

一种包含贝伐珠单抗的药物配制剂

技术领域

本发明属于生物医药技术领域，具体涉及一种包含贝伐珠单抗的药物配制剂。

背景技术

5 高特异性、有效安全的蛋白（抗体）类药物，尤其是治疗性抗体药物，已成为目前全球药物研发的热点。贝伐珠单抗（又称贝伐单抗，中文商品名：安维汀，英文商品名：Avastin）由罗氏公司开发，于 2004 年首次获美国 FDA 批准上市被广泛应用于多种恶性肿瘤的治疗，如转移性的结直肠癌、非小细胞肺癌、肾细胞癌、卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤等。贝伐珠单抗是一种人源化的单克隆 IgG1 抗体，可特异性结合血管内皮生长因子，从而阻断其与内皮细胞表面的受体（Flt-1 和 KDR）结合，避免了其后一系列级联反应，抑制异常血管的新生，进而防止肿瘤生长和扩散，最终达到消灭肿瘤的目的。此外，贝伐珠单抗特异性强，阻断 VEGF 通路的同时通常不会干扰其他靶点。由于贝伐珠单抗可破坏异常血管，并使成熟血管正常化，故通常用于联合化疗，即与其他药物共同作用于肿瘤组织。在这种治疗手段中，贝伐珠单抗可有效地辅助并巩固其他药物的治疗作用（Presta L G, Chen H, O'Connor S J, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Cancer Res 1997;57:4593-9.）。

在单抗类药物的研究中，药物制剂的研究具有重要作用。IgG1 单抗主要采用注射液体制剂，而液体制剂中蛋白易形成聚体或颗粒，对稳定性带来影响。如何在储藏期内，保持单抗液体制剂良好的物理稳定性、化学稳定性和生物稳定性，成为一个不容忽视的问题，急需开发满足制药工业需求的稳定的蛋白制剂。

发明内容

本发明的目的是提供一种包含贝伐珠单抗的药物配制剂。

本发明通过筛选和配方优化，以贝伐珠单抗（HLX04 蛋白）为研究对象，对缓冲液体系进行考察；通过设计单因素实验，考察高温加速条件下，缓冲体系中不同离子强度、pH 值以及稳定剂种类、表面活性剂种类及含量等对蛋白稳定性的影响。并且通过实验确定了制剂中各组分含量的配比范围。

本发明评价该制剂蛋白高温加速条件下稳定性的检测项目包括：外观、蛋白质浓度（A280）、渗透压、纯度（SEC-HPLC、CEX-HPLC、CE-SDS）、蛋白平均粒径以及 PdI（DLS）、亚可见颗粒数（FlowCam）。

本发明优选的药物配制剂，包括：贝伐珠单抗、缓冲液、稳定剂和表面活性剂；其中所述贝伐珠单抗为重组的人源单克隆抗体，其含量较佳地为 10-100mg/mL、优选为 10-80mg/mL，或者为 10-50mg/mL，更优选地为 10mg/mL、25 mg/mL、50mg/mL、80mg/mL。

较佳地，本发明所述缓冲液包括：组氨酸-盐酸组氨酸、醋酸-醋酸钠、盐酸组氨酸-醋酸钠体系中的一种；更佳地为醋酸-醋酸钠、盐酸组氨酸-醋酸钠体系；最优选地为盐酸组氨酸-醋酸钠缓冲液体系。

其中，所述药物配制剂的 pH 值较佳地为：pH 5.0-5.6，优选地为 pH 5.3。

该缓冲液体系中，所述组氨酸-盐酸组氨酸、醋酸-醋酸钠、盐酸组氨酸-醋酸钠缓冲液的浓度较佳地为 10-30 mM，其中，盐酸组氨酸-醋酸钠缓冲液优选地为 10 mM。

本发明制剂中还包含稳定剂，用以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）。稳定剂较佳地选自：蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨醇或甘氨酸中的一种或多种；优选地为蔗糖、海藻糖、山梨醇，更优选地为蔗糖和山梨醇。所述稳定剂的含量较佳地为：20-100 mg/mL；更佳地为：25-50mg/mL；优选地为：45mg/mL。

其中所述表面活性剂为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为聚山梨酯。其中，更佳地为吐温 80。所述表面活性剂的含量较佳地为 0.1-0.5 mg/mL，优选地为 0.2 mg/mL。

所述药物配制剂的剂型为本领域常规剂型，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或玻璃体中注射。

基于单因素研究结果，确定了贝伐珠单抗的优选制剂处方，其组成为：25mg/mL 贝伐珠单抗（bevacizumab）、10mM 盐酸组氨酸-醋酸钠、pH 5.3、45mg/mL 山梨醇、0.2mg/mL 吐温 80。根据上述配比，制备成品，加速稳定性研究和反复冻融稳定性研究，验证本发明制剂配方的稳定性。并且通过与不同的制剂处方进行稳定性测试对比，根据高温加速试验分子异构体、电荷异构体及亚可见颗粒结果分析可知，贝伐珠单抗在本发明处方的制剂中稳定性明显优于其他处方。

附图说明

图 1 HLX04 蛋白在表 5 所示处方的缓冲体系中的理化性质考察；

其中，（A）为 0 周的 Tagg 温度，（B）为 0 周的 KD 值；（C）为 HLX04 蛋白在缓冲体系中 0 周以及 40℃ 静置 4 周的蛋白平均粒径和分散指数 PDI；（D）为 HLX04 蛋白在缓冲体系中 0 周以及 40℃ 静置 4 周的 Pk 1 Area 百分含量；（E）40℃ 条件下 SEC 聚体含量变化趋势；（F）40℃ 条件下 CEX 主峰含量变化趋势。

图 2 HLX04 蛋白在表 8 所示处方的缓冲体系中的理化性质考察；

其中，（A）热力学稳定性比较图，（B）40℃ 条件下的蛋白平均粒径变化趋势；（C）40℃ 条件下 SEC 聚体含量变化趋势；（D）40℃ 条件下 CEX 主峰含量变化趋势；（E）40℃ 条件下 FlowCam 亚可见颗粒数变化趋势。

