

包含人白介素-4 受体 α 的抗体的液体组合物

本专利申请请求 2019 年 3 月 13 日提交的中国专利申请 CN201910187179.9 的优先权权益，该中国专利申请 CN201910187179.9 在此通过引用全文并入本文。

技术领域

本发明涉及生物药物制剂领域，具体而言，本发明涉及一种稳定的包含高浓度抗体的液体制剂。

背景技术

已知人白细胞介素-4 受体可产生一种可溶形式的蛋白 (shIL-4R α)，这种可溶形式的蛋白可以抑制 IL-4 介导的细胞增殖和 T 细胞介导的 IL-5 上调。该受体的两种形式与过敏反应相关，其表现为过敏性鼻炎、鼻窦炎、哮喘或湿疹等病症。因此将该蛋白作为靶点的阻断抗体有助于治疗和缓解此类疾病。

目前针对 hIL-4R 靶点的单克隆抗体药物进入临床试验，如 Dupilumab，在治疗特应性皮炎的 II 期临床中表现出了较好疗效。但是，这类抗体药物的最佳给药方式是皮下注射，且发挥效应所需要的剂量较高，因此往往需要制备高浓度的制剂。然而，高浓度的抗体制剂常常伴有许多的困难。比如，这类制剂的粘度很高，在使用注射器抽吸和推打药物时很困难，药物在容器和针筒中的残留高造成给药剂量偏差大，且造成注射部位疼痛等等；此外，制剂的高粘度还会在其生产过程中带来严重的工艺问题，如浓缩和过滤的环节需要极高的压力，或者根本无法通过滤膜。再比如，制剂中的高浓度抗体蛋白极易发生聚集，造成制剂不稳定，易形成不溶微粒，增加药物免疫原性，增加药物副作用等。

因此，本领域尚需研发一种以人白细胞介素-4 受体为靶点的新型抗体制剂，以满足对高抗体浓度且长期稳定、无聚集、低粘度等的制造与临床应用需求。

发明内容

本发明的目的在于提供一种包含人白介素-4受体 α 的抗体的液体组合物及其制剂，该液体组合物及其制剂可以使抗体在较高浓度下稳定存在，并且具有低粘度。

本发明的技术方案如下。

- 5 一方面，本发明提供一种包含人白介素-4受体 α 的抗体的液体组合物，所述液体组合物包含浓度为50-200mg/ml的所述抗体；以及缓冲剂、保护剂和表面活性剂等作为辅料，并且所述液体组合物具有5.4-6.4的pH。

在所述液体组合物中，所述抗体包含轻链可变区（VL）和重链可变区（VH），所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 1所示的CDR1、SEQ ID NO: 2
10 所示的CDR2、SEQ ID NO: 3所示的CDR3，所述重链可变区包含SEQ ID NO: 5所示的CDR1、SEQ ID NO: 6所示的CDR2、SEQ ID NO: 7所示的CDR3；

优选地，所述抗体包含SEQ ID NO: 4所示的轻链可变区和SEQ ID NO: 8所示的重链可变区。

根据本发明的具体实施方式，所述抗体具有 κ 型的轻链恒定区（CL）和
15 γ 型的重链恒定区（CH）。进一步优选地，所述抗体包含SEQ ID NO: 9所示的轻链恒定区和SEQ ID NO: 10所示的重链恒定区。更优选地，所述抗体为单克隆抗体，包含两条轻链和两条重链。

SEQ ID NO: 1（LCDR1）：RASQSVSSSYLA；

SEQ ID NO: 2（LCDR2）：GASSRAT；

20 SEQ ID NO: 3（LCDR3）：QQYDHSAGWT；

SEQ ID NO: 4（VL）：

EIVLTQSPGTL~~SLSPGERATL~~SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLL
IYGGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHSAGWT
FGQGTKVEIK。

25 SEQ ID NO: 5（HCDR1）：RNAMEF；

SEQ ID NO: 6（HCDR2）：GIGTGGATSYADSVKGR；

SEQ ID NO: 7（HCDR3）：GRYYFDY；

SEQ ID NO: 8（VH）：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRNAMEFWVRQAPGKGLE
30 WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGRYYFDYWGQGTLLTVSS。

SEQ ID NO: 9 (CL):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC。

5 SEQ ID NO: 10 (CH):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
10 EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG。

SEQ ID NO: 11 (L):

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLL
15 IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHSAGWT
FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 12 (H):

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNAMFWVRQAPGKGLE
WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARGRYYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY
TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL
25 MISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

30 优选地，所述抗体的浓度为 100-200 mg/ml，优选 130-165 mg/ml，更优
选 150±5 mg/ml。

在所述液体组合物中，所述缓冲剂为选自醋酸盐、磷酸盐和氨基酸中的

一种或多种,所述缓冲剂的浓度为 5-50 mmol/L;优选地,所述缓冲剂为 5-50 mmol/L 的氨基酸。

优选地,所述醋酸盐为醋酸钠,所述磷酸盐为磷酸二氢钠,或者所述氨基酸为盐酸组氨酸;

5 优选地,所述缓冲剂的浓度为 5-20 mmol/L;

优选地,所述缓冲剂为 5-20 mmol/L 的盐酸组氨酸,更优选为 10 mmol/L 的盐酸组氨酸。

在所述液体组合物中,所述保护剂为选自糖、醇、氨基酸和氯化盐中的一种或多种,所述保护剂的浓度为 40-220 mmol/L。

10 优选地,所述保护剂为选自糖、醇和氨基酸中的一种或多种,所述保护剂的浓度为 40-220 mmol/L,和/或所述保护剂为氯化盐,所述保护剂的浓度为 40-150 mmol/L。

优选地,所述糖为海藻糖和/或蔗糖,浓度为 40-150 mmol/L,优选为 60-150 mmol/L;所述醇为甘露醇,浓度为 40-220 mol/L,优选为 110-150
15 mmol/L;所述氨基酸为选自脯氨酸、盐酸精氨酸和甘氨酸中的一种或多种,浓度为 40-220 mmol/L,优选为 120-220 mmol/L;或者所述氯化盐为氯化钠,浓度为 40-150 mmol/L,优选为 80-120 mmol/L。

更优选地,所述保护剂为海藻糖和氯化钠的组合,优选地,所述保护剂为 40-150 mmol/L 的海藻糖和 40-150 mmol/L 的氯化钠;优选地,在所述液体组合物中,所述保护剂为 60-150 mmol/L 的海藻糖和 80-120 mmol/L 的氯化钠,优选为 60 mmol/L 的海藻糖和 100 mmol/L 的氯化钠。
20

在所述液体组合物中,所述表面活性剂为非离子型聚合物,例如为选自吐温 80、吐温 20、泊洛沙姆和聚乙二醇中的一种或多种,所述表面活性剂的浓度为 0.01%-0.2%。

25 优选地,所述表面活性剂为 0.01%-0.03%的吐温 80,优选为 0.02%的吐温 80。

本发明提供的药物组合物为无色至淡黄色透明无菌溶液,略有乳光。经测定,渗透压为 230~330 mOsmol/kg,粘度<30cP, pH 6.2±0.2。

根据本发明的具体实施方式,所述液体组合物为注射制剂,适用于皮下注射和静脉注射,优选为皮下注射制剂或静脉注射制剂。
30

优选地,所述液体组合物包含:

