



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104755096 B

(45)授权公告日 2017.10.13

(21)申请号 201380057007.0

(22)申请日 2013.10.31

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104755096 A

(43)申请公布日 2015.07.01

(30)优先权数据

2013205684 2013.04.10 AU

13153903.3 2013.02.04 EP

61/721,771 2012.11.02 US

13/803,863 2013.03.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.04.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2013/001260 2013.10.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/066943 EN 2014.05.08

(73)专利权人 杰特有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

(72)发明人 Y·武契察 G·L·沃伦

(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 唐伟杰

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61P 3/06(2006.01)

(56)对比文件

W0 2012000048A1 ,2012.01.05,

W0 2007098122A2 ,2007.08.30,

W0 2007098122A2 ,2007.08.30,

审查员 程婷

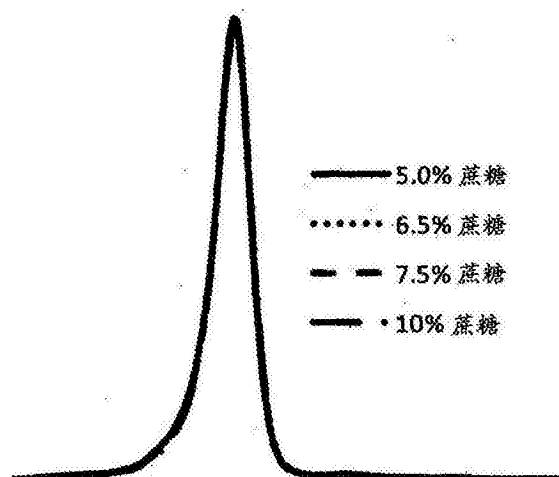
权利要求书2页 说明书10页 附图11页

(54)发明名称

重构的HDL配制剂

(57)摘要

本发明涉及重构的高密度脂蛋白(rHDL)配制剂,其包含载脂蛋白,脂质和冻干稳定剂。所述配制剂具有降低的肾毒性和良好的长期稳定性,特别是呈冻干形式的配制剂。



1. 包含载脂蛋白、脂质和冻干稳定剂的重构的高密度脂蛋白 (rHDL) 配制剂, 其中载脂蛋白与脂质的比率是1:20至1:120mol:mol, 冻干稳定剂包含蔗糖, 所述蔗糖以4.6至4.8% w/w的rHDL配制剂的浓度存在, 和冻干稳定剂以4.6至4.8% w/w的rHDL配制剂的总浓度存在。

2. 根据权利要求1的rHDL配制剂, 其中载脂蛋白与冻干稳定剂的比率是1:1w/w至1:3w/w。

3. 根据权利要求1或2中任一项的rHDL配制剂, 其中所述配制剂额外地包含洗涤剂。

4. 根据权利要求3的rHDL配制剂, 其中所述洗涤剂包含胆酸钠。

5. 根据权利要求1或4中任一项的rHDL配制剂, 其中载脂蛋白与脂质的比率是1:20至1:100mol:mol。

6. 根据权利要求1的rHDL配制剂, 其中所述载脂蛋白的浓度是5至50mg/ml。

7. 根据权利要求1或6中任一项的rHDL配制剂, 其中所述载脂蛋白包含载脂蛋白A-I (Apo A-I)。

8. 根据权利要求7的rHDL配制剂, 其中所述Apo A-I选自纯化自血浆的Apo A-I和重组的Apo A-I。

9. 根据权利要求8的rHDL配制剂, 其中所述Apo A-I包含野生型或Milano Apo A-I序列。

10. 根据权利要求1或9中任一项的rHDL配制剂, 其中所述脂质包含至少一种带电或非带电的磷脂或其混合物。

11. 根据权利要求10的rHDL配制剂, 其中所述脂质包含磷脂酰胆碱。

12. 根据权利要求1或11中任一项的rHDL配制剂, 其中所述载脂蛋白是纯化自血浆的Apo A-I, 所述脂质是磷脂酰胆碱, 所述冻干稳定剂是蔗糖和所述配制剂还包含胆酸钠洗涤剂。

13. 根据权利要求12的rHDL配制剂, 其中载脂蛋白与脂质的比率是1:45至1:65mol:mol; 冻干稳定剂以4.6至4.8% w/w的浓度存在; 和胆酸钠以0.5至1.5mg/mL的浓度存在。

14. 根据权利要求1或13中任一项的rHDL配制剂, 其中所述配制剂具有范围6至8的pH。

15. 根据权利要求1的rHDL配制剂, 其中所述配制剂是冻干的。

16. 根据权利要求1或15中任一项的rHDL配制剂, 其中所述配制剂适于肠胃外给予。

17. 根据权利要求16的rHDL配制剂, 其中所述配制剂适于静脉内给予。

18. 根据权利要求2的rHDL配制剂, 其中载脂蛋白与冻干稳定剂的比率是1:1至1:2.4w/w。

19. 根据权利要求18的rHDL配制剂, 其中载脂蛋白与冻干稳定剂的比率是1:1至小于1:2w/w。

20. 制备rHDL配制剂的方法, 包含混合载脂蛋白、脂质和包含蔗糖的冻干稳定剂, 使得载脂蛋白与脂质的比率是1:20至1:120mol:mol, 所述蔗糖以4.6至4.8% w/w的rHDL配制剂的浓度存在, 和其中冻干稳定剂以4.6至4.8% w/w的rHDL配制剂的总浓度存在。

21. 权利要求1至19中任一项的rHDL配制剂在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗有需要的人类的疾病、障碍或病症, 所述疾病、障碍或病症选自心血管疾病, 高胆固醇血症和低胆固醇血症。

22. 根据权利要求21的用途,其中所述疾病、障碍或病症选自急性冠脉综合征(ACS),动脉粥样硬化,心绞痛和心肌梗死。

重构的HDL配制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及重构的高密度脂蛋白配制剂,尤其涉及具有适宜的稳定性和药物用途的生物学特性的配制剂。

背景技术

[0002] 高密度脂蛋白(HDLs)构成一系列存在于普通血清的脂蛋白颗粒。成熟HDL颗粒以含有蛋白质和脂质的球状结构形式存在。这些颗粒的外层中是更具极性的脂质、磷脂和游离胆固醇,全部具有向外指向含水环境的带电基团。更疏水的脂质比如酯化的胆固醇和甘油三酯位于颗粒的核心。新形成的或初生的HDL颗粒缺少脂质从而呈盘状。蛋白质组分包埋在外层中。主要蛋白质组分是具有较少量的Apo A-II,Apo A-IV,Apo CIII,Apo D,Apo E和Apo J的载脂蛋白A-I(Apo A-I)。各种其它蛋白质位于HDL颗粒上,比如卵磷脂-胆固醇乙酰基转移酶,PAF乙酰基水解酶和对氧磷酶。HDLs的特征是高密度($>1.063\text{g/ml}$)和小尺寸(Stoke直径=5至17nm)。

[0003] 已经努力开发人工HDLs,其能够输注入患者血流中以模拟天然HDLs的生物学效果。这些人工颗粒一般称为“重构的HDL”(rHDL),或有时称为HDL模拟物或合成的HDL颗粒。人工颗粒含有天然颗粒组分,尤其是Apo A-I和脂质。例如,WO 2012/000048描述包含Apo A-I,磷脂酰胆碱(PC)和少量胆酸钠的rHDL。WO 2012/109162描述包含Apo A-I,鞘磷脂(SM)和磷脂酰甘油(例如1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-[磷酸-rac-(1-甘油)](DPPG))的rHDL。

[0004] 方便的是在使用前冻干(冷冻-干燥)rHDL配制剂。冻干是制备固体蛋白质药物所通常使用的方法。然而,该过程产生各种冷冻和干燥压力,比如溶剂化蛋白质的浓度,形成冰晶体,pH变化等。全部这些压力能够以不同程度使蛋白质变性。从而,在蛋白质配制剂中常常需要稳定剂来保护在冷冻和干燥过程期间的蛋白质稳定性。为了保持rHDL配制剂在冻干期间的稳定性,已使用稳定剂如糖类和糖醇。例如,US 5,089,602公开血浆衍生的脂蛋白,其用10%蔗糖或10%蔗糖和5%甘露醇的混合物稳定化。WO 2012/000048公开糖和糖醇稳定剂,以约65至85g/L rHDL配制剂(相当于约6.5至8.5%w/w)的浓度使用。WO 2012/109162公开作为稳定剂的蔗糖和甘露醇,分别以4%w/w和2%w/w用于混合物中。Kim等人,Biotechnology and Bioprocess Engineering 16,785-792(2011)调查了rHDL的制备和放置稳定性。其中,Apo A-I:大豆PC比率1:150的rHDL并不能被1或5%蔗糖充分地稳定化,而10%蔗糖被描述为最佳。

[0005] 这些文献的rHDL配制剂期望用于输注疗法,但是输注产品中的高糖浓度可以导致或恶化肾问题。在rHDL的靶标患者群体这是特别的问题,原因在于这些患者常常有肾损伤。

[0006] 因此本发明的目的是,提供与这些先前的配制剂相比备择或改善的rHDL配制剂。尤其是,发明人寻求具有降低的肾毒性的稳定的rHDL配制剂。

[0007] 该问题通过根据权利要求1的配制剂得以解决。进一步优选实施方式定义在从属权利要求中。

[0008] 令人惊讶地,已发现权利要求1的rHDL配制剂显示良好的长期稳定性。通过含有比

先前配制剂更少的冻干稳定剂,本申请配制剂也具有更低的肾毒性风险。低冻干稳定剂浓度还可以允许rHDL在rHDL功能的功能测试表现更佳。发明人还发现氨基酸、特别是脯氨酸是有用的rHDL配制剂冻干稳定剂。

发明概要

[0009] 本发明提供rHDL配制剂,其包含载脂蛋白、脂质和冻干稳定剂,其中载脂蛋白与脂质的比率是约1:20至约1:120 (mol:mol)。

[0010] 优选,冻干稳定剂以约1.0%至约6.0% (w/w rHDL配制剂),例如1.0,1.1,1.2或1.3至5.5,5.6,5.7,5.8,5.9或6.0的浓度存在。这种低量的冻干稳定剂可以降低肾毒性风险。其也特别适于在急性冠脉综合征治疗(ACS)期间接受造影剂的患者,原因在于这些试剂可以与冻干稳定剂竞争在肾清除。在优选的实施方式中,冻干稳定剂以约1.0%至小于6.0%例如约1.0%至5.9%的浓度存在。优选冻干稳定剂以约3.0至小于6.0%,例如约3.0至5.9%的浓度存在。更优选,冻干稳定剂以约4.0至5.5%,特别4.3至5.3%,更特别4.3至5.0%,和最优选4.6至4.8% (w/w)的浓度存在。所述配制剂显示良好的稳定性和低肾毒性。

