



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110234353 A

(43)申请公布日 2019.09.13

(21)申请号 201880007721.1

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2018.01.16

代理人 刘维升 林毅斌

(30)优先权数据

17152108.1 2017.01.19 EP

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/36(2006.01)

2019.07.19

A61P 7/02(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/050951 2018.01.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/134184 EN 2018.07.26

(71)申请人 拜耳制药股份公司

地址 德国柏林

(72)发明人 C.奥尔布里希 T.特里尔

M.弗林克

权利要求书1页 说明书21页

序列表3页 附图1页

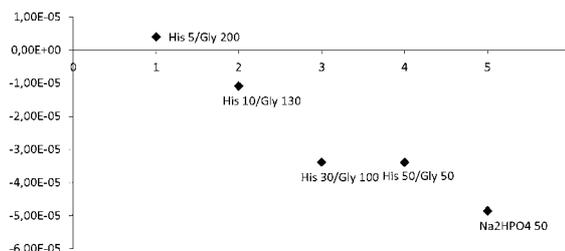
(54)发明名称

用于FXIa抗体的新型稳定制剂

(57)摘要

本发明涉及包含针对凝血因子FXIa的人抗体作为活性成分的新型液体药物制剂。本发明还涉及特定液体制剂的冻干物,且还涉及其在治疗和预防血栓形成或血栓栓塞性病症中的用途。

第二维里系数



1. 液体药物制剂,其包含浓度为10-40 mg/ml的抗FXIa抗体BAY1213790、5-10 mM组氨酸和130-200 mM甘氨酸,其中所述制剂具有5.7-6.3的pH。
2. 根据权利要求1所述的液体药物制剂,其包含选自防腐剂、载体、润湿剂和稳定剂的另外的成分。
3. 根据权利要求1和2所述的液体药物制剂,其中所述组氨酸浓度为10 mM。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的液体药物制剂,其中所述甘氨酸浓度为130 mM。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的液体药物制剂,其包含1-10% (w/v) 的稳定剂。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的液体药物制剂,其包含3-7% (w/v) 海藻糖二水合物。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的液体药物制剂,其包含浓度为0.001%至0.5% (w/v) 的润湿剂。
8. 根据权利要求6所述的液体药物制剂,其中所述润湿剂是聚山梨醇酯80。
9. 液体药物制剂,其包含浓度为25 mg/ml的抗FXIa抗体BAY1213790、10 mM组氨酸和130 mM甘氨酸、5% (w/v) 海藻糖二水合物和0.05% (w/v) 聚山梨醇酯80,其中所述制剂具有6的pH。
10. 通过冷冻-干燥根据前述权利要求中任一项所述的液体药物制剂可获得的冻干物。
11. 根据权利要求10所述的冻干物,其包含至多2%残余水。
12. 包含根据前述权利要求中任一项所述的液体药物制剂或冻干物的剂型。
13. 根据权利要求12所述的剂型,其中所述剂型是注射器或自动注射器。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的液体药物制剂,其用于治疗或预防血栓形成或血栓栓塞性病症。

## 用于FXIa抗体的新型稳定制剂

### [0001] 引言

本发明涉及包含作为活性成分的针对凝血因子FXIa的人抗体、尤其是W02013167669A1中描述的那些的新型液体药物制剂。本发明还涉及特定液体制剂的冻干物，且还涉及其在治疗和预防血栓形成或血栓栓塞性病症中的用途。

[0002] 凝血是生物体的保护机制，其有助于能够迅速地 and 可靠地“封闭”血管壁中的缺陷。因此，可以避免失血或者保持最小限度失血。血管损伤后的止血主要受凝血系统影响，其中触发血浆蛋白的复杂反应的酶促级联。许多凝血因子参与该过程，每种因子在活化后将各自下一个非活性的前体转化为其活性形式。在级联结束时出现可溶解的纤维蛋白原转化为不溶性纤维蛋白，导致血块的形成。在凝血中，传统上区分内源性和外源性系统，其结束于最终联合反应途径。

[0003] 凝血因子FXIa是由起始至凝血的放大和蔓延的过渡的中心组分：在正反馈回路中，除了因子V和因子VIII之外，凝血酶还将因子XI活化为因子XIa，藉此因子IX被转化为因子IXa，并且，经由以这种方式产生的因子IXa/因子VIIIa复合物，因子X被活化并进而因此高度刺激凝血酶形成，从而导致强血栓生长并稳定血栓。抗FXIa抗体在现有技术中已知为抗凝血剂，即用于抑制或预防凝血的物质（参见W02013167669A1）。BAY1213790是抗FXIa抗体，其包含根据SEQ ID NO:1的重链和根据SEQ ID NO:2的轻链的序列。

[0004] 治疗性蛋白诸如例如人单克隆抗体，由于其特性，通常作为液体药物制剂而通过注射来施用。由于许多治疗有效的人单克隆抗体具有不利的特性，诸如低稳定性或聚集倾向，所以必需通过合适的药物制剂调节这些不利的特性。聚集体或变性的抗体可以具有例如低治疗效力。聚集体或变性的抗体也可以引发不期望的免疫反应。稳定的蛋白药物制剂也应当适合于防止化学不稳定。蛋白的化学不稳定性可以导致降解或片段化，且因此降低效力，或者甚至导致毒性副作用。因此，应当避免或至少最小化所有类型的低分子量片段的形成或产生。这些都是可能影响制备物的安全性的因素，且因此必须受影响。此外，当使用注射器或泵时，低粘度是有利的，因为这使得所需的力保持较低并因此增加可注射性。低粘度在生产期间也是有利的，例如，使得能够精确填充制备物。然而，人单克隆抗体的治疗用途经常需要使用高抗体浓度，其经常导致高粘度的问题。在他们的概述文章中，Daugherty和Mrsny (Adv Drug Deliv Rev. 2006;58 (5-6):686-706) 讨论了该问题和在单克隆抗体的液体药物制剂中可能存在的其他问题。

[0005] 液体制剂应当稳定抗体尽可能最长时间并且还使得能够冻干。因此，合适的液体药物制剂必须稳定抗体的生物效力和人单克隆抗体的生物物理特性。因此，需要单克隆抗体的浓缩液体制剂，其包含低比例的聚集体和降解产物，经长时段是稳定的，可以冻干并且具有最小的粘度。

[0006] 本发明解决了上述需求，并提供了包含抗FXIa抗体和少量聚集体和降解产物的液体药物制剂，并且还可以由此生产稳定的冻干物。这些制剂还具有低粘度，且因此可以简单地施用于患者，例如通过注射器或自动注射器的方式。

