



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102614134 B

(45)授权公告日 2016.09.07

(21)申请号 201210090068.4

A61K 38/17(2006.01)

(22)申请日 2006.03.22

A61K 47/26(2006.01)

A61K 47/34(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102614134 A

(43)申请公布日 2012.08.01

(30)优先权数据

60/665,125 2005.03.25 US

(62)分案原申请数据

200680008569.6 2006.03.22

(73)专利权人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约

(72)发明人 D·迪克斯 K·弗莱 S·考特兹

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 李瑛

(56)对比文件

WO 97/04801 A1,1997.02.13,

US 2006/0058234 A1,2006.03.16,

US 2005/0276808 A1,2005.12.15,

US 2003/0202972 A1,2003.10.30,

Hamish M. Fraser,et al.Single

Injections of Vascular Endothelial Growth

Factor Trap Block Ovulation in the

Macaque and Produce a Prolonged, Dose-

Related Suppression of Ovarian Function.

《The Journal of Clinical Endocrinology &

Metabolism》.2004,第90卷(第2期),1114-1122

页.

审查员 刘东吉

(51)Int.Cl.

A61K 9/19(2006.01)

A61K 9/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

序列表3页

(54)发明名称

VEGF拮抗剂制剂

(57)摘要

提供了血管内皮生长因子(VEGF)特异性融合蛋白拮抗剂的制剂,包括冻干前制剂、重建的冻干制剂和稳定的液体制剂。优选,该融合蛋白具有SEQ ID NO:4的序列。

1. 稳定液体制剂, 包含5mM磷酸盐缓冲剂、5mM柠檬酸盐缓冲剂、100mM NaCl、20%蔗糖、25mg/ml融合蛋白和0.1%聚山梨酸酯;
pH为约6.0; 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:4的氨基酸27-457并且在Asn残基62、94、149、222和308处糖基化。

VEGF拮抗剂制剂

[0001] 本分案申请是基于申请号为200680008569.6,申请日为2006年03月22日,发明名称为“VEGF拮抗剂制剂”的中国专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及含有能够抑制血管内皮生长因子(VEGF)的物质的药物制剂,并涉及制备和使用该制剂的方法。本发明包括具有提高了的稳定性的药物制剂。

[0003] 相关技术综述

[0004] 血管内皮生长因子(VEGF)表达在人癌症中几乎普遍存在,与其作为肿瘤新血管生成的关键介体的作用相一致。VEGF功能通过与分子或其VEGFR-2受体结合的阻断抑制了多个不同异种移植模型中植入的肿瘤细胞的生长(参见,例如,Gerber等人(2000)Cancer Res.60:6253-6258)。已经描述了可溶性VEGF特异性融合蛋白拮抗剂,被称为“VEGF捕集物(trap)”(Kim等人(2002)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99:11399-404;Holash等人(2002)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99:11393-8)。

[0005] 冻干(在受控条件下冷冻干燥)通常用于蛋白质的长期贮藏。冻干的蛋白质在冻干状态下基本上能抵抗降解、聚集、氧化和其他退化过程(参见,例如,U.S.6,436,897)。

[0006] 发明简述

[0007] 在此提供了VEGF特异性融合蛋白拮抗剂的稳定制剂。本发明的药物学上可接受制剂包括VEGF“捕集物”拮抗剂和药物学上可接受的载体。具体实施方案中,提供了液体和冷冻干燥或冻干制剂。

[0008] 第一个方面中,本发明的特征在于VEGF特异性融合蛋白拮抗剂的稳定液体制剂,包括含有基本上由第一个VEGF受体的免疫球蛋白样(Ig)结构域2和第二个VEGF受体的Ig结构域3构成的受体成分和多聚化成分的融合蛋白、一种或多种缓冲剂和一种或多种热稳定剂。VEGF特异性融合蛋白拮抗剂的具体实施方案中,第一个VEGF受体是F1t1而第二个VEGF受体是F1k1或F1t4。更具体的实施方案中,融合蛋白具有SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列。一个实施方案中,缓冲剂是磷酸盐缓冲剂和/或柠檬酸盐。更优选,缓冲剂是磷酸盐和柠檬酸盐。一个实施方案中,热稳定剂是NaCl和/或蔗糖。更优选,热稳定剂是NaCl和蔗糖两者。

[0009] 具体实施方案中,VEGF特异性融合蛋白拮抗剂的稳定液体制剂包括1-10mM磷酸盐缓冲剂、1-10mM柠檬酸盐、25-150mM NaCl、5-30%蔗糖、10-50mg/ml融合蛋白,约6-6.5的pH。更具体的实施方案中,稳定的液体制剂包括5mM磷酸盐缓冲剂、5mM柠檬酸盐缓冲剂、100mMNaCl、20%蔗糖、25mg/ml融合蛋白,约6.0的pH。此外,可以存在聚山梨酸酯,例如0.05-0.15%聚山梨酸酯20。本发明的VEGF特异性融合蛋白拮抗剂的稳定液体制剂以25mg/ml的VEGF制剂在-80℃贮藏约6个月后几乎没有呈现出沉淀并且在5℃贮藏6个月后几乎没有沉淀。