[0011] 另选或此外,优选的载脂蛋白与冻干稳定剂的比率是约1:1至约1:3 (w:w)。尤其是,载脂蛋白与冻干稳定剂的比率是约1:1至约1:2.4 (w:w),例如小于1:2 (w:w)。发明人已发现这些配制剂保持稳定、冻干样品尺度分布显示很少的变化或不显示变化,甚至在贮藏(储存)数月之后亦如此。然而,在某些实施方式中,载脂蛋白与冻干稳定剂的比率可以小于该,例如约1:1至约1:7,和尤其是约1:1至约1:5 (w:w)。

[0012] 本发明也提供包含载脂蛋白、脂质和冻干稳定剂的rHDL配制剂,其中冻干稳定剂包含氨基酸。优选氨基酸是脯氨酸。发明人已发现氨基酸是rHDL配制剂的良好冻干稳定剂,特别是在具有低量其它稳定剂的混合物中如此。

[0013] 本发明也提供前述的rHDL配制剂,用于预防或治疗人类的疾病、障碍或病症。适宜地,疾病、障碍或病症响应rHDL配制剂的预防性或治疗性给予。

[0014] 发明详述

[0015] 在本发明的上下文中,术语“重构的HDL (rHDL) 配制剂”意指任何人工制备的脂蛋白配制剂或组合物,其功能上相似、类似、相应于或模拟高密度脂蛋白(HDL),一般存在于血浆中。rHDL配制剂在其范围内包括“HDL模拟物”和“合成的HDL颗粒”。

[0016] 在本发明的上下文中,术语“冻干稳定剂”意指在冻干期间稳定化蛋白质的物质。这种冻干稳定剂是本领域熟知的且综述于例如Wang (2000) International Journal of Pharmaceuticals 203:1-60。用于本发明中的优选冻干稳定剂包含糖,糖醇,氨基酸或其混合物。例如,发明人已发现二糖比如蔗糖是用作冻干稳定剂的特别适宜的糖类。可以使用的其它二糖包括果糖,海藻糖,麦芽糖和乳糖。除了二糖之外,还可以使用三糖如棉子糖和麦芽三糖。更大的低聚糖例如麦芽五糖、麦芽六糖和麦芽七糖也可以是适宜的。另选地,可以使用单糖如葡萄糖,甘露糖和半乳糖。这些一、二、三和更大的寡糖可以单独或彼此组合使用。如上文所述,还可以使用糖醇作为冻干稳定剂。这些糖醇还可以单独或组合使用。本发明中所用的特别糖醇是甘露醇。可以使用的其它糖醇包括肌醇,木糖醇,半乳糖醇和山梨醇。其它多元醇如甘油也可以是适宜的。可以用作冻干稳定剂的氨基酸包括脯氨酸,甘氨酸,丝氨酸,丙氨酸和赖氨酸。还可以使用修饰的氨基酸例如4-羟脯氨酸,L-丝氨酸,谷氨酸

钠,肌氨酸和 γ -氨基丁酸。发明人已发现脯氨酸是用作冻干稳定剂的特别适宜的氨基酸。

[0017] 在特别的实施方式中,冻干稳定剂包含糖和糖醇的混合物。例如,可以使用蔗糖和甘露醇的混合物。糖和糖醇可以以任意适宜比率,例如约1:1(w:w)至约3:1(w:w),和尤其是约2:1(w:w)混合。特别预期的是比率小于2:1,例如小于3:2。一般地,比率大于1:5,例如大于1:2(w:w)。在某些实施方式中,配制剂包含小于4%蔗糖和2%甘露醇(w/w rHDL配制剂),例如3%蔗糖和2%甘露醇。在某些实施方式中,配制剂包含4%蔗糖和小于2%甘露醇。在某些实施方式中,配制剂包含小于4%蔗糖和小于2%甘露醇例如约1.0%至3.9%蔗糖和约1.0%至1.9%(w/w)甘露醇。

[0018] 在特别的实施方式中,冻干稳定剂包含糖和氨基酸的混合物。例如,可以使用蔗糖和脯氨酸的混合物。糖和氨基酸可以以任意适宜比率,例如约1:1至约3:1(w:w),和尤其是约2:1(w:w)混合。特别预期的是比率小于2:1,例如小于3:2(w:w)。一般地,比率大于1:5,例如大于1:2(w:w)。优选,氨基酸以约1.0至约2.5%例如1.0,1.2或1.3至2.0,2.1,2.2,2.3,2.4或2.5%(w/w rHDL配制剂)的浓度存在。在某些实施方式中,配制剂包含1.0%蔗糖和2.2%脯氨酸,或3.0%蔗糖和1.5%脯氨酸,或4%蔗糖和1.2%脯氨酸。可以将氨基酸加入糖中以保持等渗溶液。同渗质量摩尔浓度大于350mosmol/kg的溶液一般是高渗的,而小于250mosmol/kg的那些一般是低渗的。具有250mosmol/kg至350mosmol/kg同渗质量摩尔浓度的溶液一般是等渗的。

[0019] 在特别的实施方式中,冻干稳定剂包含糖醇和氨基酸的混合物。冻干稳定剂可以包含糖、糖醇和氨基酸的混合物。

[0020] 载脂蛋白可以是任何载脂蛋白,其是天然HDL或重构的高密度脂蛋白/rHDL的功能、生物学上活性的组分。一般地,载脂蛋白是血浆衍生的或重组的载脂蛋白比如Apo A-I, Apo A-II, Apo A-V, pro-Apo A-I或变体比如Apo A-I Milano。优选,载脂蛋白是Apo A-I。更优选Apo A-I是重组衍生的、包含野生型序列或Milano序列,或者其另选地纯化自人血浆。载脂蛋白可以呈载脂蛋白的生物学活性片段形式。所述片段可以是天然、化学合成或重组的。仅举例而言,Apo A-I的生物学活性片段优选具有至少50%,60%,70%,80%,90%或95%至100%或甚至大于100%的Apo A-I的卵磷脂-胆固醇酰基转移酶(LCAT)刺激活性。

[0021] 在本发明中,载脂蛋白:脂质的摩尔比一般是约1:20至约1:120,和优选约1:20至约1:100,更优选约1:20至约1:75(mol:mol),和尤其是1:45至1:65。该范围包括摩尔比比如约1:25,1:30,1:35,1:40,1:45,1:50,1:55,1:60,1:65,1:70,1:75,1:80,1:85,1:90,1:95和1:100。特别有利的载脂蛋白:脂质比率是1:40至1:65(mol:mol)。这确保根据本发明的rHDL配制剂包含不导致肝毒性的水平的脂质。

[0022] 在其它实施方式中,载脂蛋白:脂质的摩尔比可以是约1:80至约1:120。例如,比率可以是1:100至1:115,或1:105至1:110。在这些实施方式中,摩尔比可以是例如1:80至1:90,1:90至1:100,或1:100至1:110。在优选实施方式中,根据本发明的rHDL配制剂额外地包含洗涤剂以便进一步稳定化rHDL颗粒。洗涤剂可以是适用于rHDL配制剂中的任何的离子(例如阳离子、阴离子、两性离子)洗涤剂或非离子洗涤剂,包括胆汁酸及其盐。离子清洁剂可以包括胆汁酸及其盐,聚山梨酸酯(盐)(例如PS80),3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲基铵基]-1-丙烷-磺酸盐(CHAPS),3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲基铵基]-2-羟基-1-丙烷磺酸盐(CHAPS0),鲸蜡基三甲基-溴化铵,月桂酰基肌氨酸,叔辛基苯基丙烷磺酸和4'-氨基-7-苯

甲酰氨基-牛磺胆酸。

[0023] 胆汁酸一般是二羟基化或三羟基化的具有24个碳的类固醇,包括胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸或熊去氧胆酸。优选,洗涤剂是胆汁盐比如胆酸盐,脱氧胆酸盐,鹅脱氧胆酸盐或熊脱氧胆酸盐。特别优选的洗涤剂是胆酸钠。洗涤剂尤其是胆酸钠的洗涤剂的浓度优选是0.3至1.5mg/mL。胆汁酸浓度能够用各种方法包括比色测试(例如,参见Lerch等人,1996, Vox Sang.71:155-164;Sharma,2012,Int.J.Pharm Biomed.3(2),28-34;&**Gallsäuren** 试验试剂盒和**Gallsäuren-Stoppreagens** (Trinity Biotech)) 来确定。在本发明的某些实施方式中,rHDL配制剂包含如比色测试所测0.5至1.5mg/mL的胆酸盐水平,和浓度约4.0至5.5%,特别4.3至5.3%,更特别4.3至5.0%,和最优选4.6至4.8% (w/w) 的冻干稳定剂。在特别的实施方式中,冻干稳定剂是蔗糖。所述配制剂显示良好的稳定性和低肾和肝毒性。

[0024] 通常调节载脂蛋白与冻干稳定剂的比率,使得该比率是约1:1至约1:7 (w:w)。更优选,比率是约1:1至约1:3,尤其是约1:1.1至约1:2。在特定的实施方式中,rHDL配制剂从而具有1:1.1,1:1.2,1:1.3,1:1.4,1:1.5,1:1.6,1:1.7,1:1.8,1:1.9或1:2 (w:w) 比率。然而,对于其中存在低量蛋白质(例如<20mg/mL)的具体实施方式构思的是,载脂蛋白与冻干稳定剂的比率能够拓展多至约1:7 (w:w),例如约1:4.5 (w:w)。

[0025] 适宜地,载脂蛋白的浓度是约5至约50mg/mL。这包括5,8,10,15,20,25,30,35,40,45和50mg/mL和这些量之间的任意范围。载脂蛋白优选具有约25至45mg/mL的浓度。在其它实施方式中,载脂蛋白可以具有约5至20mg/mL,例如约8至12mg/mL的浓度。

[0026] 脂质可以是任何脂质,其是天然HDL或重构的高密度脂蛋白(rHDL)的功能、生物学上活性的组分。所述脂质包括磷脂,胆固醇,胆固醇-酯,脂肪酸和/或甘油三酯。优选,脂质是至少一种带电或非带电的磷脂或其混合物。

[0027] 在优选的实施方式中,根据本发明的rHDL配制剂包含洗涤剂和非带电磷脂的组合。在备择的优选实施方式中,rHDL配制剂包含带电磷脂但完全不含洗涤剂。在进一步优选的实施方式中,rHDL配制剂包含带电和非带电的脂质以及洗涤剂。

