一种细胞程序性死亡受体 1 抗体制剂及其用途

本申请要求 2020 年 1 月 6 日提交的，题为“一种细胞程序性死亡受体 1 抗体制剂及其用途”的第 202010008058.6 号中国专利申请的优先权，该申请的内容整体援引加入本文。

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种细胞程序性死亡受体 1 (PD-1) 抗体制剂及其用途。

背景技术

细胞程序性死亡受体 1 (programmed death 1，PD-1)，也称 CD279，是一种重要的免疫抑制分子，属于免疫球蛋白超家族 CD28 家族成员，分子量为 50～55kD 的 I 型跨膜糖蛋白。PD-1 持续性表达在 T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞、单核细胞以及骨髓细胞的表面。PD-1 具有两个已知配体，PD-L1 和 PD-L2。目前，研究发现，PD-1 与其配体 PD-L1 结合，可以传导抑制性的信号，减低淋巴结 CD8+T 细胞的增生，而且 PD-1 还可以借由调节 Bcl-2 基因，控制淋巴结中抗原特异性 T 细胞的聚积。而阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合，可以有效阻止 T 淋巴细胞抑制信号的产生，从而打破免疫系统对自身组织的外周免疫耐受，促进 T 淋巴细胞的活化与增殖，以及细胞因子表达。因此研发新型的抗 PD-1 单克隆抗体，用于癌症的免疫治疗，使其具有更低的毒副作用，更佳的临床药效，成为目前的研究热点，也将给患者提供更多的药物选择。

蛋白质(单克隆抗体等)类药物制剂适合于非肠道给药，包括静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下注射等给药方式。其液体制剂使用方便，但稳定性较差，对储存条件要求较高，一般需在低温条件下保存。此外液体制剂中蛋白易形成聚体或颗粒，也会导致单抗制剂稳定性下降。通常的药物制剂中，包含的蛋白质特别是单克隆抗体类药物，很难在储藏期内，尤其非冷藏条件下保持良好的物理稳定性、化学稳定性和生物稳定性，因此需要研究针对此类药物的稳定缓冲液体系。已有报道可在蛋白(单抗)类药物中加入的稳

定剂包括表面活性剂、糖和多元醇、盐类、氨基酸/氨基酸盐以及一些大分子化合物。但是抗体类药物的结构性质各异且易于聚合，目前还缺乏满足制药工业需求的稳定的蛋白制剂。

发明内容

本发明的目的之一是提供一种包含抗 PD-1 单克隆抗体的药物制剂。

本发明通过筛选和配方优化研究，首先确定使用枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液作为抗 PD-1 单抗药物制剂的优选缓冲体系。具体地，该药物制剂包括抗 PD-1 单克隆抗体、缓冲液、稳定剂和表面活性剂、以及可选地包含等渗调节剂。

在经筛选的缓冲液体系基础上，设计单因素试验，考察蛋白质浓度、pH 值以及稳定剂种类及含量、表面活性剂种类及含量、是否添加等渗调节剂等因素对蛋白稳定性的影响。从而优化筛选得出优选的其他制剂组分。

在一些实施方案中，所述药物制剂包括：抗 PD-1 单克隆抗体、枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液、蛋白保护剂和表面活性剂。

所述药物制剂中抗 PD-1 单克隆抗体的含量较佳地为 5-50 mg/mL，更佳地为 8-30 mg/mL，优选地为 10.0 mg/mL。所述抗 PD-1 单克隆抗体可选地为具有 SEQ ID NO.7 所示的重链可变区和 SEQ ID NO.8 所示的轻链可变区。在优选的实施方案中，所述抗 PD-1 单克隆抗体为 h1G4 抗体，其包含 SEQ ID NO.10 所示的重链和 SEQ ID NO.9 所示的轻链。

在一具体实施方案中，所述药物制剂含有抗 PD-1 单克隆抗体 10 mg/ml，其中所述抗 PD-1 单克隆抗体是 h1G4 抗体，包含 SEQ ID NO.10 所示的重链和 SEQ ID NO.9 所示的轻链。

该制剂的缓冲液体系中，所述枸橼酸-枸橼酸钠的浓度较佳地为 10-50 mM，更佳地为 15-30 mM，优选地为 20 mM。在一实施方案中，所述枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液含量为 10-30 mM。

在一具体实施方案中，所述药物制剂含有 20 mmol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。

所述药物制剂的 pH 值较佳地为 pH 5.0-6.5。例如，pH 值可以为 5.0、5.5、6.0 或 6.5。优选地，所述药物制剂的 pH 值为 pH 5.5。

本发明制剂还添加蛋白保护剂提供产品的稳定性，选自本领域常规蛋白保护剂，所述蛋白保护剂能够保护蛋白质药物的稳定性，并保护蛋白质

药物的功能不受条件变化的影响(例如：冷冻、冻干或其他制备条件的变化)。蛋白保护剂较佳地包括：糖类、蛋白质、氨基酸、聚合物、盐、胺、表面活性剂等。更佳地，蛋白保护剂包括：蔗糖、甘露醇或甘氨酸中的一种或多种。在一实施方案中，所述蛋白保护剂选自蔗糖、甘氨酸和甘露醇中的一种或多种。在一具体实施方案中，蛋白保护剂为甘露醇、蔗糖或甘氨酸。

