



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104870019 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201380065765. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 10. 23

A61K 47/30(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/205(2006. 01)

10-2012-0134946 2012. 11. 27 KR

A61K 31/14(2006. 01)

A61P 19/02(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 06. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2013/009474 2013. 10. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/084508 KO 2014. 06. 05

(71) 申请人 阿特根公司

地址 韩国大田

(72) 发明人 朴淳宰 金成圭

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理

有限公司 11006

代理人 徐金国

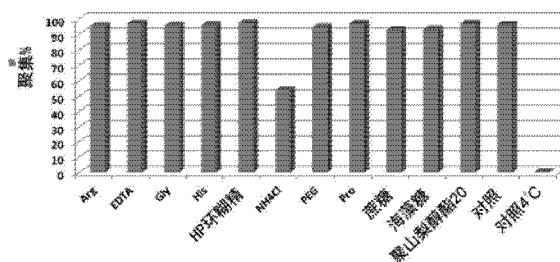
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

用于稳定蛋白质和Fc结构域融合的融合蛋白的组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种用于稳定生理活性的蛋白质和Fc结构域的融合蛋白的组合物,更具体地说,涉及一种使用含有铵盐或铵盐和琥珀酸盐的组合物,稳定蛋白质和Fc结构域的融合蛋白的方法。含有根据本发明的铵盐或铵盐和琥珀酸盐组合的组合物能有效抑制蛋白质-Fc结构域融合蛋白的聚集,并因此使得融合蛋白能够储存很长一段时间。因此,该组合物可广泛用于使用该蛋白质-Fc结构域融合蛋白的医疗领域。



1. 一种用于稳定蛋白质和 Fc 结构域的融合蛋白的组合物,其包含铵盐。
2. 根据权利要求 1 的组合物,进一步包含琥珀酸盐。
3. 根据权利要求 2 的组合物,其中以 5-200mM 的浓度包括所述琥珀酸盐。
4. 根据权利要求 2 或 3 的组合物,其中所述琥珀酸盐用作具有 pH 5.5-6.5 的缓冲液。
5. 根据权利要求 1 的组合物,其中所述铵盐抑制蛋白质 -Fc 结构域融合蛋白的聚集。
6. 根据权利要求 1 的组合物,其中所述铵盐选自氯化铵、硫酸铵、碳酸铵和硝酸铵。
7. 根据权利要求 1 的组合物,其中以 5-500mM 的浓度包括所述铵盐。
8. 根据权利要求 1 的组合物,其中所述蛋白质 -Fc 结构域融合蛋白是人 p75 肿瘤坏死因子受体的胞外配体结合结构域融合到人 IgG1 的 Fc 结构域的融合蛋白。
9. 根据权利要求 1 的组合物,进一步包含赋形剂。
10. 根据权利要求 9 的组合物,其中所述赋形剂是选自碱性氨基酸、糖类和表面活性剂中的至少一种。
11. 根据权利要求 9 的组合物,其中所述赋形剂是蔗糖、赖氨酸或蔗糖和赖氨酸两者。
12. 一种稳定蛋白质 -Fc 结构域融合蛋白的方法,向包含所述蛋白质 -Fc 结构域融合蛋白的组合物中添加铵盐。
13. 根据权利要求 12 的方法,其中所述组合物进一步包括琥珀酸盐。
14. 根据权利要求 13 的方法,其中以 5-200mM 的浓度包括所述琥珀酸盐。
15. 根据权利要求 13 或 14 中,其中以具有 pH 5.5-6.5 的缓冲液的形式添加所述琥珀酸盐。
16. 根据权利要求 12 的方法,其中所述铵盐抑制蛋白质 -Fc 结构域融合蛋白的聚集。
17. 根据权利要求 12 的方法,其中所述铵盐选自氯化铵、硫酸铵、碳酸铵和硝酸铵。
18. 根据权利要求 12 的方法,其中以 5-500mM 的浓度包括所述铵盐。
19. 根据权利要求 12 的方法,其中所述蛋白质 -Fc 结构域融合蛋白是人 p75 肿瘤坏死因子受体的胞外配体结合结构域融合到人 IgG1 的 Fc 结构域的融合蛋白。
20. 根据权利要求 12 的方法,其中所述组合物进一步包含赋形剂。
21. 根据权利要求 20 的方法,其中所述赋形剂是选自碱性氨基酸、糖类和表面活性剂中的至少一种。
22. 根据权利要求 21 的方法,其中所述赋形剂是蔗糖、赖氨酸或蔗糖和赖氨酸两者。
23. 一种用于治疗关节炎的组合物,其包含铵盐和一融合蛋白,所述融合蛋白包括融合到人 IgG1 的 Fc 结构域的人 p75 肿瘤坏死因子受体的胞外配体结合域。
24. 根据权利要求 23 的组合物,进一步包含琥珀酸盐。
25. 根据权利要求 24 的组合物,其中以 5-200mM 的浓度包括所述琥珀酸盐。
26. 根据权利要求 24 或 25 的组合物,其中所述琥珀酸盐是以具有 pH5.5-6.5 的缓冲液的形式添加。
27. 根据权利要求 23 的组合物,其中所述铵盐抑制蛋白质 -Fc 结构域融合蛋白的聚集。
28. 根据权利要求 23 的组合物,其中所述铵盐选自氯化铵、硫酸铵、碳酸铵和硝酸铵。
29. 根据权利要求 23 的组合物,其中以 5-500mM 的浓度包括所述铵盐。
30. 根据权利要求 23 的组合物,进一步包含赋形剂。
31. 根据权利要求 30 的组合物,其中所述赋形剂是选自碱性氨基酸、糖类和表面活性

剂中的至少一种。

32. 根据权利要求 30 的组合物,其中所述赋形剂是蔗糖、赖氨酸或蔗糖和赖氨酸两者。

用于稳定蛋白质和 Fc 结构域融合的融合蛋白的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于稳定生理活性的蛋白质和 Fc 结构域的融合蛋白的组合物，更具体地说，涉及一种使用含有铵盐或铵盐和琥珀酸盐组合的组合物，稳定蛋白质和 Fc 结构域的融合蛋白的方法。