130-165 mg/ml、优选 150 ± 5 mg/ml 的人白介素-4 受体 α 的抗体；

10 mmol/L 的盐酸组氨酸；

60 mmol/L 的海藻糖；

100 mmol/L 的氯化钠；

5 0.02%的吐温 80；

并且，所述液体组合物的 pH 为 6.2 ± 0.2 、优选 6.2 ± 0.05 。

本发明提供的制剂为无色或淡黄色的澄清无菌溶液，具有长期稳定性（2-8 摄氏度保存 2 年，满足质量标准），无聚集（ $\leq 10.0\%$ ）；且制剂粘度低（ < 30 cP），具有适合皮下注射使用的 pH 以及渗透压（290-310 mOsmol/kg）
10 等特点。具体参见表 14。

以上浓度均基于所述液体组合物或液体制剂的总体积或总重量计。在本文中，“液体制剂”可与“液体组合物”互换使用。

根据本发明的具体实施方式，所述液体组合物为皮下注射制剂，还包含无菌注射用水。

15 另一方面，本发明还提供所述液体组合物在制备用于治疗炎症或过敏性疾病中的用途；优选地，所述炎症或过敏性疾病包括自身免疫学疾病，例如过敏性皮炎、哮喘、嗜酸性粒细胞食管炎、湿疹、过敏性鼻炎、鼻息肉、类风湿性关节炎等。

还一方面，本发明提供其他相关产品。

20 一种容器，其包含本发明提供的液体组合物。例如，所述容器的规格为 2 mL/支的中硼硅玻璃管制注射剂瓶，其中所述液体组合物的灌装体积为大于 1 mL/支。

一种药盒，其包含本发明提供的容器；进一步地，所述药盒还包含说明书。

25 再一方面，本发明提供一种预防、治疗或改善受试者的炎症或过敏性疾病的方法，所述方法包括给有此需要的受试者施用本发明的所述液体组合物。优选地，所述受试者为哺乳类动物；更优选地，所述受试者为人。

优选地，所述炎症或过敏性疾病包括自身免疫学疾病，例如过敏性皮炎、哮喘、嗜酸性粒细胞食管炎、湿疹、过敏性鼻炎、鼻息肉、类风湿性关节炎
30 等。

本发明提供的所述液体组合物可以通过注射施用至受试者，例如通过皮下注射或静脉注射。

在预防、治疗或改善炎症或过敏性疾病时，还可以联合应用其他药物，例如所述方法还包括给受试者施用至少一种选自下述的药物：平喘药如沙丁胺醇等，抗组胺药如氯雷他定等，免疫抑制剂如他克莫司、吡美莫司等，M受体阻断剂如异丙托溴铵等，白三烯受体阻断药如孟鲁司特等，磷酸二酯酶抑制
5 剂如茶碱等，非甾体抗炎药如5-氨基水杨酸等，激素类如倍氯米松、布地奈德等。优选地，所述药物与本发明的液体组合物同时或顺序施用。

本发明针对人白介素-4受体 α 的抗体成功开发出了一种新型的液体组合物，为成药提供了基础。本发明提供的液体组合物含有高浓度的人白介素-4受体 α 的抗体，在用于皮下注射或静脉注射时，可提供高剂量的抗体，满足
10 给药需求，提高药物疗效。同时，该液体组合物在高抗体浓度无聚集的情况下具有相当低的粘度，易于通过细针头和针管递送，降低患者的不适感，同时易于生产和贮藏。并且，该液体组合物具有足够的物理和化学稳定性，不溶微粒含量在药典规定的范围($\geq 10\mu\text{m}$ 的颗粒 $\leq 6000/\text{支}$ ， $\geq 25\mu\text{m}$ 的颗粒 $\leq 600/\text{支}$)内，可反复冻融、耐振摇，且具有良好的热稳定性，满足成药要求。

15 测定了本发明提供的液体组合物对人白介素-4受体 α 的结合能力和阻断STAT-6信号传导的生物学活性。实验证明，本发明提供的液体组合物能够稳定、有效地结合IL-4R α 抗原，有效阻断STAT-6信号传导。

附图说明

20 以下，结合附图来详细说明本发明的实施方案，其中：

图1和图2显示了pH筛选时考察的制剂SEC纯度结果。

图3和图4显示了pH筛选时考察的制剂nrCE-SDS纯度结果。

图5和图6显示了pH筛选时考察的制剂rCE-SDS纯度结果。

图7和图8分别显示了pH筛选时考察的制剂CEX中性峰变化结果。

25 图9和图10分别显示了保护剂筛选时考察的制剂SEC纯度结果。

图11和图12分别显示了保护剂筛选时考察的制剂nrCE-SDS纯度结果。

图13和图14分别显示了保护剂筛选时考察的制剂rCE-SDS纯度结果。

图15和图16分别显示了保护剂筛选时考察的制剂CEX中性峰变化结果。

30 图17显示了保护剂筛选时考察的制剂粘度比较结果。

图18显示了无保护剂时考察的不同蛋白浓度下制剂粘度结果。

图19显示了CBP-201生物学活性检测结果。

实施发明的最佳方式

以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些实施例仅用于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

5 下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的药材原料、试剂材料等，如无特殊说明，均为市售购买产品。

下述实施例中的抗体代号为 CBP-201，其为单克隆抗体，具有 SEQ ID NO: 4 所示的轻链可变区，SEQ ID NO: 8 所示的重链可变区；SEQ ID NO: 9 所示的轻链恒定区，SEQ ID NO: 10 所示的重链恒定区；SEQ ID NO: 11 所示的轻链，SEQ ID NO: 12 所示的重链；与术语“蛋白”可互换使用。此外，
10 CBP-201 制剂可与 CBP-201 液体组合物互换使用。

其中，通用方法包括：

(1) pH 测定：

参照中国药典 2015 年版四部通则 0631 pH 值测定法。

15 (2) 40℃加速实验：

将制备好的测试样品放置于高温高湿条件下（40℃±2℃/75±5%RH）2 周或 4 周时间，进行稳定性研究，以考察制剂稳定性。

(3) 蛋白浓度检测：

使用紫外分光光度计消光系数(ε)法测定蛋白的浓度。根据 Lambert-Beer
20 定律，样品吸光度值为： $A = \epsilon \cdot C \cdot L / N$ ，式中：C 为样品中蛋白浓度，mg/mL；L 为光径，等于 1 cm；A 为吸光度值；ε 为消光系数；N 为样品稀释倍数。因此，样品中蛋白浓度计算公式为： $C = A / \epsilon \times N$ 。

另外，抗体理论消光系数计算公式为： ϵ 质量消光系数 = $(5500nw + 1490ny + 125nc) \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ，其中，nw 表示蛋白质氨基酸序列中 Trp 的数量；
25 ny 表示 Tyr 的数量；nc 表示 Cys 的数量；M 表示分子量；cm 为光程。

根据 CBP-201 抗体序列计算得到 ε 质量消光系数为 1.46。通过紫外分光光度计测量样品在 280nm 处的吸光度值 A，计算抗体的浓度。

(4) SEC 检测纯度：采用分子排阻色谱法（SEC-HPLC），色谱条件为：

色谱柱：TSKgel G3000SW_{XL} 7.8*300 mm column；

30 柱温：室温；

检测器：DAD 检测器；

检测波长：280nm；流速：0.7 mL/min；

样品稀释：用超纯水稀释至 5.0 mg/mL；

进样体积：10 μ l；

流动相：25mM 磷酸盐 (pH6.8 $\pm$ 0.1)，0.3M 氯化钠溶液；

5 洗脱方式：梯度洗脱

时间 (min)	D%	流速 (mL/min)
0	100	0.7
25	100	0.7

检测：按峰面积归一化法计算主峰、HMW 和 LMW 各组分峰面积百分比。

(5) nrCE-SDS 检测纯度：在非还原条件下，依据分子量大小，定量测定 CBP-201 的纯度。

10 检测：按面积归一化法计算，以 IgG 主峰的校正峰面积占所有校正峰面积之和的百分比计算主峰的纯度。

(6) rCE-SDS 检测纯度：

在还原条件下，依据分子量大小，定量测定 CBP-201 的纯度。

15 检测：按面积归一化法计算，以 LC、NGHC 和 HC 的校正峰面积分别占所有校正峰面积之和的百分比计算各自的纯度（即 CAP）。LC 与 HC 的纯度之和即为样品纯度。

