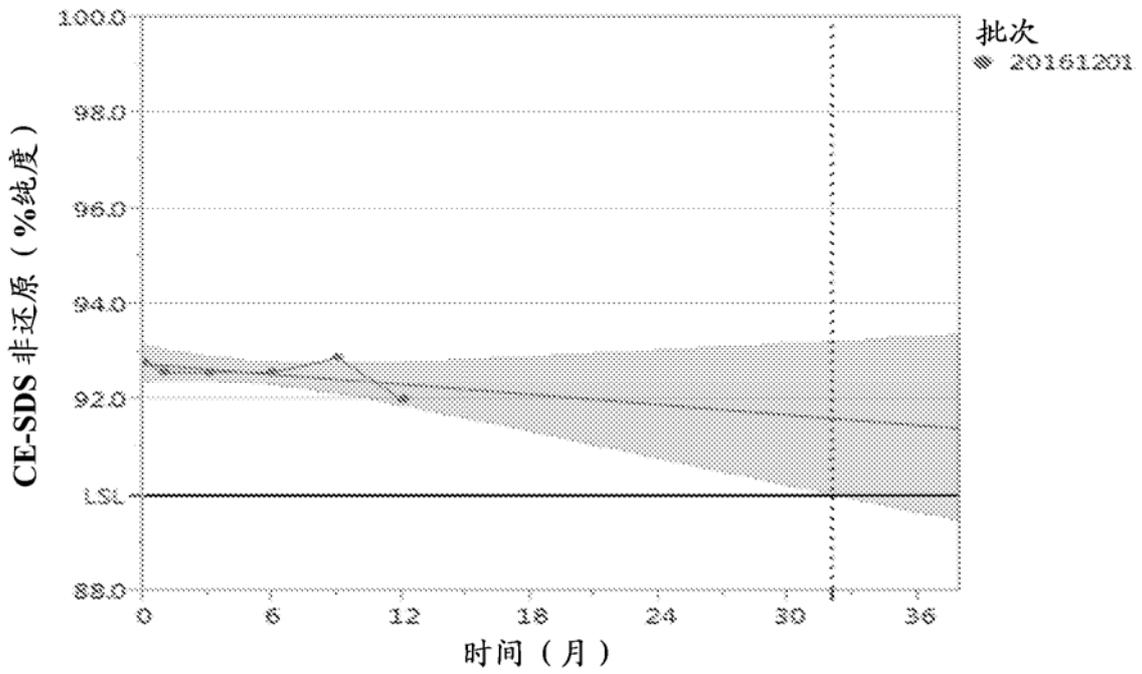
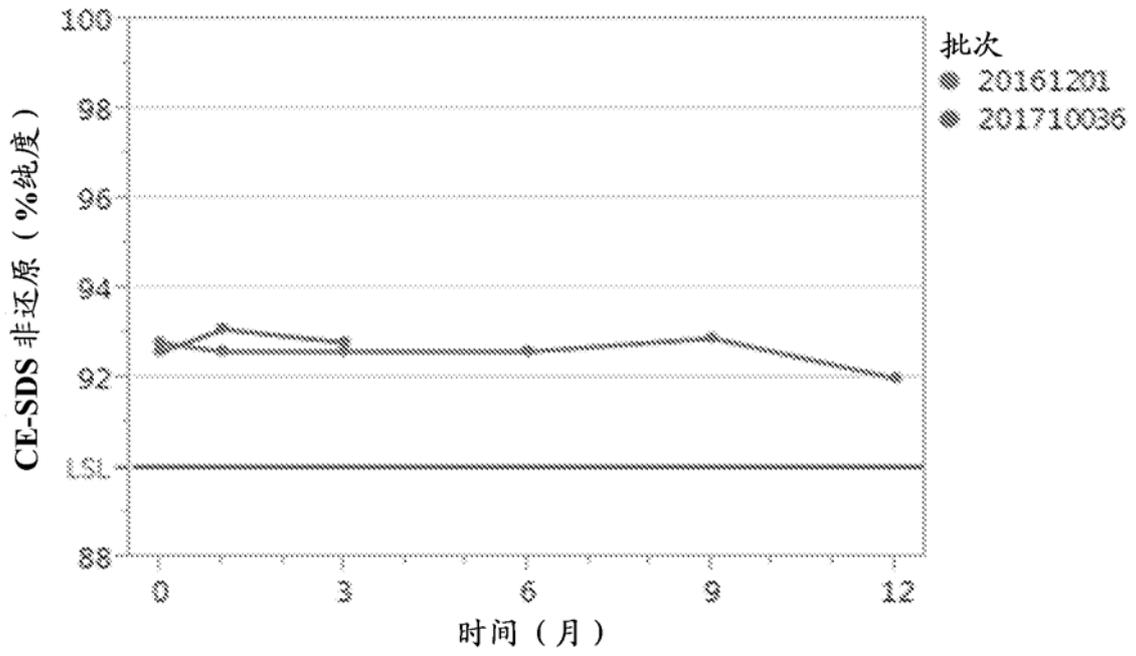