[0007] 本发明提供了包含抗FXIa抗体和组氨酸-甘氨酸缓冲系统的液体药物制剂。

**[0008] 发明描述**

在一个实施方案中,所述液体药物制剂包含5-30 mM组氨酸和100-200 mM甘氨酸。在一个优选实施方案中,所述液体药物制剂包含5-10 mM组氨酸和130-200 mM甘氨酸。在一个特别优选的实施方案中,所述液体药物制剂包含10 mM组氨酸和130 mM甘氨酸。此外,所述液体药物制剂具有5.5-7.5的pH。在一个优选实施方案中,所述液体药物制剂具有5.7-6.3的pH。在一个特别优选的实施方案中,所述液体药物制剂具有6的pH。根据本发明的液体药物制剂包含浓度为5-50 mg/ml的抗FXIa抗体。在一个优选实施方案中,所述抗FXIa抗体以10-40 mg/ml的浓度存在。在一个特别优选的实施方案中,所述抗FXIa抗体具有25 mg/ml的浓度。在所有实施方案中,所述抗FXIa抗体特别优选为BAY1213790。所述液体药物制剂还可以包含稳定剂。例如,稳定剂是糖。“糖”是指一组有机化合物,其为水溶性的,并且分为单糖、二糖和多元醇。优选的糖是非还原性二糖,特别优选蔗糖或海藻糖二水合物。在一个实施方案中,所述稳定剂存在至1-10%重量/体积(w/v)的程度,优选至3-7% (w/v)的程度,且特别优选至5% (w/v)的程度。在一个优选实施方案中,海藻糖二水合物存在至1-10%重量/体积(w/v)的程度,优选至3-7% (w/v)的程度,且特别优选至5% (w/v)的程度。所述液体药物制剂还可以包含润湿剂。术语“润湿剂”是指任何具有亲水区和疏水区的去污剂且包括非离子型、阳离子型、阴离子型和两性离子型去污剂。优选的去污剂可以选自聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯(也已知为聚山梨醇酯80或TWEEN 80)、聚氧乙烯山梨聚糖单月桂酸酯(也已知为聚山梨醇酯20或TWEEN 20)和N-月桂基肌氨酸。对于公开的组合物,优选非离子型润湿剂。对于本发明的组合物,尤其优选使用聚山梨醇酯80。所述润湿剂可以以0.001%至0.5% (w/v)的浓度使用,优选0.005%至0.1% (w/v)的浓度范围。特别优选使用0.01% (w/v)的润湿剂浓度。

[0009] 可以任选地将防腐剂或其他添加剂、填充剂、稳定剂或载体添加至根据本发明的液体药物制剂中。合适的防腐剂是,例如,十八烷基二甲基苄基氯化铵,六甲基氯化铵,和芳族醇,诸如苯酚、对羟基苯甲酸酯或间甲酚。另外的药学上可接受的添加剂、稳定剂或载体描述于例如Remington's Science And Practice of Pharmacy (第22版, Loyd V. Allen, Jr, 编辑 Philadelphia, PA: Pharmaceutical Press. 2012)。

[0010] 因此,本发明提供了包含抗FXIa抗体BAY1213790和组氨酸-甘氨酸缓冲系统的液体药物制剂,其中所述制剂包含5-30 mM组氨酸和100-200 mM甘氨酸,优选5-10 mM组氨酸和130-200 mM甘氨酸,且具有5.5-6.5、优选5.7-6.3的pH。这在低粘度下产生抗体BAY1213790的足够的稳定性和低聚集,并且还使得能够任选地冻干制剂。

[0011] 根据本发明的一个实施方案是液体药物制剂,其包含

抗FXIa抗体BAY1213790,浓度为5-50 mg/ml,优选10-40 mg/ml,  
5-30 mM组氨酸和100-200 mM甘氨酸,优选5-10 mM组氨酸和130-200 mM甘氨酸,  
其中所述制剂具有5.5-6.5、优选5.7-6.3的pH。所述制剂任选地包含选自润湿剂、防腐剂、载体和稳定剂的另外的成分。

[0012] 根据本发明的一个实施方案是液体药物制剂,其包含

抗FXIa抗体BAY1213790,浓度为5-50 mg/ml,优选10-40 mg/ml,  
5-30 mM组氨酸和100-200 mM甘氨酸,优选5-10 mM组氨酸和130-200 mM甘氨酸,  
1 - 10% (w/v) 稳定剂,优选3-7% (w/v) 海藻糖二水合物,

其中所述制剂具有5.5-6.5、优选5.7-6.3的pH。所述制剂任选地包含选自润湿剂、防腐剂、载体和稳定剂的另外的成分。

[0013] 在一个实施方案中,所述液体药物制剂包含聚山梨醇酯80作为润湿剂,浓度为0.001%至0.5% (w/v),优选0.005%至0.1% (w/v)。

[0014] 一个优选实施方案是液体药物制剂,其包含

抗FXIa抗体BAY1213790,浓度为10 - 40 mg/ml,

5-10 mM组氨酸和130-200 mM甘氨酸,

3 - 7% (w/v)海藻糖二水合物,和

聚山梨醇酯80,浓度为0.005%至0.1% (w/v),

其中所述制剂具有5.7 - 6.3的pH。所述制剂任选地包含选自防腐剂、载体和稳定剂的另外的成分。

[0015] 一个特别优选的实施方案是液体药物制剂,其包含

抗FXIa抗体BAY1213790,浓度为25 mg/ml,

10 mM组氨酸和130 mM甘氨酸,

5% (w/v)海藻糖二水合物,和

聚山梨醇酯80,浓度为0.05% (w/v),

其中所述制剂具有6的pH。所述制剂任选地包含选自防腐剂、载体和稳定剂的另外的成分。

[0016] 术语“缓冲剂”在本文中描述缓冲的溶液,在添加酸性或碱性物质后其pH仅略微改变。缓冲的溶液含有弱酸和其对应碱或弱碱和其对应酸的混合物。

[0017] 术语“患者”是指接受预防性或治疗性治疗的人或动物个体。

[0018] 术语“治疗”在本文中是指使用或施用治疗性物质至患者上/于患者,或使用或施用治疗性物质至患者的分离组织/于患者的分离组织,或至患者的细胞系/于患者的细胞系,所述患者正患有疾病,正显示疾病的症状,或具有疾病的易患性,其中目标在于治愈、改善、影响、中止或减轻疾病、其症状或疾病的易患性。

[0019] “有效剂量”在本文中描述活性分量,以该量可至少部分地实现期望效果。因此“治疗有效剂量”定义为足以至少部分地治愈疾病,或至少部分地在患者体内消除由疾病引起的不良作用的活性分量。对于该目的实际所需的量取决于疾病严重程度和患者的总体免疫状态。

[0020] “等张溶液”具有与人血液基本上相同的渗透压。等张溶液因此具有通常约250至350mOsm的渗透压。术语“低张”描述具有低于人血液的渗透压的渗透压的组合物,而“高张”组合物具有高于人血液的渗透压的渗透压。

[0021] 术语“高分子量聚集体”(同义字:“HMW”)描述由至少两个蛋白单体构成的聚集体。

[0022] 本发明进一步提供包含根据本发明的药物制剂之一和优选还包含使用说明的产品。在一个实施方案中,该产品包含含有根据本发明的液体制剂或冻干物的容器。可用的容器是,例如,瓶、小瓶、管或注射器。容器可以,例如,由玻璃或塑料制成。注射器可包含注射针头,其由,例如,金属制成。本发明进一步提供了试剂盒,其包含前述药物制剂。