(7) 检测电荷异质性（CEX 中性峰）：

20 参照中国药典 2015 年版三部通则 0514 离子色谱法。色谱柱为安捷伦 BiomAb NP5, PK, 4.6 $\times$ 250mm；色谱积分结果参照参比品，最高峰为主峰，在主峰保留时间之前积分的峰为酸性峰，在主峰保留时间之后积分的峰为碱性峰。

(8) DSC 检测：

25 DSC 热分析法（Differential Scanning Calorimeter），又称差示扫描量热法，通过差示扫描量热仪记录样品吸热或放热的速率，即热流率 dH/dt（单位毫焦/秒）为纵坐标，以温度 T 或时间 t 为横坐标，测定样品的相变温度，从而判断制剂的稳定性。

(9) 粘度检测：

使用 Brook Field 公司粘度计 DV2T 进行检测，方法参照中国药典 2015

年版四部通则 0633 粘度测定法-第三法（旋转粘度计测定法）。

（10）可见异物：

参照中国药典 2015 年版四部通则 0904 可见异物检查法-第一法（灯检法）。

5 （11）颗粒大小：

参照中国药典 2015 年版四部通则 0903 不溶性微粒检查法-第一法（光阻法）。

实施例 1 pH 值及缓冲剂

10 研究了 CBP-201 制剂的 pH 范围及缓冲剂。pH 选择 5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4 共 6 个点，缓冲剂选择醋酸钠、盐酸组氨酸、磷酸二氢钠，并添加氯化钠。将含 133.6mg/ml CBP-201 的以下蛋白溶液在 40℃进行加速实验考察，以确定适合的 pH 范围及缓冲剂（见表 1）。

表 1 pH 值与缓冲剂

编号	蛋白溶液	pH	配制体积
A	10mM NaAc 150mM NaCl	5.4	1L
B	10mM NaAc 150mM NaCl	5.6	1L
C	10mM His-HCl 150mM NaCl	5.8	3L
D	10mM His-HCl 150mM NaCl	6.5	1L
E	10mM NaH ₂ PO ₄ 150mM NaCl	6.4	1L

15 通过 40℃加速实验，检测外观、蛋白浓度、SEC 纯度、CE-SDS 纯度、电荷异质性、DSC、粘度项目。

外观检查结果：所有蛋白溶液外观均发白，且无可见异物。

蛋白浓度检测结果：蛋白浓度均在 133.6±5% mg/ml 范围内，且无明显升高、降低的趋势。

20 此外，就不同 pH 值条件下的蛋白溶液在 40℃加速 2W 后，获得以下结果：

1. SEC 纯度结果：见图 1 和图 2。发现 2W 后，SEC 纯度大小绝对值比较为：pH6.2>pH6.4>pH6.0>pH5.8>pH5.6>pH5.4（图 1）；另外，和 0h 相比，SEC 纯度下降相对幅度大小比较为：pH5.4>pH5.6>pH5.8>pH6.0>25 pH6.2>pH6.4（图 2）。

2. nrCE-SDS 结果：见图 3 和图 4。发现 2W 后，nrCE-SDS 纯度大小绝对值比较为：pH6.4>pH6.2>pH5.8>pH6.0>pH5.6>pH5.4（图 3）；另外，和 0h 相比，nrCE-SDS 纯度下降相对幅度大小比较为：pH5.4>pH5.6>pH6.0>pH5.8>pH6.2>pH6.4（图 4）。pH6.0 时，2W 后，nrCE-SDS 纯度为 97.5%，已能够保持在比较高的纯度，pH6.2 及 pH6.4 条件下时，nrCE-SDS 纯度更优于 pH6.0。

3. rCE-SDS 结果：见图 5 和图 6。发现 2W 后，rCE-SDS 纯度大小绝对值比较为：pH6.4>pH6.2>pH6.0>pH5.8>pH5.6=pH5.4（图 5）；另外，rCE-SDS 纯度下降相对幅度大小比较为：pH5.4=pH5.6>pH5.8>pH6.0>pH6.2>pH6.4（图 6）。

4. CEX 中性峰变化结果：见图 7 和图 8。发现 2W 后，CEX 中性峰占比大小比较为：pH6.4>pH6.2>pH5.6>pH6.0>pH5.8>pH5.4（图 7）；另外，发现 2W 后，CEX 中性峰占比变化（下降）相对幅度（和 0h 相比）大小比较为：pH5.8>pH5.6>pH5.4>pH6.0>pH6.2>pH6.4（图 8）。

5. DSC 结果：发现该 6 种 pH 及缓冲剂下的蛋白化学结构均较稳定，且没有显著性差异。

6. 粘度结果：比较不同缓冲剂下的蛋白溶液粘度数值，发现盐酸组氨酸体系和磷酸盐体系下的粘度相差较少，而且均低于醋酸盐体系下。盐酸组氨酸体系中蛋白溶液的粘度值在 $8.7 \pm 0.8\text{cP}$ 范围内，亦低于预期数值 20cP，而且 pH 愈高，粘度值愈低。

综合以上 SEC、nrCE-SDS、rCE-SDS、CEX、DSC、粘度检测结果，发现较高 pH 对蛋白的稳定作用更好，稳定作用大小比较为：pH6.4>pH6.2>pH6.0，即在酸碱条件 pH6.2±0.2 时能对蛋白起到良好的稳定作用。

实施例 2 保护剂

研究了 CBP-201 制剂合适的保护剂。在 pH6.0 时，加入海藻糖、蔗糖、甘露醇、脯氨酸、盐酸精氨酸、甘氨酸、氯化钠，用氯化钠组作为对照。将含 133.6 mg/ml CBP-201 的以下蛋白溶液在 40℃进行加速实验考察，确定适合的保护剂（见表 2）。

表 2 保护剂

编号	蛋白溶液
----	------

A	pH 6.0 10mmol/L His-HCl 0.13M Suc
B	pH 6.0 10mmol/L His-HCl 0.13M Tre
C	pH 6.0 10mmol/L His-HCl 0.13M Man
D	pH 6.0 10mmol/L His-HCl 0.22M Pro
E	pH 6.0 10mM His-HCl 0.128M Arg
F	pH 6.0 10mmol/L His-HCl 0.22M Gly
G	pH 6.0 10mmol/L His-HCl 0.12M NaCl

通过 40°C 加速实验，检测外观、蛋白浓度、SEC 纯度、CE-SDS 纯度、电荷异质性、粘度、DSC 项目。

外观检查结果：所有蛋白溶液外观均发白。

蛋白浓度检测结果：蛋白浓度均在 133.6±5% mg/ml 范围内。

5 此外，就不同保护剂条件下的蛋白溶液在 40°C 加速 2W 后，获得以下结果：

1. SEC 纯度结果：见图 9 和图 10。发现 2W 后，SEC 纯度大小绝对值比较为：Pro>Gly>Tre>Suc>Man>Arg>NaCl，含 NaCl 的蛋白溶液在加速 2W 时 SEC 纯度最低，为 95.3%，也可接受（图 9）；另外，和 0h 相比，
10 SEC 纯度下降幅度比较为：Arg>NaCl>Suc>Tre>Gly>Pro>Man，虽含 Arg 的蛋白溶液中蛋白 SEC 纯度下降相对幅度下降最大，为 3.04%，但是 40°C 加速 2W 后的 SEC 纯度为 95.4%，仍然可接受（图 10）。

