



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103930124 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

(21) 申请号 201280032584.X

(72) 发明人 凯文·马洛尼 宫克

(22) 申请日 2012.06.29

罗伊·奥尔斯顿

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

申请公布号 CN 103930124 A

代理人 彭鲲鹏 卢蓓

(43) 申请公布日 2014.07.16

(51) Int.CI.

A61K 38/17 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 47/02 (2006.01)

61/504,110 2011.07.01 US

C07K 16/24 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2013.12.30

CN 1829739 A, 2006.09.06

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 03072060 A3, 2004.03.25

PCT/US2012/044988 2012.06.29

WO 2012013980 A1, 2012.02.02

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 田颖

W02013/006454 EN 2013.01.10

权利要求书1页 说明书11页

(73) 专利权人 生物基因MA公司

地址 美国马萨诸塞州

(54) 发明名称

无精氨酸的TNFR:FC-融合多肽组合物及使用方法

(57) 摘要

本发明的多个方面涉及用于治疗与炎症或自身免疫反应相关的病症的无精氨酸的含多肽的组合物和方法。

1.一种组合物,其由以下组成:

10mg/ml至100mg/ml的依那西普;

浓度为0.5%至1.5%的蔗糖;

浓度为120mM至150mM的氯化钠;和

浓度为1mM至15mM的磷酸钠,

其中所述组合物不含游离氨基酸,并且其中所述组合物的pH为5.5至7.8。

2.根据权利要求1所述的组合物,包含50mg/ml的依那西普、10mM的磷酸钠、140mM的氯化钠和1%的蔗糖,其中所述组合物的pH为pH 6.0至pH 7.0。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的组合物,其中所述组合物适于皮下施用。

4.根据权利要求1或权利要求2所述的组合物,其中对所述依那西普进行纯化。

5.根据权利要求1或权利要求2所述的组合物,其中对所述组合物进行灭菌。

6.一种组合物,其由以下组成:

50mg/ml的依那西普;

浓度为10mM的磷酸钠;

浓度为140mM的氯化钠;和

浓度为1%的蔗糖,

其中所述组合物不含游离氨基酸,并且其中所述组合物的pH为pH 6.0至pH 7.0。

7.根据权利要求1所述的组合物,其中所述依那西普以50mg/mL的浓度存在。

8.组合物在制备施用至个体之药物中的用途,其中所述组合物由以下组成:

10mg/ml至100mg/ml的依那西普;

浓度为0.5%至1.5%的蔗糖;

浓度为1mM至15mM的磷酸钠;和

浓度为120mM至150mM的氯化钠,

其中所述组合物不含游离氨基酸,并且其中所述组合物的pH为5.5至7.8。

9.根据权利要求8所述的用途,其中所述组合物包含50mg/ml的依那西普、10mM的磷酸钠、140mM的氯化钠和1%的蔗糖,其中所述组合物的pH为pH 6.0至pH 7.0。

10.根据权利要求8或权利要求9所述的用途,其中所述组合物适于皮下施用。

11.根据权利要求8或权利要求9所述的用途,其中对所述分离的多肽进行纯化。

12.根据权利要求8或权利要求9所述的用途,其中对所述组合物进行灭菌。

13.根据权利要求8或权利要求9所述的用途,其中所述个体被诊断患有选自类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎、强直性脊柱炎、韦格纳病(肉芽肿)、克罗恩病、慢性阻塞性肺病(COPD)、丙肝、子宫内膜异位、哮喘、恶病质、牛皮癣、或特应性皮炎的疾病或病症。

14.根据权利要求13所述的用途,其中将所述组合物以足以治疗所述疾病或病症的量施用给所述个体。

## 无精氨酸的TNFR:Fc-融合多肽组合物及使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求根据35U.S.C. §119 (e) 要求于2011年7月1日提交的美国临时专利申请序列号61/504,110的权益,该临时申请的内容据此整体以引用方式并入。

### 发明领域

[0003] 本发明的某些方面涉及基于治疗性多肽的组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 治疗性多肽制剂通常在使用前储藏。然而,如果以水性形式储藏一段较长的时间,尤其是在不存在诸如精氨酸的稳定剂的情况下,多肽将不稳定。依赖于水性储藏的一种替代方法是制备多肽的冻干形式,然而,将干燥的多肽复溶通常会导致聚集或变性。

### 发明概要

[0006] 在一些实施方案中,提供了无精氨酸的多肽组合物。已确定了用于制备可长期稳定的无精氨酸的多肽溶液的配方。这些配方相对于精氨酸稳定的溶液具有若干优势,包括降低的成本和降低的与存在精氨酸相关的副作用的发生率。令人惊讶的是,水性多肽制剂可通过使用相对高的盐浓度而在不存在精氨酸或其他稳定性氨基酸(例如赖氨酸或甘氨酸或其他稳定性氨基酸,例如具有正电荷的氨基酸)的情况下稳定。

[0007] 在一些实施方案中,本文提供的是包含以下物质(或由以下物质组成或基本上由以下物质组成)的组合物:分离的多肽(例如,治疗性多肽,例如包含免疫球蛋白结构域的治疗性多肽);和盐,其量足以防止多肽聚集,从而使组合物稳定(例如,在不存在精氨酸或其他添加的氨基酸的情况下)。在一些实施方案中,本文提供的组合物是水性组合物(例如,水溶液)。在一些实施方案中,将多肽和盐在不含缓冲剂的水中提供。在一些实施方案中,组合物包含水性缓冲剂或其他溶剂(例如,有机溶剂)。在一些实施方案中,包含一种或多种赋形剂。