图 3 HLX04 蛋白在表 11 所示处方的缓冲体系中的理化性质考察；

其中，（A）热力学稳定性比较图，（B）40℃ 条件下的蛋白平均粒径变化趋势；（C）40℃ 条件下 SEC 聚体含量变化趋势；（D）40℃ 条件下 CEX 主峰含量变化趋势；（E）40℃

条件下 FlowCam 亚可见颗粒数变化趋势。

图 4 HLX04 蛋白在表 14 所示处方的缓冲体系中的理化性质考察；

其中，图（A）热力学稳定性比较图，（B）40℃条件下的 DLS 平均水合粒径和 PdI 变化趋势；（C）40℃条件下 SEC 聚体含量变化趋势；（D）40℃条件下 CEX 主峰含量变化趋势；

5 （E）40℃条件下 FlowCam 亚可见颗粒数变化趋势。

图 5 HLX04 蛋白在表 20 所示处方的缓冲体系中的理化性质考察；其中，（A）热力学稳定性比较图；（B）40℃条件下 DLS 平均水合粒径和 PdI 变化趋势；（C）40℃条件下 SEC 聚体含量变化趋势；（D）40℃条件下 CEX 主峰含量变化趋势；（E）40℃条件下 FlowCam 亚可见颗粒变化趋势；（F）-20℃至室温条件下 DLS 平均水合粒径和 PdI 变化趋势；（G）
10 -20℃至室温条件下 SEC 聚体含量变化趋势；（H）-20℃至室温条件下 CEX 主峰含量变化趋势；（I）-20℃至室温条件下 FlowCam 亚可见颗粒数变化趋势。

图 6(A)(B)(C) JMP 软件获得的意愿刻画器模型图。

图 7 HLX04 蛋白在表 26 所示处方的缓冲体系中的理化性质考察；（A）热力学稳定性比较图；（B）40℃条件 DLS 平均蛋白粒径变化趋势；（C）40℃条件下 SEC 主峰含量变化趋势；
15 （D）40℃条件下 CEX 主峰含量变化趋势；（E）40℃条件下 FlowCam 亚可见颗粒数变化趋势。

图 8 不同蛋白浓度稳定性对比图。（A）SEC 聚体含量变化趋势；（B）SEC 碎片含量变化趋势；（C）IgG 含量（CE-SDS 非还原）含量变化趋势；（D）CEX 主峰含量变化趋势。

20 具体实施方式

以下的实施例用于为本领域中的普通技术人员提供有关如何实施和使用本发明的完整披露和描述，并不对本发明的范围进行限制，亦非意指下文的实验是被实施的全部实验而且是仅可实施的实验。

实施例中所用化学试剂均为市售分析纯试剂，重组单抗可以是按照目前已知任何的方法
25 制备的单抗，以下示例性的抗体制备方法由上海复宏汉霖生物技术股份有限公司提供，该示例性方法并不限制本发明。

本研究所用抗体蛋白为 HLX04（贝伐珠单抗），按照现有技术中的通常方法制备抗体，其轻重链序列如下：

轻链

30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPS
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT
LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPT
 YAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTL
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 5 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 实施例 1.检测方法

1.1. 外观及可见异物

采用目视检查法进行外观检测。将样品瓶擦拭干净，在暗室中置于上海黄海药检
 SC-4000A 型澄明度检测仪下，调节光照度为 1000~1500 Lux，将样品放置于遮光板边缘处（25
 cm）手持供试品西林瓶颈部，分别在黑色和白色背景下用目视检查颜色、澄明度和可见异物
 15 等。

1.2. 蛋白质含量

使用 Trinean Dropsense16 型蛋白浓度测定仪，检测样品在 280 nm 波长的吸光度并计算
 浓度。消光系数为 $1.60 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

1.3. pH 值

20 采用 Mettler Toledo 型多功能参数仪，用 3 种标准液校准（pH 值分别为 4.01、7.00 与 9.21），
 使电极斜率在 95%~105% 范围内，取 25 μL 样品测定 pH 值。

1.4. 渗透压摩尔浓度

采用 Advanced Osmo PRO 型渗透压仪，依照《中国药典》（2015 年版）通则 0632“渗透
 压摩尔浓度测定法”测定，取 20 μL 样品及两份 290 mOsmol/kg 的渗透压标准品，使用冰点法
 25 测定样品及标准品的渗透压值。

1.5. 粘度

采用 BROOKFIELD DV2T 型粘度仪测定样品的粘度。打开外接水浴锅开关，设置温度为
 25℃，吸取 0.5mL 样品滴入样品杯中心，设定转子转速使测量扭矩落在 40~60% 内，测定样
 品粘度。

30 1.6. DLS

采用 DynaPro PlateReader-III 型高通量动静态光散射仪测定样品的粒径和粒度分布。在超
 净工作台内取 25 μL 样品加入 384 孔板微孔中，加样完毕后覆膜，将覆膜后的 384 孔板放入
 冷冻离心机内，离心去除样品微孔内气泡。仪器具体参数设置见

表 1。

35

表 1 高通量动静态光散射仪粒径检测参数设置

模块	参数	设置值
实验	实验类型	等温
	自动衰减	是
	每个样品孔的图像	是
	动态光散射采集时间	5 s
	每个样品孔的动态光散射采集次数	10
	检测静态光	否
重复检测	每个样品孔的检测次数	1
	每个样品孔扫描间等待	0 min
	扫描数量	1
	扫描间等待	0 min
温度	开始温度	25 °C
	样品板	密封
实验结束	温度	25 °C
	检测器	关