2. nrCE-SDS 结果：见图 11 和图 12。发现 2W 后，nrCE-SDS 纯度大小比较为：Tre>NaCl>Suc>Gly>Man>Pro>Arg（图 11）；另外，和 0h 相比，
15 nrCE-SDS 纯度下降幅度比较为：Arg>Pro>Man>Gly>Suc>NaCl>Tre（图 12）。因此，40°C 加速 2W 后 nrCE-SDS 纯度基数保持在较高、且和 0h 相比下降幅度又较小的，其优先顺序可基本概括为：Tre>NaCl>Suc>Gly>Man>Pro>Arg。

3. rCE-SDS 结果：见图 13 和图 14。发现 2W 后，rCE-SDS 纯度大小比较为：Suc>Man=Tre>Pro>NaCl>Gly>Arg（图 13）；另外，和 0h 相比，
20 rCE-SDS 纯度下降幅度比较为：Arg>Gly>NaCl>Pro>Tre=Man>Suc（图 14）。因此，40°C 加速 2W 后 rCE-SDS 纯度基数保持在较高、且和 0h 相比下降幅度又较小的，其优先顺序可基本概括为：Suc>Man=Tre>Pro>NaCl>Gly>Arg。

4. CEX 中性峰变化结果：见图 15 和图 16。发现 2W 后，CEX 中性峰占比大小比较为：Tre>Pro>Suc>Man>Arg>NaCl>Gly（图 15）；另外，发现 2W 后，CEX 中性峰占比变化（下降）相对幅度（和 0h 相比）大小比较为：Gly>Man>Arg>NaCl>Pro>Suc（升高）>Tre（升高）（图 16）。从
- 5 以上两点得出，保持电荷稳定上，Tre 最优，Suc 次之，Pro、Man、Arg、NaCl、Gly 再次。
5. 粘度结果：见图 17。发现加入不同保护剂后，粘度大小比较为：Suc>Pro>Tre>Man>Gly>NaCl>Arg。
6. DSC 结果：含有 7 种保护剂的蛋白溶液的 Tm1 和 Tm2 值均可接受，
- 10 化学结构稳定性较好，而且相互比较无显著性差异。

实施例 3 只含有缓冲剂下的粘度

探究 CBP-201 在只含缓冲剂（pH6.0 10 mmol/L His-HCl）不含保护剂情况下的粘度随浓度变化情况，以判断各保护剂在降低制剂粘度方面的效果；

15 挑战最高浓缩浓度，并检测粘度，为制剂中蛋白浓度选择提供依据。本实施例的缓冲液中不含 NaCl，与前面含 NaCl 的实验进行对比。

用透析缓冲液（pH6.0 10mmol/L His-HCl）透析蛋白，将透析的蛋白分别浓缩到 71.23 mg/ml、89.04 mg/ml、106.85 mg/ml、133.56 mg/ml、>151.37 mg/ml（蛋白浓度检测），然后进行过滤。进行外观及粘度检测。实验结果见

20 表 3，图 18。

表 3 CBP-201 制剂的蛋白溶液外观及粘度检测结果

编号	蛋白浓度 (mg/ml)	外观	粘度 (cP) /温度 (°C)
1	75.15	发白，无可见异物	5.51/25.0
2	91.64	发白，无可见异物	11.01/24.8
3	108.79	发白，无可见异物	18.80/24.8
4	137.94	发白，无可见异物	50.33/24.7
5	164.08	发白，无可见异物	过滤后的蛋白溶液不足 0.5ml，未进行粘度检测

结果显示，蛋白浓度越高，蛋白溶液粘度越高；目标浓度为 133.6 mg/ml（实际蛋白浓度为 137.94 mg/ml）时的蛋白溶液粘度为 50.33cP，和实施例 2

中探索合适的保护剂时的粘度相比,只有含 Suc 的蛋白溶液粘度(为 68.75cP)超过了此数值,亦即在备选的 7 种保护剂中,只有 Suc 使蛋白溶液粘度增加,其余保护剂可不同程度地降低蛋白溶液粘度。所以从降低制剂粘度方面,优先选择的保护剂顺序是: Arg、NaCl、Gly、Man、Tre、Pro。

5

实施例 4 制剂中的成分组合

结合筛选实验结果,进行 CBP-201 制剂中的成分组合实验。蛋白溶液组成见表 4。

表 4 成分组合

编号	pH	His-HCl (mmol/L)	Tre (mmol/L)	NaCl (mmol/L)	Arg-HCl (mmol/L)	吐温 80 (w/v, %)
1	6.2	10	60	100	—	0.02
2	6.2	10	130	50	—	0.02
3	6.2	10	150	40	—	—
4	6.2	10	150	40	—	0.02
5	6.2	10	150	40	—	0.2
6	6.2	10	150	—	46	0.02
7	6.0	10	150	40	—	0.02
8	6.0	10	—	150	—	—
9	6.4	10	150	40	—	0.02

10 各蛋白溶液含 133.6 mg/ml CBP-201,在 4℃、40℃进行加速实验考察。通过 4℃、40℃加速检测可见异物、颗粒大小 (MFI/FLOWCAM)、蛋白浓度、SEC 纯度、DSC、渗透压、粘度、CE-SDS、CEX 项目,得到结果见表 5-表 11。

表 5 外观检测结果

编号	外观描述			
	0h	4℃ 2W	40℃ 2W	40℃ 4W
1	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物
2	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物
3	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物

4	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物
5	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物
6	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物
7	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物
8	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物
9	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物	发白, 无可见异物

表 6 蛋白浓度检测

编号	蛋白浓度 (mg/ml)			
	0h	4°C 2W	40°C 2W	40°C 4W
1	139.97	134.05	135.59	138.93
2	139.51	132.49	137.18	130.11
3	139.56	141.48	134.85	127.78
4	135.21	130.58	139.75	136.38
5	138.33	136.71	131.56	134.96
6	136.38	140.82	134.41	139.64
7	129.56	137.26	134.91	139.01
8	139.70	130.22	139.39	133.72
9	139.81	133.31	130.61	138.55

根据外观和蛋白浓度结果可知, 4°C下放置 2 周与 40°C下放置 4 周, 编号 1 至 9 成分组合的蛋白溶液中, 蛋白浓度均没有显著下降, 样品外观均颜色发白, 这与蛋白溶液浓度高和自身性质相关。所以从外观和蛋白浓度结果, 5 编号 1 至 9 的成分组合可以接受。

表 7 SEC 纯度

编号	SEC 纯度 (%)			
	0h	4°C 2W	40°C 2W	40°C 4W
1	98.7	98.5	97.9	95.3; HMW=2.0; LMW=2.6
2	97.4	96.8	97.3	94.8; HMW=2.0; LMW=3.2
3	98.1	97.0	97.5	95.0; HMW=2.1; LMW=2.9

4	98.5	97.1	97.3	95.0; HMW=2.1; LMW=2.9
5	98.2	97.6	95.3	92.8; HMW=4.3; LMW=2.9
6	97.3	97.4	97.5	96.6; HMW=1.5; LMW=2.0
7	97.2	97.7	97.4	94.8; HMW=1.8; LMW=3.3
8	97.2	97.8	94.5	85.6; HMW=1.8; LMW=12.2
9	97.5	98.1	97.4	95.4; HMW=2.6; LMW=2.0