[0008] 在一些实施方案中,本发明的多个方面涉及无精氨酸的多肽组合物,该组合物包含含有人免疫球蛋白(例如,IgG1)的Fc区的分离的多肽。在一些实施方案中,本发明的多个方面涉及无精氨酸的多肽组合物,该组合物包含含有人p75肿瘤坏死因子(TNF)的胞外配体结合部分的分离的多肽。在一些实施方案中,本发明的多个方面涉及无精氨酸的多肽组合物,该组合物包含含有融合到人IgG1的Fc区的人p75肿瘤坏死因子(TNF)的胞外配体结合部分的分离的多肽。

[0009] 在一些方面,本文提供的是包含以下物质(或由以下物质组成或基本上由以下物质组成)的组合物:分离的多肽,其为融合到人IgG1的Fc区的人p75肿瘤坏死因子受体的胞外配体结合部分;和盐,其量足以防止多肽聚集,从而使组合物稳定(例如,在不存在精氨酸或其他添加的氨基酸的情况下)。在一些实施方案中,本文提供的组合物是水性组合物(例如,水溶液)。在一些实施方案中,将蛋白和盐在不含缓冲剂的水中提供。在一些实施方案中,组合物包含水性缓冲剂或其他溶剂(例如,有机溶剂)。在一些实施方案中,包含一种或

多种赋形剂。

[0010] 在其他方面,本文提供的是方法,包括将以下物质合并:分离的多肽,其为融合到人IgG1的Fc区的人p75肿瘤坏死因子受体的胞外配体结合部分;水性缓冲剂;和盐,其量足以防止多肽聚集,从而配制稳定的组合物。

[0011] 在另外其他方面,本文提供的是方法,包括向个体施用组合物,所述组合物包含:分离的多肽,其为融合到人IgG1的Fc区的人p75肿瘤坏死因子受体的胞外配体结合部分;水性缓冲剂;和盐,其量足以防止分离的多肽聚集,从而使组合物稳定。

[0012] 在一些实施方案中,组合物包含低于10mM的游离氨基酸(例如,精氨酸、赖氨酸和/或甘氨酸)。在一些实施方案中,组合物包含低于1mM的游离氨基酸。在一些实施方案中,组合物包含低于1mM的精氨酸。在一些实施方案中,组合物包含低于0.5mM的精氨酸。在一些实施方案中,组合物包含低于0.1mM、低于0.05mM、低于0.01mM、低于0.005mM或低于0.001mM的精氨酸。在一些实施方案中,组合物不含游离氨基酸。在一些实施方案中,组合物基本上不含精氨酸。本文所述的组合物的任一种的分离多肽可作为其氨基酸序列的一部分包含精氨酸氨基酸残基。与其他氨基酸残基一起形成蛋白的氨基酸序列的精氨酸残基不视为“游离”氨基酸。因此,“不含氨基酸”的组合物是指不含游离氨基酸但可以含有具有精氨酸氨基酸残基作为其氨基酸序列一部分的分离多肽的组合物。

[0013] 在某些实施方案中,本文所述的组合物包含约10mg/ml至约100mg/ml的分离多肽。在一些实施方案中,分离的多肽为依那西普。

[0014] 在一些实施方案中,水性缓冲剂的浓度低于100mM、低于50mM或低于25mM。在某些实施方案中,水性缓冲剂的浓度为约1mM至约15mM。在一些实施方案中,水性缓冲剂的浓度为约1mM。在一些实施方案中,水性缓冲剂的浓度低于1mM、低于0.5mM、低于0.25mM、低于0.1mM、低于0.05mM或低于0.01mM。在一些实施方案中,水性缓冲剂为磷酸钠、组氨酸、磷酸钾、柠檬酸钠或柠檬酸钾、马来酸、乙酸铵、三(羟甲基)氨基甲烷(tris)、乙酸盐、二乙醇胺或它们的组合。然而,也可以使用其他缓冲剂(例如,以较低的量),因为本发明的多个方面不限于此)。在一些实施方案中,本文所述的组合物不含水性缓冲剂。在此类实施方案中,组合物中的蛋白为自缓冲的,例如,适度浓缩的蛋白可以为自缓冲的(例如,在不含外加缓冲剂的水溶液中)。

[0015] 在一些实施方案中,盐以高于50mM或高于100mM的浓度存在。在一些实施方案中,盐以120mM至约150mM的浓度存在。在一些实施方案中,盐以高于150mM的浓度存在,具体取决于存在于溶液中的水性缓冲剂的量。一般来讲,如果水性缓冲剂的量在组合物中降低,则盐(例如,NaCl)的量增加,以便保持组合物的渗透压和热稳定性。例如,如果水性缓冲剂以低于15mM的浓度存在于组合物中,则盐可以高于150mM的浓度存在于组合物中。在一些实施方案中,盐为氯化钠。组合物的盐组分是指除了存在于水性缓冲液中的盐之外的盐。