1.7. Tagg 温度

采用 DynaPro PlateReader-III 型高通量动静态光散射仪测定样品的聚集温度。在超净工作台内取 25 μ L 样品加入 384 孔板微孔中，加样完毕后覆膜，将覆膜后的 384 孔板放入冷冻离心机内，离心去除样品微孔内气泡。仪器具体参数设置见表 2。

5

表 2 高通量动静态光散射仪 Tagg 检测参数设置

模块	参数	设置值
实验	实验类型	Thermal Ramp
	自动衰减	是
	每个样品孔的图像 Image of Each well	是
	动态光散射采集时间	5 s
	每个样品孔的动态光散射采集次数	5
	检测静态光	否
温度	开始温度	40 °C
	结束温度	80 °C
	样品板	密封
实验结束	温度	25 °C
	检测器	关

1.8. DSC

采用 TA Nano DSC 差示扫描量热仪，测定与蛋白质构象相关的热力学参数 $T_{m\ onset}$ 、 T_{m1} 及 T_{m2} 值。使用安慰剂稀释蛋白样品浓度至 1mg/mL，分别置稀释后的蛋白样品和相应的安慰剂于 96 孔样品板中，脱气处理后，置于 300 $\pm$ 50 Kpa 压力条件下，设定前平衡时间为 600 s，温度范围为 25~100°C，扫描速率为 1°C/min，分别采集蛋白样品和安慰剂的 DSC 曲线，其中安慰剂扫描三次，蛋白样品扫描一次。选择 Two State Scaled 模型进行数据拟合。

10

1.9. SEC-HPLC

- SEC-HPLC 检测采用 Agilent 1260 高效液相色谱, TOSOH TSKgel G3000 色谱柱 (7.8 mm×300 mm, 5 μm), 柱温室温 (不控温), 进样盘温度为 2~8°C, 流动相组成为 100 mM 磷酸二氢钠, 0.5%氯化钠, pH 值为 6.8, 等度洗脱, 洗脱时间为 30 min, 流速为 0.5 mL/min。
- 5 检测波长为 280 nm, 样品浓度稀释至 1 mg/mL, 进样量 50 μL。

1.10.CEX-HPLC

- CEX-HPLC 检测采用 Agilent 1260 高效液相色谱, Thermo ProPac™WCX-10 色谱柱 (4 mm×250 mm, 10 μm), 柱温为 35°C, 进样盘温度为 2~8°C, 流动相 A 组成为 50 mM 磷酸盐缓冲液, pH 值为 6.10, 流动相 B 组成为 50 mM 磷酸盐缓冲液, 300 mM 氯化钠, pH 值为 6.10, 梯度洗脱, 洗脱梯度见表 3, 流速为 1.0 mL/min。检测波长为 280 nm, 样品浓度稀释至 1 mg/mL, 进样量 50 μL。
- 10

表 3 CEX-HPLC 洗脱梯度

保留时间	流动相 B%	流速 (mL/min)
0.0 min	4.0%	1.0
3.0 min	4.0%	1.0
31.0 min	31.0%	1.0
32.0 min	100.0%	1.0
34.0 min	100.0%	1.0
34.1 min	4.0%	1.0
39.0 min	4.0%	1.0

1.11.CE-SDS

- 依照《中国药典》(2015 年版) 通则 3127“单抗分子大小变异测定法 (CE-SDS 法)”测定。采用非还原型和还原型 CE-SDS 检测, 采用 Beckman Coulter PA800 plus 型毛细管电泳仪, 使用总长 67 cm, 内径 50 μm 的非涂层毛细管; 5 KV 进样 20.0 s, 15 KV 分离 35.0 min, 使用 PDA 检测器, 在波长 220 nm 处进行检测; 按面积归一化法计算。
- 15

1.12.FlowCam

- 采用 FlowCam 8100 颗粒分析检测仪测定样品中亚可见颗粒的形态及数量。仪器具体参数设置见表 4。
- 20

表 4FlowCam 8100 颗粒分析检测仪检测参数设置

类别	参数	设置值
捕捉	颗粒间最小距离 (μm)	0
	填充图片里的缝隙	2
检测阈值	暗像素	15
	明像素	15
	包括明暗像素	选定
流通池	流通池类型	FC80FV
	流通池深度 (μm)	81

	流通池宽度 (μm)	700
Fluidics	进样体积, mL	0.4
	流速, mL/min	0.1
	效率%	70%左右

实施例 2 缓冲体系及其 pH 值筛选研究

针对缓冲体系/pH 值的研究，共进行了两轮实验，通过单因素试验设计筛选缓冲体系的种类和 pH 值范围。

5 2.1 缓冲体系/pH 值筛选研究-I

2.1.1 研究方案

表 5 缓冲体系/pH 值筛选研究-I 处方信息

编号	缓冲液类型	离子强度, mmol/L	pH 值	代号
B1	枸橼酸-枸橼酸钠	20	5.5	C55
B2			6.0	C60
B3	组氨酸-盐酸组氨酸	20	5.5	H55
B4			6.0	H60
B5	醋酸-醋酸钠	20	5.0	A50
B6			5.5	A55
B7	盐酸组氨酸-醋酸钠	20	5.5	HA55
B8	磷酸二氢钠-磷酸氢二钠	50	6.2	PB62

该研究采用经阳离子层析除去吐温 20 后的 HLX04 蛋白原液（批号：AS201801），经超滤换液、调节蛋白浓度后制备为蛋白终浓度约 25.0 mg/mL 的备选处方（

10 表 5）。在生物安全柜内采用 0.22 μm 一次性无菌过滤器过滤样品，然后无菌分装 1 mL 的蛋白溶液至 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℃ 恒温恒湿箱中保存，按表 6 设计要求进行取样和检测。

表 6 缓冲体系/pH 值筛选研究-I 考察条件及检测方法

考察条件	0 周	1 周	2 周	4 周
40℃	X, Y, Z	X	X	X, Y
X: 外观, 蛋白质含量 (A ₂₈₀), SEC, CEX Y: pH, DLS Z: Tagg, KD				