背景技术

[0002] 用于治疗疾病目的的抗体药物是应用了先进的生物过程技术，包括细胞系开发技术、细胞培养技术和纯化技术的生物药。随着这些抗体药物被证明比现有药物具有优异的疗效和安全性，对此的需求日益增多。例如，已将通过将人 p75 的人肿瘤坏死因子受体融合到人 IgG1 的 Fc 结构域的胞外配体结合部分而制备的融合蛋白 (TNFR:Fc ;依那西普) 用作治疗类风湿性关节炎的药剂。此外，为了提高生理活性物质的体内的半衰期，试图使用 GLP-1R 激动剂和 Fc 结构域的融合蛋白 (US2004-0558627 ;Chung, H. S. et al., Regulatory peptide, 170, 2011) 开发糖尿病治疗剂。另外，试图将诸如 hGH 或 EPO 的生理活性物质融合到 Fc 结构域以增加生理活性物质的体内半衰期 (KR10-2008-7018012)。近年来，VEGF 受体和 Fc 结构域的融合蛋白 (afibercept) 已被批准并用作治疗湿性年龄相关性黄斑变性 (WAMD) 的药剂。

[0003] 然而，如上所述的融合蛋白的问题在于，它们具有大且复杂的结构并且物理上不稳定，因此导致聚集。各种导致这样的聚集的因素都存在于生产和存储蛋白质的过程。

[0004] 例如，聚集可以由以下一种或多种因素引起。在纯化期间，并非最佳的 pH、盐的种类、盐浓度、温度、与空气接触、搅拌速度等都会引起聚集，而在配制过程中，蛋白质的浓度条件会引起聚集。在缓冲液交换期间，通过过滤膜、搅拌等会引起聚集，而在存储过程中，温度变化、pH 变化、与空气接触、搅拌等会引起聚集。另外，当含有蛋白质的制剂暴露于光时，也会发生聚集，并且材料封装也会引起聚集 (Hamada, H. et al., Current Pharmaceutical Biotechnology, 10:400, 2009)。

[0005] 当抗体蛋白的疏水区由于其结构变化而被暴露时，在缓冲液中发生融合蛋白的最大聚集。换句话说，蛋白质分子的疏水区被集合在一起形成聚集，并且这种聚集由于抗体蛋白质之间的共价键也可能以不可逆的方式发生 (Hamada, H. et al., Current Pharmaceutical Biotechnology, 10:348, 2009)。

[0006] 因上述原因而聚集的融合蛋白或抗体蛋白随着时间的流逝而具有降低的活性或失去活性。此外，当这些蛋白质聚集时，它们具有不会出现在非聚集状态下的抗原性，因此当被注入人体时，会导致抗毒抗体 (ADA) 的产生。因此，目前迫切需要一种用于减少融合蛋白的聚集的方法和稳定的制剂，其包含展现出降低的聚集水平的融合蛋白 (Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing, Biotechnology: Pharmaceutical Aspects Volume XI, 2010, pp 271-291)。

[0007] 为了这个目的，尝试了加入防止聚集或控制 pH 的赋形剂或者加入缓冲液组合物的方法。在抗体蛋白的疏水基团暴露于蛋白质分子的表面并相互结合而引起聚集的情况

下,使用能够稳定暴露的疏水基团的赋形剂来防止聚集。例如,报道了使用氨基酸如精氨酸、赖氨酸、脯氨酸、组氨酸和甘氨酸 (US 4362661A 和 US 7648702),聚山梨醇酯系表面活性剂,两亲性聚合物如聚乙二醇 (PEG) 或聚乙烯吡咯烷酮 (PVP),多糖如葡聚糖,或单糖或二糖如蔗糖、麦芽糖或海藻糖 (US 5945098A)。

[0008] 然而,蛋白质和 Fc 结构域的融合蛋白比通常生产的抗体蛋白质的稳定性要差,并且因此相比其它蛋白质或抗体显示出更强的形成聚集的趋势。有这样一个实例,其中向蛋白质-Fc 结构域融合蛋白中加入表面活性剂如聚山梨醇酯来制备制剂,以防止融合蛋白的聚集 (Steven J. Shire et al., Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing, XI:115, 2010)。

[0009] 因此,本发明人发现,含有铵盐或铵盐和琥珀酸盐组合的组合物可以通过抑制融合蛋白的聚集来增加蛋白质和 Fc 结构域的融合蛋白的稳定性,使其能够很容易地保存很长的一段时间,从而完成了本发明。

发明内容

[0010] 本发明的一个目的是提供一种用于稳定化的组合物和使用该组合物稳定蛋白质-Fc 结构域融合蛋白的方法,所述组合物可以通过抑制生理活性的蛋白质和 Fc 结构域的融合蛋白的聚集,增加该融合蛋白的稳定性。

[0011] 本发明的另一个目的是提供一种用于预防和治疗疾病的组合物,该组合物包含所述用于稳定化的组合物。

[0012] 为了达到上述目的,在一个方面,本发明提供了一种用于稳定蛋白质-Fc 结构域融合蛋白的组合物,其含有铵盐或铵盐和琥珀酸盐的组合,以及一种用于预防和治疗疾病的组合物,其包括所述用于稳定所述融合蛋白的组合物。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了一种用于稳定蛋白质-Fc 结构域融合蛋白的方法,将其铵盐或铵盐和琥珀酸盐的组合添加到含有所述融合蛋白的组合物中。

附图说明

[0014] 图 1 示出测量在 50℃ 将依那西普 (TNF 受体的水溶性部分和 Fc 结构域的融合蛋白) 在含有各种赋形剂 (精氨酸 (Arg)、EDTA、甘氨酸 (Gly)、组氨酸 (His)、羟丙基环糊精 (HP 环糊精)、氯化铵、聚乙二醇 (PEG)、脯氨酸 (Pro)、蔗糖、海藻糖和聚山梨醇酯 20) 的制剂溶液中存储 1 周后,依那西普的聚集度的结果。