[0016] 在其他实施方案中,本文所述的组合物的任一种可包含赋形剂。赋形剂可以为蔗糖、乳糖、甘油、木糖醇、山梨糖醇、甘露糖醇、麦芽糖、肌醇、海藻糖、葡萄糖、牛血清白蛋白(BSA)、人SA或重组HA、葡聚糖、PVA、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、聚乙烯亚胺、明胶、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、羟乙基纤维素(HEC)、聚乙二醇、乙二醇、甘油、二甲基亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)、脯氨酸、L-丝氨酸、谷氨酸钠、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐、肌氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、Tween<sup>®</sup>-20、Tween<sup>®</sup>-80、SDS、聚山梨醇酯、聚氧乙烯共聚物、磷酸钾、乙酸钠、硫酸

铵、硫酸镁、硫酸钠、三甲胺N-氧化物、甜菜碱、锌离子、铜离子、钙离子、锰离子、镁离子、CHAPS、蔗糖单月桂酸酯、2-0-β-甘露糖甘油酸酯或它们的组合。可以使用其他赋形剂,因为本发明的多个方面不限于此。在特定实施方案中,赋形剂为蔗糖。在此类实施方案中,蔗糖的浓度可以为约0.5%至约1.5%。在某些实施方案中,本文所述的组合物的任一种可具有浓度为约1重量%的蔗糖。

[0017] 在一些实施方案中,本文所述的组合物的任一种可具有约5.5至约7.8的pH。在一些实施方案中,本文所述的组合物的任一种可具有约5.8至约6.5的pH。在一些实施方案中,本文所述的组合物可具有5.8至6.5的pH。在一些实施方案中,组合物可具有5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4或6.5的pH。

[0018] 在一个实施方案中,组合物包含以下物质(由以下物质组成或基本上由以下物质组成):50mg/ml的依那西普、约10mM的磷酸钠、约140mM的氯化钠和约1%的蔗糖,其中组合物的pH为约pH6.0至约pH7.0。

[0019] 在本文所述的实施方案的每一个中,组合物不含另外的L-精氨酸(无精氨酸)。也就是说,在本文所述的组合物的任一种中,不添加L-精氨酸或与多肽组合。然而,多肽自身可含有精氨酸氨基酸残基,如本文其他地方所述。

[0020] 本文所述的组合物的任一种可具有至少24个月的商业上可行的储藏期限。

[0021] 本文所述的组合物的任一种还可以适于皮下施用(例如,无毒的、纯化的、灭菌的和/或适当的等渗性)。

[0022] 此外,在本文所述的组合物的任一种中,可对分离的多肽进行纯化。

[0023] 在某些实施方案中,可对本文所述的组合物进行灭菌。

[0024] 本文所述的组合物的任一种可用于治疗类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎、强直性脊柱炎、韦格纳病(肉芽肿)、克罗恩病(或炎性肠病)、慢性阻塞性肺病(COPD)、丙肝、子宫内膜异位、哮喘、恶病质、牛皮癣或特应性皮炎、或其他炎性或自身免疫相关疾病、病症或病状。组合物可以足以治疗(缓解症状、停止或减缓进展)病症的量(例如,治疗有效量)施用。

## 具体实施方式

[0025] 融合到Fc结构域的TNF受体(TNFR:Fc)的市售可溶形式称为依那西普。依那西普(商品名ENBREL<sup>®</sup>)通过作为TNF抑制剂干扰肿瘤坏死因子(TNF)。由连接到人IgG1的Fc部分的人75千道尔顿(p75)肿瘤坏死因子受体(TNFR)的胞外配体结合部分构成的该二聚融合多肽当前通过L-精氨酸配制以防止多肽聚集(参见以引用方式并入文本的美国专利号5,447,851和7,648,702)。

[0026] 精氨酸虽然为大多数人耐受但是可在一些人中导致严重的副作用。称为过敏症的严重过敏反应可在注射精氨酸后发生,以及胃不适,包括恶心、胃痉挛或胃绞痛或大便次数增多。其他潜在的副作用包括低血压和血液中多种化学物质及电解质的变化,诸如高钾、高氯、低钠、低磷酸盐、高血尿素氮和高肌酐水平。在理论上,精氨酸可增加出血风险、升高血糖水平、提高钾水平并可能使镰状细胞病的症状恶化。因此,患有肝脏或肾脏疾病的个体或使用凝血剂的那些人应谨慎使用精氨酸。

[0027] 如美国专利号6,748,702中所讨论,包含含有Fc结构域的多肽的水性组合物被认为需要约1mM至约100mM浓度的L-精氨酸以防止多肽聚集。另外据信,必要的是对此类水性

组合物长期储藏(例如,两年或更长)。

[0028] 令人惊讶的是,可制备基本上不含L-精氨酸(例如,不含大量L-精氨酸)的稳定的水性组合物(例如,药物组合物)使得它们稳定两年或更长的时期。申请人已发现,通过提高盐的浓度以及通过降低组合物的缓冲能力,仍可能提供可经皮下施用给个体的稳定的多肽组合物。相对于长期储藏的术语“稳定的”应理解为意指药物组合物的活性多肽相对于开始储藏时的组合物活性不丧失其活性的超过20%、超过15%、超过10%或超过5%。

[0029] 在一些实施方案中,本文提供的是包含以下物质的组合物:分离的多肽,其为融合到人IgG1的Fc区的人p75肿瘤坏死因子受体的胞外配体结合部分;水性缓冲剂;和盐,其量足以防止多肽聚集,从而使组合物稳定,其中组合物包含浓度低于1mM的L-精氨酸。在某些其他实施方案中,含Fc的多肽组合物不含或基本上不含L-精氨酸。如本文所用的“基本上不含”是指不含另外的游离氨基酸诸如精氨酸的组合物。应当理解,多肽自身可以在其结构中含有氨基酸精氨酸。在一些实施方案中,组合物不含游离精氨酸氨基酸。