图 18C-18D

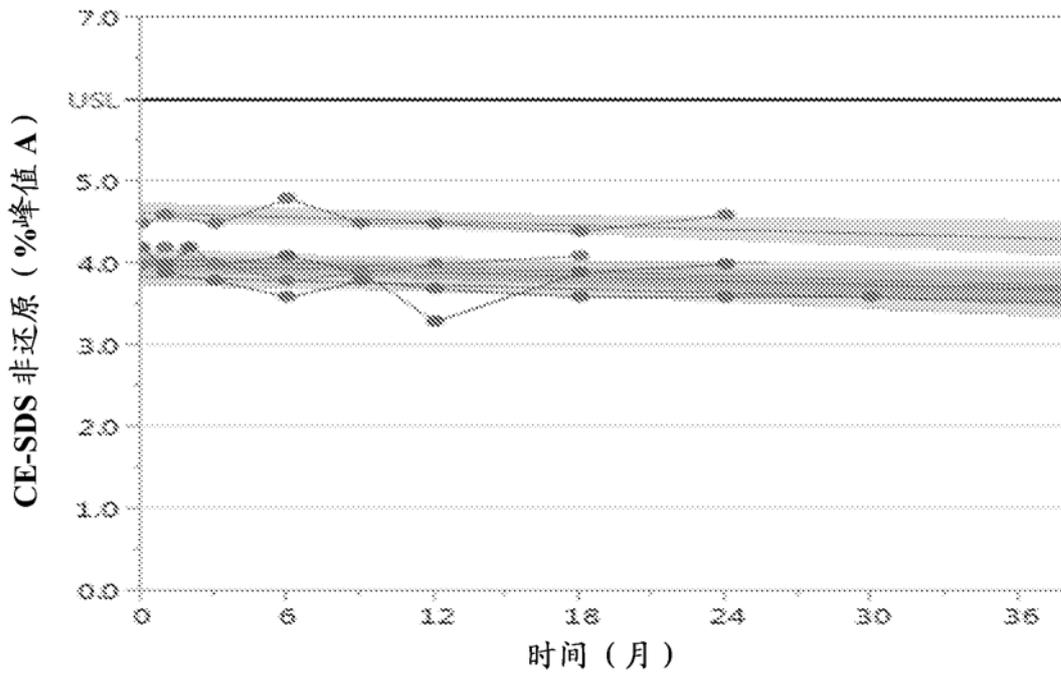
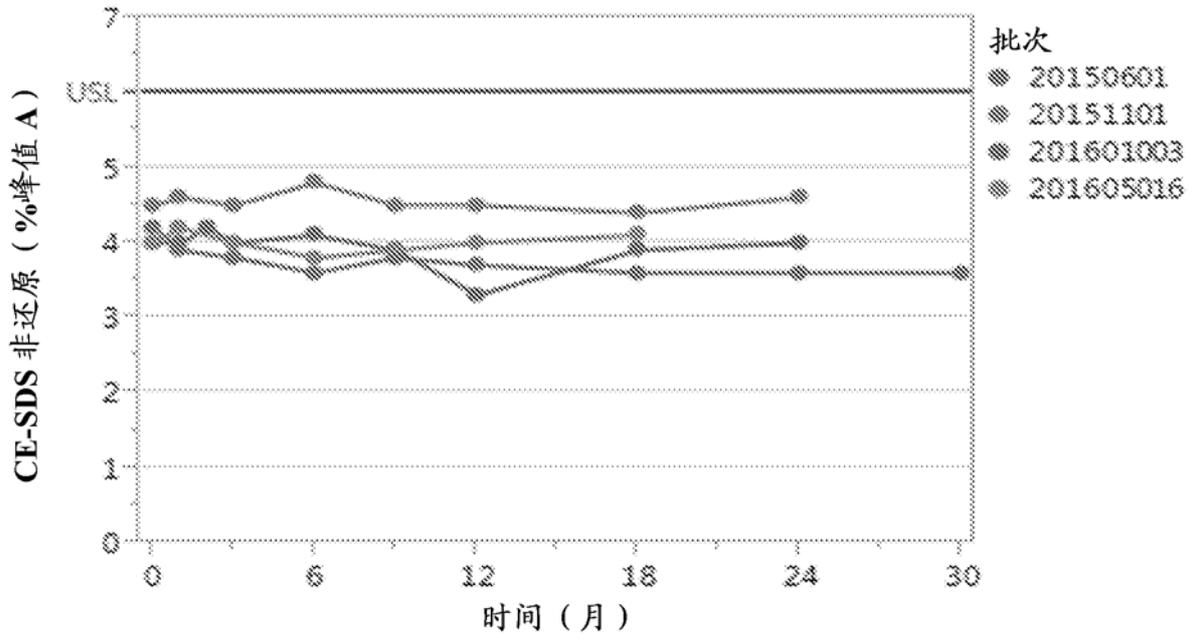