[0015] 图 2 示出测量在 50℃ 将依那西普在含有各种赋形剂 (精氨酸 (Arg)、脯氨酸 (Pro)、50mM 氯化铵、100mM 氯化铵、200mM 氯化铵、蔗糖、聚山梨醇酯 20 和羟丙基环糊精 (HPcD)) 的制剂溶液中存储 1 周后,依那西普的聚集度的结果。

[0016] 图 3 示出测量在 37℃ 将依那西普在含氯化铵的制剂溶液中存储 4 周后,依那西普的聚集度的结果。

[0017] Arg : 精氨酸 ; AmCl : 氯化铵 ; AmSu1 : 硫酸铵 ;

[0018] Am+Lys : 氯化铵 + 赖氨酸 ; Am+EDTA : 氯化铵 + EDTA ;

[0019] Am+Polysorabate 20 : 氯化铵 + 聚山梨醇酯 20 ;

[0020] Am+Suc : 氯化铵 + 蔗糖。

[0021] 图 4 和图 5 示出测量在 45℃ 将依那西普在含有精氨酸、氯化铵、硫酸铵、氯化铵 + 赖氨酸、氯化铵 + EDTA、氯化铵 + 聚山梨醇酯 20、和氯化铵 + 蔗糖的制剂溶液中存储 14 天后，依那西普的聚集度的结果。

[0022] Arg : 精氨酸 ; AmCl# : 氯化铵 # % ;

[0023] AmSul : 硫酸铵 ; Am#+Lys : 氯化铵 # % + 赖氨酸 ;

[0024] Am#+Suc : 氯化铵 # % + 蔗糖。

[0025] 图 6 示出测量在 45℃ 将依那西普在含有氯化铵的各种缓冲液（磷酸钠、琥珀酸钠、柠檬酸钠和组氨酸）中存储 5 天后，依那西普的聚集度的结果。

[0026] 图 7 示出测量在 45℃ 将依那西普在不同 pH 的含有氯化铵的琥珀酸钠缓冲液组合物中存储 5 天后，依那西普的聚集度的结果。

[0027] 图 8 示出测量在 45℃ 将依那西普在含有氯化铵和赖氨酸的琥珀酸钠缓冲液组合物中存储 14 天后，依那西普的聚集度的结果。Enbrel : 市售的依那西普 (Enbrel) 制剂；

[0028] AmCl : 氯化铵 ; AmCl+Lys : 氯化铵 + 赖氨酸。

具体实施方式

[0029] 除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解相同的含义。通常，本文中使用的命名法和将在下面描述的实验方法是本领域公知且通常采用的。

[0030] 如本文所使用，“蛋白质和 Fc 结构域的融合蛋白”、“蛋白质 -Fc 结构域融合蛋白”是指这样的融合蛋白，其包含融合至作为抗体恒定区的 Fc 结构域的蛋白，其中蛋白质意指由数个氨基酸组成的通过肽键形成的氨基酸聚合物。另外，多肽与具有低分子量的寡肽和具有高分子量的蛋白质具有相同的含义。因此，如本文所使用，“蛋白质和 Fc 结构域的融合蛋白”与“多肽和 Fc 结构域的融合蛋白”具有相同的含义。

[0031] 在本发明中，“蛋白质”是一种表现出任何生理活性的蛋白或多肽，并且对其种类没有限制。优选地，本发明所使用的蛋白质可以选自各种受体的可溶部分，所述受体例如 TNF- 受体和 VEGF 受体，GLP-1 类似物和衍生物，fltt3 配体，CD40 配体，促红细胞生成素，血小板生成素，降钙素，Fas 配体，NF- κ B 配体的受体激活物 (RANKL)，TNF 相关凋亡诱导配体 (TRAIL)，胸腺基质源性淋巴细胞生成素，粒细胞生长刺激糖蛋白，粒细胞 / 巨噬细胞生长刺激糖蛋白，肥大细胞生长因子，干细胞生长因子，表皮生长因子，RANTES，生长激素，胰岛素，促胰岛素，胰岛素样生长因子，甲状旁腺激素，干扰素，神经生长因子，胰高血糖素，白介素 1-18，集落刺激因子，淋巴毒素 β ，肿瘤坏死因子 (TNF)，白血病抑制因子，抑瘤素 -M 和细胞表面分子 Elk 和 HeK 的各种配体（如 eph 相关激酶的配体，或 LERKS）。最优选地，它可以是 p75TNF 受体的胞外配体结合结构域。

[0032] 如本文所使用，“受体的可溶性部分”是指胞外配体结合结构域，或含有胞外配体结合结构域和跨膜结构域的区域。

[0033] 在本发明中，“Fc 结构域”是指抗体的恒定结构域。它优选人 IgG1 的 Fc 结构域，但不限于此。除了人 IgG1 以外，也可以使用 IgG2、IgG3 和 IgG4，并且 Fc 结构域可包含 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的部分或全部的 CH1 结构域、CH2 结构域、CH3 结构域和铰链区。优选地，它可以包括 CH2 结构域、CH3 结构域和铰链区，但不包括 CH1 结构域。

[0034] 本发明中的蛋白质-Fc 结构域融合蛋白可以根据本领域中已知的一般方法来生产。当在细胞中生产融合蛋白时,可通过选自离心、超滤和 / 或色谱工艺中的一种或多种工艺去除融合蛋白以外的物质。

[0035] 在一个方面,本发明涉及一种用于稳定蛋白质-Fc 结构域融合蛋白的组合物,其包含铵盐。

[0036] 本发明中的“铵盐”是指由氨和酸反应生成的盐,并且可以由式 NH_4X (X = 单价酸基团) 表示。优选地,它可以选自氯化铵、硫酸铵、碳酸铵和硝酸铵,但不限于此。