2.1.1 研究结果

15 0 周时，蛋白在组氨酸-盐酸组氨酸、醋酸-醋酸钠、盐酸组氨酸-醋酸钠体系中，蛋白的 Tagg 温度较高（错误！未找到引用源。A），KD 值为正值（图 1B），并且蛋白平均粒径较小（图 1C），说明蛋白在这三种缓冲体系中的构象稳定性和胶体稳定性较好。

20 在 40℃ 静置 4 周后，蛋白质浓度、pH 值结果显示无明显差异（表 7）。SEC 结果显示蛋白在各缓冲体系中主峰含量均呈下降趋势（错误！未找到引用源。E），在枸橼酸-枸橼酸钠、组氨酸-盐酸组氨酸、醋酸-醋酸钠三种缓冲体系中均是 pH 值越低，稳定性较好，优劣排序为 C55>A50>H55>HA55>C60≈A55>H60（图 1E）。DLS 结果显示，蛋白在组氨酸-盐酸组氨酸、

磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲体系中，分散指数 PdI 变大（图 1C 错误！未找到引用源。），Pk 1 Area Int 的百分含量变小（图 1D），说明产生了低于 1 μm 的可溶性高聚体。CEX 结果显示蛋白在各缓冲体系中主峰含量均呈下降趋势（图 1F），在组氨酸-盐酸组氨酸缓冲体系中蛋白的稳定性明显优于其他缓冲体系。

5

表 7 缓冲体系/pH 值筛选研究-I 数据汇总

检测项	考察时间	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
		C55	C60	H55	H60	A50	A55	HA55	PB62
蛋白质浓度 (mg/mL)	0周	25.4	25.1	25.0	24.8	25.3	25.6	25.1	25.2
	1周	25.3	25.4	25.4	25.1	25.3	25.6	25.0	24.9
	2周	25.4	25.4	24.8	25.1	25.3	25.1	25.0	24.8
	4周	25.3	25.3	25.3	25.1	25.3	25.5	25.2	25.0
pH值	0周	5.6	6.0	5.5	6.0	5.2	5.7	5.6	6.2
	4周	5.5	6.0	5.6	6.0	5.1	5.7	5.6	6.2

2.2 缓冲体系/pH 值筛选研究-II

2.2.1 研究方案

缓冲体系/pH 值筛选研究- I 的结果表明，组氨酸-盐酸组氨酸、醋酸-醋酸钠、枸橼酸-枸橼酸钠缓冲体系中，均为 pH 越低 SEC 主峰含量越高；蛋白在不含稳定剂和表面活性剂的处方中，40℃考察条件放置 1 周，各处方下均有肉眼可见颗粒。因此本轮实验在较低的 pH 5.0，添加蔗糖和吐温 80 的处方中进一步筛选缓冲体系。

10

表 8 缓冲体系/pH 值筛选研究-II 处方信息

编号	缓冲液类型	离子强度, mmol/L	pH 值	稳定剂	表面活性剂	代号
B1	盐酸组氨酸-醋酸钠	20	5.0	50mg/mL 蔗糖	0.2mg/mL 吐温 80	HA50
B2	醋酸-醋酸钠					A50
B3	枸橼酸-枸橼酸钠					C50
B4	组氨酸-盐酸组氨酸					H50

该研究采用 HLX04 蛋白（批号：AS201901-PT），经超滤换液、添加辅料、调节蛋白浓度后制备为蛋白终浓度约 25.0 mg/mL 的备选处方（表 8）。在生物安全柜内采用 0.22 μm 一次性无菌过滤器过滤样品，然后无菌分装 1 mL 的蛋白溶液至 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℃ 恒温恒湿箱中保存，按表 9 设计要求进行取样和检测。

15

表 9 缓冲体系/pH 值筛选研究-II 考察条件及检测方法

考察条件	0 周	1 周	2 周	4 周
40℃	X, Y, Z	X	X, Y	X, Y
X: 外观, 蛋白质含量 (A ₂₈₀), pH, SEC, CEX, DLS Y: FlowCam Z: 渗透压, Tagg				

2.2.2 研究结果

0 周时，蛋白在各缓冲体系中的基本理化检测结果显示无明显差异（表 10），Tagg 聚集温度的优劣排序为 A50~HA50>H50>C50（错误！未找到引用源。A），蛋白平均粒径优劣排序 A50~HA50~H50>C50（错误！未找到引用源。B）。说明蛋白在醋酸-醋酸钠、盐酸组氨酸-醋酸钠缓冲体系中的构象稳定性和胶体稳定性较好。

在 40℃ 静置 4 周后，基本理化检测结果显示无明显差异（表 10）。SEC 结果显示蛋白在各缓冲体系中主峰含量均呈下降趋势，优劣排序为 A50~H50~HA50>C50（错误！未找到引用源。C）。CEX 结果显示蛋白在各缓冲体系中主峰含量均呈下降趋势，优劣排序为 H50~HA50>A50>C50（错误！未找到引用源。D）。FlowCam 亚可见颗粒优劣排序为 A50>H50~HA50>C50（错误！未找到引用源。E）。

表 10 缓冲体系/pH 值筛选研究-II 数据汇总

检测项	考察时间	B1	B2	B3	B4
		HA50	A50	C50	H50
蛋白质浓度（mg/mL）	0周	24.9	25.0	25.5	24.7
	1周	25.1	25.3	26.0	25.3
	2周	24.4	24.7	25.3	24.5
	4周	24.3	24.6	25.3	24.5
pH值	0周	5.1	5.1	5.1	5.0
	1周	5.0	5.1	5.1	5.0
	2周	5.1	5.1	5.1	5.1
	4周	5.1	5.1	5.1	5.0
渗透压（mOsmol/kg）	0周	202	214	219	203