图 19A-19B

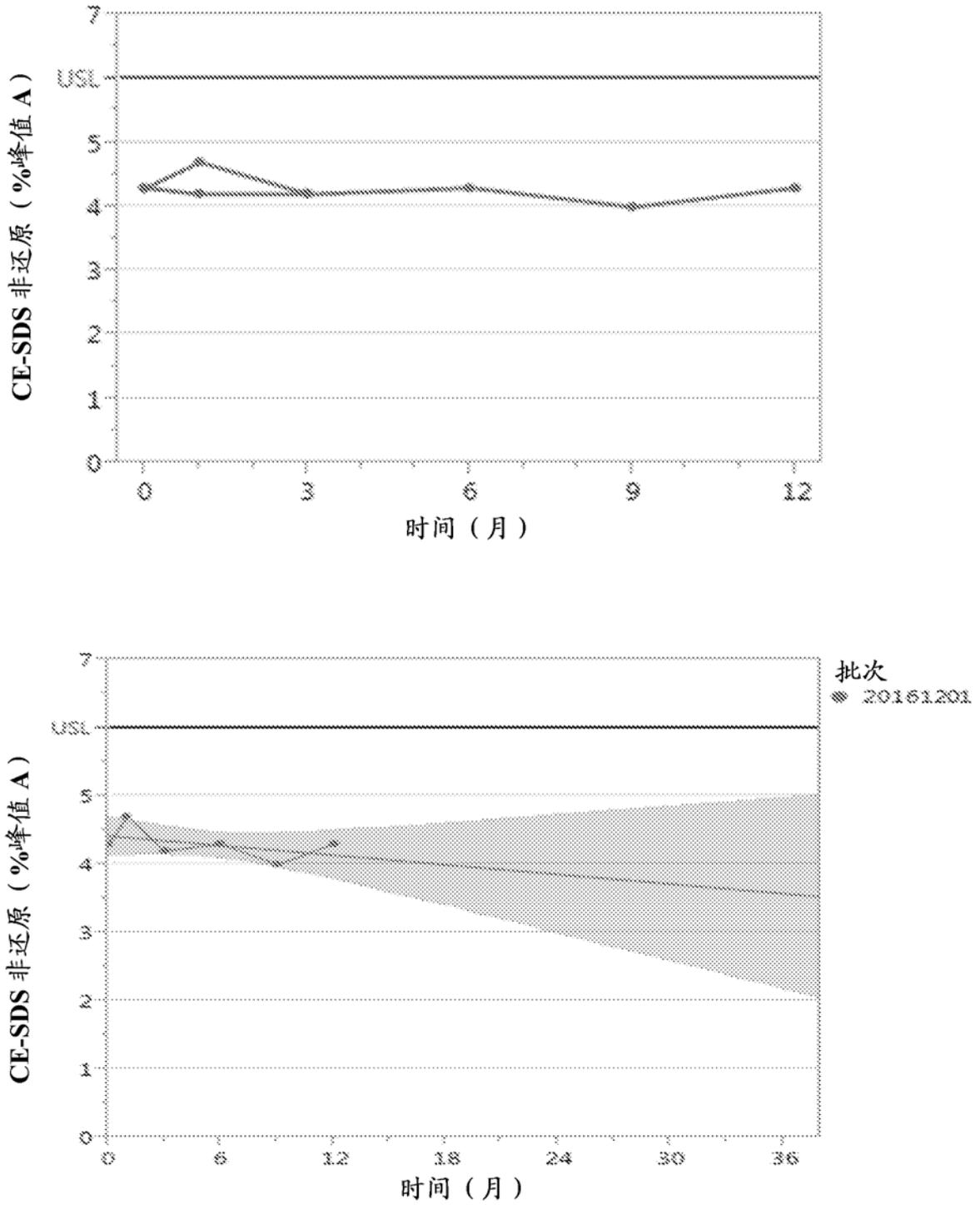


图 19C-19D

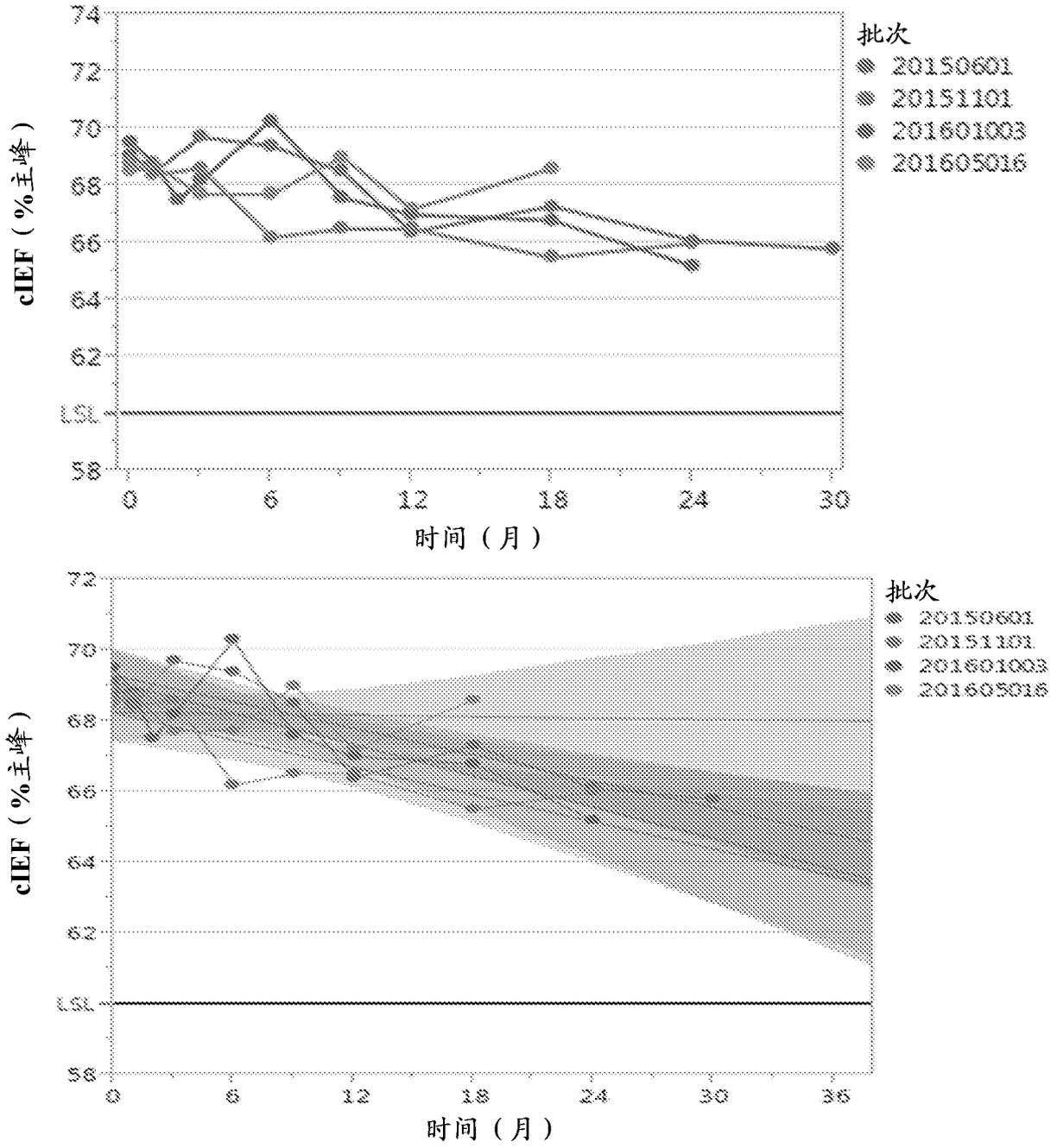