由表 7 中数据可知, 在 4℃放置 2 周时, 成分组合 2 的蛋白溶液的 SEC 纯度最低, 为 96.8%, 可接受。另外, 和 0h 相比, SEC 纯度下降幅度最大的是成分组合 4 的蛋白溶液, 降幅百分数为 1.44%, 但下降后的数值(97.1%)仍然可接受。所以在 4℃下放置 2 周, 成分组合 1 至 9 的蛋白溶液的 SEC 纯度均可接受。

在 40℃下放置 4 周时, 成分组合 5 和 8 的蛋白溶液的 SEC 纯度值低, 且此两种成分组合的蛋白溶液的 SEC 纯度下降相对幅度(与 0h 相比)也较高, 不可接受。其余成分组合的蛋白溶液在 40℃放置 4 周时, SEC 纯度值大小比较为: 成分组合 6>成分组合 9>成分组合 1>成分组合 3>成分组合 4>成分组合 2>成分组合 7, 关于 SEC 纯度下降相对幅度, 成分组合 6 的蛋白溶液下降相对值较小, 其余 6 个成分组合的蛋白溶液下降相对值相当(保持在 1.5%左右), 还可接受。

表 8 CE-SDS 纯度

编号	CE-SDS 类型	CE-SDS 纯度			
		0h	4℃ 2W	40℃ 2W	40℃ 4W
1	非还原	100.0	100.0	99.0	92.4
	还原 (HC+LC)	HC+LC=99.4 NGHC=0.7	HC+LC=99.4 NGHC=0.6	HC+LC=98.5 NGHC=0.4	HC+LC=97.3 NGHC=0.3
2	非还原	100.0	99.7	99.4	94.9
	还原 (HC+LC)	HC+LC=99.3 NGHC=0.7	HC+LC=99.4 NGHC=0.6	HC+LC=98.3 NGHC=0.4	HC+LC=97.5 NGHC=0.5
3	非还原	100.0	100.0	99.4	94.8
	还原 (HC+LC)	HC+LC=99.3	HC+LC=99.4	HC+LC=98.2	HC+LC=97.8

		NGHC=0.7	NGHC=0.6	NGHC=0.5	NGHC=0.6
4	非还原	100.0	100.0	99.5	95.4
	还原 (HC+LC)	HC+LC=99.3 NGHC=0.7	HC+LC=99.4 NGHC=0.6	HC+LC=98.4 NGHC=0.5	HC+LC=97.5 NGHC=0.6
5	非还原	100.0	100.0	98.7	94.9
	还原 (HC+LC)	HC+LC=99.4 NGHC=0.6	HC+LC=99.4 NGHC=0.6	HC+LC=98.5 NGHC=0.5	HC+LC=97.1 NGHC=0.6
6	非还原	100.0	100.0	99.6	94.5
	还原 (HC+LC)	HC+LC=99.4 NGHC=0.6	HC+LC=99.4 NGHC=0.6	HC+LC=99.2 NGHC=0.5	HC+LC=97.1 NGHC=0.5
7	非还原	100.0	99.9	97.9	89.9
	还原 (HC+LC)	HC+LC=99.3 NGHC=0.7	HC+LC=99.4 NGHC=0.6	HC+LC=98.0 NGHC=0.5	HC+LC=96.6 NGHC=0.4
8	非还原	100.0	99.9	95.9	88.1
	还原 (HC+LC)	HC+LC=99.4 NGHC=0.6	HC+LC=99.4 NGHC=0.6	HC+LC=97.7 NGHC=0.4	HC+LC=96.6 NGHC=0.0
9	非还原	100.0	100.0	99.5	97.0
	还原 (HC+LC)	HC+LC=99.4 NGHC=0.6	HC+LC=99.4 NGHC=0.6	HC+LC=98.8 NGHC=0.6	HC+LC=98.2 NGHC=0.8

由表 8 中数据可知, 4°C 下放置 2 周, 在 9 个成分组合的蛋白溶液中, nrCE-SDS 最小值为 99.7%, 即 9 个成分组合的蛋白溶液在 4°C 下放置 2 周均可保持蛋白的稳定。此外, 在 4°C 下放置 2 周, 和 0h 相比, HC+LC (rCE-SDS) 的数值基本没有变化, 即成分组合 1 至 9 的蛋白溶液中蛋白在此条件下还比较稳定。

在 40°C 下放置 4 周, 成分组合 8、7 的蛋白溶液的 nrCE-SDS 纯度均较低, 且下降相对幅度 (和 0h 相比) 均较大, 不可接受。剩余成分组合的蛋白溶液中, 除成分组合 1 的 nrCE-SDS 纯度为 92.4% 以外, 其余的 nrCE-SDS 纯度均大于 94.0%, 且相对下降幅度 (和 0h 比较) 基本维持在 5%, 也可接受。

同时, 在 40°C 下放置 4 周, 各成分组合的蛋白溶液 rCE-SDS 纯度的大小比较为: 成分组合 9 > 成分组合 3 > 成分组合 2 = 成分组合 4 > 成分组合 1

- 5 >成分组合 6=成分组合 5>成分组合 7=成分组合 8, 纯度最小值来自成分组合 7 和 8 的蛋白溶液, 为 96.6%; 此外, 和 0h 相比, 成分组合 7 和 8 的蛋白溶液的下降相对幅度也比其它成分组合的蛋白溶液大, 但是数值约为 3%, 所以成分组合 1 至 9 的蛋白溶液中蛋白在 40°C 下放置 4 周后 rCE-SDS 纯度均可接受。

表 9 电荷异质性

编号	带电性质	电荷异质性 (酸性、中性、碱性成分占比%)			
		0h	4°C 2W	40°C 2W	40°C 4W
1	酸性	9.7	10.0	8.0	25.3
	中性	89.9	89.0	90.0	69.9
	碱性	0.5	1.1	2.0	4.8
2	酸性	9.8	10.0	7.6	25.0
	中性	89.4	89.5	89.6	71.1
	碱性	0.8	0.5	2.9	3.9
3	酸性	10.1	10.1	8.0	26.3
	中性	89.5	89.2	90.0	70.2
	碱性	0.4	0.7	2.0	3.5
4	酸性	10.2	10.1	7.9	24.7
	中性	88.6	89.3	89.5	68.2
	碱性	1.2	0.5	0.5	7.1
5	酸性	10.8	10.5	12.4	25.8
	中性	87.4	88.5	85.9	69.9
	碱性	1.8	0.9	1.7	4.3
6	酸性	10.2	10.0	7.9	25.7
	中性	87.2	88.7	90.8	70.2
	碱性	2.6	1.3	1.3	4.1
7	酸性	10.1	9.8	8.0	21.7
	中性	88.4	89.9	88.3	67.3
	碱性	1.5	0.2	3.6	11.0
8	酸性	10.4	9.9	7.2	28.7
	中性	88.8	88.6	87.0	69.8

	碱性	0.7	1.4	5.8	1.5
9	酸性	10.3	10.6	11.9	32.4
	中性	88.4	88.9	86.8	63.3
	碱性	1.3	0.5	1.4	4.3

由表 9 中数据可知,成分组合 1 至 9 的蛋白溶液在 4℃放置 2 周后,CEX 中性峰占比 (和 0h 比较) 出现了不同程度的降低和升高, 在降低的成分组合的蛋白溶液中, 成分组合 1 下降最大, 但数值为 89.0%, 下降百分比仅为 1%, 可接受。另一方面, 在 2 周时的 CEX 中性峰占比的数值中, 成分组合 5 的蛋白溶液的数值最小, 为 88.5%, 但是和 0h 比较, 成分组合 5 的蛋白溶液的中性峰是增加的, 亦可接受。