2.2.3 研究结论

本轮研究结果表明，蛋白在醋酸-醋酸钠、盐酸组氨酸-醋酸钠缓冲体系中的构象稳定性和胶体稳定性较好。蛋白在组氨酸-盐酸组氨酸缓冲体系中电荷异构体结果较佳，综合考虑选择盐酸组氨酸-醋酸钠作为蛋白的缓冲体系。

实施例 3 离子强度的筛选

3.1 研究方案

表 11 离子强度筛选研究处方信息

编号	缓冲液类型	离子强度，mmol/L	pH 值	稳定剂	表面活性剂	代号
B1	盐酸组氨酸-醋酸钠	10	5.0	50mg/mL 蔗糖	0.2mg/mL 吐温 80	HA-10
B2		20				HA-20
B3		30				HA-30

该研究采用 HLX04 蛋白（批号：AS201901-PT），经超滤换液、添加辅料、调节蛋白浓度后制备为蛋白终浓度约 25.0 mg/mL 的备选处方（表 11）。在生物安全柜内采用 0.22 μm 一次性无菌过滤器过滤样品，然后无菌分装 1 mL 的蛋白溶液至 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°C 恒温恒湿箱中保存，按表 12 设计要求进行取样和检测。

表 12 离子强度筛选研究考察条件及检测方法

考察条件	0 周	1 周	2 周	4 周
40°C	X, Y, Z	X	X, Y	X, Y
X: 外观, 蛋白质含量 (A ₂₈₀), pH, SEC, CEX, DLS Y: FlowCam Z: 渗透压, Tagg				

3.2 研究结果

0 周时，蛋白在盐酸组氨酸-醋酸钠体系中的 Tagg 聚集温度（图 3A）和蛋白平均粒径（错误！未找到引用源。B）的优劣排序 HA-10>HA-20>HA-30，说明蛋白在 10 mM 的盐酸组氨酸-醋酸钠缓冲体系中的构象稳定性和胶体稳定性较好。

在 40°C 静置 4 周后，基本理化检测结果显示无明显差异（表 13）。SEC 结果显示蛋白在各缓冲体系中主峰含量均呈下降趋势（错误！未找到引用源。C），优劣排序 HA-10>HA-20≈HA-30。CEX 结果显示蛋白在各缓冲体系中主峰含量均呈下降趋势，且下降趋势无明显差异（错误！未找到引用源。D）。FlowCam 亚可见颗粒优劣排序为 HA-10>HA-20≈HA-30（错误！未找到引用源。E）。

表 13 离子强度筛选研究数据汇总

检测项	考察时间	B1	B2	B3
		HA-10	HA-20	HA-30
蛋白质浓度 (mg/mL)	0周	25.1	24.9	24.8
	1周	25.3	25.1	25.3
	2周	24.5	24.4	24.5
	4周	24.5	24.3	24.5
pH值	0周	5.1	5.1	5.0
	1周	5.1	5.0	5.0
	2周	5.2	5.1	5.1
	4周	5.2	5.1	5.1
渗透压 (mOsmol/kg)	0周	189	202	225

3.3 研究结论

本轮研究结果表明，蛋白在 10mM 的盐酸组氨酸-醋酸钠缓冲体系中的构象稳定性和胶体稳定性较好。SEC 主峰含量下降趋势较慢。FlowCam 亚可见颗粒较少。

实施例 4 pH 值范围的筛选

4.1 研究方案

表 14 pH 值范围筛选研究处方信息

编号	缓冲液类型	离子强度, mmol/L	pH 值	稳定剂	表面活性 剂	代号
B1	盐酸组氨酸-醋 酸钠	10	5.0	100mg/mL 蔗 糖	0.2mg/mL 吐温 80	HA50
B2			5.3			HA53
B3			5.6			HA56

该研究采用 HLX04 蛋白（批号：AS201901-PT），经超滤换液、添加辅料、调节蛋白浓
度后制备为蛋白终浓度约 25.0 mg/mL 的备选处方（表 14）。在生物安全柜内采用 0.22 μm 一
次性无菌过滤器过滤样品，然后无菌分装 1 mL 的蛋白溶液至 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°C 恒温恒湿箱中保存，按表 15 设计要求进行
取样和检测。

表 15 pH 值范围筛选研究考察条件及检测方法

考察条件	0 周	1 周	2 周	4 周
40°C	X, Y	X	X	X
X: 外观, 蛋白质含量 (A ₂₈₀), pH, SEC, CEX, DLS, FlowCam Y: DSC, Tagg				

4.2 研究结果

蛋白在 10 mM 盐酸组氨酸-醋酸钠体系中储存 4 周，pH 5.0-5.6 范围内蛋白的理化性质无
明显差异（表 16，错误！未找到引用源。）。因此，最终制剂处方的 pH 值范围为 5.0-5.6。

表 16 pH 值范围筛选研究数据汇总

检测项	考察时间	B1	B2	B3
		HA50	HA53	HA56
蛋白质浓度 (mg/mL)	0周	25.0	25.2	25.5
	1周	25.4	25.6	25.5
	2周	25.8	25.9	25.8
	4周	26.3	25.9	26.0
pH值	0周	5.0	5.4	5.6
	1周	5.0	5.4	5.6
	2周	5.0	5.4	5.6
	4周	5.0	5.4	5.6

实施例 5 稳定剂种类的筛选

5.1 研究方案

表 17 稳定剂种类筛选研究处方信息

编号	缓冲液类型	离子强度, mmol/L	pH 值	稳定剂	表面活性剂	代号
F1	盐酸组氨酸-醋酸钠	10	5.3	100mg/mL 蔗糖	0.2mg/mL 吐温 80	Sucrose
F2				100mg/mL 海藻糖		Trehalose
F3				50mg/mL 甘露醇		Mannitol
F4				50mg/mL 山梨醇		Sorbitol
F5				25mg/mL 甘氨酸		Glycine