图 20A-20B

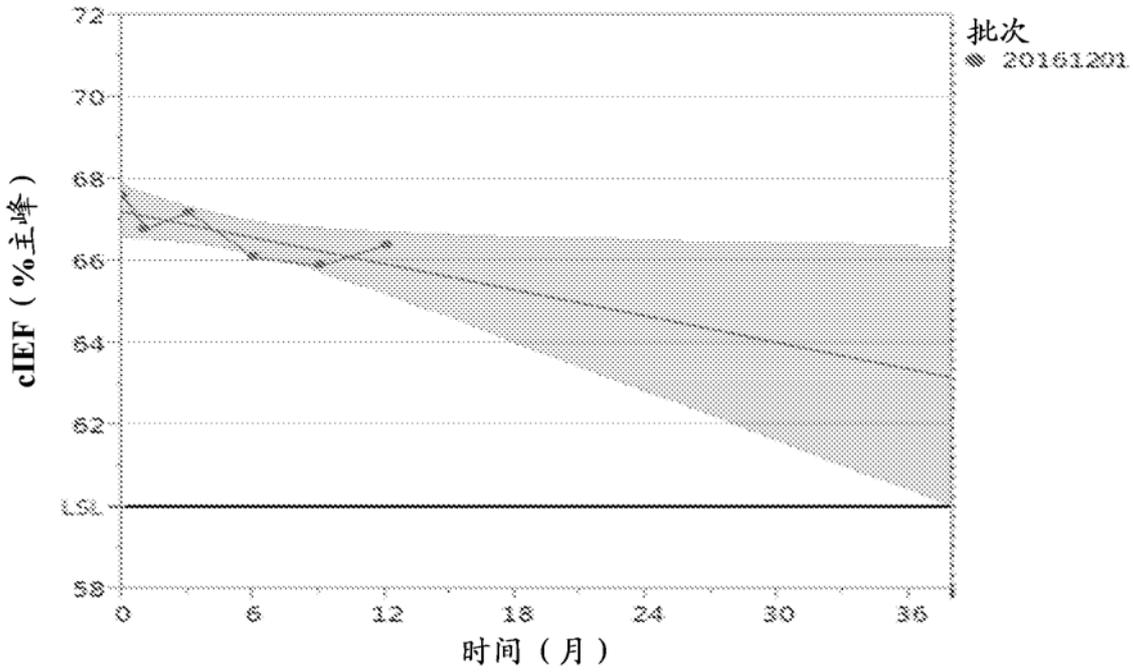
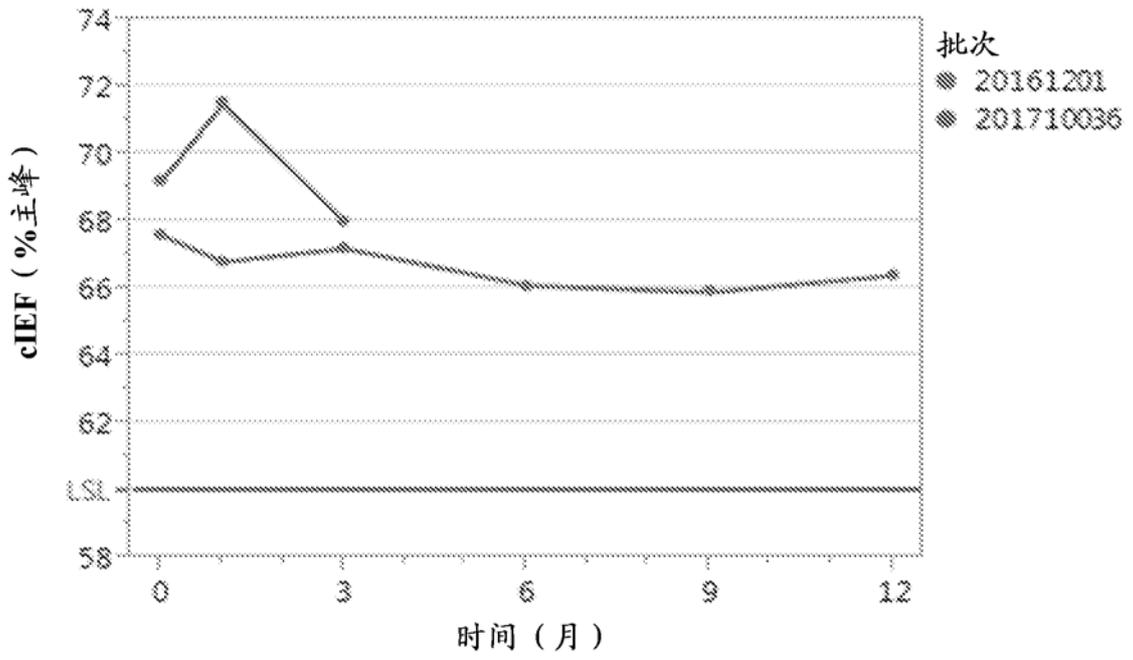