[0037] 多种盐改变蛋白质的溶解性 (Kunz, W. et al., Curr. Opin. Coll. Interface Sci., 9:1937, 2004), 并且蛋白质的溶解性和表面张力的增加有关。使表面张力最大化并且增加蛋白质稳定性的阳离子是 NH_4^+ 。然而,还没有报道使用铵盐来抑制融合蛋白的聚集或稳定含有融合蛋白的组合物。本发明人发现,当将蛋白质和 Fc 结构域的融合蛋白存储在含铵盐的水溶液中时,有效地抑制了融合蛋白的聚集。因此,本发明提供了一种稳定蛋白质和 Fc 结构域的融合蛋白的组合物,所述组合物含有铵盐。

[0038] 作为用于本发明中的铵盐,可以 5-500mM 的浓度包含选自氯化铵、硫酸铵、碳酸铵和硝酸铵中的一种。在本发明的一个例子中,以 12.5-200mM 的浓度使用铵盐,但即使在以 12.5mM 或更低或者以 200mM 或更高的浓度使用铵盐时,它仍表现出抑制融合蛋白的聚集的效果。因此,本发明中的铵盐有效地抑制多肽和 Fc 结构域的融合蛋白的聚集。在本发明的另一个例子中,显示了当将包含融合于人 IgG1 的 Fc 结构域的人 p75 肿瘤坏死因子受体的胞外配体结合结构域的融合蛋白存储在铵盐或硫酸铵溶液中时,该融合蛋白的聚集度相比与没有存储在铵盐溶液中的融合蛋白降低了高达约 80% (图 1 和 2)。

[0039] 在另一个方面,根据本发明的用于稳定蛋白质-Fc 结构域融合蛋白的组合物可进一步包括琥珀酸盐。琥珀酸盐在组合物中用作缓冲液,通过控制含有该蛋白质-Fc 结构域融合蛋白的组合物 pH 值,进一步降低蛋白质-Fc 结构域融合蛋白的聚集。

[0040] 琥珀酸盐以 5-200mM 的浓度,更优选 20-30mM 的浓度添加。在本发明中不仅可以使琥珀酸钠,也可以使用本领域中已知的各种琥珀酸盐。在含有琥珀酸盐的组合物中,琥珀酸盐缓冲液控制所述组合物的 pH 至 5.5-6.5,优选 6.0-6.3。如果组合物的 pH 值低于 5.5 或高于 6.5,那么融合蛋白的聚集会增加,并且因为这个原因, pH 值优选控制在上述范围内。

[0041] 在本发明的一个例子中,将磷酸钠、琥珀酸钠、柠檬酸钠和组氨酸缓冲液中每一种加入到被证明具有抑制融合蛋白聚集作用的氯化铵赋形剂中以便检查缓冲液之间的蛋白质聚集抑制效果的差别。结果是,表明在 pH 6.5,在含有琥珀酸钠作为缓冲液的制剂中的聚集比含有磷酸钠作为缓冲液的市售依那西普 (Enbrel™) 制剂中显著降低。另外,可以看出,在 pH 6.0,含有琥珀酸钠的制剂相比于含有其它缓冲液的制剂表现出优异的聚集抑制效果 (图 6)。此外,检查各种 pH 的琥珀酸钠缓冲液的聚集抑制效果以便使其作用最大化,并且结果是,可以看出,随着琥珀酸钠的 pH 下降,聚集更少,并且在 pH 6.0 和 pH 6.3,聚集比市售依那西普制剂 (比较制剂) 显著下降 (图 7)。

[0042] 同时,已知氨基酸抑制蛋白质的聚集,并且其中,碱性氨基酸对防止聚集具有优异的效果。在用于治疗类风湿关节炎的依那西普的情况下,精氨酸用作抗聚集剂 (美国 7648702B2),并且报道了用于稳定 Fc 修饰抗体的制剂,其包含赖氨酸、精氨酸、组氨酸、糖、

酸性缓冲液和聚山梨醇酯的组合 (US 2010-0254985)。此外,报道了糖类如海藻糖、蔗糖、甘露糖醇或麦芽糖,或阴离子缓冲液如磷酸盐或柠檬酸盐的用途。另外,表面活性剂可以粘附蛋白的暴露的疏水区并提高蛋白质的溶解性,从而防止蛋白质的聚集,因此聚山梨醇酯通常用于抗体蛋白制剂,例如莫罗单抗、阿昔单抗、利妥昔单抗、达利珠单抗、阿仑单抗、阿达木单抗、贝伐单抗和那他珠单抗。

[0043] 因此,根据本发明的用于稳定蛋白质-Fc 结构域融合蛋白的组合物为了进一步降低融合蛋白的聚集,还可以含有选自碱性氨基酸、糖类和表面活性剂中的一种或多种赋形剂。

[0044] 作为碱性氨基酸,可以 1-50mM 的浓度使用精氨酸、赖氨酸、组氨酸等,作为糖类,可以 0.5-10% w/v 的浓度使用蔗糖、海藻糖、甘露糖醇、麦芽糖等,并且作为表面活性剂,可以 0.001-0.1% w/v 的浓度使用 Triton、吐温或 Pluronic 系列,但没有限制。在本发明中可以使用任何赋形剂而没有限制,只要它可在本领域中用于抑制融合蛋白或抗体蛋白。

[0045] 在本发明的一个例子中,检查琥珀酸钠缓冲液,铵离子组分和碱性氨基酸的组合物聚集抑制效果,并且作为结果,表明在含有氯化铵、琥珀酸盐和赖氨酸的组合物中的聚集度比在依那西普制剂(比较制剂)中显著降低(图 8)。

[0046] 在另一个方面,本发明涉及通过将铵盐加入到含有融合蛋白的组合物中,稳定蛋白质-Fc 结构域融合蛋白的方法。该组合物可进一步含有琥珀酸盐。可以具有 pH 5.5-6.5 的缓冲液形式,以 5-200mM 的浓度包含该琥珀酸盐。

[0047] 在本发明的一个例子中,作为蛋白质-Fc 结构域融合蛋白,使用市售的关节炎治疗剂依那西普和通过在 CHO 细胞中表达蛋白并纯化所表达的蛋白而获得的蛋白质产物。为了检查根据本发明的铵盐是否抑制融合蛋白的聚集,并是否能有效地稳定含有该融合蛋白的制剂,进行实验,并且结果是,可以看出使用根据本发明的铵盐在抑制融合蛋白聚集方面展现出比用于防止依那西普产物聚集的精氨酸更佳的效果(实施例 2)。