[0010] 第二个方面中,本发明的特征在于VEGF拮抗剂的高浓度稳定液体制剂,该制剂包括1-50mM组氨酸、25-150mM NaCl、5-30%蔗糖、50-100mg/ml融合蛋白,约6-6.5的pH,和

0.1-0.5%聚山梨酸酯或1-5%PEG。更具体的实施方案中,高浓度稳定液体制剂包括10mM组氨酸、50mM NaCl、5-20%蔗糖、50-100mg/ml融合蛋白,约6.0-6.5的pH,和0.1%聚山梨酸酯(例如,聚山梨酸酯20)或3%PEG(例如,PEG3350)。本发明的VEGF特异性融合蛋白拮抗剂的高浓度稳定液体制剂在5℃贮藏15个月后(70或100mg/ml VEGF捕集蛋白)呈现出少于约3%降解或在24个月后(50mg/ml)少于约1.5%降解。

[0011] 第三个方面中,本发明的特征在于血管内皮生长因子(VEGF)特异性融合蛋白拮抗剂冻干前制剂,包括(i)含有基本上由第一个VEGF受体的免疫球蛋白样(Ig)结构域2和第二个VEGF受体的Ig结构域3构成的受体成分和多聚化成分的融合蛋白,(ii)缓冲剂,(iii)有机助溶剂或增量剂,和(iv)一种或多种冻干保护剂(lyoprotectant)。各种不同的实施方案中,缓冲剂是组氨酸,有机助溶剂或增量剂是PEG,且冻干保护剂是甘氨酸和蔗糖中的至少一种。一个实施方案中,本发明的冻干前制剂不含有防腐剂。

[0012] 本发明的冻干前制剂的一个实施方案中,该制剂包括5-50mM组氨酸、0.1-3.0%PEG、0.25-3.0%甘氨酸、0.5-6.0%蔗糖和5-75mg/ml融合蛋白,约6.0-6.5的pH。任何实施方案中,冻干前制剂都可以进一步包括达0.05mM的柠檬酸盐和/或0.003-0.005%的聚山梨酸酯。存在的聚山梨酸酯可以是例如聚山梨酸酯20。

[0013] 更具体的实施方案中,冻干前制剂包括约10mM组氨酸、约1.5%PEG3350、约0.75%甘氨酸、约2.5%蔗糖和约12.5至75mg/ml VEGF特异性融合蛋白,约6.25的pH。具体实施方案中,融合蛋白包括SEQ ID NO:4的蛋白质序列,作为多聚体存在,例如二聚体。个别的实施方案中,重建制剂是冻干前制剂浓度的2倍,例如,将20mg融合蛋白/ml冻干前制剂重建成60mg融合蛋白/ml的最终制剂。通常,用适于注射的无菌水来重建冻干制剂。一个实施方案中,重建液体可以是抑菌水。

[0014] 优选的实施方案中,冻干前制剂基本上由约10mM组氨酸、约1.5%PEG 3350、约0.75%甘氨酸、约2.5%蔗糖和约50mg/ml具有SEQ ID NO:4的序列作为二聚体的融合蛋白构成,约6.25的pH。可以存在柠檬酸盐(低于或等于约0.02mM)和/或聚山梨酸酯(低于或等于约0.0005%)。任选地,冻干前制剂不含有防腐剂、磷酸盐缓冲剂和/或超过痕量的NaCl。一个实施方案中,冻干前制剂由约10mM组氨酸、约1.5%PEG3350、约0.75%甘氨酸、约2.5%蔗糖和约50mg/ml的VEGF捕集蛋白(SEQ ID NO:4)构成,pH6.3,并且在重建时含有20mM组氨酸、3%PEG、1.5%甘氨酸、约5%蔗糖和约100mg/ml VEGF捕集蛋白。

[0015] 第四个方面中,本发明的特征在于生产VEGF特异性融合蛋白拮抗剂的冻干制剂的方法,该方法包括对本发明的冻干前制剂进行冻干以产生冻干制剂。该冻干制剂可以通过本领域已知的用于将液体冻干的任何方法来冻干。

[0016] 第五个方面中,本发明的特征在于生产VEGF特异性融合蛋白拮抗剂的重建冻干制剂的方法,该方法包括将本发明的冻干制剂重建成重建制剂。一个实施方案中,重建制剂是冻干前制剂浓度的两倍,例如,本发明的方法包括:(a)生产VEGF特异性融合蛋白拮抗剂的冻干前制剂,(b)对步骤(a)的冻干前制剂进行冻干;和(c)重建步骤(b)的冻干制剂。