图 20C-20D

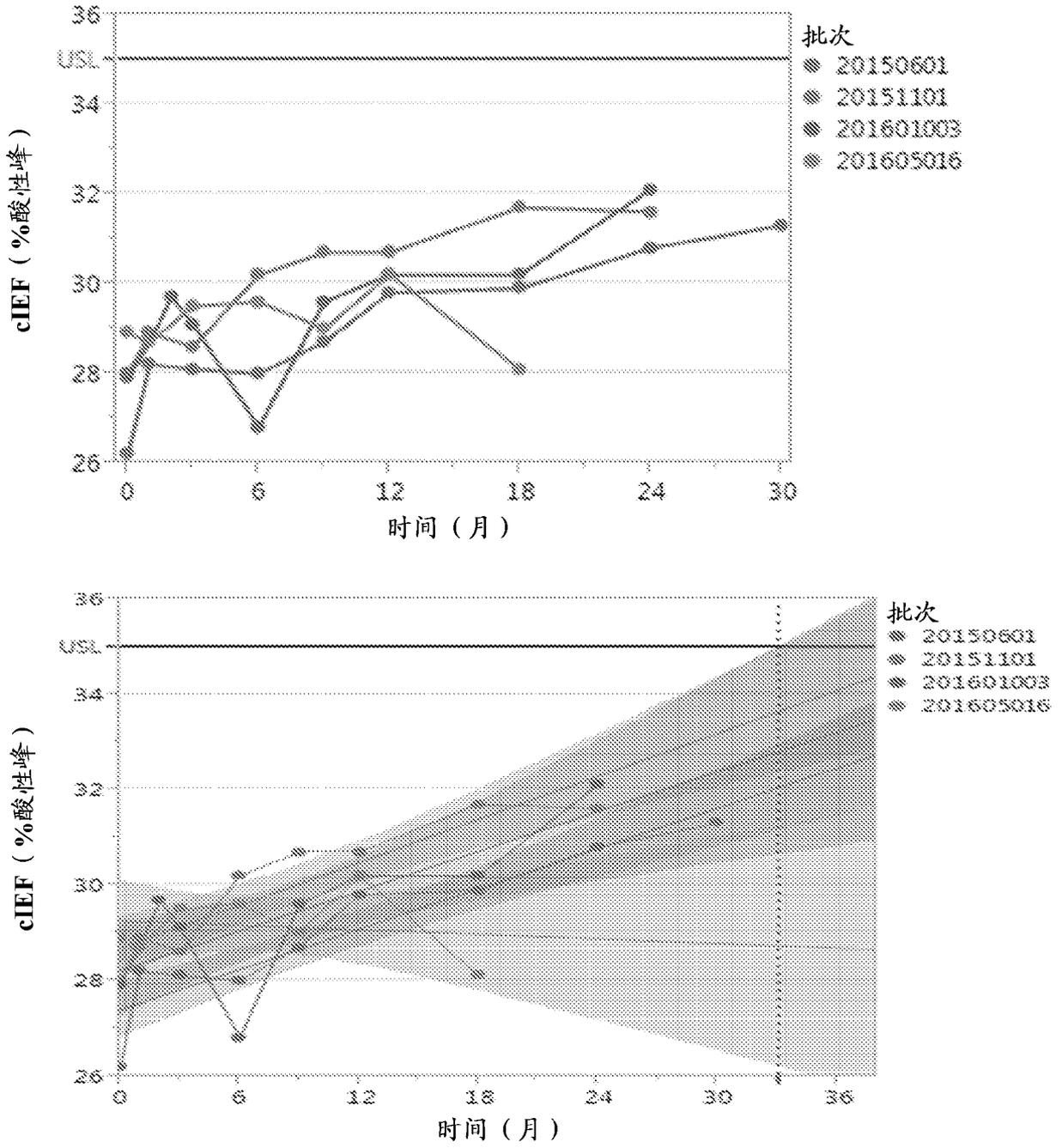


图 21A-21B

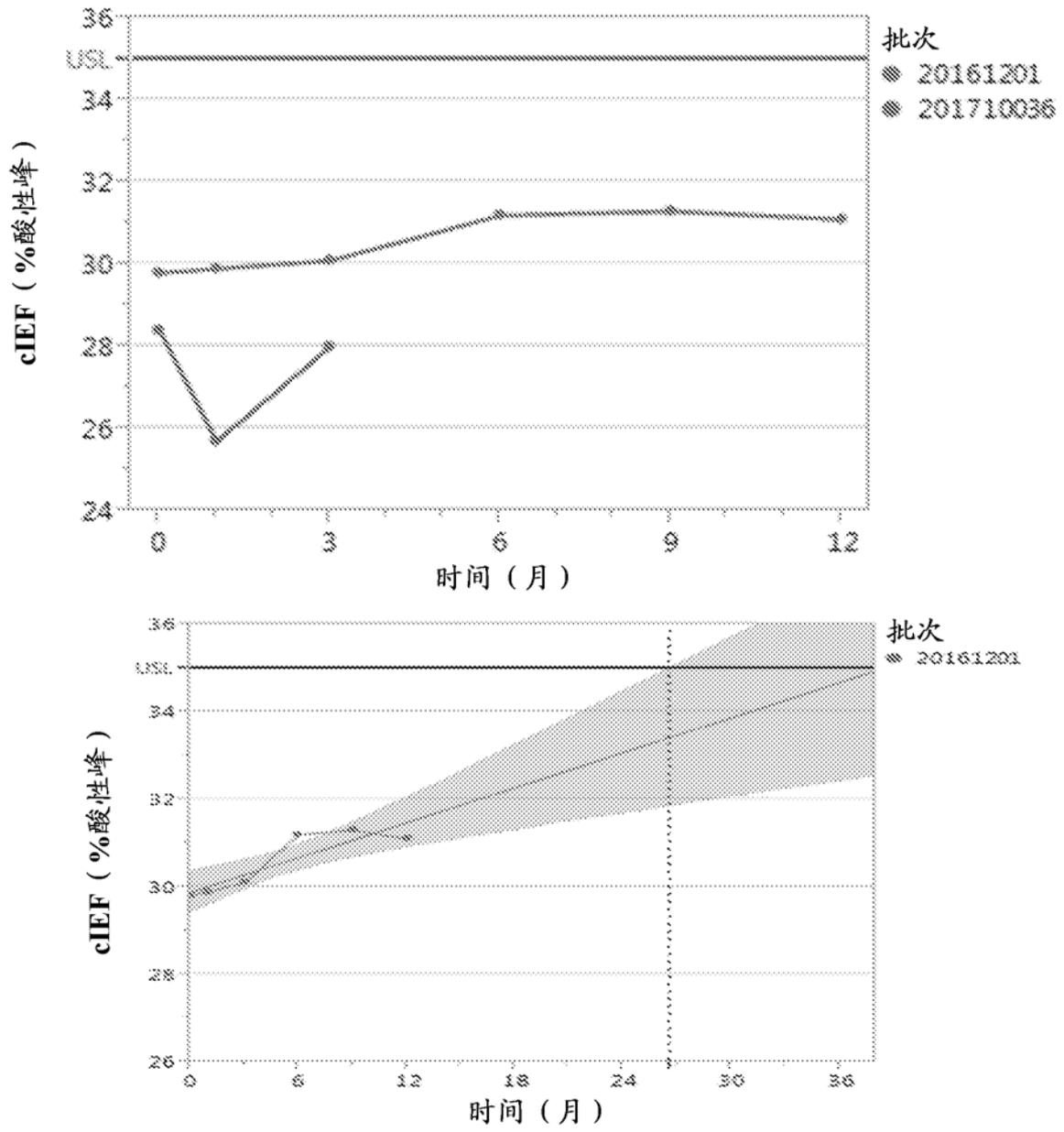