[0048] 因此,在一个优选的实施方式中,本发明提供了用于治疗关节炎的组合物,其包含铵盐和一融合蛋白,所述融合蛋白包括融合到人 IgG1 的 Fc 结构域的人 p75 肿瘤坏死因子受体的胞外配体结合结构域。

[0049] 以下,参照实施例对本发明进行更详细的说明。对本领域的普通技术人员来说显而易见的是,这些实施例是说明性的目的,并且不应被解释为限制或改变本发明的范围。

[0050] 实施例 1

[0051] 使用依那西普蛋白作为蛋白质和 Fc 结构域的融合蛋白进行实验。如本文所使用,“TNFR:Fc”是指依那西普蛋白,而“TNFR:Fc 制剂”是指含有依那西普蛋白的制剂。

[0052] 进行在本实施例中的实验来比较抑制 TNFR:Fc 的聚集的赋形剂的效果。具体地,进行实验以检查在 50℃ 时 TNFR:Fc 的聚集是否因赋形剂不同而有差异。制备除精氨酸外,与在 Enbrel 产品(Amgen, 美国)中使用的配方相同的溶液,并且向其中加入每种赋形剂。将制备的水性溶液(25mg/ml 依那西普,0.66% w/v 蔗糖,65mM 氯化钠,17mM 磷酸钠, pH6.4) 存储于 50℃,然后比较水性溶液之间的聚集度。赋形剂在水性溶液中的最终浓度为 25mM 精氨酸,100mM 脯氨酸,80mM 组氨酸,100mM 甘氨酸,0.2M 氯化铵,10mM EDTA,20% w/v 蔗糖,20% w/v 海藻糖,10% w/v 聚乙二醇,0.04% w/v 聚山梨醇酯 20(吐温 20) 和 0.1% w/v 羟丙基环糊精,并且使用 SE-HPLC 测定 TNFR:Fc 的聚集度。在缓冲流动相为 50mM 磷

酸钠 (pH 为 6.8), 0.15M 氯化钠和 0.05% w/v 叠氮化钠的条件下, 将蛋白注入到 TSK 凝胶 G3000SWXL (7.8×300mm) HPLC 柱 (TOSOH, 日本) 中, 然后检测在 280nm 的蛋白质峰值。早于主峰从该柱洗脱 TNFR:Fc 的聚集物, 并且通过比较聚集物的峰值与主峰的面积来计算聚集度。

[0053] 在 50℃ 存储 1 周的结果表明, TNFR:Fc 蛋白的聚集确实不同的赋形剂之间显著不同。储存在 4℃ (冷藏温度) 的蛋白质 (无抗聚集赋形剂的对照) 显示出很少或没有聚集, 而无论哪种赋形剂, 大多数的蛋白质确实都在 50℃ 聚集 (图 1)。其中, 表面活性剂聚山梨醇酯 20、羟丙基环糊精、两亲聚合物聚乙二醇、金属离子去除剂 EDTA 和氨基酸赋形剂 (精氨酸、脯氨酸、组氨酸、甘氨酸等) 不抑制蛋白质的聚集 (图 1)。然而, 作为糖类赋形剂的蔗糖和海藻糖, 显示出比其它赋形剂稍好的防止聚集效果。此外, 在其它赋形剂的情况下, 当氯化铵用作赋形剂时, 只有约 50% 的蛋白质会聚集。

[0054] 从上述结果中可以看出, 在苛刻条件下使用铵会有效地抑制 TNFR:Fc 的聚集。

[0055] 实施例 2

[0056] 使用 TNFR:Fc 作为蛋白质 -Fc 结构域融合蛋白进行实验。进行该实验来比较使用被用于抑制 TNFR:Fc 聚集的赋形剂精氨酸和使用其它赋形剂的聚集度。

[0057] 被选择用于比较的赋形剂是脯氨酸、氯化钠、蔗糖、聚山梨醇酯 20 和羟丙基环糊精。制备无精氨酸的阴性对照和含有 25mM 精氨酸的阳性对照, 其含有最终浓度为 10mg/ml 的 TNFR:Fc, 1% w/v 蔗糖, 100mM 氯化钠, 25mM 磷酸钠 (pH 6.4)。此外, 测试了通过各添加 100mM 脯氨酸, 50-200mM 氯化铵, 20% w/v 蔗糖, 0.04% w/v 聚山梨醇酯 20 和 0.1% w/v 羟丙基环糊精所获得的制剂。将每种制剂以与实施例 1 相同的方式在 50℃ 存储 1 周。使用 SE-HPLC 以与实施例 1 所述相同的方式检查聚集。

[0058] 将 TNFR:Fc 在 50℃ 存储 1 周, 并且结果是, 含有精氨酸的制剂显示出约 10% 的聚集度 (图 2)。然而, 可以看出, 其它氨基酸脯氨酸显示出对防止聚集的效果不显著, 并且在抗体蛋白质制剂中常用作抗聚集剂的聚山梨醇酯 20 和羟丙基环糊精 (HPCD) 对防止聚集有很少或没有效果。然而, 蔗糖这种典型的蛋白质稳定剂在过量 (20% w/v) 加入时显示出与精氨酸相比优异的防止聚集的效果。可以看出, 在实施例 1 中显示出优异的稳定效果的氯化铵的抗聚集效果随着其浓度增加而增加 (见图 2)。此外, 可以看出, 使用 50mM 氯化铵比使用 25mM 精氨酸显示出更好的聚集抑制效果。

[0059] 实施例 3

[0060] 在本实施例中, 为了进一步证明在高温下已被证明有聚集抑制作用的氯化铵赋形剂的聚集抑制效果, 在 37℃ 的温度进行实验。进行实验来证明作为另一铵盐的硫酸铵和通常已知具有抑制蛋白质聚集能力的其它赋形剂的组合的聚集抑制作用。具体地, 将每种赋形剂加入到含有 25mg/ml 的 TNFR:Fc、1% w/v 蔗糖、100mM 氯化钠和 25mM 磷酸钠的稳定缓冲液 (pH6.4) 中, 然后将每种缓冲液于 37℃ 存储 4 周, 随后测量。