[0023] 在一个实施方案中,该容器是注射器。在一个进一步实施方案中,该注射器包含在注射装置中。优选在用标准输注溶液诸如0.9% NaCl溶液稀释之后经由静脉内(快速)输注

来施用。

[0024] 根据本发明的组合物相比于现有技术中可用的抗FXIa抗体的制剂表现出稳定性增加。优选的制剂适合作为液体制剂,但对于更严格的要求也可以是冻干的。因此,根据本发明的液体药物制剂也可以是重构的冻干物。由于该特性概况,根据本发明的液体药物制剂尤其适用于肠胃外施用。肠胃外施用尤其包括静脉内注射或输注、动脉内注射或输注(至动脉中)、肌肉内注射、鞘内注射、皮下注射、腹膜内注射或输注、骨内施用或注射至组织中。根据本发明的组合物尤其适用于静脉内或皮下施用。

[0025] 根据本发明的液体药物制剂在长期测试中表现出高稳定性,甚至作为冻干物。它们还表现出优异的重构性,同时维持生物活性。根据本发明的液体药物制剂也可以是冷冻-干燥的,使得它们包含至多2%的残余水分。因此,本发明的一个进一步实施方案是通过冷冻-干燥根据本发明的液体制剂可获得的冻干物。优选包含至多2%残余水的冻干物。特别优选包含至多1%残余水的冻干物。

[0026] 根据本发明的液体药物制剂具有有价值的药理学特性且可用于预防和治疗人和动物中的疾病。可用于疾病和其治疗的根据本发明的液体药物制剂尤其包括血栓形成或血栓栓塞性疾病的组。因此,根据本发明的液体药物制剂适用于治疗和/或预防可能由凝块形成产生的疾病或并发症。

[0027] 在本发明的上下文中,“血栓形成或血栓栓塞性疾病”包括在动脉和静脉血管系统中发生并可用根据本发明的液体药物制剂治疗的疾病,特别是在心脏的冠状动脉中的疾病,诸如急性冠状动脉综合征(ACS)、存在ST段抬高(STEMI)和无ST段抬高(非STEMI)的心肌梗死、稳定型心绞痛、不稳定型心绞痛、在冠状动脉介入术诸如血管成形术、支架植入或主动脉冠状动脉搭桥术后的再闭塞和再狭窄,以及其他血管中的血栓形成或血栓栓塞性疾病,其导致外周动脉闭塞性病症、肺栓塞、静脉血栓栓塞、静脉血栓形成,特别是在下肢深静脉和肾静脉中,短暂性缺血发作以及血栓形成性中风和血栓栓塞性中风。

[0028] 凝血系统的刺激可由各种原因或相关病症发生。尤其在外科手术、不能活动、卧床、感染、炎症或癌症或癌症治疗的背景中,可高度活化凝血系统,并可能存在血栓形成并发症,特别是静脉血栓形成。根据本发明的液体药物制剂因此适用于在患有癌症的患者中的外科手术的背景下预防血栓形成。根据本发明的液体药物制剂因此还适用于预防具有活化的凝血系统的患者中,例如在所述刺激情形中的血栓形成。

[0029] 因此,根据本发明的液体药物制剂也适用于预防和/或治疗具有急性、间歇性或持续性心律失常,例如心房纤颤的患者和经受心脏复律的患者,以及具有心瓣膜病症或具有人工心瓣膜的患者中的心源性血栓栓塞,例如脑缺血、中风和系统性血栓栓塞和缺血。

[0030] 此外,根据本发明的液体药物制剂适用于治疗和预防弥漫性血管内凝血(DIC),其尤其与败血症关联发生,但也由于外科手术、肿瘤病症、烧伤或其他损伤发生并可通过微血栓形成导致严重器官损伤。

[0031] 此外,在微血管病性溶血性贫血中发生血栓栓塞并发症,和在体外循环的背景中,例如血液透析、ECMO(“体外膜氧合”)、LVAD(“左心室辅助装置”)和类似方法、AV瘘管、人造血管和人工心脏瓣膜中,通过血液与外来表面的接触发生血栓栓塞并发症。

[0032] 此外,根据本发明的液体药物制剂适用于治疗和/或预防疾病,该疾病涉及微凝块形成或脑血管中的纤维蛋白沉积物,这可能导致痴呆病症,诸如血管性痴呆或阿尔茨海默

症。在此,凝块可经由闭塞和通过结合其他疾病相关因子来造成该病症。

[0033] 此外,根据本发明的液体药物制剂可用于抑制肿瘤生长和转移形成,以及用于预防和/或治疗肿瘤患者,特别是经历大型外科手术或化疗或放疗的患者的血栓栓塞并发症,例如静脉血栓栓塞。

[0034] 此外,根据本发明的液体药物制剂也适用于预防和/或治疗肺高压。

[0035] 在本发明的上下文中,术语“肺高压”包括肺动脉高压、与左心病症相关的肺高压、与肺部病症和/或缺氧相关的肺高压和由于慢性血栓栓塞的肺高压(CTEPH)。

[0036] “肺动脉高压”包括特发性肺动脉高压(IPAH,以前也称作原发性肺高压)、家族性肺动脉高压(FPAH)和相关性肺动脉高压(APAH),其与胶原病、先天系统性肺分流缺陷、门脉高压、HIV感染、特定药物和药剂的摄入、与其他病症(甲状腺病症、糖原贮积病症、高雪氏病、遗传性毛细管扩张、血红蛋白病、骨髓增生病症、脾切除)、与具有显著静脉/毛细管影响的病症,诸如肺静脉闭塞病症和肺毛细血管瘤以及新生儿的持续性肺高压相关。

[0037] 与左心病症相关的肺高压包括患病的左心房或心室和二尖瓣或主动脉瓣缺陷。

[0038] 与肺部病症和/或缺氧相关的肺高压包括慢性阻塞性肺病、间质性肺病、睡眠呼吸暂停综合征、肺泡通气不足、慢性高空病和先天畸形。

[0039] 由于慢性血栓栓塞的肺高压(CTEPH)包括近端肺动脉的血栓栓塞性闭塞、远端肺动脉的血栓栓塞性闭塞和非血栓形成性肺栓塞(肿瘤、寄生虫、异物)。

[0040] 本发明进一步提供了根据本发明的液体药物制剂用于生产用于治疗 and/或预防与类肉瘤病、组织细胞增生症X和淋巴管瘤病相关的肺高压的药物的用途。

[0041] 此外,根据本发明的液体药物制剂也适用于治疗和/或预防在传染病和/或全身炎性综合征(SIRS)、败血性器官功能障碍、败血性器官衰竭和多器官衰竭、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ALI)、败血性休克和/或败血性器官衰竭背景中的弥漫性血管内凝血。