图 21C-21D

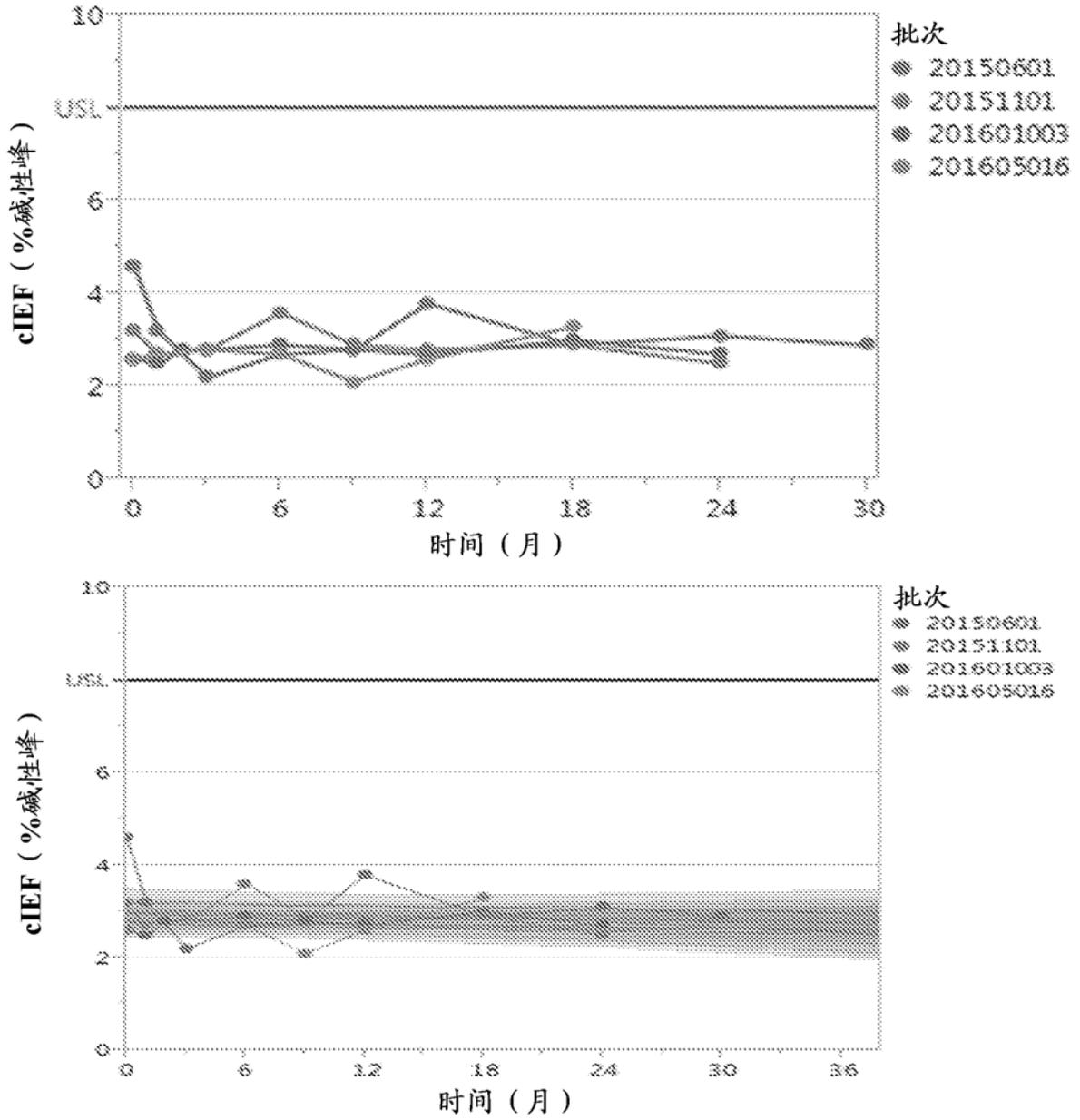


图 22A-22B

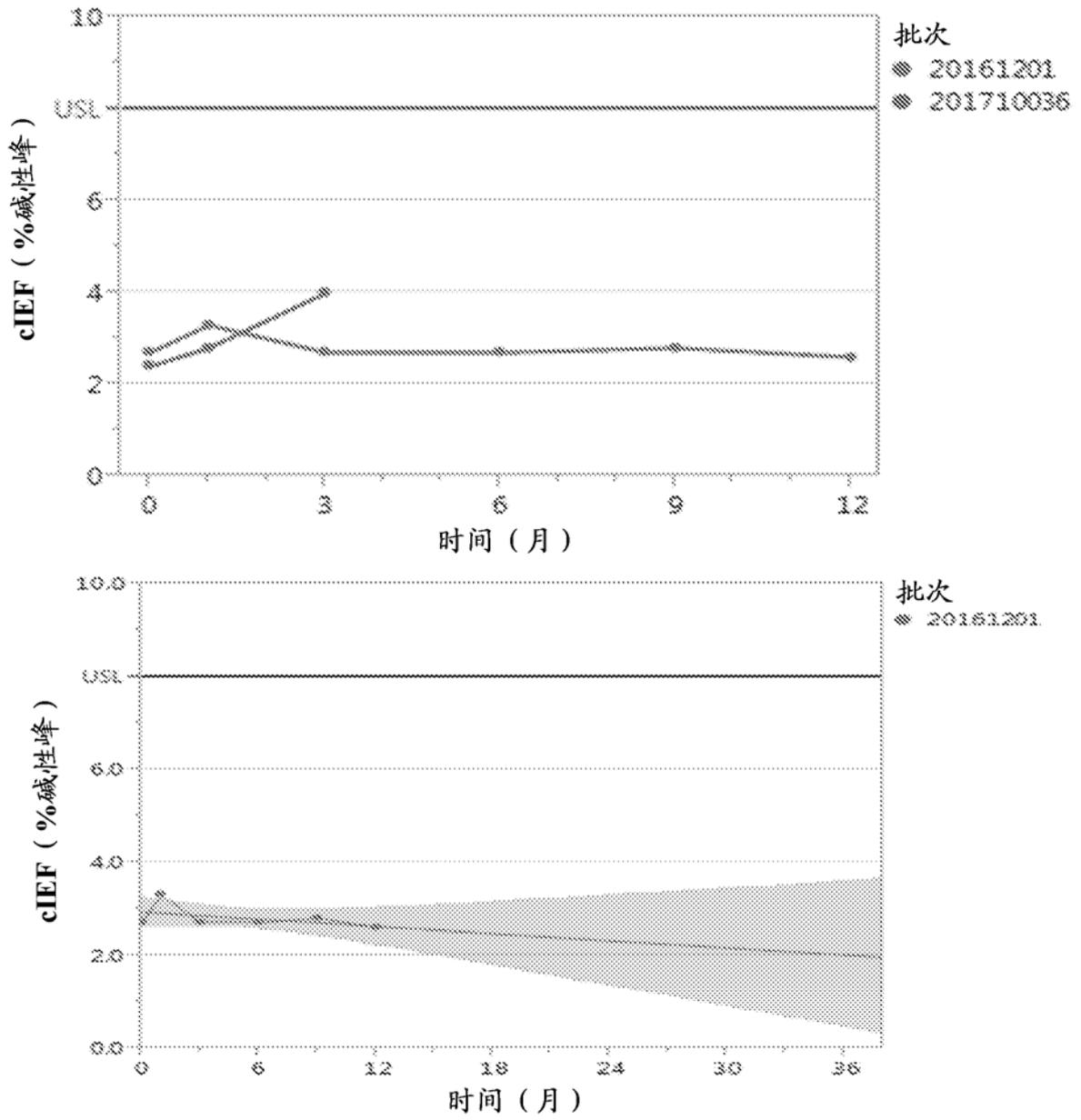