[0061] 使用不含用于聚集抑制的赋形剂的稳定缓冲液 (阴性对照制剂) 组合物, 含有 25mM 精氨酸的制剂 (阳性对照制剂), 含有 50mM 氯化铵的制剂, 含有 25mM 硫酸铵的制剂, 含有 50mM 氯化铵和 1mM EDTA 的制剂, 含有 50mM 氯化铵和 0.1% w/v 聚山梨醇酯 20 的制剂, 含有 50mM 氯化铵和 5% w/v 蔗糖的制剂, 以及含有 50mM 氯化铵和 25mM 赖氨酸的制剂。将每种制剂于 37℃ 存储 4 周。使用 SE-HPLC 以与实施例 1 中所述相同的方式, 测量抑制聚

集的效果。

[0062] 表 1：

[0063] [表 1]

[0064] 在 37℃将依那西普存储在含氯化铵的制剂中 4 周后,测量依那西普的聚集的结果

[0065]

%聚集				
周	0	1	2	4
对照	0.3	1.3	1.4	3.1
Arg		1.1	1.3	2.7
AmCl		1.1	1.3	2.7
AmSul		1.0	1.3	2.7
Am+Lys		0.9	1.3	2.4
Am+EDTA		1.6	2.8	5.2
Am+Tween		1.6	2.7	4.9
Am+Sucrose		1.0	1.2	2.4

[0066] 将 TNFR:Fc 在 37℃存储 4 周,并且结果是,可以看出含有铵盐的制剂有效地抑制蛋白质的聚集,并且与氯化铵类似,硫酸铵也抑制蛋白质的聚集。另外,有趣的是,可以看出,当赋形剂如 EDTA 或聚山梨醇酯 20 与氯化铵组合使用时,聚集度比使用阴性对照制剂时增加,但是,当蔗糖和赖氨酸与氯化铵组合使用时,聚集度比单独使用氯化铵降低(图 3 和表 1)。

[0067] 实施例 4

[0068] 进行实验来检查已被证明具有抑制融合蛋白聚集作用的氯化铵赋形剂的浓度依赖性抑制作用,并在超过 37℃的温度进行。在 45℃的温度进行实验,来检验 TNFR:Fc 的细微的聚集现象的差异。

[0069] 具体地,进行实验来检查氯化铵、硫酸铵和通常已知具有抑制蛋白质聚集作用的其它赋形剂的组合对 TNFR:Fc 的聚集抑制的效果。具体而言,在 45℃将 50mg/ml 的 TNFR:Fc 存储于含有 1% w/v 蔗糖、100mM 氯化钠和 25mM 磷酸钠的稳定缓冲液(pH 6.4)中,然后观察制剂溶液中铵盐的聚集抑制效果。

[0070] 将不含用于聚集抑制的赋形剂的稳定缓冲液组合物(阴性对照制剂),含有 25mM 精氨酸的制剂(阳性对照制剂),各含有 12.5mM、25mM 和 50mM 氯化铵的制剂,含有 25mM 氯化铵和 25mM 赖氨酸或 5% w/v 蔗糖的制剂以及含有 50mM 氯化铵和 25mM 赖氨酸或 5% w/v 蔗糖的制剂在 45℃存储 2 周,然后检查聚集度。使用 SE-HPLC 以与实施例 1 中所述相同的方式,测定聚集抑制效果。

[0071] 表 2：

[0072] [表 2]

[0073] 在 45℃将依那西普存储在含有不同浓度氯化铵的制剂中 14 天后,测量依那西普的聚集的结果

[0074]

%聚集				
天	0	3	7	14
对照	0.9	2.2	3.7	4.6
Arg		1.9	3.2	3.8
AmCl 12.5		2.3	3.5	4.4
AmCl 25		2.1	3.2	4.0
AmCl50		1.8	3.0	3.7
AmSul		1.7	3.0	3.6

[0075]

Am 25+Lys		1.7	2.8	3.5
Am25+Suc		1.6	2.9	3.5
Am50+Lys		1.5	2.6	3.0
Am50+Suc		1.8	2.6	3.1

[0076] 实验结果表明,根据铵盐的浓度,含有铵盐的制剂显示出聚集抑制效果等于或大于含有精氨酸的制剂。此外,可以看出,当氯化铵或硫酸铵与通常已知具有抑制蛋白质聚集作用的其它赋形剂(赖氨酸和蔗糖)组合使用时,可以获得对蛋白聚集更佳的抑制效果(图 4 和图 5 和表 2)。

[0077] 实施例 5

[0078] 在本实施例中,为了使已被证明具有抑制融合蛋白聚集作用的氯化铵赋形剂的效果最大化,将使用各种缓冲液制备的制剂溶液存储于 45℃,并且测量聚集抑制作用。

[0079] 具体地,进行实验来检查经常用于蛋白质制剂的磷酸钠、琥珀酸钠、柠檬酸钠和组氨酸缓冲液之间的蛋白质聚集抑制效果的差异。在 45℃,将 50mg/ml 的 TNFR:Fc 存储在 pH 6.0 和 pH 6.5 的 100mM 氯化钠、50mM 氯化铵和 25mM 的上述四种缓冲液各种中,并观察制剂溶液抑制蛋白聚集的效果。

[0080] 使用 SE-HPLC 以与实施例 1 中所述相同的方式测量聚集抑制效果。

[0081] 从实验结果表明,在 pH 6.5 时,在含有琥珀酸钠作为缓冲液的制剂中的聚集显著低于含有其它缓冲液的制剂。另外,在含有目前市售的 Enbrel 制剂中使用的磷酸钠缓冲液的制剂中的聚集高于其它制剂。此外,可以看出,在 pH 6.0 时含有琥珀酸钠的制剂显示出比含有其它缓冲液的制剂稍好的聚集抑制效果(图 6)。