[0028] 如本文所用,“非带电的磷脂”,也称为中性磷脂,是在生理学pH具有约零净电荷的磷脂。非带电磷脂可以是两性离子,但其它类型的净中性磷脂是已知和可以使用的。“带电磷脂”是在生理学pH具有净电荷的磷脂。带电磷脂可以包含单一类型的带电磷脂,或两种或更多种不同、一般类似带电的磷脂的混合物。在某些实例中,带电磷脂是带负电的糖磷脂。

[0029] 根据本发明的配制剂还可以包含不同脂质的混合物,比如数种非带电脂质的混合物或非带电脂质和带电脂质的混合物。磷脂的实例包括磷脂酰胆碱(卵磷脂),磷脂酸,磷脂酰乙醇胺(脑磷脂),磷脂酰甘油(PG),磷脂酰丝氨酸(PS),磷脂酰肌醇(PI)和鞘磷脂(SM)或其天然或合成的衍生物。天然衍生物包括卵磷脂酰胆碱,卵磷脂酰甘油,大豆磷脂酰胆碱,氢化大豆磷脂酰胆碱,大豆磷脂酰甘油,脑磷脂酰丝氨酸,鞘脂,脑鞘磷脂,卵鞘磷脂,半乳脑苷脂,神经节苷脂,脑苷脂,脑磷脂,心磷脂和二鲸蜡基磷酸酯。合成的衍生物包括二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC),二癸酰基磷脂酰胆碱(DDPC),二芥酰基(二十二碳烯酰基)磷脂酰胆碱(DEPC),二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DLPC),棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱(PMPC),棕榈酰基硬脂酰基磷脂酰胆碱(PSPC),二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE),二月桂酰基磷脂酰甘油(DLPG),二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG),二油酰基磷脂酰基甘油(DOPG),棕榈酰基油酰基磷脂

酰甘油 (POPG), 二肉豆蔻酰基磷脂酸 (DMPA), 二棕榈酰基磷脂酸 (DPPA), 二硬脂酰基磷脂酸 (DSPA), 二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸 (DPPS), 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE), 二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE), 二油酰基磷脂酰丝氨酸 (DOPS), 二棕榈酰基鞘磷脂 (DPSM) 和二硬脂酰基鞘磷脂 (DSSM)。磷脂还能够是任意上述磷脂的衍生物或类似物。最佳结果能采用磷脂酰胆碱获得。在又一实施方式中, 根据本发明的配制剂中的脂质是鞘磷脂和带负电的磷脂, 比如磷脂酰甘油 (例如DPPG)。鞘磷脂和磷脂酰甘油 (特别DPPG) 的混合物是特别构思用于本发明的。在这些实施方式中, 鞘磷脂和磷脂酰甘油可以以任意适宜比率, 例如90:10至99:1 (w:w), 一般95:5至98:2和最一般97:3存在。

[0030] 根据本发明的配制剂一般具有约1.0%至约6.0%例如1.0, 1.1, 1.2或1.3%至5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9或6.0%, 优选约1.0%至小于6.0%, 例如约1.0%至5.9% (w/w rHDL配制剂) 的冻干稳定剂浓度。优选约3.0%至小于6.0%, 例如约3.0%至5.9%, 优选约4.0至5.9%, 优选约4.0%至5.5%, 优选4.3至5.3%, 优选4.3至5.0%, 和最优选4.6至4.8% (w/w) 和在所述配制剂中载脂蛋白与脂质的比率优选是约1:20至约1:75, 更优选约1:45至约1:65 (mol:mol)。冻干稳定剂优选是糖 (例如蔗糖), 任选与糖醇比如甘露醇或山梨醇或氨基酸比如脯氨酸组合。

[0031] 在优选的实施方式中, 根据本发明的rHDL配制剂具有范围6至8, 优选范围7至8的pH。甚至更优选, pH位于7.3至7.7的范围。

[0032] 在本发明的优选实施方式中, 配制剂是冻干的。由于冻干稳定剂优选蔗糖、蔗糖和甘露醇或者蔗糖和脯氨酸的存在, 与载脂蛋白:脂质比率相结合, 冻干产生具有长存放 (储存) 期的稳定粉末。该粉末可以储存、直接或贮藏 (储存) 后用作粉末或者在再水化之后使用以形成重构的高密度脂蛋白配制剂。

[0033] 本发明可以用于大规模产生重构的高密度脂蛋白。冻干的产品可以制备用于散装制剂, 或另选在冻干之前混合的蛋白质/脂质溶液可以分配在较小容器 (例如单剂量单元) 中, 和所述较小单元可以用作无菌单元剂型。冻干的配制剂能够重构以获得作为重构的高密度脂蛋白的蛋白质-脂质复合物的溶液或悬浮液。冻干的粉末用水溶液再水化为适宜的体积。优选的水溶液是注射用水 (WFI), 磷酸盐-缓冲剂盐水或生理盐水溶液。能够搅动混合物以促进再水化。优选, 重构步骤在室温下进行。

[0034] 本领域技术人员熟知如何获得包含脂质和载脂蛋白的溶液, 比如WO 2012/000048中所述。

[0035] 在一种优选实施方式中, 本发明提供制备rHDL配制剂的方法, 包括下述步骤: 将冻干稳定剂加入包含脂质和载脂蛋白的溶液, 直至达到约1.0%至约6.0% (w/w rHDL配制剂), 例如1.0, 1.1, 1.2或1.3至5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9或6.0的浓度。在优选的实施方式中, 加入冻干稳定剂直至达到约1.0%至小于6.0%例如约1.0%至5.9%的浓度。优选加入冻干稳定剂, 直至达到约3.0至小于6.0%, 例如约3.0至5.9%的浓度。更优选, 加入冻干稳定剂, 直至达到约4.0至5.5%, 特别4.3至5.3%, 更特别4.3至5.0%, 和最优选4.6至4.8% (w/w) 的浓度。溶液可以已经含有稳定剂。

[0036] 在优选的实施方式中, 溶液额外地包括洗涤剂比如胆酸钠。在优选的实施方式中, rHDL配制剂制备如下: 在浓度约1.0%至约6.0%, 优选约1.0%至小于6.0% w/w的蔗糖和胆酸钠存在下, 将纯化自血浆的Apo A-I与磷脂酰胆碱 (PC) 组合, 产生盘状、非共价结合的颗

粒(MW大约144kDa)。

[0037] 在特别的实施方式中,rHDL配制剂包含浓度约1.0%至约6.0%w/w,优选约1.0%至小于6.0%的蔗糖和胆酸盐稳定化的Apo A-I(重组或纯化自血浆)和磷脂酰胆碱。在特别的实施方式中,胆酸盐水平是约0.5至约1.5mg/mL。优选,重组Apo A-I包含野生型序列或Milano序列(其在表达时形成二聚体)。

[0038] 本发明的冻干的rHDL配制剂可以用本领域已知的任何冻干方法形成,包括但不限于冻干,即对含载脂蛋白/脂质的溶液进行冷冻随后减压蒸发。

[0039] 所提供的冻干的rHDL配制剂基本上能够保留它们最初的稳定性特征持续至少2,4,6,8,10,12,18,24,36或更多个月。例如,如通过HPLC-SEC测量,在储存6个月或更长的情况下,储存在2-8℃或25℃的冻干的rHDL配制剂一般能够保留基本上相同的分子大小分布。在储存在2-8℃和/或室温时,rHDL配制剂的具体实施方式能够是稳定的和适于商业药物用途至少6个月,12个月,18个月,24个月,36个月或甚至更长。

[0040] 根据本发明的rHDL配制剂可以用于预防或治疗人类的疾病、障碍或病症。适宜地,疾病、障碍或病症响应于根据本发明的rHDL配制剂的预防性或治疗性给予。所述疾病、障碍或病症的实例包括动脉粥样硬化;心血管疾病(例如急性冠脉综合征(ACS)比如心绞痛和心肌梗死);或使易患ACS的疾病、障碍或病症比如糖尿病;高胆固醇血症(例如升高的血清胆固醇或升高的LDL胆固醇)和降低的高密度脂蛋白(HDL)水平导致的低胆固醇血症,比如作为Tangier病的症状。

[0041] 根据本发明的rHDL配制剂可以通过本领域已知的任意给药途径给予。优选,rHDL配制剂经肠胃外比如通过静脉内(IV)输注或注射给予。在优选的实施方式中,rHDL配制剂包含Apo A-I(重组或纯化自血浆),其是已重构的以形成适于IV输注的颗粒。

[0042] 给予的rHDL配制剂剂量可以是约1至约120mg/kg体重。优选,剂量是约5至约80mg/kg,包括8mg/kg,10mg/kg,12mg/kg,20mg/kg,30mg/kg,40mg/kg,50mg/kg,60mg/kg和70mg/kg剂量。另选地,递送能够通过固定剂量的rHDL实现,也即独立于患者体重的量。优选的固定剂量包括0.1-15g,0.5-12g,1-10g,2-9g,3-8g,4-7g或5-6g载脂蛋白。特别优选的固定剂量包括1-2g,3-4g,5-6g或6-7g载脂蛋白。特定的固定剂量的非限制性实例包括0.25g,0.5g,1.0g,1.7g,2.0g,3.4g,4.0g,5.1g,6.0g,6.8g和8.0g载脂蛋白。相应地,小瓶优选包含冻干的rHDL配制剂,具有0.25g,0.5g,1,2,2.5,3,3.5,4,4.5,5,5.5,6,6.5,7,8或10g每小瓶的蛋白质含量。更优选,蛋白质含量是0.5,1,2,4,6,8或10g每小瓶。

[0043] 本发明也提供载脂蛋白试剂盒,包含一个或多个单元剂量的本文公开的载脂蛋白配制剂和一种或多种其它试剂盒组分。

[0044] 适宜地,试剂盒用于预防或治疗性地治疗如前文所述的人类的疾病、障碍或病症。

[0045] 一种或多种其它试剂盒组分的非限制性实例包括使用指南;含有各单元剂量的小瓶、容器或其它贮藏(储存)容器;递送装置比如针、导管、注射器、管道(输液管)等;和/或适于安全和方便地储存和/或运输试剂盒的包装。优选使用指南是标签或包装说明书,其中该标记或包装说明书指明载脂蛋白配制剂可以通过向有需要的人类受试者给予固定剂量量用来治疗疾病或病症比如心血管疾病。

[0046] '包装说明书'是指包括在载脂蛋白配制剂的商品包装中的说明书,其含有关于适应症、用途、剂量、给药、禁忌症的信息和/或涉及所述载脂蛋白制剂的用途的警告。

