



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106620690 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201510726430.6

(22)申请日 2015.10.30

(71)申请人 上海抗体药物国家工程研究中心有
限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技
园区李冰路399号3幢

(72)发明人 黎健荣 张彦 胡湘丽 董玮婷
顾云凯

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 47/42(2017.01)

A61K 47/40(2006.01)

A61K 47/26(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

(54)发明名称

一种稳定的抗体制剂

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,本发明公开了一种稳定的抗体制剂。更具体地,本发明公开了一种包含玻璃酸酶和环糊精的高浓度的抗EGFR抗体制剂,该制剂具有良好的稳定性,尤其适合于皮下注射。可用于治疗人的头颈部鳞状上皮癌、结肠直肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌等疾病。

1. 一种稳定的高浓度抗体制剂,其包含:抗体、玻璃酸酶和环糊精。
2. 根据权利要求1所述的制剂,其还包括一种或多种稳定剂、非离子型表面活性剂或缓冲剂。
3. 一种稳定的高浓度抗体制剂,其包含:
 - a. 浓度 50mg/ml 以上的抗体;
 - b. 1 至 150mM 缓冲剂;
 - c. 15 至 250mM 糖;
 - d. 0.01 至 0.1%的非离子型表面活性剂;
 - e. 40000 个 U/ml 以上的玻璃酸酶;和
 - f. 20%至 50%的环糊精。
4. 根据权利要求 1-3 任一所述制剂,其特征在于,所述玻璃酸酶为 rHuPH20。
5. 根据权利要求 1-3 任一所述制剂,所述环糊精为 HP- β 环糊精。
6. 根据权利要求 1-3 任一所述制剂,所述糖为 80 至 150mM 蔗糖。
7. 根据权利要求 1-3 任一所述制剂,所述非离子型表面活性剂选自下组:聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、和聚乙烯-聚丙烯共聚物。
8. 根据权利要求 7 所述的非离子型表面活性剂为浓度 0.02%至 0.08%的聚山梨酯 80。
9. 一种稳定的高浓度抗体制剂,其包含:
 - a. 浓度 100 到 300mg/ml 的抗 EGFR 抗体;
 - b. 50 至 150mM 的组氨酸缓冲剂;
 - c. 100 至 150mM 蔗糖;
 - d. 0.02%至 0.08%的聚山梨酯 80;
 - e. 40000 个 U/ml 至 70000 个 U/ml 的 rHuPH20;和
 - f. 15%至 40%的 HP- β 环糊精。
10. 根据权利要求 9 所述制剂,其包含:
 - a. 浓度 200mg/ml 的抗 EGFR 抗体;
 - b. 100mM 的组氨酸缓冲剂;
 - c. 120mM 蔗糖;
 - d. 0.06%的聚山梨酯 80;
 - e. 55000 个 U/ml 的 rHuPH20;和
 - f. 35%的 HP- β 环糊精。

一种稳定的抗体制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,更具体地,本发明公开了一种稳定的制剂。

背景技术

[0002] 表皮生长因子受体 (EGFR) 是一种上皮生长因子细胞增殖和信号传导的重要受体,EGFR 通过与其配体相结合来产生效应。EGFR 的特异性配体为 EGF 和 EGF 相关多肽,包括转化生长因子 α (TGF- α)、双调蛋白和肝素结合 EGF 样生长因子。为了激活 EGFR,配体 EGF (单体) 同时结合并连接两个相邻的受体链,使受体的胞内激酶局域在多个酪氨酸上相互磷酸化,酪氨酸激酶活性提高从而可以激活数个信号通路如 ras-MAPK 通路,PI3 激酶通路以及 JAK/STAT 通路等。EGFR 受体过表达或突变后结构激活 (不需要配体) 以及自分泌刺激导致的过度 EGFR 功能与多种癌症发生相关。EGFR 的致癌效应包括 DNA 合成启动、促进细胞生长、侵袭以及转移,特异性敲除 EGFR 可导致细胞周期俘获、细胞凋亡以及癌细胞的分化。研究发现,EGFR 在多种人上皮组织来源的癌症 (如膀胱、乳腺、宫颈、结肠、头颈、肾、肺、胰腺、以及前列腺等) 中有不同水平的表达,EGFR 在结肠直肠癌表达率高达 25 - 77%,且与肿瘤的恶化以及不良预后相关。正因为 EGFR 具有上述特点,以 EGFR 为靶点的抗体药物不断被开发,有的产品已被用于肿瘤治疗的临床实践:

[0003] ERBITUX® (爱必妥、cetuximab、西妥昔单抗) 是 Imclone 公司开发的一种鼠/人嵌合的单克隆抗 EGFR 抗体。ERBITUX® 是一种无菌、澄明、无色液体, pH 7.0 至 7.4,其中可能含少量容易可见、白色、无定形西妥昔单抗微粒。每小瓶 Erbitux 包含:2mg/mL 的 cetuximab、8.48mg/mL 的氯化钠、1.88mg/mL 的磷酸氢二钠七水、0.41mg/mL 磷酸二氢钠一水合物,和注射用水 (USP)。Cetuximab 可以与 EGFR 受体以高出内源配体约 5 到 10 倍的亲和力与 EGFR 特异结合,从而竞争性拮抗配体与 EGFR 的结合,封锁受体与配体的结合继而抑制配体介导的 EGFR 酪氨酸激酶的激活,从而使肿瘤细胞或肿瘤微环境中的基质细胞中多种由 EGFR 信号通路调节的细胞过程被阻断,包括 EGFR 下调,细胞内信号的抑制,细胞周期的抑制,凋亡的诱导, DNA 修复的抑制,血管生成的抑制,肿瘤细胞运动性、侵袭性以及转移性的抑制等等。美国 FDA 于 2004 年 2 月批准 ERBITUX® 用于结直肠癌的治疗,2006 年 FDA 还批准其用于治疗头颈部肿瘤。

[0004] Vectibix® (帕尼单抗、panitumumab) 是由 Amgen 公司开发的一种用于治疗化疗失败后转移性结直肠癌的抗 EGFR 全人源单克隆抗体, Vectibix® 是一种无菌、无色、pH 5.6 至 6.0 的液体制剂,有 5mL、10mL、20mL 三种规格,其中 5mL 规格的单次用小瓶含 100mg 的 panitumumab、29mg 的氯化钠、34mg 醋酸钠,和注射用水, USP ;10mL 规格的单次用小瓶含 200mg 的 panitumumab、58mg 的氯化钠、68mg 的醋酸钠,和注射用水, USP ;20mL 规格的单次用小瓶含 400mg 帕尼单抗、117mg 氯化钠、136mg 醋酸钠、和注射用水, USP。2006 年 Vectibix® 被美国 FDA 批准用于治疗转移结肠癌。

[0005] 201010148069.0 公开了一种具有高亲和力的抗 EGFR 单克隆抗体和其在制备抗肿

瘤药物中的用途；其中重链可变区 (VH) 的氨基酸序列为 SEQ ID NO :14, 轻链可变区 (VL) 的氨基酸序列为 SEQ ID NO :6 或 SEQ ID NO :12 的抗体与 EGFR 的亲合力和 Cetuximab 相比提高至少 10 倍。

[0006]

[0007] 但是, 现有的这些抗 EGFR 抗体的制剂均是低浓度的制剂, 其并不适合于皮下注射, 因为用于皮下注射的药物溶液的体积比静脉内输注体积小得多, 所以其要求抗体制剂浓度通常高达几十、甚至几百 mg/ml 的水平。而皮下注射给药与静脉注射给药相比, 使用更为方便快捷、安全可靠, 且有助于提高患者的生活质量、减少病人的就诊时间, 目前已成为未来的发展方向。但是, 高浓度的抗体溶液相对于低浓度的制剂来说更不稳定, 易发生蛋白质聚集, 而聚集易造成活性抗体的生物利用率减少、药物代谢动力学改变、不利的免疫原性等问题的发生 (Frokjaer, S. 和 Otzen, D. E., Nat. Rev. Drug. Discov. 4:298_306 (2005); Jiskoot, W. 和 Crommelin, D. J. A., EJHP Practice 12 :20-21 (2006))。目前防止聚集常见策略一是通过添加赋形剂至蛋白质溶液, 常使用的稳定剂包括糖、盐、游离氨基酸、多元醇、聚乙二醇 (PEG) 和可以减少蛋白质-蛋白质相互作用的其他聚合物, 如聚山梨酯 (polysorbates) 或泊洛沙姆 (Nema, S. ^A, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 51:166-171 (1997)); 或者通过加入适当的赋形剂 (包括冻干保护剂) 低压冻干来防止蛋白质聚集。但是, 这些策略应用于需要上百 mg/ml 以上的高浓度注射制剂时, 效果不是很理想。