[0030] 如本文所用,短语“组合物”可指包含多肽的配方,其制备方式使得其适于注射和/或施用给对其有需要的个体。“组合物”还可以称为“药物组合物”。在某些实施方案中,本文提供的组合物为基本上无菌的并且不含对接受者具有不当毒性或感染性的任何药剂。另外,如本文所用,溶液或水性组合物可意指包含一种或多种溶于合适的溶剂(例如,水和/或其他溶剂,例如有机溶剂)或天然可混溶溶剂的混合物中的化学物质的流体(液体)制剂。

[0031] 此外,如本文所用,术语“约”可意指在所述组合物的组分浓度中可能存在为给定值的5%、10%、15%或至多并包括20%的变化。例如,如果组合物具有约10mg/ml的含Fc结构域的多肽,则该组合物可具有8至12mg/ml的所述多肽。在某些实施方案中,组合物包含约10mg/ml至约100mg/ml的多肽。在相关实施方案中,组合物包含50mg/ml或约50mg/ml的多肽。组合物可包含更多或更少的多肽,因为本发明的多个方面不限于此。

[0032] 在特定实施方案中,含Fc结构域的多肽是融合到Fc结构域的TNF受体(TNFR:Fc)的可溶形式。市售TNFR:Fc称为依那西普(Enbrel®, Immunex Corporation),其为由连接到人IgG1的Fc部分的人75千道尔顿(p75)肿瘤坏死因子受体(TNFR)的胞外配体结合部分组成的二聚融合多肽。依那西普的Fc组分包含恒定重链2(CH2)结构域、恒定重链3(CH3)结构域和铰链区,但不含人IgG1的恒定重链1(CH1)结构域。在一些实施方案中,Fc结构域可包含上述结构域之一,而在其他实施方案中,Fc结构域可包含上述所有结构域。依那西普通过重组DNA技术在中国仓鼠卵巢(CHO)哺乳动物细胞表达系统中产生。它由934个氨基酸组成并具有约150千道尔顿的表观分子量(Physicians' Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc.)。

[0033] 设想用于本文所述的特定组合物和方法的其他多肽包括但不限于包含抗体Fc结构域的至少一部分的融合多肽。融合到Fc结构域并与以下多肽之一相同或基本上相似的多肽适用于本发明的组合物:f1t3配体、CD40配体、促红细胞生成素、促血小板生成素、降钙素、Fas配体、NF-κB受体激活剂的配体(RANKL)、肿瘤坏死因子(TNF)相关细胞凋亡诱导配体(TRAIL)、胸腺基质源淋巴细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、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至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以及细胞表面

分子ELK和Hek的各种配体(诸如eph相关激酶或LERKS的配体)。

[0034] 在某些实施方案中,多肽包括但不限于包含抗体的Fc结构域加上任何上述多肽的受体或基本上与此类受体相似的多肽的重组融合多肽。这些受体包括但不限于:TNFR的两种形式(称为p55和p75)、白介素-1受体(1型和2型)、白介素-4受体、白介素-15受体、白介素-17受体、白介素-18受体、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体、粒细胞集落刺激因子受体、抑瘤素-M和白血病抑制因子的受体、NF- $\kappa$ B受体激活剂(RANK)、TRAIL的受体(TRAIL受体1、2、3和4)以及包含死亡结构域的受体,诸如Fas或细胞凋亡诱导受体(AIR)。

[0035] 在其他实施方案中,多肽包括但不限于融合到抗体的Fc结构域的分化抗原(称为CD多肽)或其配体或基本上与它们任一者相似的多肽。此类抗原在Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VI<sup>th</sup> International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996) 进行了公开。相似的CD多肽在后续研讨会中进行了公开。此类抗原的实例包括CD27、CD30、CD39、CD40及其配体(CD27配体、CD30配体等)。CD抗原中的多种是TNF受体家族的成员,该家族还包括41BB配体和OX40。配体通常为TNF家族的成员,与41BB配体和OX40配体一样。因此,TNF和TNFR家族的成员可如本所述进行配制。

[0036] 在某些实施方案中,酶活性多肽或其配体可用于本文所述的组合物和方法。实例包括但不限于包含融合到以下多肽或其配体或基本上与这些多肽之一相似的多肽之一的全部或一部分的抗体Fc结构域的重组融合多肽:金属蛋白酶-解整合蛋白家族成员、各种激酶、葡萄糖脑苷脂酶、过氧化物歧化酶、组织型纤溶酶原激活剂、因子VIII、因子IX、载脂蛋白E、载脂蛋白A-I、球蛋白、IL-2拮抗剂、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶、TNF- $\alpha$ 转化酶、任何上述酶的配体以及多种其他酶及其配体。