[0047] 出于本文意图, '小瓶'是指装载载脂蛋白配制剂的容器。小瓶可以被塞子密封, 所述塞子可被注射器穿透。一般地, 小瓶形成自玻璃材料。小瓶中的载脂蛋白配制剂能够呈各种状态包括液体、冻干、冷冻状态等。固定剂量载脂蛋白配制剂优选是稳定的, 原因在于浊度是优选度量。在约5, 10, 15, 20或30NTU以下的浊度水平一般能视为稳定的剂量载脂蛋白配制剂。浊度测量能够进行如下: 于贮藏(储存)温度比如室温或2至8℃, 在时间期间比如0小时, 2小时, 4小时, 6小时, 12小时, 18小时, 24小时, 36小时, 72小时, 7天和14天内温育载脂蛋白配制剂。优选, 在载脂蛋白配制剂于室温下储存14天和展示小于约15NTU的浊度的情况下, 将其视为作为液体稳定的。

[0048] 试剂盒可以便于健康专业人员给药或者患者或护理人员自行给药载脂蛋白配制剂。

[0049] 如本文所用, 术语"包含"涵盖"包括"以及"由...组成", 例如描述为"包含"X的配制剂或配制剂组分可以排它地由X组成或者可以包括额外的物质例如X+Y。

[0050] 用于数值x的术语"约"意指例如 $x \pm 10\%$ 。

[0051] 措辞"基本上"不排除"完全", 例如"基本上不含"Y的组合物可以完全不含Y。需要时, 措辞"基本上"可以从本发明定义中省略。

[0052] 在本发明提供牵涉多个顺序步骤的情况下, 本发明还能够提供牵涉小于总步骤数的方法。不同步骤能够在不同地点(例如在不同国家)由不同的人以很不同的时间进行。

[0053] 除非特别指出, 包括混合两种或更多种组分的步骤的方法不需要任何特定的混合次序。从而, 组分能够以任意次序混合。在存在三种组分的情况下, 则两种组分能够相互组合, 然后该组合可以与第三组分组合, 等等。

[0054] 本发明的各种实施方式描述于本文。应认识到在各实施方式中指定的特征可以与其它指定的特征相组合, 以提供进一步实施方式。特别地, 本文强调为适宜、典型或优选的实施方式可以相互组合(除非它们相互排斥)。

附图说明:

[0055] 图1: 含有5至10%w/w蔗糖的配制剂的分子大小分布。

[0056] 图2A: 含有4和7.5%w/w蔗糖的配制剂的分子大小分布的直接比较。

[0057] 图2B: 含有1, 2, 3, 4和7.5% (w/w) 蔗糖的配制剂的分子大小分布。

[0058] 图2C: 含有蔗糖和脯氨酸和7.5%蔗糖的配制剂的分子大小分布。

[0059] 图3A和3B: 4至10%w/w蔗糖配制剂的LCAT活性。

[0060] 图3C: 1, 2, 3, 4和7.5%w/w蔗糖配制剂的LCAT活性。

[0061] 图3D: 含有蔗糖和脯氨酸的配制剂的LCAT活性。

[0062] 图4A至4B: 蔗糖浓度对胆固醇流出的影响。

[0063] 图4C: 含有蔗糖和脯氨酸的配制剂对胆固醇流出的影响。

[0064] 图5A至5H: 具有不同的蔗糖浓度的配制剂以及含有蔗糖和脯氨酸的配制剂的浊度。

[0065] 图6: 具有不同蔗糖浓度的冻干饼的图片。

[0066] 图7: 具有不同蔗糖浓度和蔗糖和脯氨酸的冻干饼的图。

实施例

[0067] 实施例1:制备样品

[0068] 为了制备用于后续实验的样品,将胆酸钠(New Zealand Pharmaceuticals)溶于缓冲剂(10mM NaCl,1mM EDTA,10mM TRIS,pH 8.0),搅拌直至透明。将大豆磷脂酰胆碱(磷脂GmbH)加至适当体积的胆酸盐,在室温下搅拌16小时。用10mM NaCl将Apo A-I溶液稀释至9.0mg/mL的蛋白质浓度(由OD280测定),与适当体积的脂质溶液混合,获得1:45至1:65的蛋白质:脂质比率。在2-8℃搅拌混合物30分钟至16小时。HDL模拟物制备如下:用1%蔗糖作为透析过滤缓冲剂进行胆酸盐透析。浓缩洗脱物至33至38g蛋白质/L的蛋白质浓度。加入蔗糖,获得所希望的浓度(1%,2%,3%,4%,5%,6.5%,7%,10%w/w)。用0.2M NaOH调节溶液pH至pH 7.50±0.1,随后加入WFI(注射用水),获得30mg/mL的蛋白质浓度。然后,通过0.2+0.1μm滤器无菌过滤最终配制剂,将其于1.7g蛋白质每小瓶充入100mL玻璃小瓶,冻干。

[0069] 在某些配制剂中,加入脯氨酸至所希望的浓度。脯氨酸维持等渗的配制剂。

[0070] 实施例2:分子大小分布

[0071] 颗粒形成用HPLC-SEC确定,并用各种配制剂的分子大小分布进行评价。尺寸排阻色谱法(HPLC-SEC)进行如下;在Superose6HR 10/30柱(GE Healthcare)上,采用140mmol/L NaCl,10mmol/L Na-磷酸盐,0.02%Na₃N, pH7.4,流速0.5ml/min。添加约90μg蛋白质的样品,于280nm记录洗脱曲线。

[0072] 对于最终配制剂中含有5-10%w/w蔗糖的配制剂(图1)几乎没有观察到差异,这指出含有≥5%w/w蔗糖的配制剂在重构之后不影响颗粒稳定性。图1显示(1)内标,2:5%w/w蔗糖,3:6.5%w/w蔗糖,4:7.5%w/w蔗糖和5:10%w/w蔗糖的完整色谱图。

[0073] 此外,7.5%w/w蔗糖配制剂和4%w/w蔗糖配制剂的直接比较展示这些配制剂展示相似的分子大小分布(图2A)。

[0074] 图2B和2C显示蔗糖浓度1,2,3和4%(w/w)以及包含蔗糖和脯氨酸的配制剂的结果。

[0075] 全部测试配制剂都是稳定的。4至7.5%w/w的蔗糖含量最优且不影响重构之后的颗粒稳定性。

[0076] 实施例3:LCAT活化

[0077] 在各种配制剂中,rHDL颗粒有效性的测量通过测量LCAT活性来确定。HDL颗粒能够通过ATP-结合盒转运蛋白A1(ABCA1)相互作用螯合来自沿动脉壁或细胞形成的斑块的胆固醇。卵磷脂-胆固醇酰基转移酶(LCAT)是一种血浆酶,其将游离胆固醇转化为胆固醇基酯(更疏水的胆固醇形式),然后螯合进入HDL颗粒核心,随后被运输至肝进行代谢。如果最终配制剂中的蔗糖含量影响rHDL颗粒的效力,则LCAT活性会降低。

[0078] 卵磷脂-胆固醇酰基转移酶(LCAT)活性酯化如Stokke和Norum(Scand J Clin Lab Invest.1971;27(1):21-7)的描述来测试。在20μl [4-14C]胆固醇(7.5μCi/ml)存在下,将150μl汇集的人血浆(CSL Behring)与10μl rHDL样品和150μl PBS于4℃温育1.5小时。为了引发胆固醇的酯化,在37℃将反应混合物的一半放置30分钟而将另一半于4℃进一步温育30分钟(以测定背景噪音)。对于两份样品,胆固醇和胆固醇基酯均通过液液萃取用正己烷萃取。用固相萃取柱(SampliQ Amino,Agilent)将胆固醇基酯与未酯化的胆固醇分离,通过

闪烁计数测量。将在4℃储存的样品的计数率从在37℃储存样品的计数率扣除。相同程序也对参比样品进行。LCAT活性表示为参比样品的%。

[0079] 图3A和3B显示4-10%w/w蔗糖配制剂的LCAT活性。图3C显示1-4%w/w蔗糖配制剂的LCAT活性。在最终配制剂中蔗糖范围是5-10%w/w的情况下观察到LCAT活性几乎没有差异(图3A),然而在蔗糖进一步降低至4%w/w的情况下则显现轻度降低趋势(图3B)。图3D显示包含蔗糖和脯氨酸的配制剂的LCAT活性。对于含有蔗糖和脯氨酸的配制剂观察到LCAT活性没有明显趋势。从而,蔗糖/脯氨酸配制剂中HDL颗粒效力得以保持。

[0080] 实施例4:胆固醇流出

[0081] 反向胆固醇运输(RCT)是蓄积的胆固醇从容器壁运输至肝进行分泌的途径。细胞流出经由ABCA1途径将胆固醇游离至低脂质的Apo A-I。胆固醇流出测试测量HDL接受从细胞释放的胆固醇的能力。预计如果蔗糖含量影响颗粒形成和/或完整性,则其差异会影响胆固醇流出。

[0082] 来自鼠类巨噬细胞细胞系J774和RAW 264.7的胆固醇流出高度响应cAMP刺激,其导致ABCA1上调(Bortnick等人,.J Biol Chem.2000;275(37):28634-40)。RAW264.7细胞得自American Type Culture Collection(ATCC)。在加湿的CO₂温育器中,于37°在DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium,Gibco)中培养细胞,所述培养基补充有10%(v/v)胎牛血清(FCS,Gibco),2mM谷氨酰胺,100单元/mL青霉素和100μg/mL链霉素。对于流出实验,将细胞于0.35x 10⁶细胞每孔的密度接种入24-孔板。第二天,在补充5%(v/v)FCS的DMEM中,将细胞用[1,2-³H]胆固醇(1μCi/mL,GE)标记。在36小时的标记时间段之后,将细胞用磷酸缓冲的盐水(PBS)洗涤,然后,于不存在或存在0.3mM 8-溴腺苷3',5'-环状一磷酸钠盐-cAMP(8Br-cAMP)的情况下,在含有0.2%无脂肪酸的牛血清白蛋白(BSA)DMEM中温育16小时以上上调ABCA1。用PBS洗涤两次之后,将细胞与不同的胆固醇受体在DMEM/0.2%无脂肪酸BSA培养基中温育。在温育5-6小时之后,于500g将板离心10分钟以除去任何飘浮的细胞和细胞碎屑。细胞上清液中的放射性通过液体闪烁计数来测量。在对照孔中用0.1M Triton X-100萃取细胞至少30分钟之后,确定总细胞结合的[³H]胆固醇。胆固醇流出表示为从细胞释放入培养基的放射性相对细胞和培养基中的总和放射性的百分比。在对照与8Br-cAMP-刺激的细胞之间的流出差异用作ABCA1-依赖性流出的度量。