[0008] 因此, 如何开发一种适于皮下注射用的高浓度的稳定的抗体制剂仍是非常必要的。

发明内容

[0009] 本发明的申请人经过大量的研究实验, 开发了一种高浓度的稳定的抗体制剂, 该制剂包含玻璃酸酶和环糊精; 该制剂配方尤其适合于制备注射用的高浓度抗 EGFR 抗体制剂。具体地, 本发明公开了:

[0010] 1、一种稳定的高浓度抗体制剂, 其包含: 抗体、玻璃酸酶和环糊精。

[0011] 2、上述 1 所述的制剂, 其还包括一种或多种稳定剂、非离子型表面活性剂或缓冲剂。

[0012] 3、一种稳定的高浓度抗体制剂, 其包含:

[0013] a. 浓度 50mg/ml 以上的抗体;

[0014] b. 1 至 150mM 缓冲剂;

[0015] c. 15 至 250mM 糖;

[0016] d. 0.01 至 0.1% 的非离子型表面活性剂;

[0017] e. 40000 个 U/ml 以上的玻璃酸酶; 和

[0018] f. 20% 至 50% 的环糊精。

[0019] 4、上述 1-3 任一所述制剂, 其特征在于, 所述玻璃酸酶为 rHuPH20。

[0020] 5、上述 1-4 任一所述制剂, 所述环糊精为 HP- β 环糊精。

[0021] 6、上述 1-4 任一所述制剂, 所述糖为 80 至 150mM 蔗糖。

[0022] 7、上述 1-6 任一所述制剂, 所述非离子型表面活性剂选自下组: 聚山梨酯 20、聚山

梨酯 80、和聚乙烯 - 聚丙烯共聚物。

[0023] 8、上述 7 所述的非离子型表面活性剂为浓度是 0.02% 至 0.08% 的聚山梨酯 80。

[0024] 9、上述 1-5 任一所述制剂,所述抗体为浓度 100 至 250mg/ml 的抗 EGFR 抗体。

[0025] 10、一种稳定的高浓度抗体制剂,其包含:

[0026] a. 浓度 100 到 300mg/ml 的抗 EGFR 抗体;

[0027] b. 50 至 150mM 的组氨酸缓冲剂;

[0028] c. 100 至 150mM 蔗糖;

[0029] d. 0.02% 至 0.08% 的聚山梨酯 80;

[0030] e. 40000 个 U/ml 至 70000 个 U/ml 的 rHuPH20 ;和

[0031] f. 15% 至 40% 的 HP- β 环糊精。

[0032] 实验结果表明,本发明的制剂可有效防止高浓度抗体在长期储存过程中发生聚集,从而提供了一种具有良好稳定性的抗体制剂,该制剂即使在常温下也具有较好的稳定性,保证制剂合理的保质期。

[0033] 本发明的抗 EGFR 抗体制剂,其可用于治疗人的头颈部鳞状上皮癌、结肠直肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌等。优选地可作为注射用水性溶液制剂使用,更优选的可将溶液充装在预充式注射器中通过皮下注射使用。

具体实施方式

[0034] 下面的实施例是为了举例说明本发明并帮助本领域技术人员进行和使用本发明,不应理解为是对本发明的限制。

[0035] 以下实施例中,抗 EGFR 抗体(参照中国专利号 201010148069.0 中公开的方法制备得到),其它实验用材料均是通过商业渠道得到,如 HP- β 环糊精(购自源叶生物)、rHuPH20(Halozyme)、组氨酸(江莱生物)、蔗糖(诺辰生物)、聚山梨酯 80(盛天恒创)等。

[0036] 任何本领域的普通技术人员将会理解的是,将被包括在组合物中的各种组分的组合可以以任何适当的顺序来完成,即,可以首先添加、在中间添加或在最后添加缓冲剂,并且也以可首先添加、在中间添加或在最后添加表面活性剂等。同样,本领域的普通技术人员将会理解的是,在某些组合中这些化学物质中的一些是不相容的,并且因此,它们可以容易被具有相似性质但在有关混合物中是相容的不同的化学物质取代。