图 22C-22D

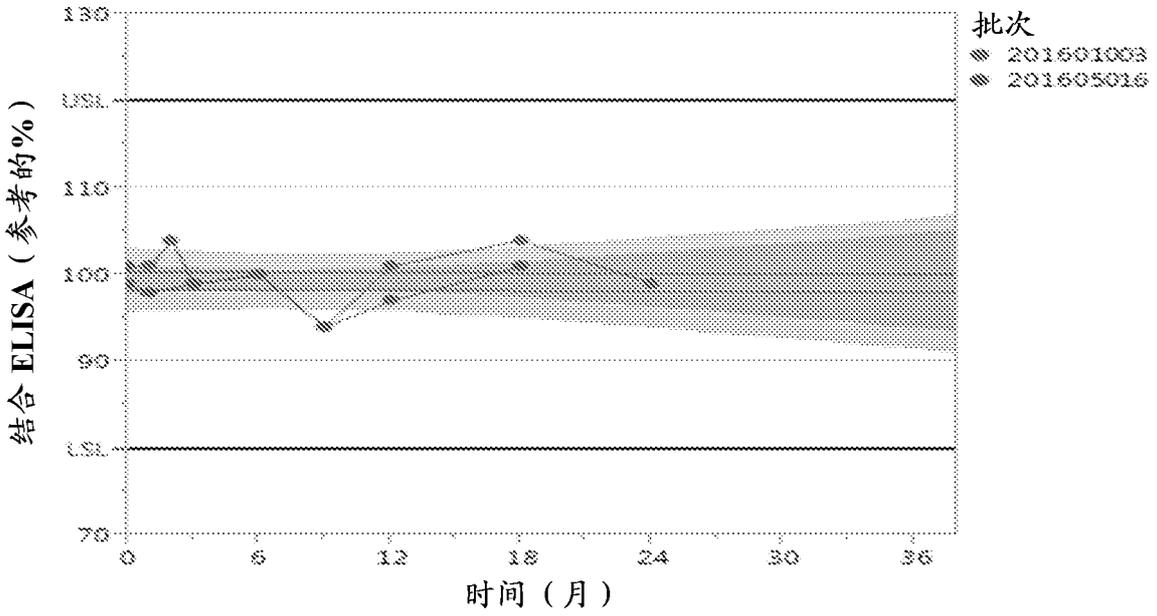
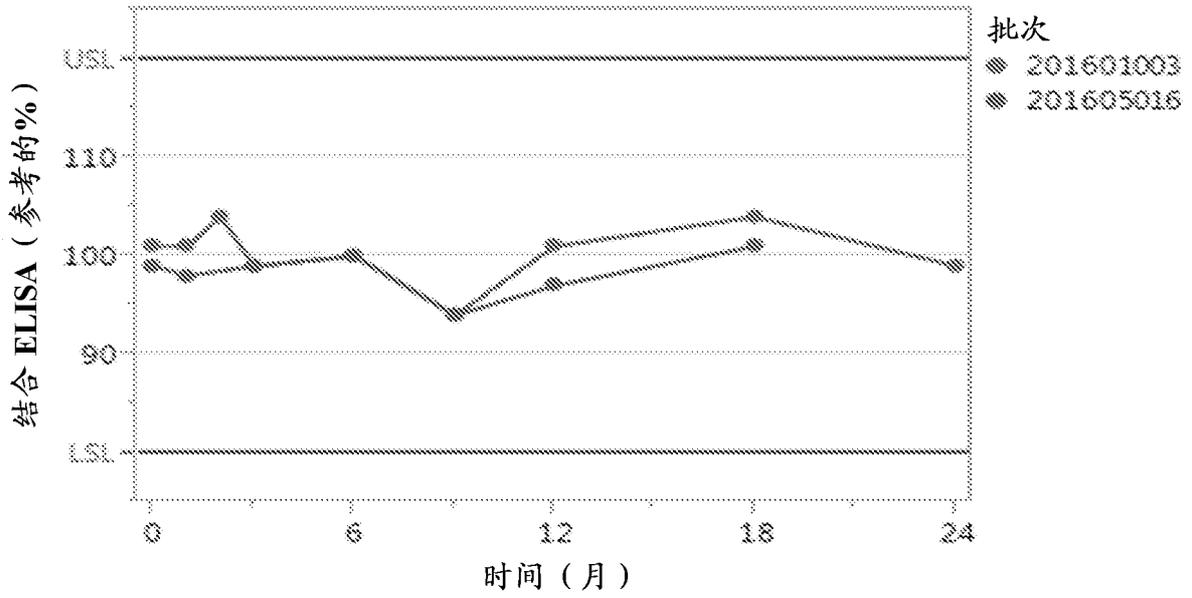