[0017] 生产重建冻干制剂方法的具体实施方案中,冻干前溶液以每ml冻干前制剂溶液25mg VEGF特异性融合蛋白拮抗剂存在于小瓶中,将其冻干并重建成50mg/ml溶液。另一实施方案中,将30mg/ml冻干前溶液冻干并重建成60mg/ml溶液。另一实施方案中,将40mg/ml冻干前溶液冻干并重建成80mg/ml溶液。另一实施方案中,将12.5mg/ml冻干前溶液冻干并

重建成25mg/ml溶液。另一实施方案中,将50mg/ml冻干前溶液冻干并重建成100mg/ml溶液。另一实施方案中,将75mg/ml冻干前溶液冻干并重建成150mg/ml溶液。优选,重建的冻干制剂不含有防腐剂。

[0018] 其他目的和优势将从以下的详述中将变得显而易见。

[0019] 发明详述

[0020] 本发明不限于所述的特定方法和实验条件,因此这样的方法和条件可以改变。还应理解在此所用的术语只是为了描述特定的实施方案,而不是打算来限制,除非另外指出,因为本发明的范围只受到所附权利要求的限制。

[0021] 如本说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“a”、“an”和“the”包括复数提及物,除非上下文中另外清楚地规定。因此,例如,对“一种方法”的提及包括一种或多种方法,和/或在此所述类型的步骤和/或本领域技术人员经阅读本公开内容将变得清楚。

[0022] 概述

[0023] 含蛋白制剂的安全处理和给药代表了对药物制造者的重大挑战。蛋白质具有出现稳定性问题的独特化学和物理特征:对于蛋白质而言存在多种降解途径,涉及到化学和物理不稳定性。化学不稳定性包括:脱氨基、聚集、肽主链的截短和甲硫氨酸残基的氧化。物理不稳定性包括许多现象,包括,例如,聚集。

[0024] 可以通过从蛋白质中除去水来提高化学和物理稳定性。冻干(在受控条件下冷冻干燥)通常用于蛋白质的长期贮藏。冻干的蛋白质在处于冻干状态时基本上能够抵抗降解、聚集、氧化和其他退化过程。通常在给药之前用任选地含有抑菌防腐剂(例如,苯甲醇)的水重建冻干的蛋白质。

[0025] 定义

[0026] 术语“载体”包括稀释剂、辅剂、赋形剂或媒介物,组合物将与其一起给药。载体可以包括无菌液体,如,例如,水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,如,例如,花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。

[0027] 术语“赋形剂”包括加入药物组合物中的非治疗性物质以提供所需的稠度或稳定作用。合适的药物赋形剂包括,例如,淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。

[0028] 术语“冻干的”或“冷冻干燥的”包括已经经过干燥程序处理如冻干的物质的状态,其中已经除去了至少50%的水分。

[0029] 短语“增量剂”包括药物学上可接受的并给冻干块状物增加体积的化合物。通常,本领域已知的可接受增量剂包括,例如,碳水化合物,包括单糖如葡萄糖、核糖、果糖等,醇糖如甘露醇、肌醇和山梨糖醇,二糖包括海藻糖、蔗糖和乳糖,天然存在的聚合物如淀粉、葡聚糖、壳聚糖、透明质酸酯、蛋白质(例如,明胶和血清白蛋白)、糖原以及合成单体和聚合物。在本发明的制剂中,PEG 3350是搅拌、混合或操作时用于稳定融合蛋白的有机助溶剂,并作为增量剂来帮助产生可接受的体积。

[0030] 术语“冻干保护剂”包括可以加入冷冻干燥或冻干制剂中来帮助维持冷冻干燥或冻干时蛋白质结构的物质。

[0031] “防腐剂”包括通常加入制剂中来延迟或消除制剂中细菌或其它污染微生物生长

的抑菌、杀菌、抑真菌或杀真菌化合物。防腐剂包括,例如,苯甲醇、苯酚、苯扎氯铵、间甲酚、硫柳汞、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯等。可以在USP中找到药物学上可接受的防腐剂的其它实例。

[0032] VEGF拮抗剂

[0033] VEGF拮抗剂是能够阻断或抑制血管内皮生长因子(VEGF)的生物作用的化合物,并包括能够捕获VEGF的融合蛋白。优选的实施方案中,VEGF拮抗剂是SEQ ID NO:2或4的融合蛋白;更优选,SEQ ID NO:4。具体实施方案中,VEGF拮抗剂在哺乳动物细胞系如CHO细胞中表达并可以在翻译后修饰。一个具体实施方案中,融合蛋白包括SEQ ID NO:4的氨基酸27-457并在Asn残基62、94、149、222和308上糖基化。