所述蛋白保护剂的含量较佳地为质量/体积百分比(g/L)0.5-5%。在又一实施方案中，蛋白保护剂含量为质量/体积百分比 1-5%，其中质量/体积比为 g/L。

在优选的实施方案中，蛋白保护剂选自蔗糖、甘氨酸和甘露醇中的一种或多种，其含量为质量/体积百分比 0.5-5%，其中质量/体积比为 g/L。

在一实施方案中，所述药物制剂含有质量/体积百分比为 1-3%的蔗糖。在又一实施方案中，所述药物制剂含有质量/体积百分比为 1%的甘氨酸。在一优选实施方案中，所述药物制剂含有质量/体积百分比为 3%的甘露醇。如上所述的质量/体积比为 g/L。本发明制剂可以包括表面活性剂，选自本领域常规表面活性作用剂，较佳地为非离子型表面活性剂。本文中的表面活性剂的例子较佳地包括：聚山梨酯(例如聚山梨酯 20 和聚山梨酯 80)；泊洛沙姆(例如泊洛沙姆 188)；Triton；十二烷基硫酸钠(SDS)；月桂基硫酸钠；辛基糖苷钠；月桂基-，肉豆蔻基-，亚油基-，或硬脂酰基-磺基甜菜碱；月桂基-，肉豆蔻基-，亚油基-，或硬脂酰基-肌氨酸；亚油基-，肉豆蔻基，或鲸蜡基-甜菜碱；月桂酰氨基丙基-，椰油酰氨基丙基-，亚油酰氨基丙基-，肉豆蔻酰氨基丙基-，棕榈酰氨基丙基-，或异硬脂酰氨基丙基-甜菜碱(例如月桂酰氨基丙基-甜菜碱)；肉豆蔻酰氨基丙基-，棕榈酰氨基丙基-，或异硬脂酰氨基丙基-二甲胺；甲基椰油基牛磺酸钠或甲基油基牛磺酸二钠；和 MONAQUATTM 系列(Mona Industries，Inc.，Paterson，N.J.)；聚乙二醇，聚丙二醇，及乙二醇和丙二醇共聚物(例如 Pluronics，PF68 等。在一些优选实施方案中，表面活性剂为聚山梨酯。更优选地，表面活性剂为聚山梨酯 80。

所述表面活性剂的含量较佳地为体积比 0.01%-0.05%。在一优选实施方案中，表面活性剂的含量为体积比 0.02%。

在一具体实施方案中，所述药物制剂含有体积百分比为 0.02%的聚山梨酯 80。

在一具体实施方案中，所述药物制剂包括：抗 PD-1 单克隆抗体、枸橼

酸-枸橼酸钠缓冲液、蛋白保护剂和表面活性剂，其中

所述枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液含量为 10-30 mM；

所述蛋白保护剂选自蔗糖、甘氨酸和甘露醇中的一种或多种，含量为质量/体积百分比 0.5-5%，其中质量/体积百分比为 g/L；

所述表面活性剂为聚山梨酯 80，含量为体积比 0.01%-0.05%；

所述抗 PD-1 单克隆抗体具有 SEQ ID NO.7 所示的重链可变区和 SEQ ID NO.8 所示的轻链可变区。

本发明的制剂中可以根据需要含有或不含有等渗调节剂，其中所述等渗调节剂为本领域常规等渗调节剂。在一优选实施方案中，等渗调节剂为氯化钠。在一实施方案中，等渗调节剂的含量为质量/体积百分比 0.1-0.5%，其中质量/体积比为 g/L。

在一具体实施方案中，所述药物制剂含有质量/体积百分比为 0.3%的氯化钠，其中质量/体积比为 g/L。

本发明对各个组分的制剂进行了 40℃，最长 4 周的高温加速试验，检测评价各制剂配方的稳定性数据，检测项目包括：外观、浓度、浊度(A350)、pH 值、渗透压、纯度(SEC-HPLC、CEX-HPLC)等测试。结合测试结果，分析得出最优的制剂配方。

在一具体实施方案中，所述药物制剂含有：抗 PD-1 单克隆抗体 10 mg/ml，20 mmol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液，质量/体积百分比为 3%的甘露醇，体积百分比为 0.02%的聚山梨酯 80，质量/体积百分比为 0.3%的氯化钠，pH 5.5，其中质量/体积比为 g/L。

在另一具体实施方案中，所述药物制剂含有：抗 PD-1 单克隆抗体 10 mg/ml，20 mmol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液，质量/体积百分比为 1-3%的蔗糖，体积百分比为 0.02%的聚山梨酯 80，质量/体积百分比为 0.3%的氯化钠，pH 5.5，其中质量/体积比为 g/L。