图 23A-23B

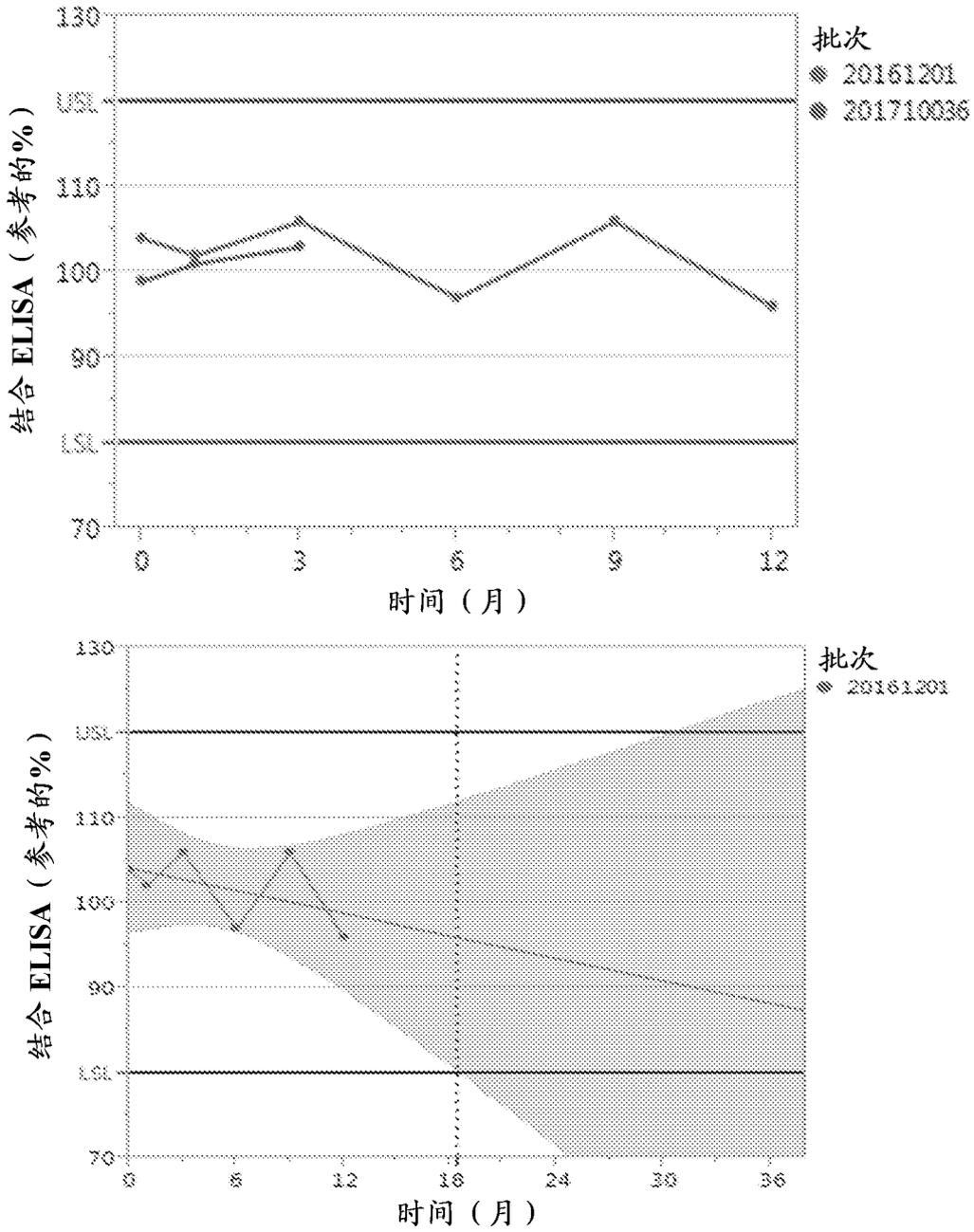


图 23C-23D