[0037] 在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法用于制备包含抗体、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体(例如,具有连接到一个或多个鼠可变抗体免疫球蛋白结构域的人恒定抗体免疫球蛋白结构域的抗体)和/或非人类抗体或其片段的组合物。适用于本发明的组合物的抗体的具体实例包括但不限于市售抗体,诸如莫罗单抗-CD3(Orthoclone OKT-3®, Ortho Biotech)、阿昔单抗(REOPRO®, Lilly)、利妥昔单抗(RITUXAN®, IDEC)、达昔单抗(ZENAPAX®, Roche Laboratories)、巴利昔单抗(SIMULECT®, Novartis)、英夫利西单抗(REMICADE®, Centocor)、帕利珠单抗(SYNAGIS®, MedImmune)、曲妥珠单抗(HERCEPTIN®, Genentech)、吉妥珠单抗奥唑米星(MYLOTARG™, Wyeth-Ayerst)和阿仑单抗(CAMPATH®, Berlex)。当前,前述每一种均可作为在施用前需要复水的冻干粉或需要稀释的浓缩物获得。本发明的组合物不再需要在施用前进行任何操纵,例如复水或稀释,而在长期储藏期间保持活性成分的稳定性。

[0038] 在特定实施方案中,本文所述的组合物用于储藏包含偶联到细胞毒性或发光物质的抗体的多肽。此类物质包括但不限于:美登素衍生物(诸如DM1)、肠毒素(诸如葡萄球菌肠毒素)、碘同位素(诸如碘-125)、锝同位素(诸如Tc-99m)、花菁荧光染料(诸如Cy5.5.18)和核糖体失活多肽(诸如bouganin、白树毒素或皂草素-S6)。

[0039] 设想在本文使用的抗体或抗体/细胞毒素或抗体/发光团偶联物的实例包括但不限于识别以下抗原中的一种或多种的那些:CD2、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD14、CD18、CD20、CD22、CD23、CD25、CD33、CD40、CD44、CD52、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD147、IL-4、IL-5、IL-

8、IL-10、IL-2受体、IL-4受体、IL-6受体、IL-13受体、PDGF— $\beta$ 、VEGF、TGF、TGF— $\beta$ 2、TGF— $\beta$ 1、EGF受体、VEGF受体、C5补体、IgE、肿瘤抗原CA125、肿瘤抗原MUC1、PEM抗原、LCG(其为与肺癌相关而表达的基因产物)、HER-2、肿瘤相关糖蛋白TAG-72、SK-1抗原、以高水平存在于患有结肠和/或胰腺癌的个体的血清中的肿瘤相关表位、在乳腺、结肠、鳞状细胞、前列腺、胰腺、肺和/或肾癌细胞上和/或在黑素瘤、胶质瘤或神经母细胞瘤细胞上表达的癌相关表位或多肽、TRAIL受体1、2、3和4、肿瘤坏死核心、整合素 $\alpha 4\beta 7$ 、整合素VLA-4、B2整合素、TNF- $\alpha$ 、粘附分子VAP-1、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、细胞间粘附分子-3(ICAM-3)、白细胞整合素粘附分子、血小板糖蛋白gpIIb/IIIa、心肌肌球蛋白重链、甲状旁腺激素、rNAPc2(其为因子VIIa-组织因子的抑制剂)、MHC I、癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP)、肿瘤坏死因子(TNF)、CTLA-4(其为细胞毒性T淋巴细胞相关抗原)、Fc- $\gamma$ —1受体、HLA-DR10 $\beta$ 、HLA-DR抗原、L-选择素、IFN- $\gamma$ 、呼吸道合胞病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、乙肝病毒(HBV)、变异链球菌和金黄色葡萄球菌。

[0040] 在一些实施方案中，本文所述的组合物用于抗独特型抗体或基本上相似的多肽，包括但不限于针对以下物质的抗独特型抗体：靶向肿瘤抗原gp72的抗体；针对神经节苷脂GD3的抗体；或针对神经节苷脂GD2的抗体。

[0041] 在其他实施方案中，用于本文所述的组合物的含Fc结构域的多肽通过表达多肽的活宿主细胞(诸如就抗体而言的杂交瘤)或就融合多肽或抗体而言经过基因工程改造以产生多肽的宿主细胞产生。对细胞进行基因工程改造以产生多肽的方法是本领域熟知的。参见例如Ausubel等人编辑(1990), Current Protocols in Molecular Biology(Wiley, New York)。此类方法包括将编码多肽并允许多肽表达的核酸引入活宿主细胞。这些宿主细胞可以为但不限于在培养中生长的细菌细胞、真菌细胞或动物细胞。细菌宿主细胞包括但不限于大肠杆菌细胞。合适的大肠杆菌菌株的实例包括但不限于HB101、DH5 $\alpha$ 、GM2929、JM109、KW251、NM538、NM539和不能裂解外来DNA的任何大肠杆菌菌株。可以使用的真菌宿主细胞包括但不限于酿酒酵母、巴斯德毕赤酵母、曲霉菌细胞。可以使用的动物细胞系的几个实例为CHO、VERO、BHK、HeLa、Cos、MDCK、293、3T3和W138。可以使用本领域技术人员熟知的方法建立新的动物细胞系(例如通过转化、病毒感染和/或筛选)。任选地，多肽可通过宿主细胞分泌到培养基中。

[0042] 在某些实施方案中，将表达的含Fc结构域的多肽通过标准方法纯化。当含Fc结构域的多肽在细胞内产生时，例如通过离心或超滤而移除颗粒碎片。当多肽分泌到培养基中时，可首先使用标准多肽浓缩过滤器对得自此类表达系统的上清液进行浓缩。也可将蛋白酶抑制剂加入以抑制蛋白水解，并且可以将抗生素包含在内以防止微生物生长。