[0082] 实施例 6

[0083] 在本实施例中,为了使具有抑制融合蛋白聚集的优异效果的琥珀酸钠缓冲液的作用最大化,将使用调节至不同 pH 的琥珀酸钠缓冲液制备的制剂溶液存储于 45℃,并测量制剂溶液的聚集抑制。

[0084] 具体地,进行实验来检验具有不同 pH 的琥珀酸钠缓冲液之间的蛋白质聚集抑制效果的差异。在 45℃,将 50mg/ml 的 TNFR:Fc 存储在 pH 6.0、6.3、6.5 和 7.0 的 100mM 氯化钠、50mM 氯化铵和 25mM 琥珀酸钠缓冲液中,并测量制剂溶液的抑制聚集的效果。

[0085] 使用 SE-HPLC 以与实施例 1 中所述相同的方式测量聚集抑制效果。

[0086] 从实验结果表明,随着琥珀酸钠缓冲液的 pH 降低,融合蛋白的聚集减少,并且在 pH 6.0 和 pH 6.3 时,在琥珀酸盐缓冲液中的融合蛋白聚集少于市售依那西普制剂(比较制剂)(图 7)。

[0087] 实施例 7

[0088] 在本实施例中,为了证实对融合蛋白聚集具有优异抑制作用的琥珀酸钠缓冲液和铵离子组分以及碱性氨基酸的组合对融合蛋白的聚集具有更好的效果,将通过混合组分而制备的制剂溶液存储于 45℃,并测量制剂溶液抑制聚集的效果。

[0089] 具体地,进行实验来检查琥珀酸钠缓冲液、氯化铵和赖氨酸组合对蛋白质聚集的抑制效果。在 45℃,将 50mg/ml 的 TNFR:Fc 存储在含有 100mM 氯化钠、50mM 氯化铵、25mM 赖氨酸和 25mM 琥珀酸钠的缓冲液中,观察 0、5、10 和 15 天的制剂溶液抑制聚集的效果。

[0090] 使用 SE-HPLC 以与实施例 1 中所述相同的方式测量聚集抑制效果。

[0091] 从实验结果表明,在含有氯化铵、琥珀酸盐和赖氨酸的组合物中的聚集比在 Enbrel 制剂(比较制剂)更少(图 8)。

[0092] 工业实用性

[0093] 如上所述,根据本发明的含有铵盐或铵盐和琥珀酸盐组合的组合物,可有效地抑制蛋白质-Fc 结构域融合蛋白的聚集,从而使融合蛋白质存储很长的一段时间。因此,该组合物可广泛用于使用该蛋白质-Fc 结构域融合蛋白的医疗领域。

[0094] 虽然已参照具体特征对本发明作了详细描述,但对本领域技术人员显而易见的是该描述仅仅用于优选实施方式,并不限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围将由所附权利要求书及其等同物来限定。