[0083] 图4A和4B显示随蔗糖浓度从7.5%w/w降低至4%w/w,胆固醇流出增加。在含脯氨酸的配制剂与7.5%蔗糖配制剂之间未观察到胆固醇流出的明显差异(图4C)。

[0084] 实施例5:浊度

[0085] 术语浊度用来描述溶液中的浑浊或混浊。严格来说,浊度产生自可见光被溶液中的元素分散的多个事件。由于浊度产生自净分散的光,其取决于样品的路径长度,蛋白质浓度和蛋白质/聚集体/颗粒的尺寸。如果重构后全部降低蔗糖的配制剂含有相同的蛋白质浓度,并用相同的路径长度测量,则浊度差异能够是由各种蔗糖配制剂中的蛋白质/聚集体/颗粒的尺寸和/或数量差异所导致。

[0086] 浊度用LED浊度计(Hach 2100AN Turbidimeter,Loveland,CO.)测量,用formacin作内标。结果表示为相对光散射(NTU)。

[0087] 含有4-10%w/w蔗糖的配制剂重构后产生相似浑浊的溶液(图5A&5B)。小于4%的蔗糖浓度则显示增加的浊度(图5E和5G)。基于浊度,4%(w/w)及以上的蔗糖浓度是最优的。

[0088] 贮藏(储存)后溶液浊度的相对增加常常在蛋白质生物药中视为团聚的指示。图5C、5D、5F和5H显示以液体形式贮藏(储存)后几乎未观察到至未观察到浊度增加,由此指出颗粒的稳定性。

[0089] 实施例6:冻干饼外观

[0090] 具有4%w/w和7.5%w/w蔗糖的蔗糖配制剂产生最稳定的冻干饼(图6)。

[0091] 具有1至4%w/w蔗糖的蔗糖配制剂和含有蔗糖和脯氨酸的配制剂也产生稳定的冻干饼(图7)。

[0092] 实施例7:rHDL配制剂的稳定性

[0093] 在40℃贮藏(储存)(避光)12周之前和之后检查冻干的rHDL配制剂的稳定性(按照实施例1制备)。测试参数包括pH,浊度,LCAT活化,HPLC-SEC(聚集体含量,单峰中的%脂蛋白及其相对保留时间)和胆固醇流出(C-流出)(表1&2)。结果指出配制剂在贮藏(储存)时间段内保持稳定。

[0094] 表1

[0095]

1385.E009.09-13 / 40℃	t=0					t=12 周				
	1% 蔗糖	2% 蔗糖	3% 蔗糖	4% 蔗糖	7.5% 蔗糖	1% 蔗糖	2% 蔗糖	3% 蔗糖	4% 蔗糖	7.5% 蔗糖
浊度	12.4	10.4	8.63	6.87	6.06	13.7	11.1	7.24	5.41	5.16
LCAT-活化	97	102	104	110	111	94	101	100	98	105
HPLC-SEC-聚集体	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
HPLC-SEC-脂蛋白峰值	98.8	99.2	99.5	99.6	99.6	99.3	99.7	99.6	99.6	99.6
C-流出(总流出)	110	95	103	119	102	109	85	114	116	84

[0096] 表2

[0097]

1385.E009.14-16 / 40℃	t=0			t=12 周		
	1% 蔗糖 / 2.2% 脯氨酸	3% 蔗糖 / 1.5% 脯氨酸	4% 蔗糖 / 1.2% 脯氨酸	1% 蔗糖 / 2.2% 脯氨酸	3% 蔗糖 / 1.5% 脯氨酸	4% 蔗糖 / 1.2% 脯氨酸
浊度	8.20	8.48	7.48	8.74	6.14	6.12
LCAT-活化	104	116	109	95	103	99
HPLC-SEC-聚集体	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
HPLC-SEC-脂蛋白峰值	98.6	99.4	99.5	99.2	99.5	99.7
C-流出(总流出)	114	80	97	120	108	99