40℃放置 4 周后, 9 个成分组合的蛋白溶液中, CEX 中性峰占比均出现较大幅度的下降, 下降后的数值基本相当, 大部分维持在 70%±2%范围内, 其大小比较: 成分组合 2>3=6>1=5>8>4>9, 下降相对幅度最大的为成分组合 9 的蛋白溶液, 百分比是 39.7%, 其余的成分组合的蛋白溶液则保持在 30%±5%范围内。

表 10 DSC

编号	Tm1	Tm2
1	63.90327	74.50385
2	64.63635	74.06069
3	64.34447	75.93933
4	64.73612	74.34037
5	65.15704	74.74829
6	64.65687	74.68807
7	--	73.46957
8	62.28054	74.11718
9	62.21537	73.47579

由表 10 中数据可知, 除编号 7 的成分组合的蛋白溶液只有一个 Tm (与其他 8 组无显著性差异) 值外, 其余各组蛋白溶液的 Tm1 和 Tm2 值均可接受, 且相互之间无显著性差异。

表 11 粘度和渗透压 (0h)

编号	粘度 (cP) /温度 (℃)	渗透压 (Osmol/kg)
----	-----------------	----------------

1	7.96/24.5	0.301/0.299/0.299
2	10.73/25.2	0.279/0.278
3	25.64/25.1	0.290/0.290
4	15.27/25.4	0.297/0.304/0.298
5	14.33/24.7	0.291/0.309/0.297
6	11.69/24.9	0.323/0.322
7	15.20/25.0	0.311/0.313
8	11.16/25.5	0.319/0.321
9	17.47/25.2	0.298/0.289

由表 11 中数据可知，9 个成分组合的蛋白溶液均有不同程度的粘度降低，其粘度大小比较为：成分组合 1<2<8<6<5<7<4<9<3。成分组合 3、4、5 的蛋白溶液相比较，表明吐温 80 能够降低蛋白溶液粘度，但是降低的程度与吐温 80 的浓度并不呈线性关系，吐温 80 为 0.2% 时仅比 0.02% 的蛋白溶液粘度降低 0.94cP（百分数为 6.2%）。成分组合 4、7、9 的蛋白溶液相比较，成分组合 4 和 7 的蛋白溶液粘度相当，成分组合 9 的蛋白溶液粘度比成分组合 7 的蛋白溶液高 2.27cP(13.0%)，比成分组合 4 的蛋白溶液高 2.20cP（12.6%），表明 pH6.0、pH6.2 比 pH6.4 更容易使制剂粘度降低，选择 pH6.2 比较合理。成分组合 1、2、4 的蛋白溶液相比较，成分组合 4 的蛋白溶液的粘度比成分组合 2 的蛋白溶液高 29.7%，比成分组合 1 的蛋白溶液高 48.8%，即 NaCl 比 Tre 更能降低制剂粘度，但是在只含有 NaCl 时，蛋白则不容易稳定，所以 NaCl 和 Tre 需要分配得当。

实施例 5 海藻糖对制剂粘度的影响

制剂粘度 (1):

配制 CBP-201 抗体蛋白溶液，浓度 102.8mg/ml，缓冲液为 pH 6.2 10mmol/L His-HCl 40mmol/L NaCl，不含海藻糖，用超滤管浓缩蛋白至 133.6mg/ml、151.4mg/ml、>151.4mg/ml 3 个浓度，进行粘度测定，与含 Tre 的成分组合进行粘度对比。结果见表 12。

表 12 粘度检测结果

编号	目标蛋白浓度 (mg/ml)	实际蛋白浓度 (mg/ml)	粘度 (cP) /温度 (℃)
1	133.6	137.23	19.71/24.5

2	151.4	156.85	23.07/24.9
3	>151.4	173.36	33.88/25.2

由表 12 中数据可知，蛋白浓度的增高会造成粘度的上升，过浓缩时需要提前注意过浓缩的程度。137.23mg/ml 时的蛋白粘度为 19.71cP/24.5℃，相比于实施例 4 中的成分组合 3（比本实验组分多含有 Tre，粘度为 25.64cP/25.1℃）的蛋白溶液，表明 Tre 在此条件下会使制剂粘度升高。

5 制剂粘度 (2):

配制 CBP-201 抗体蛋白溶液，在透析缓冲液（pH 6.2 10mmol/L His-HCl 40mmol/L NaCl）中加入海藻糖（1×）150mmol/L，并采用切向流方式进行透析、浓缩，后进行 SEC 纯度和粘度检测，结果分别见表 13。

表 13 粘度检测结果

编号	实际蛋白浓度 (mg/mL)	粘度 (cP) /温度 (℃)
1	53.69	3.93/25.2
2	133.37	23.18/25.0
3	155.15	45.22/24.9

10 由 SEC 纯度检测结果可知，在透析浓缩过程中，SEC 纯度没有显著降低，说明此过程以及透析浓缩的方式基本不影响蛋白的 SEC 纯度。

在粘度检测结果中，蛋白浓度为 133.37 mg/ml 时的粘度为 23.18cP/25.0℃，此结果与实施例 4 中的成分组合 3 的蛋白溶液的结果（粘度为 25.64cP/25.1℃）基本相符，表明该实验可重复。蛋白浓度为 155.15 mg/ml
15 时的粘度为 45.22cP/24.9℃，比粘度 (1) 中 156.85 mg/ml 时（粘度为 23.07cP/24.9℃）高出 49.0%，显然 Tre 的加入提高了制剂粘度，所以在保证蛋白稳定的前提下酌量加入 Tre。

实施例 6 CBP-201 抗体制剂的生产

20 澄清过滤

细胞培养液先经过澄清过滤步骤去除细胞残片。膜包采用密理博公司的 MD0HC 和 MA1HC 型膜包，两者联合用于澄清过程中。膜包安装固定至夹具后，分别用注射用水和 PBS 缓冲液润洗。润洗结束后，进口端切换为细胞培养液，进口压力 0~20psi。进料结束后用 PBS 缓冲液冲洗膜包，，收
25 获所有料液。

亲和层析

首先将 MabSelect SuRe LX 填料填充到层析柱中，柱高为 18-22cm，并确保对称因子为 0.8-1.0，理论塔板数 ≥ 2000 塔板/m。首先用亲和平衡液（0.025 mol/L Tris, 0.10 mol/L NaCl, pH7.40 $\pm$ 0.20）平衡 4-6 个柱体积。将澄清后的细胞收获液上样。上样完毕用亲和平衡液平衡 3-4 个柱体积。然后用亲和冲洗液 1（0.025 mol/L Tris, 1.00 mol/L NaCl, pH7.40 $\pm$ 0.20）、亲和冲洗液 2（0.05 mol/L NaAc, pH5.50 $\pm$ 0.10）分别冲洗 2-3 个柱体积。冲洗完毕用亲和洗脱液（0.10 mol/L NaAc-HAc, pH3.60 $\pm$ 0.10）洗脱蛋白，当紫外吸收值升至 0.1000-0.1500 AU/5mm 时收集蛋白，当紫外吸收值降至 0.2000-0.3000 AU/5mm 时结束收集。

低 pH 病毒灭活

配制蛋白酸性滴定液（1.00 mol/L 醋酸）并调节亲和层析洗脱蛋白 pH 为 3.50-3.70，并在 20-25°C 环境中放置 2-3h。低 pH 病毒灭活处理结束后，用蛋白碱性滴定液（2.00 mol/L Tris）调节蛋白溶液至 5.40-5.60 并检测蛋白电导率，连接除菌过滤器将蛋白溶液过滤至一次性储液容器中，取样检测蛋白浓度、pH、电导率、细菌内毒素、SEC-HPLC、CEX-HPLC、CE-SDS、微生物限度。