[0034] 可以通过本领域已知的任何合适方法来制备本发明方法和制剂中的VEGF拮抗剂,或者该拮抗剂是已知的。VEGF拮抗剂在用于制备药物学上可接受的制剂时优选基本上无蛋白质污染物。优选,“基本上无蛋白质污染物”意思是至少90%重量的用于制备制剂的VEGF特异性融合蛋白拮抗剂制剂中的蛋白质是VEGF融合蛋白拮抗剂蛋白质,更优选至少95%,最优选至少99%。融合蛋白优选基本上无聚集体。“基本上无聚集体”意思是在融合蛋白用于制备药物学上有效的制剂时至少90%重量的融合蛋白不存在聚集体。作为纯化处理的结果,本发明方法和制剂中的融合蛋白可以含有少量或痕量化合物,例如,少量或痕量柠檬酸盐和/或聚山梨酸酯。含有约50mg融合蛋白/ml的本发明冻干前制剂的一个实施方案中,柠檬酸盐可以以约0.02mM的浓度存在和/或聚山梨酸酯可以以约0.0005%的浓度存在。如果在冻干后将冻干前制剂重建成最初体积的一半(例如,100mg/ml融合蛋白),那么所得到的浓度可能是0.04mM柠檬酸盐和/或0.001%聚山梨酸酯。

[0035] 冻干和冻干制剂

[0036] 本发明的一个方面中,提供了包括VEGF特异性融合蛋白拮抗剂的药物学上可接受的制剂,其中该制剂是冷冻干燥或冻干制剂。可以将冻干制剂重建成溶液、悬浮液、乳液或用于给药或使用的任何其他合适的形式。通常首先将冻干制剂制备成液体,然后冷冻和冻干。冻干之前的总液体体积可以小于、等于或大于冻干制剂的最终重建体积。冻干处理是本领域普通技术人员公知的,并且通常包括在受控条件下使水从冷冻制剂中升华。

[0037] 冻干制剂可以贮藏于宽范围的温度下。冻干制剂可以贮藏于低于25℃,例如,冷藏于4℃,或贮藏于室温(例如,大约25℃)。优选,将冻干制剂贮藏于低于约25℃,更优选,约4-20℃;低于约4℃;低于约-20℃;约-40℃;约-70℃,或约-80℃。

[0038] 通常通过加入水溶液使冻干制剂溶解来重建冻干制剂供使用。可以使用各种水溶液来重建冻干制剂。优选,使用水来重建冻干制剂。优选基本上由水(例如,USP WFI,或注射用水)或抑菌水(例如,含有0.9%苯甲醇的USP WFI)构成的溶液来重建冻干制剂。然而,也可以使用含有缓冲剂和/或赋形剂和/或一种或多种药物学上可接受的载体的溶液。

[0039] 通常从液体,即,从溶液、悬浮液、乳液等制备冷冻干燥或冻干制剂。因此,经历冷冻干燥或冻干的液体优选含有最终重建的液体制剂中所需的所有成分。结果,当重建时,冷冻干燥或冻干制剂重建之后将立即成为所需的液体制剂。用于产生冷冻干燥或冻干制剂的优选液体制剂包括药物学上有效量的VEGF特异性融合蛋白拮抗剂、缓冲剂、稳定剂和增量剂。冷冻干燥或冻干制剂优选包括组氨酸,因为组氨酸与磷酸盐相比,在将融合蛋白冻干时可更有效地稳定融合蛋白。有机助溶剂,如PEG 3350,用于在搅拌、混合或操作时稳定融合

蛋白。优选在冷冻干燥或冻干制剂中使用冻干保护剂。冻干保护剂在冷冻干燥或冻干时有助于维持蛋白质的二级结构。两种优选实例冻干保护剂是甘氨酸和蔗糖,优选一起使用。

[0040] 稳定的液体制剂

[0041] 一方面,本发明提供了包括VEGF特异性融合蛋白拮抗剂的稳定的药物学上可接受的制剂,其中该制剂是液体制剂。优选,该液体制剂包括药物学上有效量的融合蛋白。该制剂还可以包括一种或多种药物学上可接受的载体、缓冲剂、增量剂、稳定剂、防腐剂和/或赋形剂。药物学上可接受的液体制剂的实例包括药物学上有效量的VEGF特异性融合蛋白拮抗剂、缓冲剂、助溶剂和一种或多种稳定剂。