[0037] 除特别注明外,制剂中的含量%比均为质量体积百分比浓度(w/v),溶液 PH 可根据需要调节,优选 4-8。

[0038] 实施例 1 玻璃酸酶和环糊精对抗体制剂的影响

[0039] 25 $^{\circ}$ C 含有玻璃酸酶和环糊精的抗 EGFR 抗体制剂的稳定性研究。所述制剂除玻璃酸酶和环糊精外还可含有其它的按照在表 1 中所给出的赋形剂。

[0040] 表 1 :抗 EGFR 抗体制剂配方

[0041]

序号	成分	制剂配方							
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
1	抗 EGFR 抗体 (mg/ml)	200	200	200	200	200	200	200	300
2	蔗糖 (mM)	120	200	120	120	120	120	120	120
3	组氨酸缓冲剂 (mM)	100	120	100	100	100	100	100	100
4	聚山梨酯 80 (%)	0.05	0.08	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
5	rHuPH20 (个 U/ml)	0	0	0	55000	30000	40000	55000	70000
6	HP-β 环糊精 (%)	0	0	35	0	15	15	30	40

[0042] 上述样品制剂在 35℃ 下孵育 60 天, 然后分别在第 0、20、40、60 天时间点通过 SDS-PAGE 进行分析。SDS-PAGE 被用作一种分析技术, 可以根据分子量从天然蛋白质中分离出游离的和高分子量的种类。由于在高浓度的抗体制剂中, 大分子抗体具有高的聚集倾向, 非还原 SDS-PAGE 被用来评定共价聚集体。

[0043] 表 2: 不同配方抗 EGFR 抗体制剂聚集体 SDS-PAGE 分析结果

[0044]

实验结果	时间	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
聚集体	0 天	无	无	无	无	无	无	无	无
	20 天	少量	无	无	无	无	无	无	无
	40 天	有	有	少量	无	无	无	无	无
	60 天	有	有	有	少量	少量	无	无	无

[0045] SDS-PAGE 分析结果显示, 没有添加玻璃酸酶和环糊精的 F1、F2 制剂更易产生抗体聚集体, 加有玻璃酸酶和环糊精两种辅料的制剂 F5、F6、F7、F8 几乎没有产生聚集体, 具有更好的稳定性。

[0046] 实施例 2 糖对抗体制剂的影响

[0047] 评价不同水平的糖对抗 EGFR 抗体制剂稳定性的影响。我们将样品放置于 -20℃、8℃ 和 45℃, 60% 湿度的条件下并在不同时间点通过 SE-HPLC 方法检测抗 EGFR 抗体制剂中抗体的聚集情况。

[0048] 表 3: 抗 EGFR 抗体制剂配方表

[0049]

序号	成分	F9	F10	F11	F12
1	抗 EGFR 抗体 (mg/ml)	200	200	200	200
2	蔗糖 (mM)	20	100	200	400
3	组氨酸缓冲剂 (mM)	150	150	150	150
4	聚山梨酯 80 (%)	0.02	0.02	0.02	0.02
5	rHuPH20 (个 U/ml)	50000	50000	50000	50000
6	HP- β 环糊精 (%)	35	35	35	35

[0050] 表 4: 糖对抗 EGFR 抗体制剂稳定性的影响

[0051]

保存条件	时间 (月)	聚集体%			
		F9	F10	F11	F12
起始	0	0.50	0.50	0.50	0.50
-20℃	3	0.95	0.71	0.55	0.65
8℃	1	0.91	0.67	0.51	0.61
	3	1.06	0.72	0.57	0.64
	6	1.15	0.75	0.65	0.69
	9	1.20	0.85	0.71	0.75
	12	1.40	0.95	0.72	0.81
45℃	1	1.97	1.10	0.91	1.07
	3	2.34	1.33	1.10	1.21
	6	2.60	1.74	1.51	1.58

[0052] 由表 4 所示实验结果可知,糖对抗 EGFR 抗体制剂稳定性有一定影响,优选地,当蔗糖为 100-200mM 时,制剂稳定性更佳。

[0053] 实施例 3 表面活性剂对抗体制剂的影响

[0054] 从非离子表面活性剂聚山梨酯 (例如聚山梨酯 20 或 80) 和帕洛沙姆 (例如帕洛沙姆 188 或 168) 中筛选出在稳定性方面最适合的候选物。我们主要通过对比分析不同含量的聚山梨酯 20 和帕洛沙姆 188 的抗 EGFR 抗体制剂在储存过程中的聚集情况,从而分析