该研究采用 HLX04 蛋白（批号：AS201901-PT），经超滤换液、添加辅料、调节蛋白浓度后制备为蛋白终浓度约 25.0 mg/mL 的备选处方（表 17）。在生物安全柜内采用 0.22 μm 一次性无菌过滤器过滤样品，然后无菌分装 1 mL 的蛋白溶液至 2 mL 西林瓶中，加 13 mm 胶塞，

5 轧 13 mm 铝塑组合盖。将分装后样品按表 18 设计要求进行考察和检测。

表 18 稳定剂种类筛选研究考察条件及检测方法

考察条件	0 周	1 周	2 周	4 周
40°C	X, Y	X	X	X
-20°C 至室温		5 轮	10 轮	
		X	X	
X: 外观, 蛋白质含量 (A ₂₈₀), pH, SEC, CEX, DLS, FlowCam Y: DSC, Tagg, 渗透压, 粘度				

5.2 研究结果

0 周时，蛋白在含各稳定剂的处方中，T_{agg} 温度优劣排序为蔗糖>海藻糖>山梨糖醇~甘露醇>甘氨酸；T_{m onset} 稳定优劣排序为甘氨酸>甘露醇~蔗糖~海藻糖~山梨糖醇（图 5A）。

10 在 40°C 静置 4 周后，SEC 结果显示蛋白在含各稳定剂的处方中主峰含量均呈下降趋势，甘氨酸（Glycine）样品的下降趋势明显较快（图 5C）。DLS 结果优劣排序为山梨醇~甘露醇>甘氨酸>蔗糖~海藻糖（图 5B）。CEX 结果显示蛋白在各含各稳定剂的处方中主峰含量均呈下降趋势，含甘氨酸样品的下降趋势明显较快（图 5D）。FlowCam 结果显示亚可见颗粒优劣排序为山梨醇~蔗糖~海藻糖~甘露醇>甘氨酸（图 5E）

15 经反复冻融循环 10 轮后，SEC 结果显示蛋白在含蔗糖、海藻糖、山梨醇的处方中主峰含量与 0 周末发生改变，在含甘露醇或甘氨酸的处方中主峰含量下降趋势明显较快（图 5G）。DLS 结果优劣排序为山梨醇>蔗糖~海藻糖>甘氨酸~甘露醇（图 5F）。CEX 结果显示蛋白在含蔗糖、海藻糖、山梨醇的处方中主峰含量与 0 周末发生改变，在含甘露醇和甘氨酸的处方中主峰含量下降趋势明显较快（错误！未找到引用源。H）。FlowCam 结果显示亚可见颗粒优劣

20 排序为山梨醇~蔗糖~海藻糖>甘露醇~甘氨酸（错误！未找到引用源。I 及表 19）

本轮研究结果表明，40°C 高温静置和反复冻融条件下，在 pH5.3，10mM 的盐酸组氨酸-醋酸钠缓冲体系中，加入蔗糖或山梨醇稳定剂的处方蛋白稳定性较好。

表 19 稳定剂种类筛选研究数据汇总

考察条件	检测项	考察时间	F1	F2	F3	F4	F5
------	-----	------	----	----	----	----	----

			Sur	Tre	Man	Sor	Gly
40 °C	蛋白质浓度 (mg/mL)	0周	25.2	25.2	24.3	24.4	24.6
		1周	25.6	25.2	24.5	24.6	24.6
		2周	25.9	25.5	24.7	24.9	24.8
		4周	25.9	25.6	25.0	25.3	25.0
	pH值	0周	5.4	5.3	5.3	5.3	5.4
		1周	5.4	5.3	5.4	5.4	5.4
		2周	5.4	5.4	5.4	5.3	5.5
		4周	5.4	5.4	5.4	5.5	5.6
-20°C至室温	蛋白质浓度 (mg/mL)	0周	25.2	25.2	24.3	24.4	24.6
		5轮	25.2	24.8	24.3	24.5	24.4
		10轮	25.5	25.1	24.7	24.5	24.5
	pH值	0周	5.4	5.3	5.3	5.3	5.4
		5轮	5.4	5.3	5.3	5.4	5.5
		10轮	5.3	5.3	5.3	5.3	5.4
渗透压（mOsmol/kg）		0周	372	345	336	321	363
粘度（cP）		0周	1.6	1.6	1.4	1.4	1.2

实施例 6 稳定剂和表面活性剂的筛选

6.1 研究方案

- 本轮研究利用 JMP 15 软件，选取稳定剂种类、稳定剂含量及吐温 80 含量 3 个因素，采用 Box-Behnken 效应面法设计 10 个试验组（表 20），通过冻融、振摇、光照、高温等加速条件确定稳定剂和表面活性剂浓度（表 21）。

表 170 稳定剂和表面活性剂筛选研究处方信息

编号	缓冲体系	稳定剂类型	稳定剂含量, mg/mL	吐温 80 的含量, mg/mL
F1	10mM 盐酸组氨酸-醋酸钠 pH5.3	山梨醇	0	0.1
F2			0	0.8
F3			40	0.45
F4			40	0.45
F5			80	0.1
F6			80	0.8
F7		蔗糖	0	0.45
F8			40	0.1
F9			40	0.8
F10			80	0.45

该研究采用 HLX04 蛋白（批号：AS201901-PT），经超滤换液、添加辅料、调节蛋白浓度后制备为蛋白终浓度约 25.0 mg/mL 的备选处方（本轮研究利用 JMP 15 软件，选取稳定剂

种类、稳定剂含量及吐温 80 含量 3 个因素，采用 Box-Behnken 效应面法设计 10 个试验组（表 20），通过冻融、振摇、光照、高温等加速条件确定稳定剂和表面活性剂浓度（表 21）。

表 20)。在生物安全柜内采用 0.22 μm 一次性无菌过滤器过滤样品，然后无菌分装 1 mL 的蛋白溶液至 2 mL 西林瓶中，加 13 mm 胶塞，轧 13 mm 铝塑组合盖。将分装后样品按表设计要求进行考察和检测。