阳离子交换层析

阳离子交换层析所采用的填料为 Capto S ImpAct，柱高为 18-22cm，并确保对称因子为 0.8-1.8，理论塔板数 ≥ 2000 N/m。用阳离子交换平衡液（0.05 mol/L NaAc, 0.05 mol/L NaCl, pH 5.50 $\pm$ 0.05）平衡层析柱 4-6 个柱体积。然后将蛋白溶液上样，上样完毕用阳离子交换平衡液平衡柱床 2-4 个柱体积。然后用阳离子交换冲洗液（0.05 mol/L NaAc, 0.08 mol/L NaCl, pH 5.50 $\pm$ 0.05）冲洗层析柱 5-7 个柱体积。冲洗完毕后，用阳离子交换洗脱液（0.05 mol/L NaAc, 0.22 mol/L NaCl, pH 5.50 $\pm$ 0.05）洗脱蛋白，当紫外吸收值升至 0.2000-0.3000 AU/5mm 时开始收集蛋白，当紫外吸收值降至 1.0000-1.5000 AU/5mm 时停止收集。

阴离子交换层析

阴离子交换层析所采用的填料为 POROS 50 HQ，柱高为 18-22cm，并确保对称因子为 0.8-1.8，理论塔板数 ≥ 2000 N/m。上样之前调节蛋白溶液 pH 为 7.35-7.45，并测量蛋白的电导率。之后将蛋白溶液用除菌过滤器（载

量 $\leq 3000 \text{ g/m}^2$) 过滤至一次性储液容器中。

纳滤

连接纳滤系统，首先用阴离子交换平衡液润洗预滤膜。润膜结束后将除菌过滤器串联至纳滤系统中，将蛋白进行纳滤，压力 28-32psi，操作时间

5 不超过 4h。

浓缩透析

膜包型号为 Sartocan cassette 30KD。首先组装超滤系统，测试膜包的完整性及水通量。完整性测试通过后，首先用透析缓冲液 (0.060 mol/L 海藻糖，0.010 mol/L 盐酸组氨酸，0.10 mol/L NaCl， $\text{pH}6.20 \pm 0.05$) 冲膜。冲膜

10 结束将纳滤后蛋白搅拌均匀后上样，将蛋白溶液浓缩至 40-60 mg/mL。透析结束后用 10-12 倍浓缩后蛋白体积的透析缓冲液进行透析。然后进行 2 步过度浓缩至蛋白浓度为 170-190 mg/mL。用透析缓冲液两次冲膜并收集冲膜液，每次冲膜体积约为 1.5 倍系统滞留体积，总冲膜量为 2-4 倍系统滞留体积。最终蛋白溶液的浓度为 140-180 mg/mL，测定蛋白浓度。

原液制备 (稀释、辅料添加)

用吐温 80 母液 (2%吐温 (w/v))，0.060 mol/L 海藻糖，0.010 mol/L 盐酸组氨酸，0.10 mol/L 氯化钠) 和透析缓冲液 (0.060 mol/L 海藻糖，0.010 mol/L 盐酸组氨酸，0.10 mol/L 氯化钠， $\text{pH}6.20 \pm 0.05$) 将蛋白溶液稀释至

15 $150 \pm 5 \text{ mg/mL}$ ，吐温 80 的终浓度 (w/v) 为 0.02%。将稀释好的蛋白溶液过

20 滤至一次性洁净容器中，过滤后的蛋白溶液即为原液。原液制备完成后，分装于 PETG 瓶中， $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ 保存。

制剂的制备

取原液于室温条件化冻并混匀，将半成品过滤。对胶塞、铝盖进行分装、灭菌，西林瓶清洗去热源后传入相应位置，进行灌装。灌装后的西林瓶进入

25 轧盖间，对全压塞后的西林瓶进行轧盖。之后逐瓶检查轧盖质量，剔除瓶内装量不准、萎缩、可见颗粒、异物、轧盖破损、空瓶。之后黏贴标签，将标签后成品放入包装盒中，在包装盒正上表面中央位置贴盒签。

放行标准和检测结果见表 14。

表 14 放行标准和检测结果

检查项目	放行标准	第一批	第二批
外观/颜色	应为无色或淡黄色液	无色澄明液体	淡黄色液体，浅于

检查项目	放行标准	第一批	第二批
	体, 不深于 Y4 号标准比色液		Y4 号标准比色液
澄清度	TBD	26.4 NTU	20.8 NTU
鉴别 (nrCE-SDS)	谱图应与参比品一致	谱图与参比品一致	谱图与参比品一致
鉴别 (rCE-SDS)	谱图应与参比品一致	谱图与参比品一致	谱图与参比品一致
鉴别 (pI-iCIEF)	主峰 pI 为 7.6~8.6, 谱图应与参比品一致 (与参比品主峰 pI 相差不大于 ± 0.200)	PI = 8.2, 与参比品一致	主峰 PI = 8.1, 谱图与参比品一致 (与参比品主峰 pI 相差 0.015)
不溶性微粒	每支 $\geq 10 \mu\text{m}$ 微粒不得超过 6000 粒 $\geq 25 \mu\text{m}$ 微粒不得超过 600 粒	$\geq 10 \mu\text{m}$: 10.0 粒/支 $\geq 25 \mu\text{m}$: 0.7 粒/支	$\geq 10 \mu\text{m}$: 35 粒/支 $\geq 25 \mu\text{m}$: 8 粒/支
可见异物	无明显可见异物	无细微可见异物	无明显可见异物
杂质 (聚集体) (SEC-HPLC)	HWM% $\leq 10.0\%$	0.4 %	2.2%
纯度 CEX	TBD	酸性峰 = 8.5% 碱性峰 = 1.7% 中性峰 = 89.8%	酸性峰 = 13.4% 碱性峰 = 1.7% 中性峰 = 84.9%
纯度 (nrCE-SDS)	主峰应 $\geq 90.0\%$	97.6%	95.6%
纯度 (rCE-SDS)	HC+LC $\geq 95.0\%$	HC+LC = 99.1%	HC+LC=98.9%
吐温 80 含量	TBD	0.19 mg/mL	0.13 mg/mL
纯度 (聚集体+降解) (SEC-HPLC)	主峰应 $\geq 90.0\%$	99.6%	97.8%
结合活性	相对结合活性在 50%~150%	99.3%	106%
生物学活性	相对细胞活性在 50%~150%	108.3%	107.1%
蛋白浓度	126.0~154.0 mg/mL	140.4 mg/mL	141.3 mg/mL
pH 值	5.9~6.5	6.2	6.2

检查项目	放行标准	第一批	第二批
装量	不少于 1 mL	供试品装量：1.16 mL；1.17 mL；1.17 mL，1.16 mL；1.16 mL	最大装量 1 mL 最小装量 1 mL 平均装量 1 mL
渗透压摩尔浓度	230~330 mOsmol/kg	290 mOsmol/kg	286 mOsmol/kg
无菌	应无菌生长	无菌生长	无菌生长
细菌内毒素	< 0.3 EU/mg 蛋白	< 0.1 EU/mg 蛋白	< 0.3 EU/mg 蛋白