[0042] 在感染过程中,可能存在凝血系统的泛发性活化(弥漫性血管内凝血或消耗性凝血病,下文称作“DIC”),伴随着各种器官中的微血栓形成和继发性出血并发症。此外,可能存在内皮损伤,伴有增加的血管通透性,并且体液和蛋白扩散到血管外空间中。随着感染的进展,可能存在器官衰竭(例如肾衰竭、肝衰竭、呼吸衰竭、中枢神经缺陷和心血管衰竭)或多器官衰竭。

[0043] 在DIC的情况中,在受损内皮细胞的表面、异物表面或交联血管外组织的表面存在凝血系统的大规模活化。因此,凝血存在于各种器官的小血管中,伴随着缺氧和后续器官功能障碍。继发效应是凝血因子(例如因子X、凝血酶原和纤维蛋白原)和血小板的消耗,这降低血液的凝血能力并可能导致大出血。

[0044] 根据本发明的液体药物制剂也适用于在基因突变导致提高的酶活性或提高的酶原水平并通过酶活性或酶原浓度的相关测试/测量确定这些的患者中初始预防血栓形成或血栓栓塞性病症和/或炎性病症和/或具有提高的血管通透性的病症。

[0045] 本发明进一步提供了根据本发明的液体药物制剂用于治疗和/或预防病症、特别是上述病症的用途。

[0046] 本发明进一步提供了根据本发明的液体药物制剂用于生产治疗和/或预防病症、特别是上述病症的药物的用途。

[0047] 本发明进一步提供了使用治疗有效量的本发明的化合物治疗和/或预防病症、特别是上述病症的方法。

[0048] 本发明进一步提供了根据本发明的液体药物制剂,其用于使用治疗有效量的根据本发明的化合物治疗和/或预防病症、特别是上述病症的方法。

[0049] 这些在人中充分描述的疾病在其他哺乳动物中也可出现相当的病因学且可使用本发明的液体药物制剂治疗。

[0050] 在本发明的背景下,术语“治疗(treatment)”或“治疗(treat)”在常规意义上使用并意指目的在于对抗、降低、减弱或减轻疾病或健康异常,和改善由该疾病损害的生活条件来照料、照顾和护理患者。

[0051] 因此,本发明进一步提供了根据本发明的液体药物制剂用于治疗 and/或预防病症、特别是上述病症的用途。

[0052] 本发明进一步提供了根据本发明的液体药物制剂用于生产用于治疗 and/或预防病症、特别是上述病症的药物的用途。

[0053] 本发明进一步提供了根据本发明的液体药物制剂在用于治疗 and/或预防病症、特别是前述病症的方法中的用途。

[0054] 本发明进一步提供用于使用有效量的根据本发明的液体药物制剂之一治疗和/或预防疾病、更具体地前述疾病的方法。

[0055] 在一个优选的实施方案中,治疗和/或预防是肠胃外施用根据本发明的液体药物制剂。特别优选静脉内或皮下施用。

[0056] 根据本发明的药物制剂可单独使用,或者如果需要,与一种或多种其他药理活性物质组合使用,条件是该组合不导致不期望和不可接受的副作用。因此,本发明进一步提供了包含根据本发明的组合物中的至少一种和一种或多种另外的活性成分的药物,其特别用于治疗 and/或预防前述疾病。

[0057] 根据本发明的液体可以作为单一治疗施用,但也可以依次重复施用,或者可以在诊断后长期施用。

## 实施例

### [0058] 分析方法的描述

蛋白浓度(UV/VIS光谱学):

蛋白浓度通过280 nm处的吸光度来测定。对于可能的光散射,还在320 nm处校正测试。

### [0059] 缓冲液筛选:

制剂缓冲液测试遵循以下原则:

通过DSC方法(DSC:差示扫描量热法)通过温度曲线(T:15至105°C)的方式测定抗体的热稳定性(解折叠)。所谓的热解折叠(TM<sub>1</sub>)是用于比较各种缓冲系统的量度:随着TM<sub>1</sub>值增加,所述蛋白的热稳定性增加。因此,“更高”的TM<sub>1</sub>表明抗体在相关缓冲系统中的良好稳定性。

### [0060] 视觉图像:

受保护人员目视评价样品的可见颗粒的存在及其外观(薄片/纤维)(目视检查)。溶液应当尽可能不含可见颗粒。

[0061] 蛋白回收率(C<sub>280</sub>)：

在Äkta(色谱法)上再缓冲期间,可以测定回收率,因为所述抗体可以在过程期间累积在各种表面上。因此,在完成该过程期间/之后的高回收率是成功最终产品的重要先决条件。

[0062] pH测量：

测量总是在相同温度(20-25°C)下进行。每天用2种标准溶液校准仪器,其后测量对照,其偏差必须不超过0.05个pH单位。

[0063] SEC(HMW,单体,LMW)与UV检测器(280nm)的组合：

SEC(大小排阻色谱法)将单体与片段(低分子量LMW)和寡聚物(高分子量HMW)基于其空间大小分离。在这里,单体级分应当尽可能高。

[0064] DLS(中值)：

药物抗体溶液的另外的质量标准可以通过动态光散射(DLS)确定。在这里,分子的光散射用于测定它们的流体动力学半径。抗体的流体动力学半径尤其取决于其构象。在应激测试期间,所述抗体的构象可以由于解折叠或自我缔合而改变-所述改变可通过DLS检测：

1) 随着溶液中抗体浓度增加,分子间相互作用增加。如果力在这里具有吸引效应,则所述抗体倾向于所谓的寡聚体形成,即先前存在的单个单体现在形成几个抗体的实体。由于抗体实体看起来“更大”,所以测量的流体动力学半径增加。

2) 周围培养基可能具有对所述抗体有利/不利的电荷;在这种情况下,其可以导致单个单体变性(解折叠);因此,测量的流体动力学半径同样看起来“放大”。

[0065] 当考虑DLS结果时,应当考虑到在开发期间,两种不同的仪器用于DLS测量。在柏林,使用来自HORIBA Instruments的LB-550。在伍珀塔尔,使用来自Malvern的Zetasizer Nano-ZS。组成和样品测量的差异可以导致略微不同的值。由于该原因,不应当比较结果!然而,可以再现用两种仪器的值的趋势。下面每个表描述用何种仪器测量获得的值。

[0066] A2值：

在第二维里系数(A2值)的测量中,通过静态光散射记录分子量的发展。在这种情况下,可以监测分子间相互作用,类似于动态光散射的测量。如果分子量随着浓度增加而超成比例地(super-proportionately)增加,则所述抗体倾向于聚集——制剂中的主要条件被称为“有吸引力的”。相反,如果分子量低于成比例地(sub-proportionately)发展,则“排斥”条件在系统中占优势。聚集的趋势受限。