表 21 稳定剂和表面活性剂筛选研究考察条件及检测方法

研究条件	0 周	1 轮	5 轮
-20°C 至室温	X,Y,Z,W	X	X
研究条件		2 周	4 周
25°C, 250rpm		X	X,Y
研究条件		2 周	4 周
40°C		X,Y	X,Y
研究条件		5 天	10 天
4500lx		X,Y	X,Y,Z
X: 外观, FlowCam, DLS Y: 蛋白质含量 (A ₂₈₀), SEC Z: CEX, CE W: pH, Tagg, 渗透压, 粘度			

6.2 研究结果

将检测数据导入 JMP 15 软件中，利用最小二乘法对各因素（因变量）进行多元线性回归和二项式方程拟合，得到具有统计学意义（P 值<0.1）的模型（表 22），其校正决定系数（R²）均大于 0.95，说明模型与实际拟合性好，方程对响应值有较好的精确性和可靠性，可以用该回归模型代替真实试验点对实验结果进行分析和预测。

应用 JMP 15 软件，根据表 22 中的分析结果，采用最大化意愿模型预测最佳的制剂处方。选择山梨醇作为稳定剂时，处方的意愿较高；山梨醇含量 4.5%时，处方意愿最大；聚山梨酯 80 含量增大，处方意愿呈下降趋势，聚山梨酯 80 含量在 0.01~0.03%范围内对处方意愿较大，选择中点 0.02%（见图 6A、6B、6C）。

通过缓冲体系/pH 值筛选研究、离子强度筛选研究、表面活性剂种类筛选研究、稳定剂种类筛选研究、稳定剂和表面活性剂筛选研究，最终的制剂处方组成为：10mM 盐酸组氨酸-醋酸钠缓冲体系，pH 5.3，45mg/mL 山梨醇，0.2 mg/mL 吐温 80。

表 22 稳定剂和表面活性剂筛选研究数据汇总

考察条件	响应	R ²	P 值	因子							
				稳定剂种类	稳定剂含量	吐温 80 含量	稳定剂种类*稳定剂含量	稳定剂含量*稳定剂含量	稳定剂种类*吐温 80 含量	稳定剂含量*吐温 80 含量	吐温 80 含量*吐温 80 含量
0 周	渗透压	0.99	0.0083	0.0079	0.003	0.2597	0.0104	0.0998	0.2597	0.6082	0.289
	粘度	0.99	0.1113	0.1875	0.0362	0.3275	0.6196	0.7332	0.1969	0.448	0.2598
	I _{agg}	0.99	0.033	0.1784	0.0169	0.0188	0.02	0.1027	0.0362	0.0321	0.1784
	蛋白平均水合粒径	0.99	0.1095	0.1462	0.0371	0.3498	0.1529	0.2785	0.1282	0.1114	0.4788
冻融研究	1 轮-亚可见颗粒数 ^a	0.96	0.0369	0.051	0.0069	0.5427	0.057	0.1161		0.0613	
	5 轮-亚可见颗粒数	0.99	0.0583	0.1056	0.0258	0.2988	0.0743	0.0368	0.0825	0.2184	0.7177
稳定性研究	2 周-亚可见颗粒数 ^a	0.97	0.0201	0.9802	0.0126	0.8786		0.2381	0.0095	0.0112	
	4 周-亚可见颗粒数 ^a	0.98	0.0163	0.0497	0.0036	0.1329	0.241		0.0171	0.0342	
	4 周-SEC 主峰含量	0.99	0.0493	0.0877	0.0202	0.0362	0.1692	0.1238	0.2143	0.0473	0.0877
	4 周-SEC 聚体含量	0.99	0.0496	0.0985	0.0211	0.0354	0.1103	0.1462	0.3498	0.0449	0.0846
	5 天-SEC 主峰含量	0.99	0.0658	0.1924	0.0269	0.1529	1	0.079	0.0519	0.0499	0.1924
光照研究	5 天-SEC 聚体含量	0.99	0.068	0.2785	0.0273	0.1529	0.7532	0.0846	0.0556	0.0528	0.2279
	10 天-CEN 凝缩含量 ^a	0.98	0.0619	0.0355	0.0726	0.4535	0.0332	0.2361	0.0332	0.0722	
40℃	4 周-SEC 主峰含量	0.99	0.0724	0.1492	0.0406	0.0472	0.0911	0.0665	0.0987	0.0925	0.409
	4 周-SEC 聚体含量	0.99	0.0547	0.1177	0.026	0.041	0.0967	0.0495	0.0776	0.0894	0.1663
	4 周-SEC 碎片含量	0.99	0.1347	0.2785	0.1892	0.0648	0.0967	0.1924	0.1892	0.0894	0.1924

备注：标^a号为逐步分析后的结果

实施例 7 选定处方与其他处方的对比

7.1 研究方案

5

表 23 处方信息

编号	缓冲体系	pH 值	稳定剂类型	稳定剂含量, mg/mL	盐	表面活性剂类型	表面活性剂含量, mg/mL	代号
F1	10mM 盐酸组氨酸-醋酸钠	5.3	山梨醇	45	-	吐温 80	0.2	HA53
F2	50mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠	6.2	海藻糖	60	-	吐温 20	0.4	PB62
F3	10mM 枸橼酸-枸橼酸钠	5.0	蔗糖	20	100mM 精氨酸盐酸	吐温 20	0.5	C50

该研究采用 HLX04 蛋白（批号：AS201901-PT），经超滤换液、添加辅料、调节蛋白浓度后制备为蛋白终浓度约 25.0 mg/mL 的备选处方（表 23）。在生物安全柜内采用 0.22 μm 一次性无菌过滤器过滤样品，然后无菌分装 1 mL 的蛋白溶液至 2 mL 西林瓶中，加 13 mm 胶塞，