在又一具体实施方案中，所述药物制剂含有：抗 PD-1 单克隆抗体 10 mg/ml，20 mmol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液，质量/体积百分比为 1%的甘氨酸，体积百分比为 0.02%的聚山梨酯 80，质量/体积百分比为 0.3%的氯化钠，pH 5.5，其中质量/体积比为 g/L。

所述药物制剂的剂型可以为本领域常规剂型，较佳地包括注射用液体制剂或冻干制剂等等。所述注射用液体制剂较佳地包括皮下注射制剂、静脉注射制剂、腹腔给药制剂、肌肉注射制剂、静脉/皮下注射制剂或玻璃体

注射制剂等。所述注射用液体制剂较佳地包括水针注射制剂、预充针注射制剂等，优选地为水针注射制剂，该水针注射制剂可以用于静脉注射。因此，在又一方面，本发明还涉及所述药物制剂在制备注射用液体制剂或冻干制剂中的应用。

除非另有说明，本文所用的术语和短语具有下文所列的含义。特定的术语或短语在没有特别定义的情况下不应该认为是不确定的或不清楚的，而应该按照本领域技术人员通常理解的含义进行解释。当本文中出现商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。本文引用的每个文件(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、指引等)，无论是上文或下文，均整体援引加入本文。本文中的任何内容均不得解释为承认本发明无法享有在先申请的优先权。

本文提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如，“例如”)的使用仅为了更好地说明本发明，并且不对本发明的范围构成限制。

除非另有说明，否则任何数值，例如本文所述的浓度、浓度范围或含量，在任何情况下均应理解为由术语“约”修饰。因此，数值通常包括所述数值的±10%。例如，1 mg/mL 的浓度包括 0.9 mg/mL 至 1.1 mg/mL。同样，1%至 10% (w/v)的浓度范围包括 0.9% (w/v)至 11% (w/v)。如本文所用，除非上下文另外明确指出，否则数值范围的使用明确地包括所有可能的子范围，该范围内的所有单个数值，包括该范围内的整数以及数值的分数。

表述“包含”或与其同义的类似表述“包括”、“含有”和“具有”等是开放性的，不排除额外的未列举的元素、步骤或成分。表述“由…组成”或“由…构成”排除未指明的任何元素、步骤或成分。表述“基本上由…组成”指范围限制在指定的元素、步骤或成分，加上任选存在的不会实质上影响所要求保护的主题的基本和新的特征的元素、步骤或成分。应当理解，表述“包含”涵盖表述“基本上由…组成”和“由…组成”。

术语“可选”或“可选地”是指随后描述的事件或情况可能发生或可能不发生，该描述包括发生所述事件或情况和不发生所述事件或情况。例如，组合物可选地包含等渗调节剂涵盖包含或者不包含等渗调节剂的情况。

术语“药物制剂”指被施予需要治疗的患者的药品，其可以为固体或液体等形式(即“剂型”)，例如液体制剂(例如注射用液体制剂)、粉剂和冻干制剂等。

本发明的药物制剂经过高温加速测试，主要检测指标均无明显变化；

在 40℃条件下经过 4 周的加速处理，经检测表明，各项主要检测指标均无明显变化，较为稳定，且所有检测结果均符合本品现行质量标准要求，表现出良好的稳定性。

附图说明

图 1. h1G4 抗体制剂缓冲体系筛选研究加速稳定性试验(40℃)SEC 片段含量(%)柱状图。

图 2. h1G4 抗体制剂缓冲体系筛选研究加速稳定性试验(40℃)浊度柱状图。

具体实施方式

以下通过实施例对本发明进行进一步的详细说明，不应理解为对本发明的限制。

试剂来源：本发明的实验部分涉及的试剂均为市售产品。

实施例 1. 样品测试方法

1.1. 渗透压检测

移液器吸取 20 μl 样品及 2 份 290 mOsmol/kg 的渗透压标准品，采用 Advanced 2020 型渗透压仪测定样品及标准品的渗透压值。

1.2. SEC-HPLC

采用 Agilent 1260 高效液相色谱，TOSOH TSK G3000(300*7.8 mm)色谱柱分析样品，柱温为室温，流速 0.5 mL/min，检测波长 280 nm。流动相组成为 100 mM PB，0.5% NaCl，pH 6.8，供试样品用流动相稀释到 1.0 mg/mL 左右，进样 50 μL，停止时间 30 min。

1.3. CEX-HPLC

采用 Agilent 1260 高效液相色谱，Thermo ProPac WCX-10 色谱柱(4×250 mm)分析样品，柱温为 35℃，流速 1.0 mL/min，检测波长 280 nm，流动相洗脱梯度见表 1 所示。流动相 A 组成为 CX-1 Gradient buffer A，pH 5.6，流动相 B 组成为 CX-1 Gradient buffer B，pH 10.2，供试样品用流动相 A 稀释到 1.0 mg/mL 左右，进样 20 μL。