[0067] CGE：

毛细管电泳是用于在电场中由于其电荷而分离分子的分析方法。分子的形状和大小也在通过凝胶样介质的分离中起作用,所得在这里也-类似于大小排阻色谱法,分离抗体及其片段或聚集体。

[0068] 浑浊度：

借助于浊度测量实施溶液的浑浊度。在这种情况下,定义光度的光通过溶液,且然后可以在溶液的相对侧上检测和记录多少能量被并入。如果浑浊度增加,则浊度同样增加-更多的光被溶液“扣留”。

[0069] 生物测定：

BAY 1213790(抗hFXIa单克隆抗体)的生物化学测试测定所述抗体对活化的人凝血因

子XI (hFXIa)的抑制活性。在这种情况下,使用荧光酶活性测定法测定BAY1213790对人FXIa的功能中和作用。将测试样品的EC50值与BAY 1213790参考标准品进行比较。该标准品已通过相当的生产方法生产,并在<-60°C下储存在pH 6的10 mM组氨酸/130 mM甘氨酸缓冲液中。

[0070] Biacore:

通过表面等离子体共振光谱法 (SPR, Biacore) 测定BAY 1213790测试样品和BAY 1213790参考标准品与人因子XIa (FXIa) 抗原的结合。将测试样品的结合亲和力与BAY 1213790参考标准品进行比较。该标准品已通过相当的生产方法生产,并在<-60°C下储存在pH 6的10 mM组氨酸/130 mM甘氨酸缓冲液中。

[0071] 结果:

对于缓冲液筛选,在5.0至7.5的pH范围内选择适合于肠胃外剂型的缓冲系统的pH范围。在第一次测试(热稳定性测定)中制备的制剂的抗体浓度为约1 mg/ml。没有添加另外的助剂。

[0072] 表1:各种缓冲系统中BAY1213790 (1 mg/ml)的 $TM_1$  (DSC方法)

pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
<b>PBS (Sigma P3813)</b>						72.5
<b>50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</b>	67.0	68.6	71.7	72.1	71.8	76.0
<b>50 mM L-组氨酸</b>		66.3	69.2	70.7	72.5	73.1
<b>50 mM 乙酸钠</b>	69.8	66.4				
<b>50 mM Tris</b>						71.4
<b>50 mM 柠檬酸钠</b>	65.4	67.9	69.5	70.9		
<b>50 mM L-精氨酸</b>			70.6	69.9	70.6	71.0
<b>50 mM L-甘氨酸</b>			72.8	78.7	73.5	78.4
<b>50 mM L-赖氨酸</b>			70.0	69.9	70.2	70.9
<b>10 mM His, 130 mM Gly</b>			72.0	72.3	72.5	73.6

[0073]  $TM_1$ 值(解折叠温度)在65.4°C和78.7°C之间。选择具有高于72.0°C的 $TM_1$ 的制剂用于进一步测试,因为具有高 $TM_1$ 值的蛋白制剂是稳定制剂的指标。

[0074] 含有Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.0至7.5)、L-甘氨酸(pH 6.0至7.5)、L-组氨酸(pH 7.0至7.5)和10 mM组氨酸和130 mM甘氨酸的组合(pH 6.0至7.5)的抗因子XIa Ab BAY1213790制剂显示最高的热稳定性。

[0075] 由于制剂的目标浓度被确立为25 mg/mL,所以使用制备型SEC系统将蛋白再缓冲至下一步骤中的选择的缓冲系统中,并使用Vivapore 10/20浓缩(从约6至40 mg/ml)。

[0076] 表2: BAY1213790的再缓冲/浓缩

缓冲系统	C <sub>蛋白</sub> [mg/ml] <sup>1</sup>	回收率 [%]	SEC HMW [%]	SEC 单体 [%]	SEC LMW [%]	视觉上
50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O pH 6.0	37.63	93.1	1.28	98.7	0.03	好的
50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O pH 6.5	43.48	106.8	1.46	98.5	0.04	好的
50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O pH 7.0	43.12	103.7	1.62	98.3	0.03	好的
50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O pH 7.5	37.24	91.1				
50 mM L- 组氨酸 pH 6.0	38.38	95.4	1.18	97.9	0.96	好的
50 mM L- 组氨酸 pH 6.5	37.98	92.1	-	-	-	好的
50 mM L- 组氨酸 pH 7.0	33.86	83.5	-	-	-	好的
50 mM L- 组氨酸 pH 7.5	33.97	83.7	-	-	-	好的
10 mM L- 组氨酸, 130 mM L-甘氨酸 pH 6.0	39.31	97.8	1.01	98.7	0.29	好的
10 mM L- 组氨酸, 130 mM L-甘氨酸 pH 6.5	34.47	84.5	-	-	-	好的
10 mM L- 组氨酸, 130 mM L-甘氨酸 pH 7.0	30.03	74.6	-	-	-	好的

缓冲系统	C <sub>蛋白</sub> [mg/ml] <sup>1</sup>	回收率 [%]	SEC HMW [%]	SEC 单体 [%]	SEC LMW [%]	视觉上
10 mM L- 组氨酸, 130 mM L-甘氨酸 pH 7.5	24.09	57.7	-	-	-	好的

<sup>1</sup> 由于不同的缓冲液组成和与之相关的作用,再缓冲后的样品具有不同的浓度。

[0077] 组氨酸和组氨酸/甘氨酸制剂表现出pH依赖性的蛋白回收率,其中随着pH增加,回收率降低。在pH 6.0下发现良好的回收率( $\geq 95\%$ )。磷酸盐缓冲液没有显示该趋势。对于具有高回收率的样品,另外确定SEC。没有显示单体含量或视觉图像的差异。

[0078] 通常,蛋白对搅拌应激敏感,剧烈振荡可能潜在地导致蛋白的聚集并且可能形成寡聚物(HMW)直至可见颗粒。已知添加表面活性剂诸如聚山梨醇酯80和聚山梨醇酯20对蛋白具有针对表面应激的保护作用。将聚山梨醇酯80添加至选择的制剂中,使得所述制剂含有总共0.01%聚山梨醇酯80。

[0079] 用搅拌应激测试(在300 rpm和室温下24小时)测试抗因子XIa Ab制剂的稳定性。随后,通过以下方法的方式研究制剂的变化:

- 1) 视觉图像
- 2) 蛋白回收率(C<sub>280</sub>):
- 3) SEC (HMW, 单体, LMW)
- 4) DLS (中值)。

[0080] 在搅拌应激之后,所有Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>制剂在SEC中显示增加的寡聚物(HMW > 2%)。一些样品另外具有可见颗粒。

[0081] 在搅拌期间,pH 6.5至7.5的组氨酸制剂絮凝。pH 6.0的溶液在开始时看起来良好,但寡聚物已增加(2.9%)并且回收率为仅91%。

[0082] 这显示样品之间的严重差异,这取决于选择的缓冲系统。

[0083] pH 6.0的组氨酸/甘氨酸制剂显示98.0%的良好单体含量,且回收率为95%。

[0084] 磷酸氢钠系统的DLS值(流体动力学直径)在d(H):23至30nm之间,而优选制剂中的抗体的直径保持在19 nm。构象的这种差异表明形成相对大的聚集体(由有吸引力的分子间相互作用引起),这在通过SEC (HMW的增加)和通过一些溶液中的可见颗粒的分析研究中得到证实。