[0043] 在一些实施方案中，将含Fc结构域的多肽使用例如羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、渗析和亲和色谱和/或已知的或有待发现的纯化技术的任何组合进行纯化。例如，蛋白A可用于纯化基于人类 $\gamma$ 1、 $\gamma$ 2或 $\gamma$ 4重链的含Fc结构域的多肽(Lindmark等人, 1983, J. Immunol. Meth. 62:1-13)。蛋白G建议用于所有小鼠同种型以及用于人类 $\gamma$ 3(Guss等人, 1986, EMBO J. 5:1567-1575)。

[0044] 用于多肽纯化的其他技术诸如在离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀法、反相HPLC、二氧化硅上的色谱法、肝素SEPHAROSET<sup>TM</sup>上的色谱法、阴离子或阳离子交换树脂上的色谱法(诸如聚天冬氨酸柱)、层析聚焦、SDS-PAGE以及硫酸铵沉淀法也可根据需要使用。可

以使用其他多肽纯化技术/方法。

[0045] 在特定实施方案中，本文所述的组合物通过除了上述纯化多肽外还将缓冲剂、盐(例如，NaCl)和另外的赋形剂(例如，蔗糖)组合而制备。在一些实施方案中，本发明的组合物包含低于1mM的L-精氨酸，而在其他实施方案中，本文所述的组合物不含或基本上不含精氨酸(例如L-精氨酸)。本领域的普通技术人员将会理解的是，将待包含在组合物中的各种组分组合可按任何合适的顺序进行，即，可以最先、在中间或最后添加缓冲剂，并且还可以最先、在中间或最后添加渗透压调节剂。本领域的普通技术人员还将理解的是，这些化学物质中的一些可能在某些组合中不相容，并因此，容易地由具有相似性质但在相关混合物中相容的不同化学物质替代。

[0046] 聚集抑制剂降低多肽在不当的或不想要的三元或四元复合物中缔合的趋势。令人惊讶的是，本发明人已发现，在包含含Fc的多肽的组合物中，通过提高盐浓度以及通过降低缓冲能力，不需要再添加游离氨基酸(例如，精氨酸、赖氨酸、甘氨酸)。无精氨酸的组合物中的多肽仍保持活性(有效)并可储藏至少24个月。在某些实施方案中，盐浓度高于100mM，而在其他实施方案中，盐浓度为约140mM或更高。如本文所用的盐可包括但不限于氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、柠檬酸钠(Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O)、硫酸镁(MGSO<sub>4</sub>)、氯化钙(CaCl<sub>2</sub>)、次氯酸钠(NaClO)、硝酸钠(NaNO<sub>3</sub>)、硫化汞(HgS)、铬酸钠(Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>)和二氧化镁(MgO<sub>2</sub>)。盐例如在不存在精氨酸(例如，L-精氨酸)的情况下既维持组合物的等渗性也维持热稳定性。

[0047] 缓冲剂将pH维持在所需的范围内，并且适用于本文所述的组合物的多种缓冲剂包括但不限于组氨酸、磷酸钾、柠檬酸钠或柠檬酸钾、马来酸、乙酸铵、三(羟甲基)氨基甲烷(tris)、各种形式的乙酸盐和二乙醇胺。在某些实施方案中，缓冲剂为磷酸钠，因为其缓冲能力在pH6.2处或附近。在一些实施方案中，缓冲剂在组合物中的浓度为约25mM或更低。在一些实施方案中，缓冲剂的浓度为25mM。在特定实施方案中，缓冲剂的低浓度为约10mM或更低。在一些实施方案中，缓冲剂的浓度为10mM。缓冲剂是本领域熟知的并通过已知的方法制造且可从商业供应商获得。

[0048] 当组合物的pH设定在生理水平处或附近时，在施用时个体的舒适度得到最大程度提高。在某些实施方案中，pH为约5.8至8.4。在其他实施方案中，pH为约6.2至7.4。应当理解，pH可在必要时进行调节以最大程度提高特定组合物中多肽的稳定性和溶解性，并因此而言，在生理范围之外但个体仍可耐受的pH也在本发明的范围内。

[0049] 在某些实施方案中，将使处于溶液形式(也处于干燥或冷冻形式)的多肽稳定的赋形剂(也称为化学添加剂、共溶质或共溶剂)加到组合物中。实例包括但不限于糖/多元醇，诸如蔗糖、乳糖、甘油、木糖醇、山梨糖醇、甘露糖醇、麦芽糖、肌醇、海藻糖、葡萄糖；聚合物，诸如：血清白蛋白(牛血清白蛋白(BSA)、人SA或重组HA)、葡聚糖、PVA、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、聚乙烯亚胺、明胶、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、羟乙基纤维素(HEC)；非水性溶剂，诸如：多元醇(例如，PEG、乙二醇和甘油)、二甲基亚砜(DMSO)和二甲基甲酰胺(DMF)；氨基酸，诸如脯氨酸、L-丝氨酸、谷氨酸钠、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐、肌氨酸和γ-氨基丁酸；表面活性剂，诸如TWEEN-80<sup>TM</sup>(聚山梨醇酯80)、TWEEN-20<sup>TM</sup>(聚山梨醇酯20)、SDS、聚山梨醇酯、聚氧乙烯共聚物；以及其他赋形剂，诸如：磷酸钾、乙酸钠、硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、三甲胺N-氧化物、甜菜碱、金属离子(例如，锌、铜、钙、锰和镁)、CHAPS、单月桂酸酯、2-O-β-甘露糖甘油酸酯或以上的任意组合。