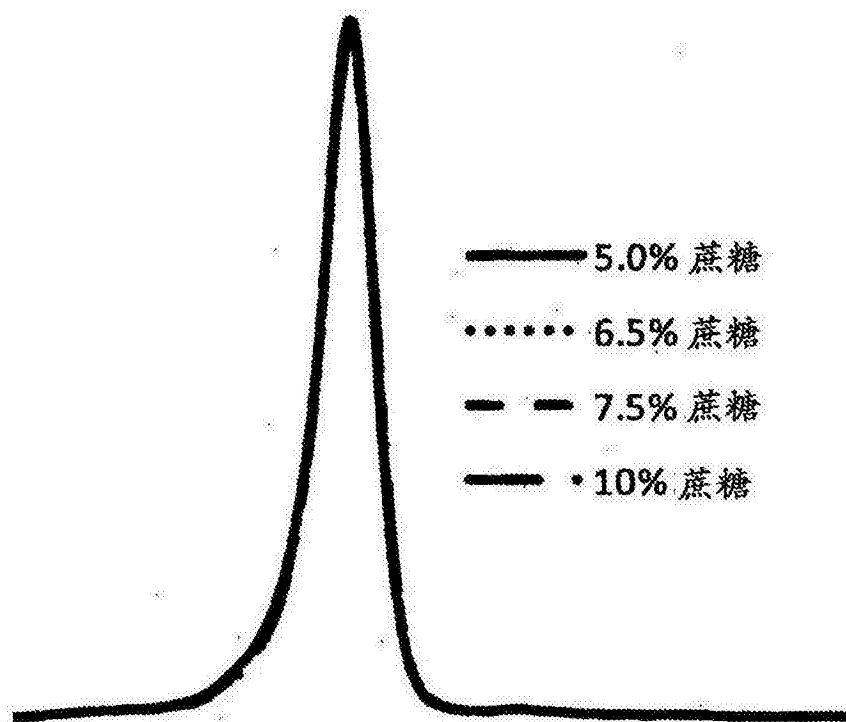


图1

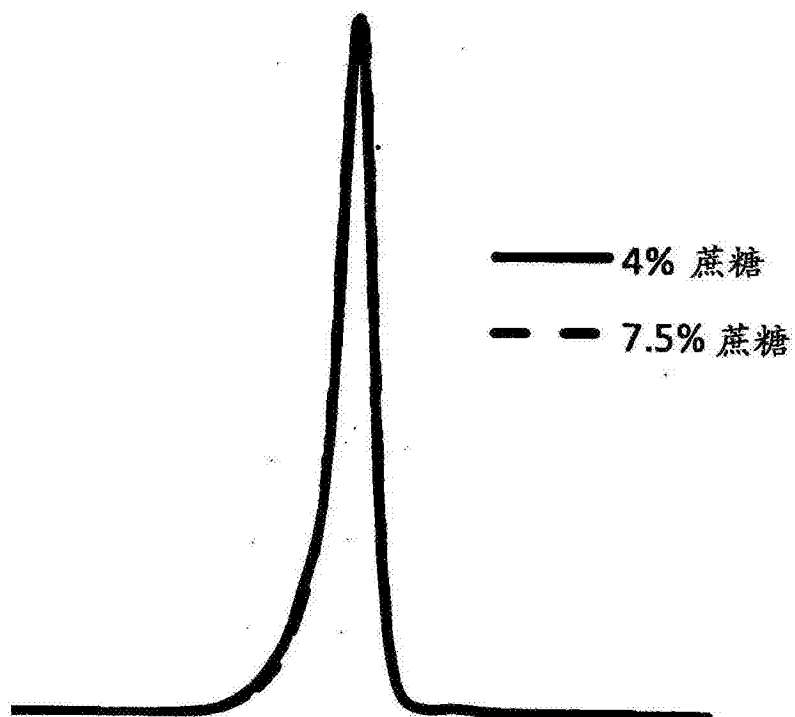


图2A

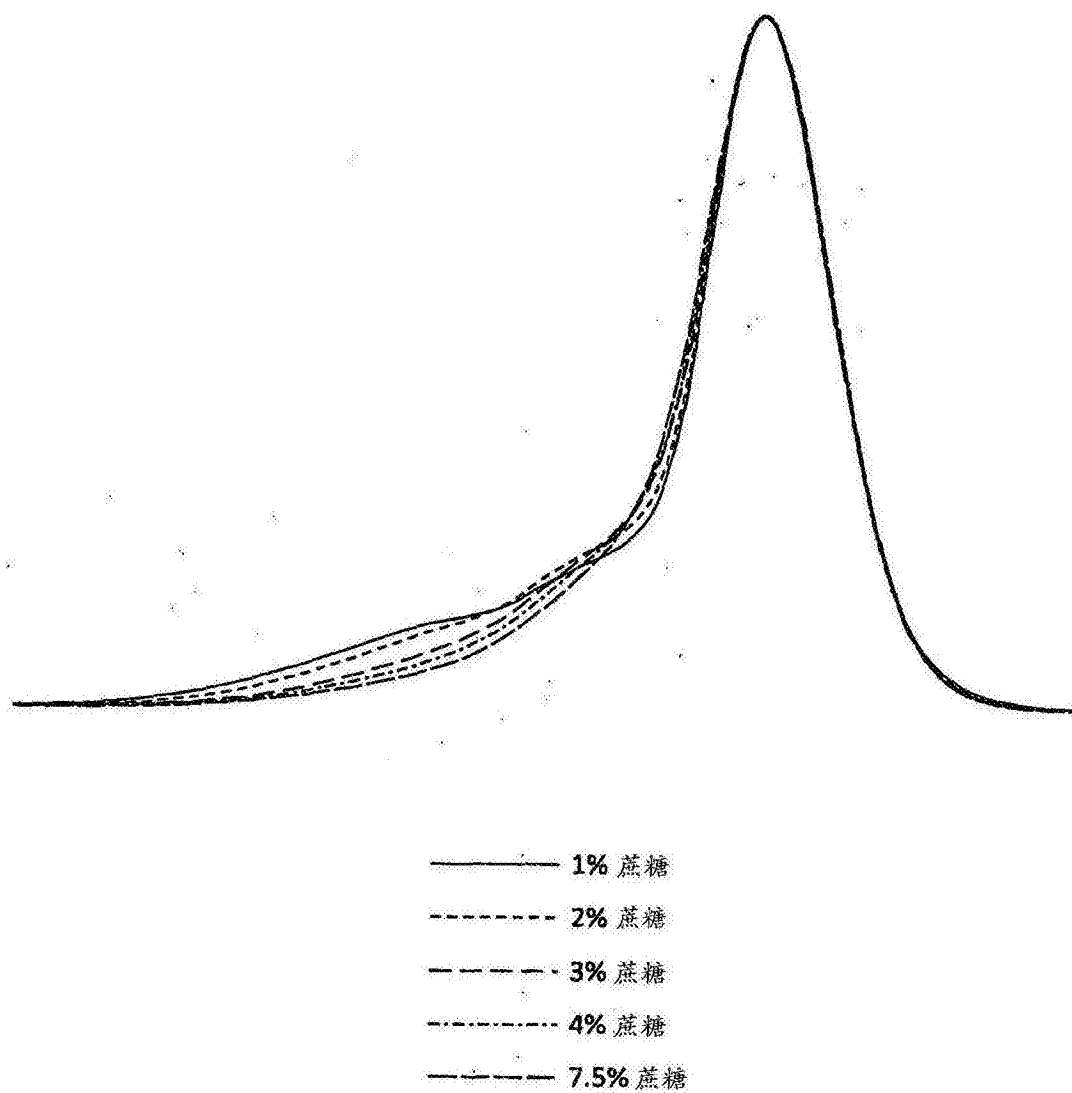


图2B

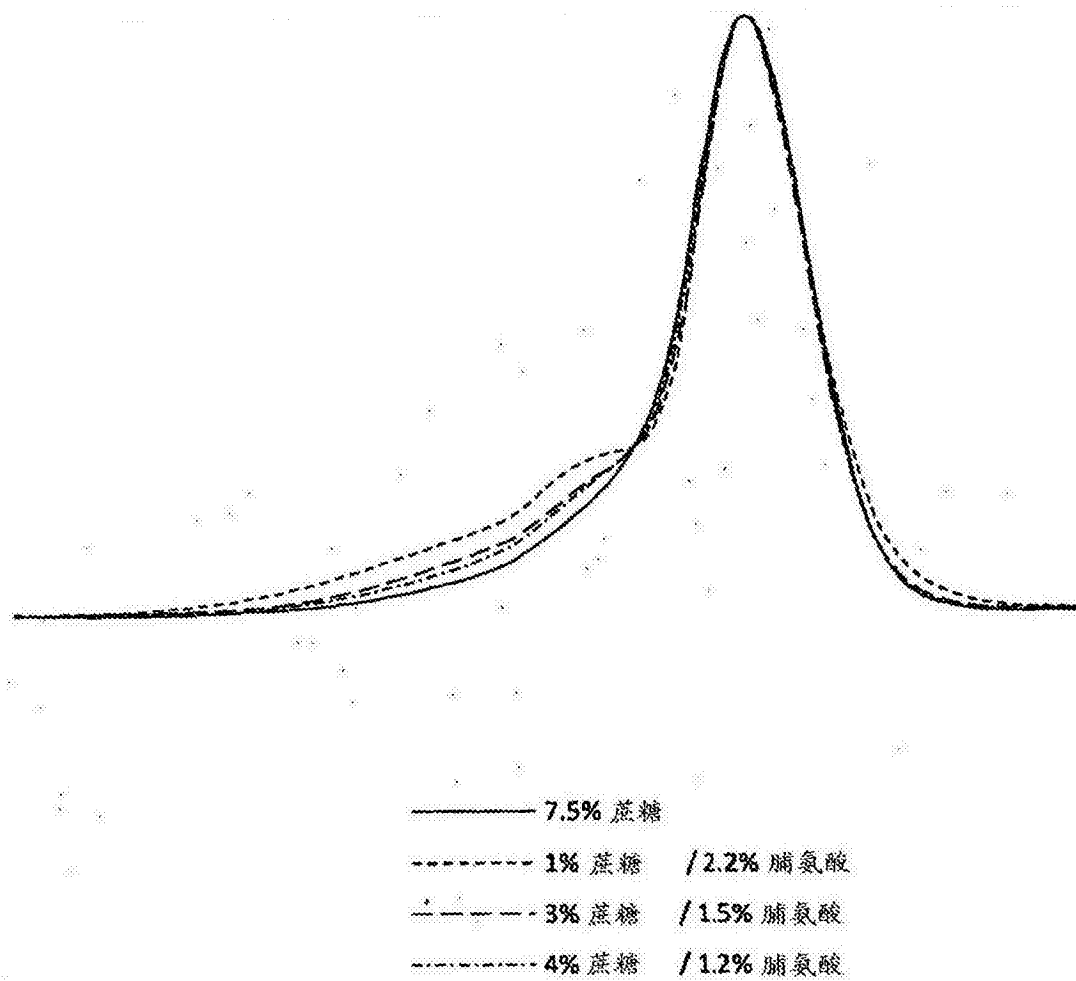


图2C

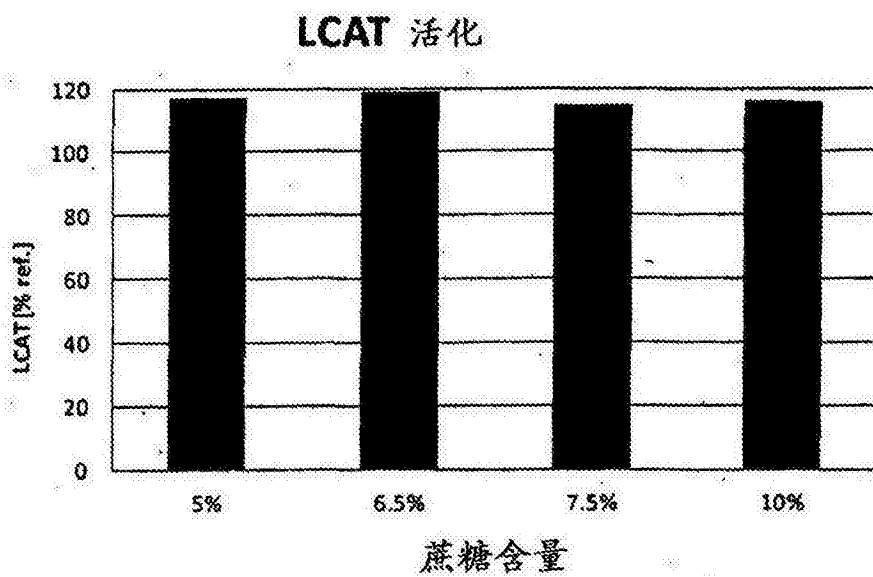


图3A

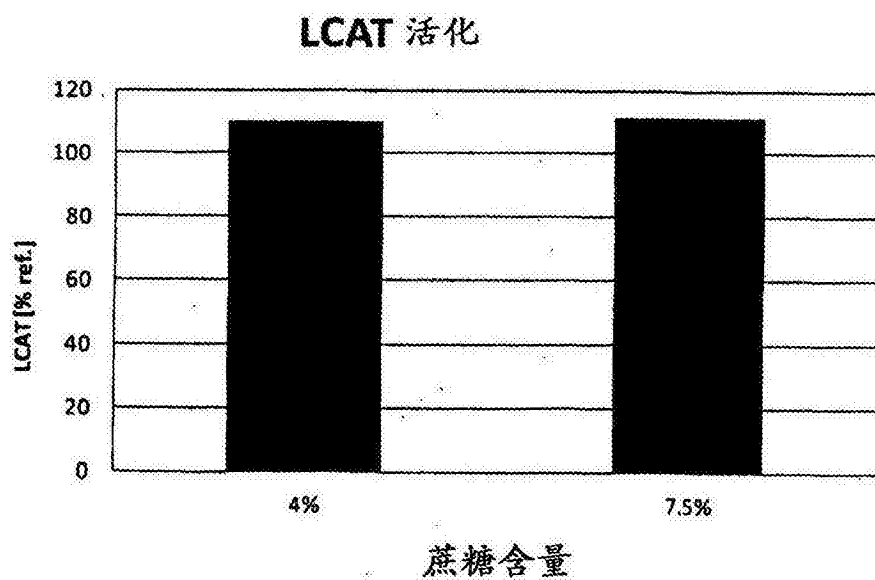


图3B

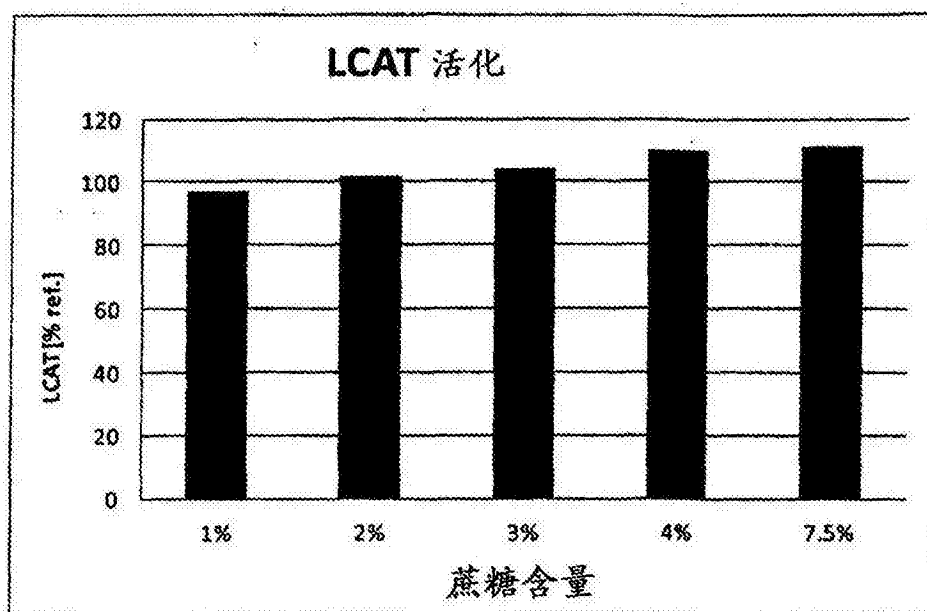