[0042] 优选的液体制剂包括磷酸盐缓冲剂、有机助溶剂和一种或多种将贮藏时聚集物和低分子量产物的形成减到最少的热稳定剂,和约10mg/ml至约50mg/ml融合蛋白,其中该制剂约为pH 6.0-6.5。优选的液体制剂包括约5mM磷酸盐缓冲剂、约5mM柠檬酸盐、约100mM NaCl、约25%蔗糖和约10-50mg/ml融合蛋白,其中该制剂为约6.0的pH;任选地可以存在聚山梨酸酯(例如,0.1%聚山梨酸酯20)。尽管NaCl或蔗糖可以用作稳定剂,已经确定NaCl和蔗糖的组合比任一单独的稳定剂可更有效地稳定融合蛋白。

[0043] 在规定的的时间点以多种方式来测定稳定性,包括pH的测定、颜色和外观的目测、通过本领域已知的方法,例如UV光谱法、SDS-PAGE、大小排阻HPLC、活性的生物测定、等电点聚焦和异天冬氨酸定量对总蛋白含量的测定。用于测定VEGF拮抗剂活性的生物测定的一个实例中,使用BAF/3VEGFR1/EPOR细胞系来测定通过本发明的VEGF特异性融合蛋白拮抗剂的VEGF165结合。

[0044] 制剂,不管是液体还是冷冻干燥和冻干的,都可以贮藏于缺氧环境中。可以通过将制剂贮藏于惰性气体如,例如氩、氮或氦下来产生缺氧环境。

实施例

[0045] 在描述本发明方法之前,应当理解本发明不限于所述的特定方法和实验条件,因为这样的方法和条件可以改变。还应当理解在此所用的术语只是为了描述特定的实施方案,而不是打算来限制,因为本发明的范围只限于所附的权利要求。

[0046] 如本说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“a”、“an”和“the”包括复数提及物,除非上下文中另外清楚地规定。因此,例如,对“一种方法”的提及包括一种或多种方法,和/或在此所述类型的步骤和/或本领域技术人员在阅读该公开内容之后将变得清楚。

[0047] 除非另外限定,在此所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含意。尽管与在此所述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料都可以用于实践或测试本发明,现在描述优选的方法和材料。

[0048] 实施例1. 50mg/ml VEGF捕集物的液体制剂的稳定性

[0049] 将含有10mM磷酸盐、50mM NaCl、0.1%聚山梨酸酯20、20%蔗糖和50mg/ml VEGF捕集物(SEQ ID NO:4), pH6.25的液体制剂贮藏于5℃并在3、6、9、12、18和24个月时测试样品。通过SE-HPLC测定稳定性。表1中所示的结果表明了分别在12和24个月时98.6%和98.3%的VEGF捕集蛋白保持完整(未降解)。在OD405nm处测量浊度;和通过大小排阻HPLC测定回收的蛋白质百分比。

[0050] 表1. 贮藏于5℃时50mg/ml VEGF捕集蛋白(VEFT-SS065)的稳定性

	月数	目测外观	浊度	pH	回收的 VEGF 捕集物 %	VEGF 捕集物 天然构象 %
[0051]	0	通过	0.00	6.2	100	99.0
	3	通过	0.00	6.2	102	98.8
	6	通过	0.00	6.2	103	98.7
	9	通过	0.00	6.3	102	98.2
	12	通过	0.00	6.3	106	98.6
	18	通过	0.00	6.3	103	98.4
	24	通过	0.00	6.2	93	98.3

[0052] 将含有10mM磷酸盐、50mM NaCl、3%PEG 3350、20%蔗糖和50mg/ml VEGF捕集物 (SEQ ID NO:4), pH6.25的液体制剂贮藏于5℃并在3、6、9、12、18和24个月时测试样品。稳定性结果显示于表2中。

[0053] 表2.贮藏于5℃时50mg/ml VEGF捕集蛋白(VEFT-SS065)的稳定性

	月数	目测外观	浊度	pH	回收的 VEGF 捕集物 %	VEGF 捕集物 天然构象 %
[0054]	0	通过	0.00	6.2	100	99.0
	3	通过	0.00	6.2	100	98.8
	6	通过	0.01	6.3	103	98.5
	9	通过	0.00	6.3	103	98.3
	12	通过	0.01	6.3	110	98.3
	18	通过	0.00	6.3	113	98.0
	24	通过	0.01	6.2	90	97.8

[0055] 实施例2.75mg/ml VEGF捕集物的液体制剂的稳定性

[0056] 将含有10mM磷酸盐、50mM NaCl、0.1%聚山梨酸酯20、20%蔗糖和75mg/ml VEGF捕集物 (SEQ ID NO:4), pH6.25的液体制剂贮藏于5℃并在0、1、2、3、3、9、12和15个月时测试样品。稳定性结果显示于表3中。