[0085] 这些观察显示pH 6.0的组氨酸/甘氨酸系统对BAY 1213790抗体具有比其他系统更好的稳定作用,尽管通过考虑未应激样品,这并不明显。

[0086] 表3:在搅拌应激测试后含有0.01% (w/v)聚山梨醇酯80的制剂中的BAY 1213790

缓冲系统	C <sub>蛋白</sub> [mg/ml] <sup>1</sup>	回收率 [%]	SEC HMW [%]	SEC 单体 [%]	SEC LMW [%]	DLS [nm]	视觉 上
50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6.0	36.51	97.0	2.61	97.4	0.03	30	颗粒
50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6.5	44.72	102.9	3.10	96.8	0.05	28	好的
50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7.0	39.78	92.3	5.99	94.0	0.03	25	颗粒
50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7.5	41.19	110.6	7.50	91.8	0.04	23	好的
50 mM 组氨酸 pH 6.0	34.79	90.6	2.90	96.3	0.72	22	好的
50 mM 组氨酸 pH 6.5	39.72	104.6	-	-	-	-	浑浊的
50 mM 组氨酸 pH 7.0	30.77	90.9	-	-	-	-	薄片
50 mM 组氨酸 pH 7.5	21.76	64.1	-	-	-	-	薄片
10 mM 组氨酸,	37.32	94.9	1.68	98.0	0.35	19	好的

缓冲系统	C <sub>蛋白</sub> [mg/ml] <sup>1</sup>	回收率 [%]	SEC HMW [%]	SEC 单体 [%]	SEC LMW [%]	DLS [nm]	视觉 上
<b>130 mM 甘氨酸 pH 6.0</b>							
<b>10 mM 组氨酸, 130 mM 甘氨酸 pH 6.5</b>	31.40	91.1	-	-	-	-	薄片
<b>10 mM 组氨酸, 130 mM 甘氨酸 pH 7.0</b>	28.27	94.2	-	-	-	-	薄片
<b>10 mM 组氨酸, 130 mM 甘氨酸 pH 7.5</b>	20.37	84.6	-	-	-	-	薄片

<sup>1</sup> 由于不同的缓冲液组成和与之相关的作用,再缓冲后的样品具有不同的浓度。

[0087] 为了能够展现各种助剂浓度对所述抗体的影响,在该领域中实施另外的测试。同时修改用于测定DLS数据的技术,并且还在另一浓度(25 mg/mL)下实施测试,使得结果略微不同,但其趋势相似。

[0088] 表4:T0:各种缓冲系统中BAY 1213790 (25mg/mL)的未应激样品,所述缓冲系统全部包含:0.01% (w/v)聚山梨醇酯80,且pH为6.0(使用来自Malvern的Zetasizer Nano-ZS测量DLS值)

样品	DLS d(H) [nm]	视觉上	C蛋白 [mg/ml]
5 mM 组氨酸, 200 mM 甘氨酸	11.12	好的	25.38 mg/mL
10 mM 组氨酸, 130 mM 甘氨酸	13.85	好的	24.88 mg/mL
30 mM 组氨酸, 100 mM 甘氨酸	16.18	好的	26.40 mg/mL
50 mM 组氨酸, 50 mM 甘氨酸	16.97	好的	25.77 mg/mL
50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	18.36	好的	25.29 mg/mL

[0089] 表5:T24 (24 h, 300 rpm): 各种缓冲系统中的应激的BAY 1213790样品 (25 mg/mL), 所述缓冲系统全部包含: 0.01% (w/v) 聚山梨醇酯80, 且pH为6 (使用来自Malvern的Zetasizer Nano-ZS测量DLS值)

样品	DLS d(H) [nm]	视觉上	C蛋白 [mg/ml]
5 mM 组氨酸, 200 mM 甘氨酸	11.52	好的	25.04 mg/mL
10 mM 组氨酸, 130 mM 甘氨酸	13.72	好的	24.92 mg/mL
30 mM 组氨酸, 100 mM 甘氨酸	16.23	好的	26.23 mg/mL
50 mM 组氨酸, 50 mM 甘氨酸	16.93	好的	25.84 mg/mL
50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	18.21	颗粒	25.04 mg/mL

[0090] 可以看到, 与优选的制剂 (样品2) 相比, 磷酸氢钠样品 (样品5) 的DLS数据已增加。该现象是由于分子间相互作用增加, 这通过测定第二维里系数 (A2值) 得到证实。在该情况

下,正A2值描述系统内的“排斥”相互作用。由于它们的表面电荷,所述抗体相互排斥。负值描述系统内的有吸引力的条件 - 这在这里意味着数值越远离“0”,效果越明显。在图1中,可以找到来自表4的五种未应激制剂的测量的第二维里系数。可以看到,样品1 (pH 6.0的5 mM组氨酸/200 mM甘氨酸)是具有正A2值且因此具有排斥相互作用的唯一样品。然而,由于低组氨酸比例的缓冲能力低,选择制剂2 (pH 6.0的10 mM组氨酸/130 mM甘氨酸),其在该系列中具有最低的负A2值,并且仍然能够在处理和储存期间在制剂中保持pH稳定。

[0091] 在下文中,使用稳定剂海藻糖二水合物或蔗糖,使所述制剂为等张的。

[0092] 使四种制剂(His/Gly 10/130 mM或50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,各自含有蔗糖或海藻糖二水合物和0.05% (w/v) 聚山梨醇酯80)经受三次应激测试:

1. 搅拌应激测试(在300 rpm和RT下24小时)
2. FTC-80°C(冷冻-解冻循环,在-80°C下):  
3x冷冻和解冻(>2h),在室温下(>2h)
3. FTC-20°C(冷冻-解冻循环,在-20°C下):  
3x冷冻和解冻(>2h),在室温下(>2h)。

[0093] 随后,已研究所述制剂的BAY 1213790的稳定性的变化,其包括视觉图像,蛋白回收率(C<sub>蛋白</sub>),SEC (HMW,单体,LMW),CGE,未还原的(1H1L、2H、2H1L和IgG)和DLS(中值)。

[0094] 表6a:制备之后和搅拌应激之后的制剂

His/Gly: 10 mM组氨酸,130 mM甘氨酸,0.05% (w/v) 聚山梨醇酯80,pH 6和5% (w/v) 海藻糖二水合物或5% (w/v) 蔗糖

PO<sub>4</sub>: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.05% (w/v) 聚山梨醇酯80,pH 6和5% (w/v) 海藻糖二水合物或5% (w/v) 蔗糖