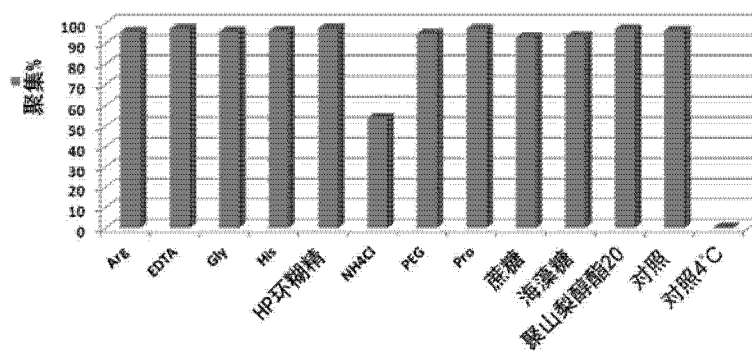


图 1

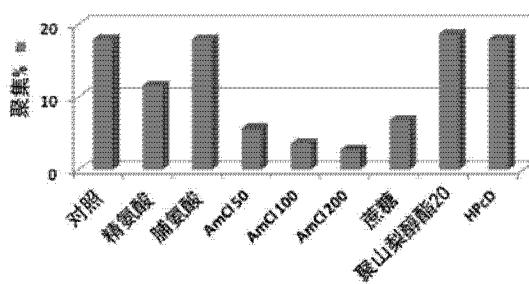


图 2

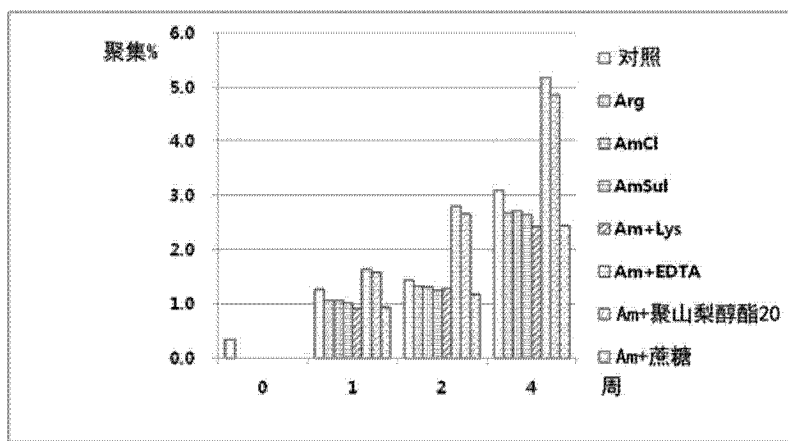


图 3

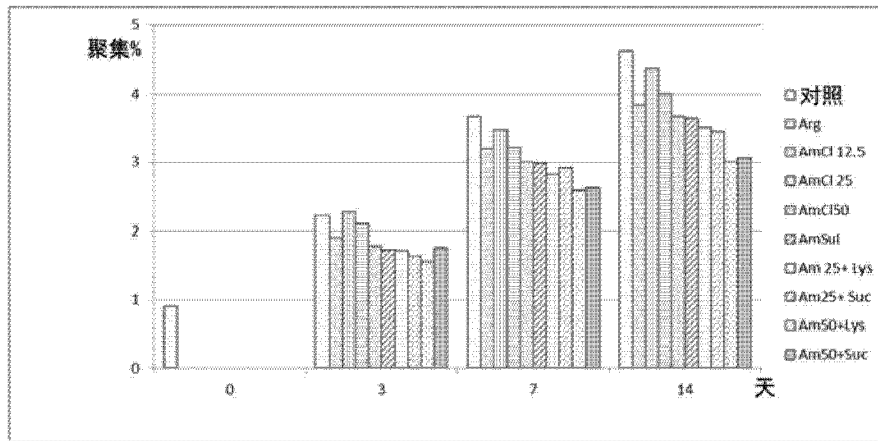


图 4

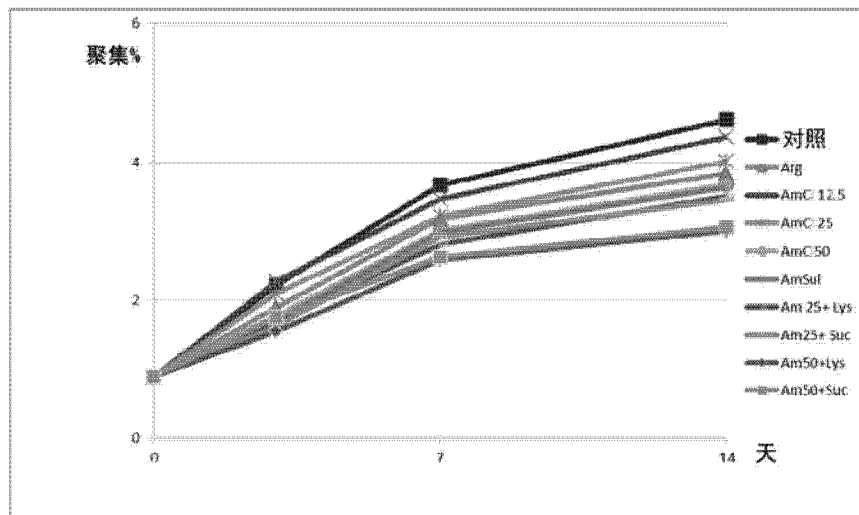


图 5

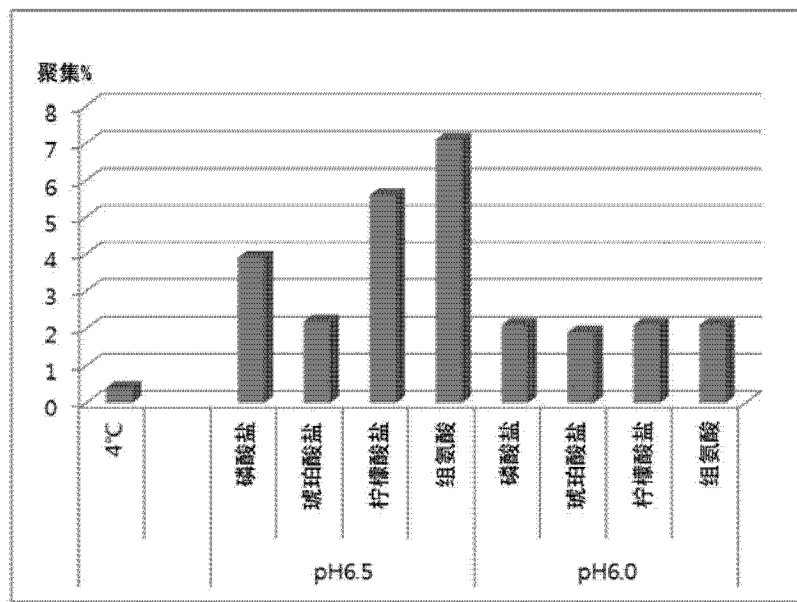


图 6

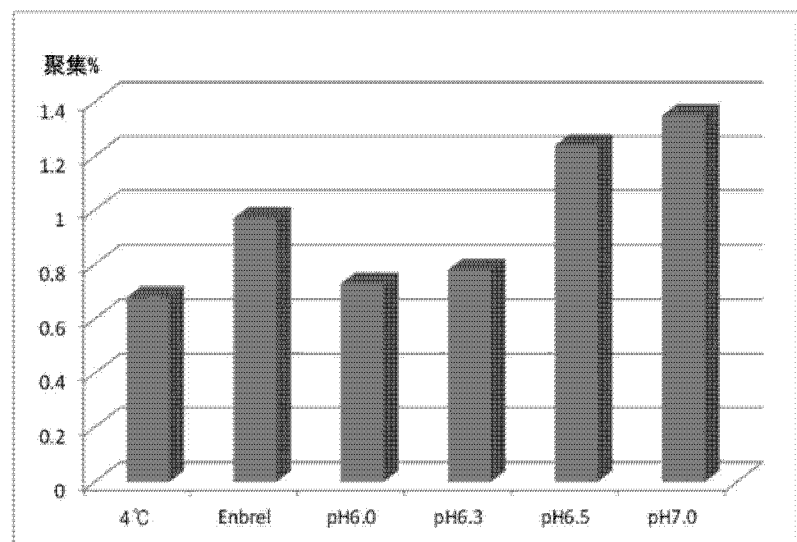


图 7

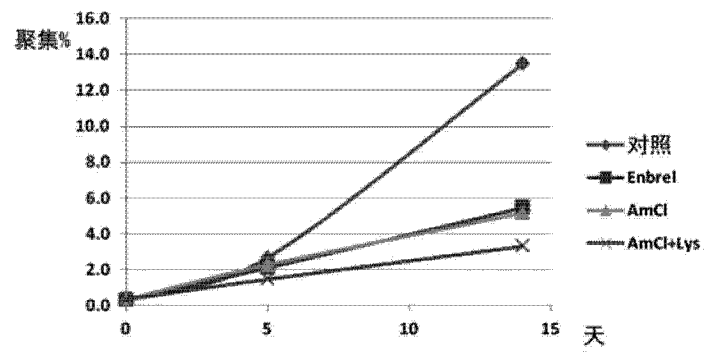


图 8