[0057] 表3.贮藏于5℃时75mg/ml VEGF捕集蛋白(VEFT-SS101)的稳定性

	月数	目测外观	浊度	pH	回收的 VEGF 捕集物 %	VEGF 捕集物 天然构象 %
[0058]	0	通过	0.00	6.2	100	97.1
	1	通过	0.00	6.2	96	97.0
	2.3	通过	0.00	6.2	98	96.7
	3	通过	0.00	6.2	97	96.1
	9	通过	-0.01	6.0	101	96.0
	12	通过	0.00	6.3	110	94.5
	15	通过	0.00	6.3	92	95.6

[0059] 将含有10mM磷酸盐、50mM NaCl、3%PEG 3350、20%蔗糖和75mg/ml VEGF捕集物 (SEQ ID NO:4), pH6.25的液体制剂贮藏于5℃并在0、1、2、3、3、9、12和15个月时测试样品。稳定性结果显示于表4中。

[0060] 表4.贮藏于5℃时75mg/ml VEGF捕集蛋白(VEFT-SS101)的稳定性

	月数	目测外观	浊度	pH	回收的 VEGF 捕集物 %	VEGF 捕集物 天然构象 %
	0	通过	0.00	6.2	100	96.8
	1	通过	0.00	6.2	99	96.7
[0061]	2.3	通过	0.00	6.2	97	96.3
	3	通过	0.00	6.2	89	95.6
	9	通过	-0.01	6.2	98	95.4
	12	通过	-0.01	6.3	112	94.1
	15	通过	0.00	6.3	98	94.8

[0062] 实施例3.100mg/ml VEGF捕集物的液体制剂的稳定性

[0063] 将含有10mM磷酸盐、50mM NaCl、0.1%聚山梨酸酯20、20%蔗糖和100mg/ml VEGF捕集物(SEQ ID NO:4),pH6.25的液体制剂贮藏于5℃并在0、1、2.3、3、9、12和15个月时测试样品。稳定性结果显示于表5中。

[0064] 表5.贮藏于5℃时100mg/ml VEGF捕集蛋白(VEFT-SS101)的稳定性

	月数	目测外观	浊度	pH	回收的 VEGF 捕集物 %	VEGF 捕集物 天然构象 %
	0	通过	0.00	6.3	100	96.7
	1	通过	0.00	6.2	92	96.6
[0065]	2.3	通过	0.00	6.2	92	96.2
	3	通过	0.00	6.2	99	95.5
	9	通过	-0.01	6.2	92	95.5
	12	通过	-0.01	6.2	110	93.9
	15	通过	0.00	6.3	108	94.8

[0066] 将含有10mM磷酸盐、50mM NaCl、3%PEG 3350、20%蔗糖和100mg/ml VEGF捕集物(SEQ ID NO:4),pH6.25的液体制剂贮藏于5℃并在0、1、2.3、3、9、12和15个月时测试样品。稳定性结果显示于表6中。

[0067] 表6.贮藏于5℃时100mg/ml VEGF捕集蛋白(VEFT-SS101)的稳定性

	月数	目测外观	浊度	pH	回收的 VEGF 捕集物 %	VEGF 捕集物 天然构象 %
	0	通过	0.00	6.3	100	96.5
	1	通过	0.01	6.2	94	96.2
[0068]	2.3	通过	0.01	6.2	93	95.7
	3	通过	0.01	6.2	102	94.6
	9	通过	0.00	6.2	95	94.6
	12	通过	0.00	6.3	96	92.8
	15	通过	0.01	6.3	102	93.9

[0069] 实施例4.稳定的VEGF捕集物制剂的另外的实施方案

[0070] 一个实施方案中,本发明提供了稳定的液体VEGF结合融合蛋白(VEGF捕集物)制剂,其含有5mM磷酸盐、5mM柠檬酸盐、100mM NaCl、0.1%聚山梨酸酯20、20%蔗糖、25mg/ml

VEGF捕集蛋白, pH6.0。该制剂可以皮下递送或通过静脉内输注来稀释并递送。由于该制剂的高摩尔渗透压浓度, 将其稀释3倍以获得用于静脉内给药的等渗溶液。稳定性研究显示了在2-8℃贮藏3年后检测到少于约1%的降解。

[0071] 一个实施方案中, 本发明的特征在于冻干制剂, 优选将冻干前制剂浓缩两倍成为冻干后制剂, 例如, 50至100mg/ml; 75至150mg/ml, 或100至200mg/ml VEGF捕集蛋白。一个具体的实施方案中, 冻干前制剂包括10mM组氨酸、1.5%PEG 3350、0.75%甘氨酸、2.5%蔗糖、50mg/ml VEGF捕集蛋白, pH6.3, 将其重建成包括20mM组氨酸、3%PEG3350、1.5%甘氨酸、5%蔗糖、100mg/ml VEGF捕集蛋白, pH6.3的制剂。稳定性研究显示出在2-8℃贮藏6个月未检测到降解。