10 轧 13 mm 铝塑组合盖。将分装后样品放置于 40℃ 恒温恒湿箱中保存，按表 924 设计要求进行取样和检测。

表 24 考察条件及检测方法

考察条件	0 周	1 周	2 周	4 周
40℃	X, Y, Z	X	X, Y	X, Y

X: 外观, 蛋白质含量 (A ₂₈₀), pH, SEC, CEX, DLS, FlowCam
Y: DSC, Tagg, Tg'

7.2 研究结果

0 周时, 蛋白在 3 种处方下的外观均为无色微乳光液体, 无明显可见异物。Tagg 聚集温度的优劣排序 HA53>PB62>C50(图 7A), 蛋白平均粒径的优劣排序 HA53>C50>PB62(图 7B), 说明蛋白在 HA53 处方中的构象稳定性和胶体稳定性较好。

5 在 40℃ 静置 4 周后, 蛋白在 3 种处方中均能保持一定的稳定性, 蛋白的基础理化检测无明显变化(表 25)。SEC 结果显示蛋白在各处方中主峰含量均呈下降趋势(图 7C), 优劣排序 HA53>C50>PB62。CEX 结果显示蛋白在各处方中主峰含量均呈下降趋势(图 7D), 优劣排序 HA53>C50>PB62。FlowCam 亚可见颗粒优劣排序为 HA53>PB62>C50(图 7E)。

表 25 各处方对比研究数据汇总

检测项	考察时间	F1	F2	F3
		HA53	PB62	C50
蛋白质浓度 (mg/mL)	0 周	25.2	24.8	24.3
	1 周	25.6	25.2	24.5
	2 周	25.9	25.2	24.4
	4 周	25.9	25.2	24.6
pH 值	0 周	5.4	6.2	5.0
	1 周	5.4	6.1	5.1
	2 周	5.4	6.2	5.0
	4 周	5.4	6.2	5.1

10 根据高温加速试验分子异构体、电荷异构体及亚可见颗粒结果, 贝伐珠单抗在本申请所选处方的稳定性明显优于现有的贝伐珠单抗使用的处方(PB62)及其他类似处方。

实施例 8 不同蛋白浓度稳定性对比

8.1 研究方案

表 26 处方信息

编号	缓冲体系	pH 值	稳定剂类型	稳定剂含量, mg/mL	表面活性剂类型	表面活性剂含量, mg/mL	代号
F1	10mM 盐酸组氨酸-醋酸钠	5.3	山梨醇	45	吐温 80	0.2	10
F2							25
F3							50
F4							80
F5	50mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠	6.2	海藻糖	60	吐温 20	0.4	Avastin

15 经过处方筛选研究后, 确定 HLX04 制剂处方为: 10mM 盐酸组氨酸-醋酸钠, 45 mg/mL 山梨醇, 0.2 mg/mL 吐温 80, pH5.3。本轮研究采用 40℃ 高温加速条件, 对比 HLX04 制剂处

方下 10~80 mg/mL 浓度范围内样品与 Avastin® 的稳定性差异。采用 HLX04 PT 蛋白（批号：AS201901-PT），经超滤换液、添加辅料、调节蛋白浓度后制备为各备选处方（表）。在生物安全柜内采用 0.22 μm 一次性无菌过滤器过滤样品，然后无菌分装 0.5 mL 的蛋白溶液至 2 mL 西林瓶中，加 13 mm 胶塞，轧 13 mm 铝塑组合盖。将分装后样品和原研药（批号：H0154B14，代号：Avastin）放置于 40°C 恒温恒湿箱中保存，按表 9 设计要求进行取样和检测。

表 27 考察条件及检测方法

考察条件	0 周	2 周	4 周
40°C	X	X	X
X: 外观, 蛋白质含量 (A ₂₈₀), pH, SEC, CEX, CE			

8.2 研究结果

本研究通过高温（40°C）加速试验，对比 HLX04 制剂处方下 10~80 mg/mL 浓度范围内样品与 Avastin® 的稳定性差异。研究结果显示（表 28），0 周时，HLX04 制剂处方下 10~80 mg/mL 浓度范围内样品的聚体含量为 2.0~2.7%，少于 Avastin 的聚体含量（3.6%）。在 40°C 静置 4 周后，HLX04 制剂处方下 10~80 mg/mL 浓度范围内样品的聚集速率（图 8 A），降解速率（图 8 B, C）及电荷异构体变化趋势（图 8 D）均显著慢于 Avastin。

综上所述，与原研药 Avastin（60 mg/mL）相比，10~80 mg/mL 浓度范围内的 HLX04 制剂处方稳定性更优。

表 28 不同蛋白浓度稳定性对比数据汇总

检测项		考察时间	代号				
			10	25	50	80	Avastin
SEC	主峰%	0 周	97.9	97.7	97.5	97.2	96.2
		2 周	98.4	98.1	97.3	96.3	94.3
		4 周	96.2	95.9	94.8	93.3	90.1
	聚体%	0 周	2.0	2.2	2.4	2.7	3.6
		2 周	1.2	1.5	2.3	3.3	5.2
		4 周	1.3	1.6	2.8	4.3	7.0
	碎片%	0 周	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
		2 周	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5
		4 周	2.6	2.5	2.4	2.3	2.8
CEX	主峰%	0 周	61.2	60.9	61.2	60.9	63.9
		2 周	49.9	50.2	49.9	49.7	47.6
		4 周	41.1	41.7	41.2	40.8	36.0
	酸性峰%	0 周	30.6	30.8	30.7	30.6	27.3
		2 周	41.3	41.2	40.9	40.5	42.1
		4 周	49.9	49.5	49.2	48.6	52.1
	碱性峰%	0 周	8.2	8.2	8.2	8.5	8.8
		2 周	8.7	8.7	9.2	9.8	10.4
		4 周	9.0	8.8	9.5	10.6	11.9
CE-SDS	IgG%	0 周	95.7	95.6	95.5	95.6	96.0
		2 周	94.6	94.5	94.3	94.5	95.4
		4 周	87	86.9	86.8	86.2	83.5