不同表面活性剂对制剂稳定性的影响。我们将样品放置于 30℃、60%湿度的条件下并在不同时间点通过 SE-HPLC 方法检测抗 EGFR 抗体制剂中抗体的聚集情况。

[0055] 表 5: 抗 EGFR 抗体制剂配方表

[0056]

序号	配方	F13	F14	F15	F16	F17
1	抗 EGFR 抗体 (mg/ml)	150	150	150	150	150
2	蔗糖 (mM)	150	150	150	150	150
3	组氨酸缓冲剂 (mM)	100	100	100	100	100
4	表面活性剂 (%)	0.02%聚山梨酯 80	0.06%聚山梨酯 80	0.08%聚山梨酯 80	0.20%帕洛沙姆 188	0.40%帕洛沙姆 188
5	rHuPH20 (个 U/ml)	60000	60000	60000	60000	60000
6	HP- β 环糊精 (%)	40	40	40	40	40

[0057] 表 6 :: 表面活性剂对抗 EGFR 抗体制剂稳定性的影响

[0058]

保存条件	时间 (月)	聚集体%				
		F13	F14	F15	F16	F17
起始	0	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61
30℃, 60%湿度	1	0.67	0.64	0.65	0.71	0.70
	3	0.70	0.68	0.70	0.77	0.76
	6	0.78	0.71	0.72	0.84	0.82
	9	0.89	0.75	0.77	0.98	0.95
	12	0.98	0.79	0.80	1.15	1.13

[0059] 由上表 6 可知,与含有帕洛沙姆 188 表面活性剂的制剂相比,聚山梨酯 80 具有更少的聚集体,优选地,含有 0.06%聚山梨酯 80 的抗 EGFR 抗体制剂具有更好的稳定性。

[0060] 实施例 4 抗 EGFR 抗体制剂的配制及稳定性试验

[0061] 表 7 抗 EGFR 抗体制剂优选配方

[0062]

抗 EGFR 抗体	200mg/ml
蔗糖	120mM
组氨酸缓冲剂	100mM
聚山梨酯 80	0.06%
rHuPH20	55000 个 U/ml
HP-β 环糊精	35%
PH	5.5-8

[0063] 参考 ZL200610147281.9 中所述溶液制剂配制方法制备表 7 所述配方的抗 EGFR 抗体溶液制剂。然后在 -20℃、5℃ 和 25℃ 下储存抗 EGFR 抗体溶液制剂在储存开始、1 个月、3 个月以及 6 个月之后的聚集体情况,通过 SE-HPLC 分析抗 EGFR 抗体溶液制剂的稳定性。结果见表 8。

[0064] 表 8 :抗 EGFR 抗体溶液制剂稳定性试验结果

[0065]

测定 ^a	0 个月			1 个月			3 个月			6 个月		
	-20℃	5℃	25℃	-20℃	5℃	25℃	-20℃	5℃	25℃	-20℃	5℃	25℃
SE-HPLC 测定聚集%	0.50	0.50	0.51	0.51	0.52	0.75	0.55	0.56	0.98	0.56	0.60	1.20

[0066] (备注:每个温度测定 3 组平行制剂取平均值)

[0067] 另外,我们还将配制好的表 9 所述配方的抗 EGFR 抗体溶液制剂在空气层流下用 0.2 μm 过滤器灭菌并在 60℃ 下储存。通过 SE-HPLC 分析该制剂在储存开始、10 天、20 天、30 天之后的稳定性。结果见表 9。

[0068] 表 9: 抗 EGFR 抗体溶液制剂稳定性试验结果

[0069]

测定 ^a	0 天	10 天	20 天	30 天
SE-HPLC 测定的聚集化%	0.51	1.20	1.95	2.75

[0070] (备注:每个温度测定 3 组平行制剂取平均值)

[0071] 由上述表 8-9 可知,本发明的抗 EGFR 抗体溶液制剂稳定性较好,即使在常温或更高温度的情况下仍具有较好的稳定性。

[0072] 另外,本发明的研究人员还对其它商业化的 cetuximab、panitumumab 等抗 EGFR 抗体进行上述 1-5 实验,制剂稳定性与上述实验结果类似,均具有较好的稳定性。

[0073] 本发明的抗 EGFR 抗体制剂,其被用于治疗人的头颈部鳞状上皮癌、结肠直肠癌、

胰腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌等。优选地作为注射用水性溶液而被使用,更优选的可将溶液充装在预充式注射器中通过皮下注射使用。