实施例 7 CBP-201 抗体制剂的结合活性检测

采用间接 ELISA 法测定本发明的制剂对 sIL-4R α 抗原的结合能力。

- 将抗原（sIL-4R α ，根据序列 NM_000418.4 表达）包被吸附在 ELISA 固相载体吸附板上，洗涤，封闭后洗涤，加入待测样品与之结合，其中待测样品为按照本申请实施例 6 制备的制剂，使用 1% BSA 将制剂样品分别稀释至抗体浓度为 1000 ng/mL 后，按起始浓度 1000 ng/mL – 0 ng/mL 进行梯度稀释，孵育后洗涤去除未结合的抗体，加入酶标二抗，孵育后洗涤去除未结合的酶标二抗，再加入酶反应底物显色，最后加入反应终止液，于酶标仪上 450nm 和 655nm 处读取吸光值。根据其吸光值，用曲线拟合的方法计算出半数有效浓度 EC₅₀。

CBP-201 制剂的结合活性检测结果示例见表 15。

表 15 结合活性检测结果

实验编号	CBP-201 制剂批次 1 EC ₅₀ (ng/ml)	CBP-201 制剂批次 2 EC ₅₀ (ng/ml)
1	1.587	1.400
2	1.516	1.282
3	1.837	1.767
4	1.849	1.801
5	1.837	1.767
6	1.533	1.446
平均值	1.693	1.557

实施例 8 CBP-201 抗体制剂的生物学活性检测

使用 HEK Blue IL4/IL13 细胞（购自 Invivogen）测定 CBP-201 制剂阻断 STAT-6 信号传导的活性。

将 HEK Blue IL4/IL13 细胞铺在 384 孔细胞培养板上，加入待测样品，其中待测样品为按照本申请实施例 6 制备的制剂，使用含 10% FBS 的 DMEM 稀释至抗体浓度为 5000 ng/mL 后，按起始浓度 5000 ng/mL – 0 ng/mL 进行梯度稀释，再加入终浓度为 0.5 ng/mL 的 IL4（购自 Invivogen），在细胞培养箱中孵育 22 小时后，取上清加入 Quanti-blue 显色，于酶标仪上 650nm 处读取吸光值。根据其吸光值，用曲线拟合的方法计算出半数抑制浓度 IC50。

CBP-201 制剂的生物学活性检测结果示例见表 16 和图 19。

表 16 生物学活性检测结果

实验编号	CBP-201 制剂批次 1 IC50 (ng/ml)	CBP-201 制剂批次 2 IC50 (ng/ml)
1	3.283	3.339
2	3.637	4.276
3	3.373	4.657
4	5.379	6.339
5	4.154	4.062
6	5.331	4.407
平均值	4.193	4.513

使用 HEK Blue IL4/IL13 细胞检测成品 CBP-201 制剂的活性，两个批次 CBP-201 制剂的平均值分别为 4.193 ng/ml 和 4.513 ng/ml。

以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明，本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形，只要不脱离本发明的精神，均应属于本发明所附权利要求的范围。

权 利 要 求

1. 一种包含人白介素-4 受体 α 的抗体的液体组合物, 所述液体组合物包含浓度为 50-200 mg/ml 的所述抗体; 以及缓冲剂、保护剂和表面活性剂作为辅料, 并且所述液体组合物具有 5.4-6.4 的 pH。

2. 根据权利要求 1 所述的液体组合物, 其特征在于, 所述液体组合物中, 所述抗体包含轻链可变区和重链可变区, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 1 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 2 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 3 所示的 CDR3, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 6 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 7 所示的 CDR3;

优选地, 所述抗体包含 SEQ ID NO: 4 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO: 8 所示的重链可变区;

优选地, 所述抗体的浓度为 100-200 mg/ml, 优选 130-165 mg/ml, 更优选 150 $\pm$ 5 mg/ml。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的液体组合物, 其特征在于, 所述缓冲剂为选自醋酸盐、磷酸盐和氨基酸中的一种或多种, 所述缓冲剂的浓度为 5-50 mmol/L; 优选地, 所述缓冲剂为 5-50 mmol/L 的氨基酸。

4. 根据权利要求 3 所述的液体组合物, 其特征在于, 所述醋酸盐为醋酸钠, 所述磷酸盐为磷酸二氢钠, 或者所述氨基酸为盐酸组氨酸;

优选地, 所述缓冲剂的浓度为 5-20 mmol/L;

优选地, 所述缓冲剂为 5-20 mmol/L 的盐酸组氨酸, 更优选为 10 mmol/L 的盐酸组氨酸。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的液体组合物, 其特征在于, 所述保护剂为选自糖、醇、氨基酸和氯化盐中的一种或多种, 所述保护剂的浓度为 40-220 mmol/L。

6. 根据权利要求 5 所述的液体组合物, 其特征在于, 所述保护剂为选自糖、醇和氨基酸中的一种或多种, 所述保护剂的浓度为 40-220 mmol/L, 和/或所述保护剂为氯化盐, 所述保护剂的浓度为 40-150 mmol/L;

优选地, 所述糖为海藻糖和/或蔗糖, 浓度为 40-150 mmol/L, 优选为 60-150 mmol/L; 所述醇为甘露醇, 浓度为 40-220 mmol/L, 优选为 110-150 mmol/L; 所述氨基酸为选自脯氨酸、盐酸精氨酸和甘氨酸中的一种或多种,

浓度为 40-220 mmol/L, 优选为 120-220 mmol/L; 或者所述氯化盐为氯化钠, 浓度为 40-150 mmol/L, 优选为 80-120 mmol/L;

5 优选地, 所述保护剂为海藻糖和氯化钠的组合, 优选地, 所述保护剂为 40-150 mmol/L 的海藻糖和 40-150 mmol/L 的氯化钠; 更优选地, 在所述液体组合中, 所述保护剂为 60-150 mmol/L 的海藻糖和 80-120 mmol/L 的氯化钠, 优选为 60 mmol/L 的海藻糖和 100 mmol/L 的氯化钠。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的液体组合物, 其特征在于, 所述表面活性剂为非离子型聚合物, 例如为选自吐温 80、吐温 20、泊洛沙姆和聚乙二醇中的一种或多种, 所述表面活性剂的浓度为 0.01%-0.2%;

10 优选地, 所述表面活性剂为 0.01-0.03% 的吐温 80, 优选为 0.02% 的吐温 80。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的液体组合物, 其特征在于, 所述液体组合物为注射制剂, 优选为皮下注射制剂或静脉注射制剂;

优选地, 所述液体组合物包含:

15 130-165 mg/ml、优选 150±5 mg/ml 的所述抗体;

10 mmol/L 的盐酸组氨酸;

60 mmol/L 的海藻糖;

100 mmol/L 的氯化钠;

0.02% 的吐温 80;

20 并且, 所述液体组合物的 pH 为 6.2±0.2、优选 6.2±0.05。

9. 权利要求 1 至 8 中任一项所述的液体组合物在制备用于治疗炎症或过敏性疾病中的用途;

25 优选地, 所述炎症或过敏性疾病包括自身免疫学疾病, 例如过敏性皮炎、哮喘、嗜酸性粒细胞食管炎、湿疹、过敏性鼻炎、鼻息肉、类风湿性关节炎等。

10. 一种容器或包含其的药盒, 所述容器包含权利要求 1 至 8 中任一项所述的液体组合物。

30 11. 一种预防、治疗或改善受试者的炎症或过敏性疾病的方法, 所述方法包括给有此需要的受试者施用权利要求 1 至 8 中任一项所述的液体组合物;

优选地, 所述受试者为哺乳类动物, 更优选人;

优选地,所述炎症或过敏性疾病包括自身免疫学疾病,例如过敏性皮炎、哮喘、嗜酸性粒细胞食管炎、湿疹、过敏性鼻炎、鼻息肉、类风湿性关节炎等;

优选地,通过注射、例如通过皮下注射或静脉注射施用至所述受试者。