表 1. 流动相洗脱梯度

时间(min)	流动相 B%	流速(mL/min)
0.00	10.0	1.0
5.00	10.0	1.0
35.00	40.0	1.0
35.01	100.0	1.0
40.00	100.0	1.0
40.01	10.0	1.0
45.00	10.0	1.0

1.4. DSC

通过差示热量扫描方法测试供试品 Tm onset、Tm1 及 Tm2 值。样品扫描前需用安慰剂稀释至 1.0 mg/ml。

实施例 2. 抗体的制备

PD-1 抗体 h1G4 来源自专利申请 WO2018052818 中所公开的 h1G4，其制备方法完全引用 WO2018052818。PD-1 抗体 h1G4 的氨基酸序列如下：

表 2. h1G4 的 CDR 序列

LCDR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
h1G4	KASQDVTTAVA (SEQ ID NO:1)	WASTRHT (SE ID NO:2)	QQHYTIPWT (SEQ ID NO:3)
HCDR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
h1G4	FTFSNYGMS (SEQ ID NO:4)	TISGGGSNIY (SEQ ID NO:5)	VSYYYGIDF (SEQ ID NO:6)

h1G4	重链可变区(SEQ ID NO：7)	轻链可变区(SEQ ID NO:8)
抗体可变区序列	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG**FTFSNYGMS**WIRQAPGKGLEWVS**TISGGGSNIY**YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**VSYYYGIDF**WGQGTSVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQDVTTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASTRHT**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQHYTIPWT**FGGGTKLEIK

h1G4 抗体轻链(LC)SEQ ID NO：9

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRH
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTIPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

h1G4 抗体重链(HC)SEQ ID NO：10

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWIRQAPGKGLEWVSTISGG
GSNIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSYYYGIDFWGQGTS
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

实施例 3. 缓冲体系筛选研究

本研究选择了两组不同的制剂缓冲体系作为备选处方(以下分别称为B1~B6)，目标药物 h1G4 抗体浓度为 10.0 mg/mL。其中 B1~B3 为 20 mmol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲体系，pH 值分别为 5.0、5.5 及 6.0；B4~B6 为 20 mmol/L 组氨酸-组氨酸盐酸缓冲体系，pH 值分别为 5.0、5.5 及 6.0；上述缓冲体系中均含有 3%甘露醇、0.02%聚山梨酯 80 以及 0.3%氯化钠作为辅料，其中辅料浓度百分比均指代质量/体积比(w/v，g/L)。h1G4 抗体制剂缓冲体系筛选研究备选处方信息见表 3。

表 3. h1G4 抗体制剂备选缓冲体系组成

处方编号	处方代号	缓冲液种类及离子强度	pH 值	甘露醇含量(%)	氯化钠含量(%)	聚山梨酯 80 含量(%)
B1	C50	20 mmol/L 枸橼酸-枸橼酸钠	5.0	3	0.3	0.02
B2	C55		5.5	3	0.3	0.02
B3	C60		6.0	3	0.3	0.02
B4	H50	20 mmol/L 组氨酸-组氨酸盐酸	5.0	3	0.3	0.02
B5	H55		5.5	3	0.3	0.02
B6	H60		6.0	3	0.3	0.02

取适量抗体原液超滤换液，加辅料，调节浓度制备成如表 3 所示的处方。生物安全柜内采用 0.22 μm 一次性无菌过滤器过滤样品，无菌分装至 2 mL 西林瓶中，加 13 mm 胶塞，轧 13 mm 铝塑组合盖。将分装后样品放置于 40℃及 2~8℃的恒温药用保存箱内正置 2 周，于第 0、1、2 周分别取样，检测分析，测试项目详见表 4。

表 4. h1G4 抗体缓冲体系筛选研究考察条件

考察条件	检测时间点		
	0 周	1 周	2 周
40℃	X，Y	X	X
2~8℃		--	X
X = 外观、浓度、A_{350}、SEC-HPLC、CEX-HPLC、R-CE-SDS Y = 渗透压摩尔浓度、DSC；--表示该时间点未检测。			

研究结果

高温加速试验结果

0 周时除 20 mmol/L pH 5.0 的枸橼酸体系(C50)出现颗粒外，其余缓冲体系外观均为无色微乳光液体，无明显可见异物，浓度在 9~11 mg/mL 范围内，渗透压摩尔浓度为 300~340 mOsmol/kg。SEC 主峰含量均大于 99.0%，聚体含量为 0.6~0.7%。CEX 主峰含量为 47.0~48.6%，酸性峰含量为 11.0~14.3%，碱性峰含量为 38.6~40.9%，R-CE-SDS 纯度为 94.1~96.9%。基础理化检测结果显示 0 周时，各缓冲体系质量良好，无明显差异(见表 5)。