图3C

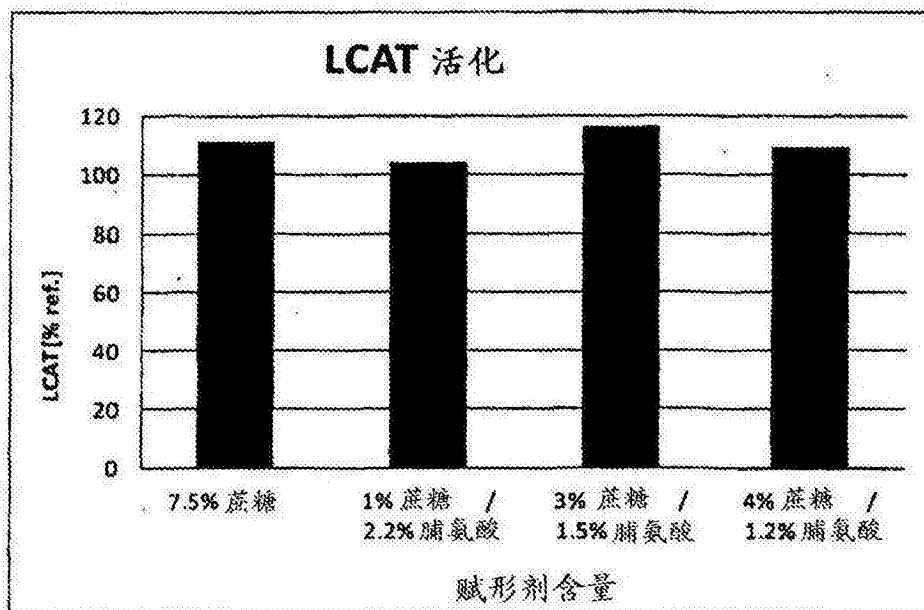


图3D

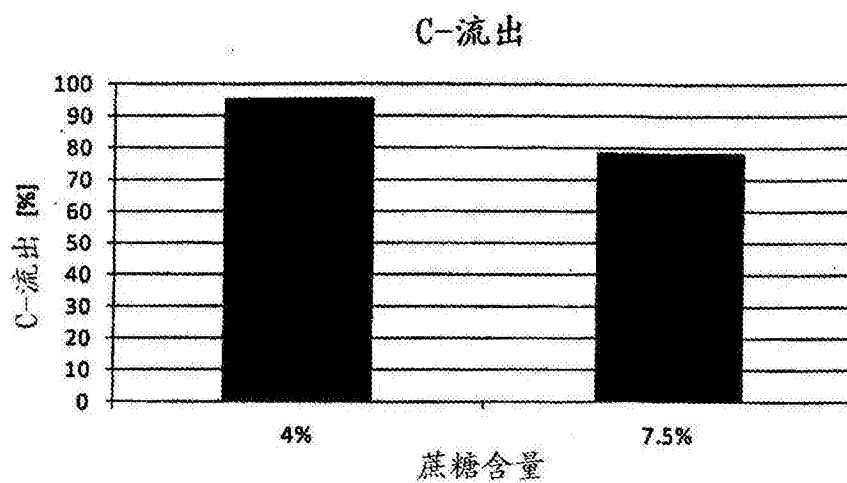


图4A

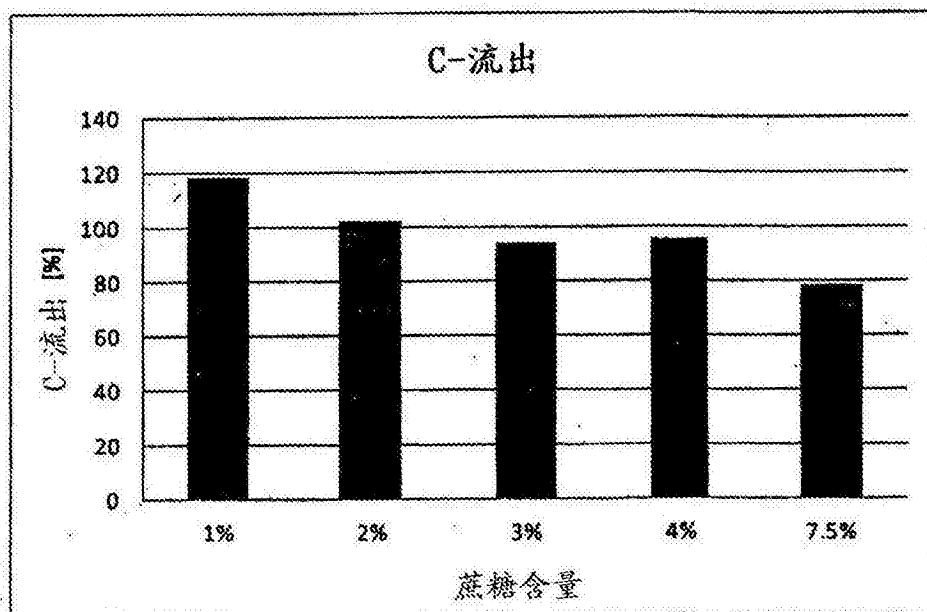


图4B

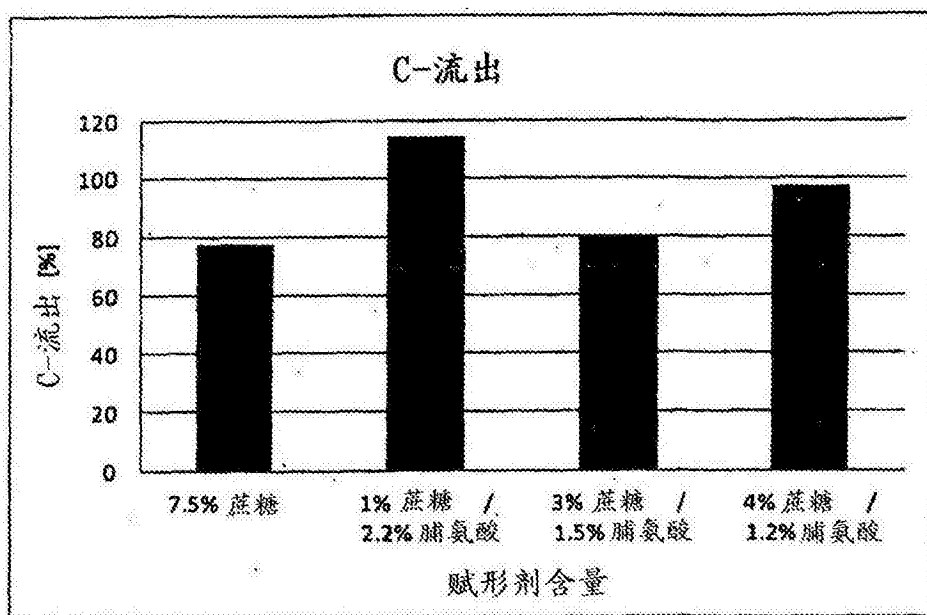


图4C

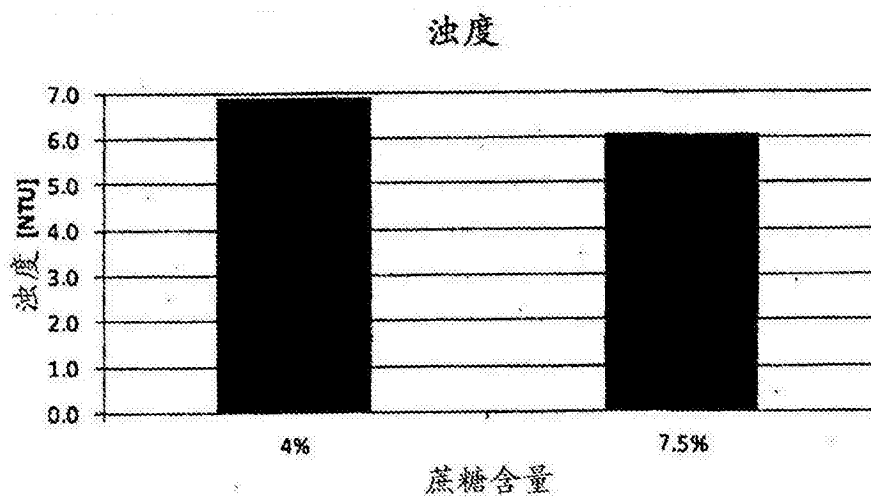


图5A

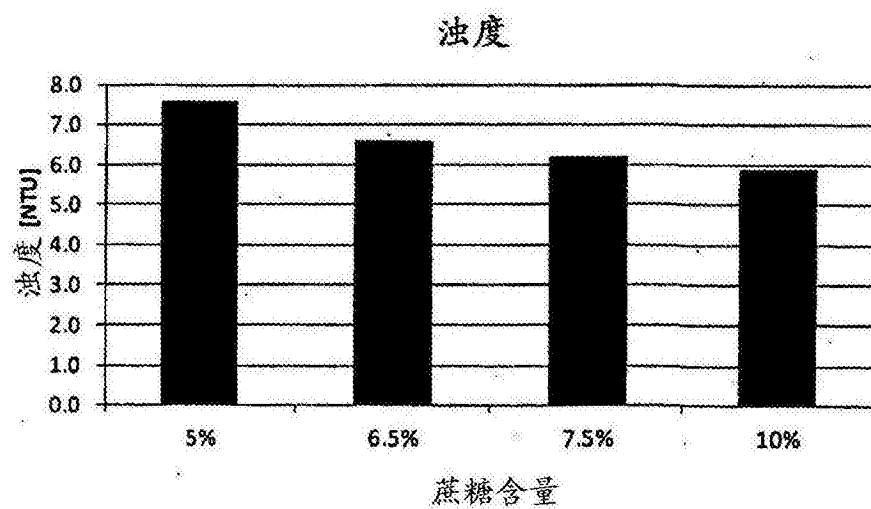


图5B