所有制剂都包含25 mg/ml BAY1213790

为了简化,下表中使用以下赋形剂缩写:Tre =海藻糖二水合物;Suc =蔗糖;Mono = 单体;Vis =视觉测试;CGE分析:2H =由两条重链构成的片段;2H1L =由两条重链和一条轻链构成的片段。(使用来自Horiba的LB-550测量DLS值)

样品	C <sub>蛋白</sub> [%]	HMW [%]	Mono [%]	LMW [%]	1H1L [%]	2H [%]	2H1L [%]	IgG [%]	DLS [nm]	Vis
生产之后										
His/Gly, Tre	-	1.05	97.92	1.03	0.18	0.42	2.39	96.18	24	好的
His/Gly, Suc	-	1.03	97.92	1.05	0.18	0.37	2.50	96.13	21	好的
PO <sub>4</sub> , Tre	-	1.26	97.58	1.12	0.18	0.43	2.59	95.91	27	好的
PO <sub>4</sub> , Suc	-	1.29	97.63	1.08	0.19	0.41	2.72	95.81	28	好的
搅拌应激之后										
His/Gly, Tre	101.9	0.99	98.01	1.00	0.13	0.30	2.49	96.51	25	好的
His/Gly, Suc	102.2	0.93	98.11	0.96	0.17	0.28	2.99	95.73	24	好的
PO <sub>4</sub> , Tre	100.6	1.27	97.68	1.05	0.17	0.31	2.95	95.74	29	好的
PO <sub>4</sub> , Suc	99.2	1.30	97.71	0.99	0.17	0.34	3.13	95.52	30	好的

[0095] 表6b. FTC之后的制剂

His/Gly: 10 mM组氨酸, 130 mM甘氨酸, 0.05% (w/v) 聚山梨醇酯80, pH 6和5% (w/v) 海藻糖二水合物或5% (w/v) 蔗糖

PO<sub>4</sub>: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% (w/v) 聚山梨醇酯80, pH 6和5% (w/v) 海藻糖二水合物或5% (w/v) 蔗糖

所有制剂都包含25 mg/ml BAY1213790

为了简化, 下表中使用以下赋形剂缩写: Tre =海藻糖二水合物; Suc =蔗糖; Mono = 单体; Vis =视觉测试; CGE分析: 2H =由两条重链构成的片段; 2H1L =由两条重链和一条轻链构成的片段。(使用来自Horiba的LB-550测量DLS值)

样品	C <sub>蛋白</sub> [%]	HMW [%]	Mono [%]	LMW [%]	1H1L [%]	2H [%]	2H1L [%]	IgG [%]	DLS [nm]	Vis
FTC -80℃之后										
His/Gly, Tre	100.4	0.97	97.67	1.36	0.16	0.31	2.56	96.1 9	26	好的
His/Gly, Suc	102.2	0.98	97.95	1.08	0.20	0.33	2.78	96.4 8	25	好的
PO <sub>4</sub> , Tre	100.2	1.26	97.71	1.03	0.19	0.36	2.89	95.6 7	29	好的
PO <sub>4</sub> , Suc	99.9	1.28	97.73	0.99	0.19	0.29	2.97	95.6 9	28	好的
FTC -20℃之后										
His/Gly, Tre	100.7	0.98	97.94	1.08	0.22	-	2.37	96.6 7	23	好的
His/Gly, Suc	101.6	0.99	97.97	1.04	0.18	-	2.85	96.0 2	23	好的
PO <sub>4</sub> , Tre	100.0	1.27	97.65	1.09	0.16	0.31	2.80	96.0 8	29	好的
PO <sub>4</sub> , Suc	99.5	1.28	97.67	1.05	0.18	0.30	2.82	95.8 5	28	好的

[0096] 下面用各种稳定剂(海藻糖二水合物和蔗糖)研究遇到的效果(DLS大小变化)。

[0097] 为此目的,实施与上述类似的测试;然而,应当注意,由于时间的差异,存在起始材料的一些差异或已使用其他/新的分析设备。

[0098] 表7:起始材料,FTC(-20℃),以蔗糖作为稳定剂(使用来自Malvern的Zetasizer Nano-ZS测量DLS值)

所有样品都包含:25 mg/mL BAY 1213790,0.05% (w/v)聚山梨醇酯80,5% (w/v)蔗糖,且pH为6

样品	浑浊度 [NTU]	DLS [nm]	视觉上
起始材料			
<b>5 mM 组氨酸, 200 mM 甘氨酸</b>	7.61	16.42	好的
<b>10 mM 组氨酸, 130 mM 甘氨酸</b>	7.81	16.64	好的
<b>30 mM 组氨酸, 100 mM 甘氨酸</b>	9.87	18.51	好的
<b>50 mM 组氨酸, 50 mM 甘氨酸</b>	10.1	19.17	好的
<b>50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	10.1	20.24	好的
FTC (-20°C)之后			
<b>5 mM 组氨酸, 200 mM 甘氨酸</b>	7.45	16.41	好的
<b>10 mM 组氨酸, 130 mM 甘氨酸</b>	7.47	16.23	好的
<b>30 mM 组氨酸, 100 mM 甘氨酸</b>	10.5	18.35	好的
<b>50 mM 组氨酸, 50 mM 甘氨酸</b>	9.72	19.22	好的
<b>50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	10.5	19.57	好的

[0099] 表8:起始材料, FTC (-20°C), 以海藻糖二水合物作为稳定剂 (使用来自Malvern的Zetasizer Nano-ZS测量DLS值)。所有样品都包含: 25 mg/mL BAY 1213790, 0.05% (w/v) 聚山梨醇酯80, 5% (w/v) 海藻糖二水合物, 且pH为6

样品	浑浊度 [NTU]	DLS [nm]	视觉上
起始材料			
<b>5 mM 组氨酸, 200 mM 甘氨酸</b>	7.28	16.49	好的
<b>10 mM 组氨酸, 130 mM 甘氨酸</b>	9.44	17.45	好的
<b>30 mM 组氨酸, 100 mM 甘氨酸</b>	8.62	18.39	好的
<b>50 mM 组氨酸, 50 mM 甘氨酸</b>	8.98	18.97	好的
<b>50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	10.1	20.28	好的
FTC (-20°C)之后			
<b>5 mM 组氨酸, 200 mM 甘氨酸</b>	11.7	16.39	好的
<b>10 mM 组氨酸, 130 mM 甘氨酸</b>	10.8	17.46	好的
<b>30 mM 组氨酸, 100 mM 甘氨酸</b>	9.36	18.30	好的
<b>50 mM 组氨酸, 50 mM 甘氨酸</b>	10.5	19.00	好的
<b>50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	13.0	20.70	好的

#### [0100] 粘度

制剂的粘度是浓度依赖性的,并且取决于蛋白浓度,在1.14 mPa\*s (10 mg/mL BAY 1213790)和2.25 mPa\*s (40 mg/mL BAY 1213790)之间。对于测试,仅改变蛋白浓度,而制剂的其他成分未被改变(pH 6的10/130 mM组氨酸/甘氨酸,5% (w/v)海藻糖二水合物和0.05% (w/v)聚山梨醇酯80)。