在 40℃加速条件下放置 2 周后，所有枸橼酸-枸橼酸钠缓冲体系蛋白浓度无明显变化，均在 9~11 mg/mL 范围内，但是组氨酸-组氨酸盐酸缓冲体系中浓度显著升高，并且 C50、C60 以及 H55 缓冲体系出现蛋白沉淀，组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲体系的浊度(A350：使用 NanoDrop 2000C，加样 2.5 μL，测定样品在 350 nm 波长下的吸光度值。重复测定三次取其均值为最终结果。)数值明显增加(见图 1 和图 2)，故缓冲体系优劣排序为 C55>C60>C50, H60>H55>H50。40 ± 2℃条件下放置 2 周通过 CE-SDS 测定发现重链含量降低 5.4~23.7%，纯度排序为 C55, H55, H50>H60>C50>C60。

40℃加速条件下放置 2 周，枸橼酸-枸橼酸钠缓冲体系 SEC 主峰含量降低 0.1~2.5%，聚体含量增加 0.1~0.4%，片段含量增加 0~2.1%。但是所有组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲体系均发生明显降解反应，因此枸橼酸-枸橼酸钠缓

冲体系优于组氨酸-组氨酸盐酸体系，最佳 pH 为 5.5。

表 5. h1G4 抗体缓冲体系筛选研究加速稳定性试验(40℃)数据汇总表

处方编号	处方代号	取样点	外观	浓度(mg/mL)	浊度 A_{350}	SEC-HPLC			CEX-HPLC			R-CE-SDS		
						主峰%	聚体%	片段%	主峰%	酸性峰%	碱性峰%	轻链%	重链%	纯度%
B1	C50	0	无色微乳光	9.8	0.008	99.3	0.7	0.0	47.0	13.8	39.2	31.1	65.8	96.9
		1 周	无色微乳光，有颗粒	9.7	0.048	99.0	0.9	0.1	43.5	26.7	29.8	N/A	N/A	N/A
		2 周	无色乳浊，蛋白沉淀	9.8	0.036	98.3	0.8	0.9	34.7	43.9	21.4	31.7	43.4	75.1
B2	C55	0	无色微乳光	10.1	0.002	99.4	0.7	0.0	47.7	13.4	39.0	30.3	66.1	96.4
		1 周	无色微乳光	10.5	0.011	99.1	0.8	0.1	47.7	15.1	37.1	N/A	N/A	N/A
		2 周	无色微乳浊	10.5	0.014	99.2	0.8	0.0	43.4	23.9	32.7	30.6	60.7	91.2
B3	C60	0	无色微乳光	9.9	0.002	99.4	0.7	0.0	47.1	14.3	38.6	30.4	63.7	94.1
		1 周	无色微乳光	10.0	0.012	99.0	0.9	0.1	41.2	33.1	25.7	N/A	N/A	N/A
		2 周	无色乳浊，蛋白沉淀	10.2	0.030	96.9	1.0	2.1	30.9	50.5	18.7	31.7	40.0	71.7
B4	H50	0	无色微乳光	9.5	0.001	99.3	0.7	0.0	48.6	11.0	40.4	30.4	65.1	95.4
		1 周	无色微乳浊	17.8	0.056	87.9	1.2	10.9	48.7	13.3	38.0	N/A	N/A	N/A
		2 周	无色乳浊，蛋白沉淀	43.0	0.081	17.8	0.1	82.1	47.8	11.7	40.5	39.3	52.0	91.3
B5	H55	0	无色微乳光	9.9	0.001	99.3	0.7	0.0	48.2	11.0	40.9	30.9	64.0	95.0
		1 周	无色微乳浊	14.4	0.043	94.0	1.0	5.0	47.3	14.2	38.5	N/A	N/A	N/A
		2 周	无色微乳浊	22.7	0.039	39.0	0.4	60.5	45.7	17.4	37.0	34.3	56.8	91.1
B6	H60	0	无色微乳光	10.2	-0.002	99.4	0.7	0.0	47.6	11.5	40.9	29.9	64.8	94.7
		1 周	无色微乳浊	12.4	0.030	98.0	0.9	1.1	46.6	16.4	37.0	N/A	N/A	N/A
		2 周	无色微乳浊	23.8	0.033	40.6	0.3	59.0	42.8	22.3	34.9	31.1	55.3	86.5

注：N/A 表示不适用。

实施例 4. 辅料筛选研究

本轮研究共 6 个备选处方(以下分别称为 F1~F6)，目标蛋白 h1G4 抗体浓度为 10.0 mg/mL。缓冲体系均为 20 mmol/L pH 5.5 的枸橼酸-枸橼酸钠溶液。除了处方 F3 不含氯化钠以外，其余处方中均含有 0.3%氯化钠、0.02%聚山梨酯 80，其中处方 F1、F2 和 F4 中甘露醇的含量分别为 1%、3%和 5%，单因素考察甘露醇含量对蛋白稳定性影响。对比处方 F2 (0.3% NaCl)及 F3 (0% NaCl)，考察氯化钠是否有助于增加蛋白的稳定性。F2、F5 和 F6 处方中分别含有等渗的 3%甘露醇、3%蔗糖以及 1%甘氨酸，筛选有助于 h1G4 抗体制剂长期稳定性的最优辅料体系。h1G4 抗体制剂辅料筛选研究备选处方信息见表 6。