[0072] 液体制剂的一个实施方案中, 该制剂包括10mM组氨酸、50mM NaCl、5-20%蔗糖、50-100mg/ml VEGF捕集物和0.1%聚山梨酸酯20或3%PEG3350之一。该液体制剂的优势之一在于它提供了较高浓度的VEGF捕集物而不需要制造冻干产品。因此, 该制剂易于皮下递送, 例如, 通过允许提供预先填充液体的注射器, 其浓度高于经IV输注递送的浓度。此外, 该制剂可有利地用于提供较小的输注体积和较短的输注时间。在5℃保温长达15或24个月通过SE-HPLC测定的降解量概括于表7中。

[0073] 表7. 含有50-100mg/ml VEGF捕集物的液体制剂(VEGF-SS101)的稳定性

	保温 (月数)	VEGF 捕集物 (mg/ml)	聚山梨酸酯 20%	PEG 3350%	降解%
[0074]	24	50	0.1	—	0.7
	24	50	—	3	1.3
	15	75	0.1	—	1.5
	15	75	—	3	2.0
	15	100	0.1	—	1.9
	15	100	—	3	2.6

[0075] 实施例5. 冻干的和液体的稳定性和活性

[0076] 在6个月期间测定重建的冻干制剂的稳定性。冻干前制剂含有10mM组氨酸、1.5%PEG 3350、2.5%蔗糖、0.75%甘氨酸和50mg/ml VEGF捕集蛋白。冻干后, 重建的制剂含有20mM组氨酸、3%PEG 3350、5%蔗糖、1.5%甘氨酸和100mg/ml VEGF捕集蛋白(SEQ ID NO: 4)。结果显示于表8中。在基于细胞的生物测定中测定活性, 该测定直接测量VEGF捕集物抑制人VEGF对小鼠Baf/3 VEGFR1/EpoR细胞系的生物活性的能力。因此, 该生物测定直接测量蛋白质的生物活性。将结果表示为相对效能百分比(测试样品IC₅₀/参照VEGF IC₅₀标准×100)。使用特异性测量含有VEGF和各种浓度VEGF捕集物的平衡混合物中游离VEGF的灵敏ELISA来测量VEGF与VEGF捕集物的结合亲和力。将结果表示为相对结合百分比(测试样品的IC₅₀/参照的IC₅₀×100)。测量的pH在6.3-6.5的范围内。所有溶液在视觉上都是澄清的。在A_{280nm}处用UV分光光度计来测定回收的VEGF捕集物浓度, 以mg/ml表示。用SE-HPLC测定以天然构象回收的VEGF捕集物百分比(主峰纯度)。

[0077] 表8. 贮藏于5℃的VEGF捕集物冻干制剂(VGT-RS475)的稳定性

	月数	生物测定	结合测定	回收的%	天然构象%
	0	120	126	97.9	98.7
	1	117	74	97.9	98.6
	1+24 小时	126	72	99.0	98.5
[0078]	1+4 小时	94	81	101.5	98.2
	3	101	98	98.1	98.6
	3+24 小时	65	94	98.1	98.2
	6+4 小时			96.9	98.7
	6+24 小时			98.8	98.6

[0079] 测试含有约5mM磷酸盐、5mM柠檬酸盐、100mM NaCl、0.1%聚山梨酸酯20、20%蔗糖和25mg/ml VEGF捕集蛋白的制剂在5℃贮藏时36个月内的稳定性和活性。结果显示于表9中。如通过目测所确定的,所有样品是澄清的和无色的。pH范围为6.0-6.1。*直接表示两次测量(1和2个月)的结合测定结果而不是以标准的百分比表示。

[0080] 表9.液体制剂(VGT-FS405)的稳定性和活性

	月数	天然构象%	生物测定	结合测定	蛋白质含量 mg/ml
	0	99.7	106	72	25.0
	1	99.9	119	4.4pM*	25.2
	2	99.6	102	5.4pM*	25.1
	3	99.6	97	88	25.1
[0081]	6	99.6	101	106	25.0
	9	99.4	89	126	25.4
	12	99.5	85	95	25.2
	18	99.4	99	81	25.5
	24	99.3	75	95	25.6
	36	98.8	109	79	25.6