[0050] 在某些实施方案中,一种或多种赋形剂在本文所述的组合物中的浓度为约0.001重量%至5重量%,而在其他实施方案中,一种或多种赋形剂的浓度为约0.1重量%至2重量%。赋形剂是本领域熟知的并通过已知的方法制造且可从商业供应商获得。在一些实施方案中,赋形剂为蔗糖。在其他实施方案中,蔗糖以约1%的浓度存在于组合物中。

[0051] 在一个特定实施方案中,本文所述的组合物包含约pH6.0至约pH7.0的以下物质(或由以下物质组成或基本上由以下物质组成):约25至约50mg的TNFR:Fc(例如,依那西普)、约10mM至约50mM的磷酸钠(例如,磷酸二氢钠和/或磷酸氢二钠)、约0.75%至约1.25%的蔗糖、约50mM至约150mM的NaCl。

[0052] 在另一个实施方案中,本文所述的组合物包含约pH6.2的以下物质(或由以下物质组成或基本上由以下物质组成):约50mg/ml的TNFR:Fc、约10mM的磷酸钠、约140mM的氯化钠和约1%的蔗糖。

[0053] 在某些实施方案中,本文提供的是治疗个体的方法,包括向个体施用治疗有效量的本文所述的组合物,其中该个体具有可通过组合物形式的含Fc结构域的多肽而有益地治疗的疾病或病症。在一些实施方案中,含Fc结构域的多肽衍生自将用组合物治疗的个体相同的物种。在特定实施方案中,个体为需要治疗的人。当组合物的含Fc结构域的多肽为TNFR:Fc时,可治疗的疾病或病症的实例包括但不限于类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎、强直性脊柱炎、韦格纳病(肉芽肿)、克罗恩病(或炎性肠病)、慢性阻塞性肺病(COPD)、丙肝、子宫内膜异位、哮喘、恶病质、牛皮癣和特应性皮炎。可通过TNFR:Fc治疗的另外的疾病或病症包括在W000/62790、W001/62272和美国专利申请号2001/0021380中所述的那些。

[0054] 在其他方面,本文提供的是具有改善的长期储藏的多肽组合物,使得活性成分(例如,含Fc结构域的多肽)在以液体(或冷冻)状态储藏的过程中稳定。如本文所用,短语“长期”储藏意指组合物可储藏三个月或更长、六个月或更长、或一年、或两年或更长。长期储藏还应理解为意指将组合物作为液体在2—8°C储藏或(例如)在-20°C或更冷的温度下冷冻。在某些实施方案中,可将组合物冻融多次。相对于长期储藏的术语“稳定的”应理解为意指组合物的活性多肽不丧失其活性超过20%或15%或甚至10%。在特定实施方案中,组合物的活性多肽相对于开始储藏时的组合物活性不丧失其活性的超过5%。组合物的稳定性可基于效价、外观、浓度、pH和氧化而评估,并可使用例如疏水相互作用色谱(HIC)、毛细管电泳-十二烷基硫酸钠(CE-SDS)、高精度(HIAC)液体粒子计数器和/或等电点聚焦。其他蛋白稳定性测定法是本领域已知的并可用于本文。

[0055] 组合物的含Fc结构域的多肽的合适剂量或治疗有效量将取决于待治疗的病状、病状的严重性、之前的疗法以及个体的临床史和对治疗剂的反应。正确的剂量可根据主治医生的判断而调整,使得其可一次性施用给个体或经一系列施用。组合物可根据需要作为唯一的治疗剂或与另外的疗法组合而施用。

[0056] 在某些实施方案中,每个成年人有效的含Fc结构域的多肽量在约1-500mg/m<sup>2</sup>或约1-200mg/m<sup>2</sup>或约1-40mg/m<sup>2</sup>或约5-25mg/m<sup>2</sup>的范围内。作为另外一种选择,可施用固定剂量,其量可在2-500mg/剂、2—100mg/剂或约10-80mg/剂的范围内。如果剂量将每周施用不止一次,则示例性剂量范围与前述剂量范围相同或更低,并且优选地以25—100mg/剂的每剂范围每周施用两次或更多次。在其他实施方案中,通过注射而施用的可接受剂量包括80—100mg/剂,或包括80mg/剂。剂量可两周施用一次、每周一次,或间隔若干周(例如,2至8周)。

在一个特定实施方案中,通过单次皮下(SC)注射施用25mg的TNFR:Fc(依那西普)。设想了其他施用途径。

[0057] 在许多情况下,个体病症的改善将通过在至少三周的期间每周一至三次至多约100mg的组合物获得,然而更长时期的治疗可能是必要的以引起所需的改善程度。对于不治慢性病症,方案可无限期地持续。对于儿科个体(年龄4—17岁),合适的方案涉及0.4mg/kg至5mg/kg剂量的本发明的多肽,每周施用一次或多次。