表 6. h1G4 抗体制剂辅料筛选研究备选处方组成

处方编号	缓冲液种类及离子强度	pH值	稳定剂(%)	氯化钠含量(%)	聚山梨酯80含量(%)
F1	20 mmol/L 枸橼酸-枸橼酸钠	5.5	1%甘露醇	0.3	0.02
F2			3%甘露醇	0.3	0.02
F3			3%甘露醇	0.0	0.02
F4			5%甘露醇	0.3	0.02
F5			3%蔗糖	0.3	0.02
F6			1%甘氨酸	0.3	0.02

取适量原液超滤换液，加辅料，调节浓度制备成如表 6 所示的处方，生物安全柜内采用 0.22 μm 一次性无菌过滤器过滤样品，无菌分装至 2 mL 西林瓶中，加 13 mm 胶塞，轧 13 mm 铝塑组合盖。将分装后样品放置于 40℃及 2~8℃的恒温药用保存箱内正置 8 周。于第 0、1、2、4、6、8 周分别取样检测。

h1G4 抗体制剂辅料筛选研究单因素试验设计 6 个处方，根据 40℃加速稳定性试验结果以及辅料优劣排序(见表 7)，不含氯化钠的处方(F3)以及含有 5%甘露醇的处方(F4)稳定性略差，含有 1%甘露醇(F1)、3%甘露醇(F2)的处方与含有 3%蔗糖的处方(F5)无显著性差异。

表 7. h1G4 抗体制剂辅料筛选研究高温加速试验(40℃)数据汇总表

处方编号	取样点	外观	浓度 mg/mL	渗透压 mOsm/kg	A_{350}	SEC-HPLC			CEX-HPLC		
						主峰%	高聚体%	片段%	主峰%	酸性峰%	碱性峰%
F1	0	无色微乳光	10.3	207	0.029	96.6	3.4	0.0	39.2	26.6	34.3
	1周	无色微乳光	10.2	N/A	0.008	96.8	3.1	0.1	41.6	29.1	29.3
	2周	无色微乳光	10.3	206	0.008	96.3	3.5	0.2	36.7	33.5	29.8
	4周	无色微乳光	9.7	N/A	0.004	95.0	4.2	0.8	31.5	40.9	27.6
	6周	无色微乳光	10.6	N/A	0.008	94.8	4.2	0.9	25.0	47.4	27.6
	8周	无色微乳光	10.5	N/A	0.005	95.1	3.5	1.4	23.2	52.9	23.9
F2	0	无色微乳光	10.4	326	0.024	96.7	3.3	0.0	39.3	26.6	34.1
	1周	无色微乳光	10.3	N/A	0.006	96.9	3.0	0.1	40.4	29.1	30.5
	2周	无色微乳光	10.5	322	0.008	96.3	3.6	0.2	37.1	33.6	29.4
	4周	无色微乳光	9.8	N/A	0.007	95.1	4.1	0.8	30.8	40.1	29.1
	6周	无色微乳光	10.7	N/A	0.007	95.0	4.1	1.0	24.0	47.1	28.9
	8周	无色微乳光	10.8	N/A	0.004	95.0	3.6	1.5	23.1	52.5	24.4
F3	0	无色微乳光	10.7	230	0.037	96.7	3.3	0.0	39.2	26.9	33.9
	1周	无色微乳光	10.5	N/A	0.007	96.9	3.1	0.1	41.2	30.1	28.7
	2周	无色微乳光	10.6	230	0.007	96.3	3.6	0.2	36.4	34.9	28.8
	4周	无色微乳光	10.0	N/A	0.006	95.0	4.3	0.7	29.9	43.1	27.1
	6周	无色微乳光	10.8	N/A	0.005	94.5	4.1	1.4	23.0	49.1	27.9
	8周	无色微乳光	10.8	N/A	0.003	94.7	4.0	1.3	21.7	56.1	22.2
F4*	0	无色微乳光	10.3	442	0.027	96.7	3.3	0.0	38.7	26.7	34.6
	1周	无色微乳光	10.0	N/A	0.006	97.0	3.0	0.1	41.5	29.1	29.4
	2周	无色微乳光	10.1	431	0.009	96.5	3.4	0.1	36.0	33.7	30.3
	4周	无色微乳光	9.5	N/A	0.006	95.2	4.0	0.8	31.1	40.6	28.3
	6周	无色微乳光	10.3	N/A	0.005	95.1	3.9	1.0	24.9	48.7	26.4
	8周	无色微乳光	10.4	N/A	0.008	94.5	3.8	1.7	22.1	55.5	22.4
F5	0	无色微乳光	10.7	251	0.025	96.7	3.3	0.0	38.4	26.7	34.9
	1周	无色微乳光	10.4	N/A	0.007	96.9	3.0	0.1	41.9	29.2	28.9
	2周	无色微乳光	10.3	245	0.008	96.4	3.4	0.2	36.5	33.9	29.6
	4周	无色微乳光	9.8	N/A	0.005	95.4	4.0	0.5	30.9	41.0	28.1
	6周	无色微乳光	10.6	N/A	0.004	95.0	4.0	1.0	24.7	49.0	26.4
	8周	无色微乳光	10.4	N/A	0.005	94.8	3.8	1.4	22.9	53.3	23.8
F6	0	无色微乳光	10.6	284	0.005	96.7	3.3	0.0	38.1	27.3	34.7
	1周	无色微乳光	10.4	N/A	0.006	97.2	2.7	0.1	41.5	28.9	29.6
	2周	无色微乳光	10.6	276	0.006	96.6	3.2	0.2	37.1	33.0	30.0
	4周	无色微乳光	9.7	N/A	0.004	94.9	4.2	0.9	32.0	38.4	29.5
	6周	无色微乳光	10.5	N/A	0.007	94.4	4.2	1.5	24.9	44.2	30.9
	8周	无色微乳光	10.5	N/A	0.005	94.3	3.8	1.8	24.6	49.3	26.1