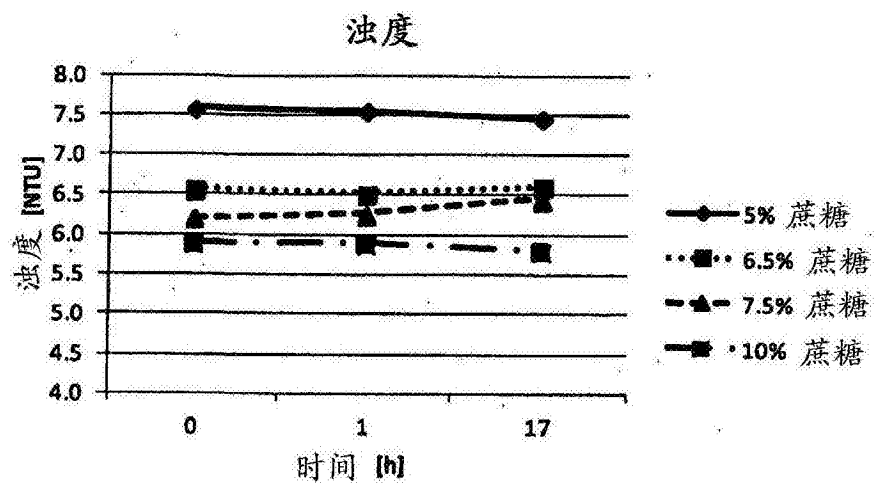


图5C

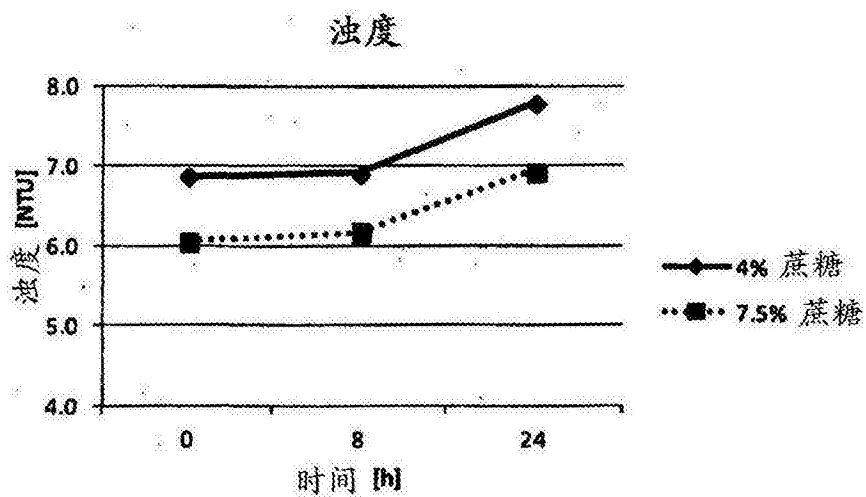


图5D

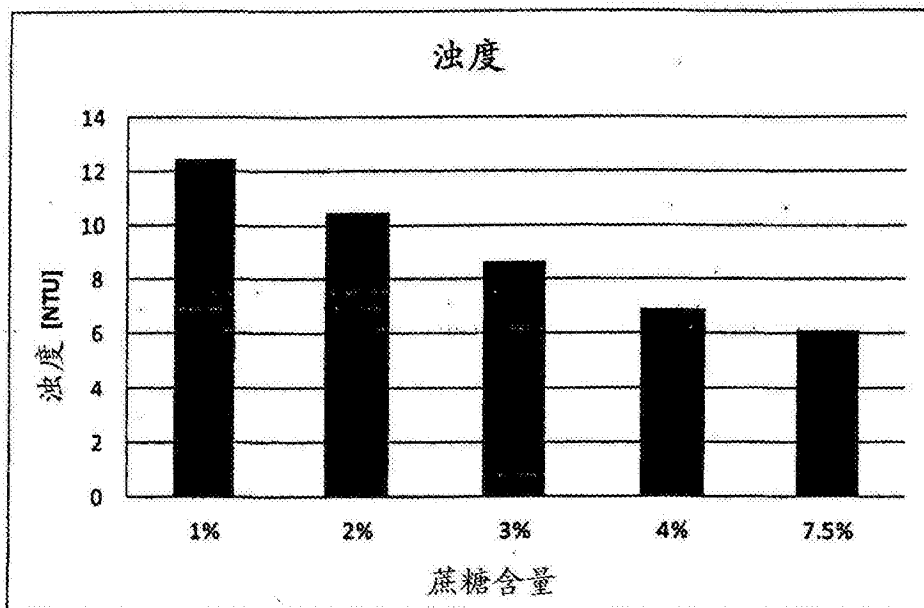


图5E

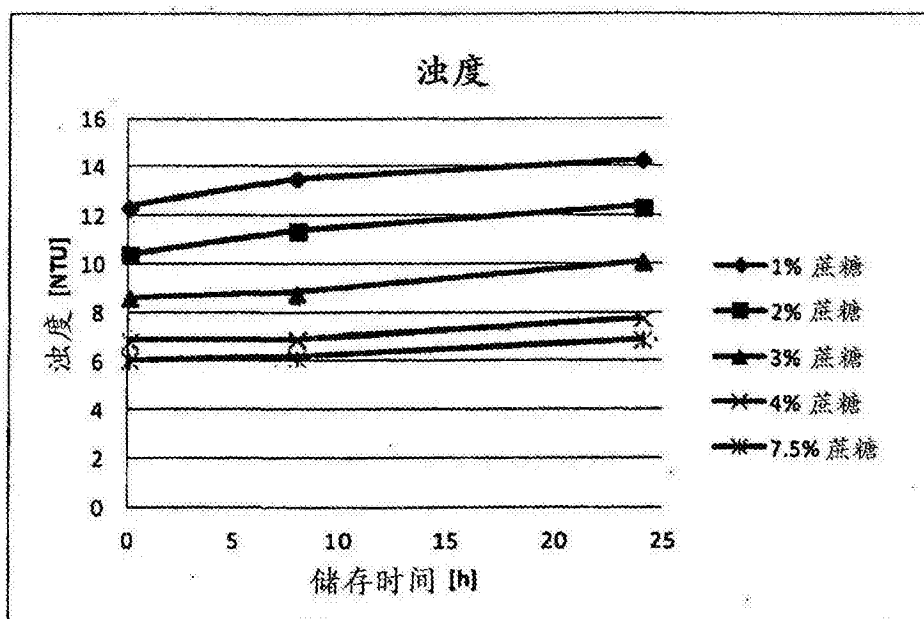


图5F

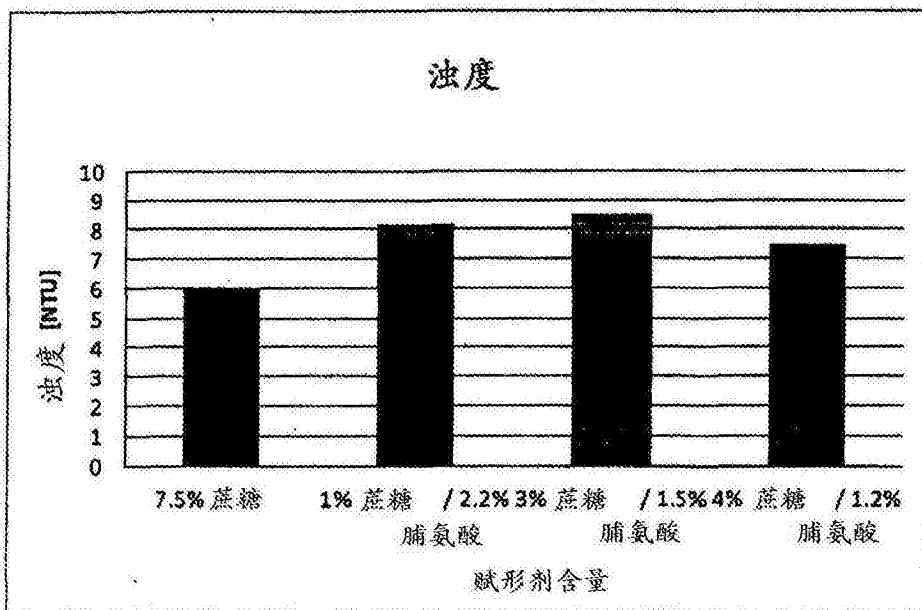


图5G

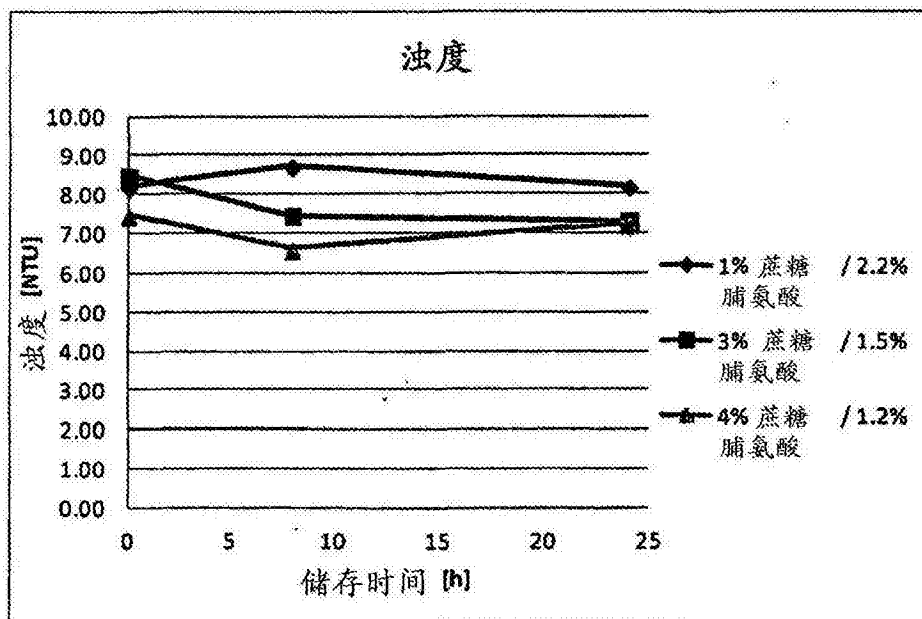


图5H

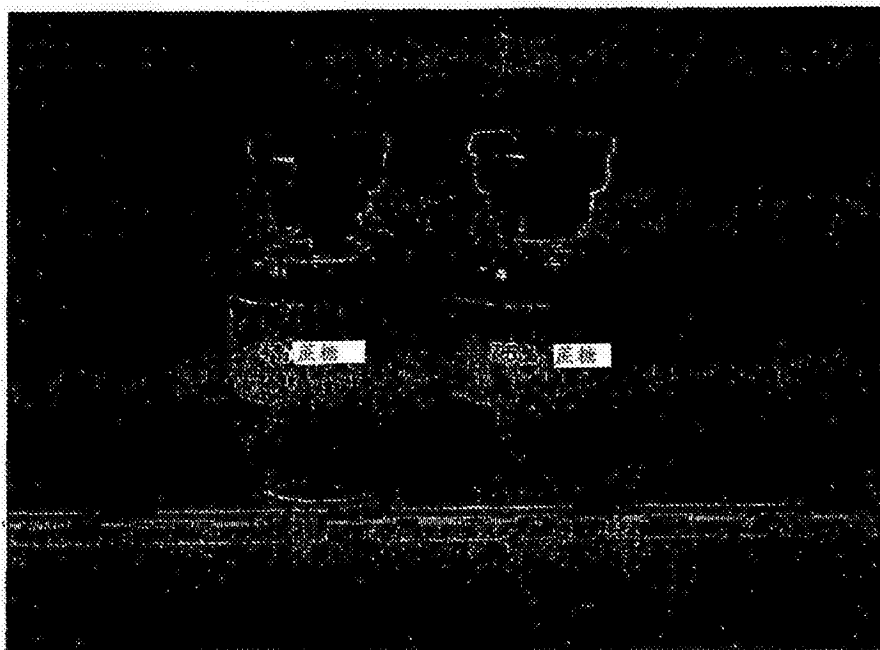


图6



图7