序列表

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> VEGF拮抗剂制剂

<130> 4030A-WO

<140> 待给定

<141> 2006-03-22

<150> 60/665, 125

<151> 2005-03-25

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1453

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

```

aagcttgggc tgcaggtcga tcgactctag aggatcgatc cccgggcgag ctcgaattcg 60
caaccaccat ggtcagctac tgggacaccc gggtcctgct gtgcgcgctg ctcagctgtc 120
tgetttctac aggatctagt tccggaggta gacctttcgt agagatgtac agtgaaatcc 180
ccgaaattat acacatgact gaaggaaggg agctcgtcat tccctgccgg gttacgtcac 240
ctaacatcac tgttacttta aaaaagtttc cacttgacac tttgatccct gatggaaaac 300
gcataatctg ggacagtaga aagggttca tcatatcaaa tgcaacgtac aaagaaatag 360
ggcttctgac ctgtgaagca acagtcaatg ggcatttgta taagacaaac tatctcacac 420
atcgacaaac caatacaatc atagatgtgg ttctgagtcg gtctcatgga attgaactat 480
ctgtttggaga aaagcttggt ttaaattgta cagcaagaac tgaactaaat gtggggattg 540
acttcaactg ggaataccct tcttcgaagc atcagcataa gaaacttgta aaccgagacc 600
taaaaaccca gtctgggagt gagatgaaga aatttttgag cacccttaact atagatgggtg 660
taaccceggag tgaccaagga ttgtacacct gtgcagcacc cagtgggctg atgaccaaga 720
agaacagcac atttgtcagg gtccatgaaa agggcccggg cgacaaaact cacacatgcc 780
caccgtgccc agcactgaa ctcctggggg gaccgtcagt ctctctcttc ccccaaaaac 840
ccaaagacac cctcatgac tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtgggtg gtggacgtga 900
gccacgaaga cccctgaggtc aagtccaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg 960
ccaagacaaa gcgcggggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctca 1020
ccgtctctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggte tccaacaaag 1080
ccctccagc ccccatcgag aaaacatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac 1140
aggtgtacac cctgcccaca tcccggtatg agctgaccaa gaaccaggte agcctgacct 1200
gectgtgcaa aggtctctat cccagcgaca tcgcctgga gtgggagagc aatgggcagc 1260
cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgcctggactc cgacggctcc ttcttctct 1320
atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgtctcg 1380
tgatgatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta 1440
aatgagcggc cgc 1453

```

<210> 2

<211> 458

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成

<400> 2

```

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
1      5      10      15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu
20     25     30
Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu
35     40     45
Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu
50     55     60
Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile
65     70     75     80
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu
85     90     95

```

[0002]

Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys
 100 105 110
 Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val
 115 120 125
 Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val
 130 135 140
 Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn
 145 150 155 160
 Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg
 165 170 175
 Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr
 180 185 190
 Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys
 195 200 205
 Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg
 210 215 220
 Val His Glu Lys Gly Pro Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 3
 <211> 1377
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 合成

<400> 3
 atggtcagct actgggacac cggggtcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc 60
 acaggatcta gtcccggaag tgataccggt agaccittcg tagagatgta cagtgaatac 120
 ccggaatata tacacatgac tgaaggaaagg gagctcgtca ttccctgcgc ggttacgtca 180
 cctaacaatca ctgttacttt aaaaaagttt ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa 240
 cgcataatct gggacagtag aaaggccttc atcatatcaa atgcaacgta caaagaaata 300
 gggtcttctga cctgtgaage aacagtcatt gggcatttgt ataagacaaa ctatctcaca 360
 catcgacaaa ccaatacaat catagatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaacta 420
 tctgttggag aaaagcttgt cttaaattgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt 480
 gacttcaact gggaataccc ttcttcgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac 540
 ctaaaaaccc agtctgggag tgagatgaag aaatttttga gcaccttaac tatagatggt 600
 gtaacccega gtgaaccaagg attgtacacc tgtgcagcat ccagtgggct gatgaccaag 660
 aagaacagca cattttgcag ggtccatgaa aaggacaaaa ctacacatg cccaccgtgc 720
 ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 780
 accctcatga tctccggac ccttgaggtc acatgcgtgg tgggtggact gagccacgaa 840
 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 900
 aagccgctgg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtctcg 960
 caccaggact ggctgaatgg caaggagtag aagtccaagg tctccaacaa agccctccca 1020
 gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1080
 acctgcccc catccgggga tgaactgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcttggtc 1140

```

aaagcttct atccagcga catgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1200
aactacaaga ccacgctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag 1260
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1320
gaggtcttgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1377

```

<210> 4
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 合成

<400> 4

```

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
1      5      10      15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
20      25      30
Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
35      40      45
Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
50      55      60
Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
65      70      75      80
Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
85      90      95
Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
100     105     110
Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
115     120     125
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
130     135     140
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
145     150     155     160
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
165     170     175
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
180     185     190
Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
195     200     205
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
210     215     220
Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225     230     235     240
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245     250     255
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
260     265     270
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275     280     285
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290     295     300
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305     310     315     320
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325     330     335
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340     345     350
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
355     360     365
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370     375     380
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385     390     395     400
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405     410     415
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420     425     430
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435     440     445
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450     455

```

[0003]