注：N/A 表示不适用。*表示 F4 处方在 40±2℃放置 2 周后乳光情况略重于其余处方。

实施例 5. 稳定剂的筛选

本轮研究通过单因素试验筛选制剂处方，共设计 9 个备选处方(以下分别称为 F7~F15)，目标药物 h1G4 抗体浓度为 10.0 mg/mL。其中处方 F7~F14 的缓冲体系均为 20 mmol/L pH 5.5 枸橼酸-枸橼酸钠，F15 为 20 mmol/L 枸橼酸钠-磷酸氢二钠，制剂辅料筛选研究备选处方信息见表 8。

表 8. h1G4 抗体制剂辅料筛选研究备选处方组成

处方编号	缓冲液种类及离子强度	pH值	非还原糖及含量(%)	氯化钠含量(%)	聚山梨酯80含量(%)
F7	20 mmol/L 枸橼酸-枸橼酸钠	5.5	1%甘露醇	0.3%	0.02%
F8			3%甘露醇	0.3%	0.02%
F9			1%蔗糖	0.3%	0.02%
F10			3%蔗糖	0.3%	0.00%
F11			3%蔗糖	0.3%	0.02%
F12			3%蔗糖	0.3%	0.05%
F13			1%甘氨酸	0.3%	0.02%
F14			3%甘氨酸	0.3%	0.02%
F15	20 mmol/L 枸橼酸钠-磷酸氢二钠	5.5	1%甘氨酸	0.3%	0.02%

取适量原液超滤换液，加辅料，调节浓度制备成表 8 处方，生物安全柜内采用 0.22 μm 一次性无菌过滤器过滤样品，无菌分装至 2 mL 西林瓶中，加 13 mm 胶塞，轧 13 mm 铝塑组合盖。将分装后样品放置于恒温摇床内 40℃，200 rpm 振摇 4 周。于第 0、1、2、4 周分别取样，检测分析(见表 9)。

表 9. h1G4 抗体制剂辅料筛选研究考察条件

考察条件	**检测点**			
	0周	**1周**	**2周**	**4周**
40℃，200 rpm	X，Y	X	X	X
X = 外观、浓度、浊度(A_{350})、pH值、SEC-HPLC、CEX-HPLC； Y = 摩尔渗透压浓度				

研究结果

0 周时所有处方外观均为无色澄清液体，无明显可见异物，浓度在 9~11 mg/mL 范围内，渗透压为 185~540 mOsmol/kg，浊度(A350)为 0.006~0.009。

SEC 主峰含量为 98.0~98.2%，聚体含量为 1.7~1.9%。CEX 主峰含量为 35.4~39.1%，酸性峰含量为 31.6~33.8%，碱性峰含量为 27.5~30.8%(见表 10)。基础理化检测结果显示 0 周时，各处方质量良好，无明显差异。