## [0101] 冷冻-干燥

将25 mg/mL BAY 1213790配制于含有5% (w/v)海藻糖二水合物和0.05% (w/v)聚山梨醇酯80的pH 6的10 mM组氨酸/130 mM甘氨酸缓冲液(10/130 His/Gly)中。随后用表9中所述的冷冻-干燥循环冻干制剂。

[0102] 表9:制剂(10/130 His/Gly、5% (w/v)海藻糖二水合物、0.05% (w/v)聚山梨醇酯80 (pH 6)中的25 mg/mL BAY 1213790)的冷冻-干燥循环

设定表面温度 [°C]	时间 [min]	真空 [微巴]
冷冻阶段		
-5	30	-
-5	60	-
-45	40	-
-45	210	-
初次干燥		
-45	60	100
-10	60	100
-10	3500	100
二次干燥		
40	60	40
40	720	40

[0103] 在冷冻-干燥之后,将小瓶储存在2-8°C。表10显示在储存36个月之前和之后冻干制剂的稳定性数据。

[0104] 还测量0和36个月之间的另外的时间点,并且所有数据在这里也都在规格内。来自表10的以下数据证实,选择的制剂可以冻干,并且随后甚至稳定3年的时段。

[0105] 表10:冻干的制剂(10/130 His/Gly、5% (w/v)海藻糖二水合物、0.05% (w/v)聚山梨醇酯80 (pH 6)中的25 mg/mL BAY 1213790)的稳定性数据

测试	规格	在 2-8℃ 下储存	
		t <sub>0</sub>	t = 36 个月
制剂	稳定的冻干物	符合	符合
颜色	白色至发白的饼	符合	符合
重构溶液的澄清度	澄清的或乳白色不强于 RS IV	<RSIII	<RSIII
pH	5.5 - 6.5	6.1	6.1
残余水分	最多 2.0%	0.6	0.5
可见颗粒	几乎不含可见颗粒	符合	符合
粒径 ≥ 25 μm (HIAC)	每个小瓶最多 600 个颗粒	3	3
粒径 ≥ 10 μm (HIAC)	每个小瓶最多 6000 个颗粒	62	64
IgG 纯度(CGE 非红色, 主峰)	最少 90%	99	99
IgG 纯度(CGE 红色, HC + LC 之和)	最少 95%	98	99
纯度(SEC-HPLC), 单体级分	最少 93%	98	96
蛋白浓度 (UV/VIS)	22.5 - 27.5 mg/mL	25	24.7
相对于参考的活性(生物测定)	60-140%	104	101
相对于参考的活性 (Biacore <sup>a</sup> /ELISA <sup>b</sup> )	50-150%	108 <sup>a</sup>	104 <sup>b</sup>

[0106] 结论:

由于目前的结果,选择pH 6.0的10 mM组氨酸/130 mM甘氨酸缓冲系统,其具有足够的缓冲能力,在压力测试期间已显示最佳的稳定效果。

[0107] 尽管未应激样品在不同制剂中具有相似的稳定性特征,但在应激样品中展示关于以下在组氨酸-甘氨酸系统和其他制剂之间的明显差异:

- 蛋白构象 (DLS)
- 分子间相互作用 (A2值)
- 单体级分 (SEC)
- 可见颗粒 (视觉图像)。

[0108] 这显示pH 6的组氨酸/甘氨酸系统对BAY1213790抗体具有比其他系统更好的稳定作用。通过分析未应激样品无法预测这一点。

## 序列表

- <110> Bayer Pharma AG  
 <120> 用于FXIa抗体的新型稳定制剂  
 <130> BHC161051  
 <160> 2  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 抗FXIa抗体BAY1213790的重链  
 <400> 1

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Tyr
           20           25           30
Gly Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ser Gly Ile Gly Pro Ser Gly Gly Ser Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
           50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Thr Arg Gly Gly Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
           100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
           115          120          125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
           130          135          140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145          150          155          160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
           165          170          175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
           180          185          190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
  
```

195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp	Lys Lys Val Glu	Pro Lys Ser Cys Asp
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro	Cys Pro Ala Pro	Glu Leu Leu Gly Gly
225	230	235
240	245	250
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	Lys Pro Lys Asp Thr	Leu Met Ile
255	260	265
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr	Cys Val Val Val Asp	Val Ser His Glu
270	275	280
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn	Trp Tyr Val Asp Gly	Val Glu Val His
285	290	295
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg	Glu Glu Gln Tyr Asn	Ser Thr Tyr Arg
300	305	310
Val Val Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp Trp	Leu Asn Gly Lys
315	320	325
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Ala Leu Pro	Ala Pro Ile Glu
330	335	340
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	Gly Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val Tyr
345	350	355
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp	Glu Leu Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu
360	365	370
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	Tyr Pro Ser Asp Ile	Ala Val Glu Trp
375	380	385
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu	Asn Asn Tyr Lys Thr	Thr Pro Pro Val
390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe	Phe Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp
405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly	Asn Val Phe Ser Cys	Ser Val Met His
420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr	Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro
435	440	445

Gly

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗FXIa抗体BAY1213790的轻链

&lt;400&gt; 2



第二维里系数

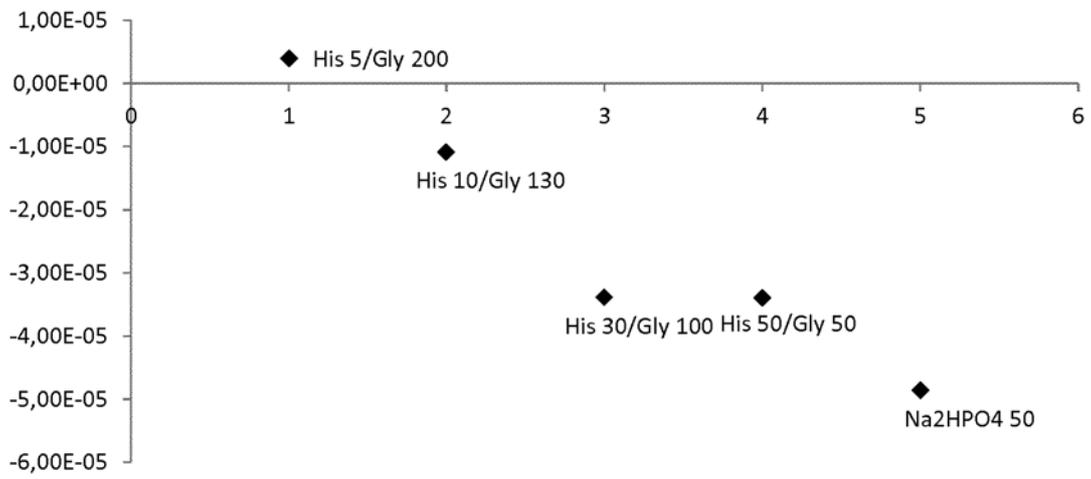


图 1