经过最长 4 周的 40℃加速处理，可以看出枸橼酸钠-磷酸氢二钠缓冲体系不适于 h1G4 抗体的稳定保存。

表 10. h1G4 抗体制剂辅料筛选研究振摇稳定性试验(40℃，200 rpm)数据汇总表

处方编号	取样点	外观	浓度(mg/mL)	pH 值	渗透压(mOsm/kg)	A_{350}	SEC-HPLC			CEX-HPLC		
							主峰%	高聚体%	片段%	主峰%	酸性峰%	碱性峰%
F7	0	无色澄清	10.2	5.5	204	0.007	98.0	1.9	0.1	39.1	31.6	29.3
	1 周	无色澄清	10.2	5.4	N/A	0.007	97.8	2.0	0.2	43.3	29.9	26.8
	2 周	无色澄清	10.3	N/A	N/A	0.003	97.1	2.2	0.8	39.8	33.5	26.7
	4 周	无色澄清	10.6	5.5	N/A	0.008	96.5	2.6	0.9	36.4	38.1	25.5
F8	0	无色澄清	10.5	5.5	322	0.008	98.0	1.9	0.1	39.3	32.2	28.5
	1 周	无色澄清	10.3	5.5	N/A	0.005	97.8	2.0	0.1	44.3	28.5	27.2
	2 周	无色澄清	10.5	N/A	N/A	0.004	97.6	2.2	0.2	40.8	32.0	27.2
	4 周	无色澄清	10.5	5.4	N/A	0.008	96.8	2.5	0.7	37.7	35.4	27.0
F9	0	无色澄清	10.4	5.5	185	0.006	98.1	1.9	0.0	39.6	32.9	27.5
	1 周	无色澄清	10.4	5.5	N/A	0.005	97.8	2.1	0.1	44.5	28.6	26.8
	2 周	无色澄清	10.4	N/A	N/A	0.004	97.5	2.3	0.3	41.0	31.8	27.3
	4 周	无色澄清	10.6	5.5	N/A	0.012	96.7	2.6	0.7	37.7	35.7	26.7
F10	0	无色澄清	10.5	5.5	242	0.008	98.2	1.7	0.1	37.4	32.6	30.0
	1 周	无色澄清	10.3	5.5	N/A	0.004	97.9	2.0	0.2	44.5	28.4	27.0
	2 周	无色澄清，有颗粒	10.4	N/A	N/A	0.006	97.6	2.1	0.3	41.0	31.8	27.2
	4 周	无色澄清，有颗粒	11.0	5.6	N/A	0.010	97.0	2.4	0.6	38.6	35.7	25.7
F11	0	无色澄清	10.3	5.5	246	0.009	98.0	1.9	0.1	35.4	33.9	30.8
	1 周	无色澄清	10.4	5.5	N/A	0.005	97.9	2.0	0.1	44.5	28.4	27.1
	2 周	无色澄清	10.5	N/A	N/A	0.004	97.6	2.2	0.2	41.1	31.7	27.3
	4 周	无色澄清	10.6	5.5	N/A	0.006	96.8	2.5	0.7	38.7	35.5	25.9
F12	0	无色澄清	10.3	5.5	250	0.006	98.1	1.9	0.1	38.9	33.7	27.4
	1 周	无色微乳光	10.3	5.6	N/A	0.007	97.5	2.3	0.1	44.5	28.2	27.3
	2 周	无色微乳光	10.4	N/A	N/A	0.007	97.6	2.2	0.2	41.1	31.6	27.3
	4 周	无色微乳光	10.6	5.5	N/A	0.010	96.8	2.6	0.6	38.6	35.6	25.9
F13	0	无色澄清	10.4	5.5	298	0.008	98.2	1.8	0.1	37.3	32.6	30.1
	1 周	无色澄清	10.4	5.5	N/A	0.006	98.2	1.6	0.2	44.3	28.9	26.8

处方编号	取样点	外观	浓度(mg/mL)	pH 值	渗透压(mOsm/kg)	A_{350}	SEC-HPLC			CEX-HPLC		
							主峰%	高聚体%	片段%	主峰%	酸性峰%	碱性峰%
	2 周	无色澄清	10.5	N/A	N/A	0.006	98.0	1.7	0.2	41.3	31.4	27.3
	4 周	无色澄清	10.5	5.5	N/A	0.008	97.2	2.1	0.7	39.4	34.1	26.5
F14	0	无色澄清	10.2	5.5	540	0.008	98.2	1.8	0.1	38.7	33.1	28.2
	1 周	无色微乳光	10.3	5.5	N/A	0.005	98.3	1.5	0.1	43.4	30.0	26.6
	2 周	无色微乳光	10.3	N/A	N/A	0.009	98.2	1.6	0.3	40.7	33.0	26.4
	4 周	无色微乳光	10.3	5.5	N/A	0.007	97.3	2.0	0.8	37.3	36.1	26.5
F15	0	无色澄清	10.0	5.6	272	0.006	98.1	1.8	0.1	36.7	33.6	29.8
	1 周	无色澄清	10.1	5.4	N/A	0.004	97.7	1.6	0.7	40.3	35.6	24.1
	2 周	无色澄清	10.2	N/A	N/A	0.003	97.3	1.7	0.9	35.1	40.0	24.9
	4 周	无色澄清	10.3	5.6	N/A	0.005	96.2	2.1	1.7	30.3	45.6	24.2

注：N/A 表示不适用。

结果表明，本发明的 h1G4 制剂成品在 40℃条件下保存最长 4 周的情况下，外观、可见异物、蛋白质含量、SEC、CEX、pH、渗透压均未见明显变化趋势，均符合本品现行质量标准草案要求，表明所述制剂具有较好的稳定性。

应理解，在阅读了本发明的上述内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。