[0058] 在其他实施方案中,本文所述的组合物以散装配方制备,并因此而言,对组合物的组分进行调整,使得其将比施用所需的更高,并在施用前适当地稀释。

[0059] 在某些实施方案中,将本文所述的组合物在肠胃外施用,例如皮下、肌内、静脉内、腹膜内、脑脊髓内、关节内、滑膜内和/或鞘内。肠胃外施用可通过推注或连续输注进行。注射用组合物可以单位剂型的形式存在,例如在安瓿或多剂量容器中,含有外加的防腐剂。此外,已开发了多种最新的药物递送方法,并且本发明的组合物适用于使用这些新方法施用,例如Inject-ease<sup>TM</sup>、GENJECT<sup>TM</sup>、诸如GENPEN<sup>TM</sup>的注射笔以及诸如MEDIJECTOR<sup>TM</sup>和BIOJECTOR<sup>TM</sup>的无针装置。本发明的组合物也可适用于有待发现的施用方法。另见Langer, 1990, Science, 249:1527—1533。

[0060] 在一些实施方案中,将本文所述的组合物配制成为库型制剂。此类长效组合物可通过植入(例如,皮下或肌内)或通过肌内注射而施用。因此,例如,组合物可通过合适的聚合物或疏水性材料(例如,作为可接受的油中的乳液)或离子交换树脂改性,或改性为微溶的衍生物,例如作为微溶的盐。

[0061] 在其他实施方案中,本文所述的组合物存在于可容纳含有活性成分的一个或多个单位剂型的小瓶、包或分配装置中。在一些实施方案中,分配装置包括具有可直接注射的单剂液体组合物的注射器。注射器可伴有施用说明。

[0062] 在其他方面,本文提供的是容纳本发明的水性组合物的试剂盒或容器。多肽在水性组合物中的浓度可在宽范围内变化。在某些实施方案中,其范围为约0.05至约20,000毫克每毫升( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )水性组合物。试剂盒还可以伴有使用说明。

[0063] 下文通过非限制性实施例进一步描述组合物。

[0064] 实施例

[0065] 实施例1:稳定的多肽组合物的一个实施方案:

[0066] 表1:依那西普组合物。

成分	功能	每毫升剂型的量		等级
依那西普	活性成分	50 mg		N/A
磷酸氢二钠七水合物	缓冲剂	0.67 mg	10 mM	美国药典(USP)
磷酸二氢钠单水合物	缓冲剂	1.04 mg		美国药典
氯化钠(NaCl)	稳定剂	8.18 mg	140 mM	美国药典/欧洲药典(Ph.Eur.)
蔗糖	稳定剂	0.01 mg	1%	国家处方集 ( NF ) /欧洲药典
水 (注射用)	溶剂	适量		美国药典/欧洲药典

[0067]

实施例2:多肽组合物在-70℃的稳定性数据:

[0069]

表2:依那西普在-70℃的稳定性数据。

测试方法	预期结果/范围	时间点 (月)			
		初始	1	3	6
外观	颜色< Y3, 澄明度< 80NTU, 报告(FIO)可见粒子	Y7-Y6 3-6NTU	Y7-Y6 0-3NTU	Y7-Y6 3-6NTU	Y7-Y6 3-6NTU
蛋白浓度紫外检测法	45.0 至 55.0 mg/mL	48.2	49.4	51.5	51.0
尺寸排阻色谱法(SEC)	报告% HMW, 预期结果≤5.0% HMW	1.2	1.1	1.1	1.2

[0070]

实施例3:多肽组合物在5±3℃的稳定性数据:

[0072]

表3:依那西普在5±3℃的稳定性数据。

测试方法	预期结果/范围	时间点 (月)			
		初始	1	3	6
外观	颜色< Y3, 澄明度< 80NTU, 报告(FIO)可见粒子	W-Y7 3-6NTU 粒子	Y7-Y6 W-3NTU 粒子	Y7-Y6 6-18NTU 粒子	Y7-Y6 3-6NT U 粒子
蛋白浓度紫外检测法	45.0 至 55.0 mg/mL	47.8	49.3	51.3	50.0
尺寸排阻色谱法(SEC)	报告% HMW, 预期结果≤5.0% HMW	1.2	1.3	1.3	1.6
颗粒物	报告结果 ≥10 μm	460	435	135	180
	报告结果 ≥25 μm	110	25	55	25

[0074] 等效物和范围

[0075] 本领域的技术人员将认识到或能够仅使用常规实验确定本文所述的具体实施方案的许多等效物。本发明的范围并非意图限于上述“具体实施方式”，而是如所附权利要求书中所示。

[0076] 在权利要求书中，除非相反地指出或从上下文中显而易见，否则诸如“一个/种”和“该/所述”的冠词可意指一个/种或不止一个/种。除非相反地指出或从上下文中显而易见，否则在一群组中的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求项或描述被视为满足在给定产物或方法中存在、采用一个、不止一个或全部群组成员，或者一个、不止一个或全部群组成员与给定产物或方法有关。本发明包括在给定产物或方法中存在、采用正好一个群组成员、或者正好一个群组成员与给定产物或方法有关的实施方案。本发明包括在给定产物或方法中存在、采用不止一个或全部群组成员、或者不止一个或全部群组成员与给定产物或方法有关的实施方案。此外，应了解，本发明涵盖将一个或多个所列权利要求项的一个或多个限制、要素、条款、描述性术语等引入另一权利要求项中的所有变化、组合和排列。例如，任何附属于另一权利要求项的权利要求项可经修改以包括附属于同一基本权利要求项的任何其他权利要求项中所见的一个或多个限制。

[0077] 当以列举形式，例如以马库什群组 (Markush group) 形式提供要素时，应了解也公开所述要素的每个子群组，并且可从群组中除去任何要素。应了解，一般来讲，当将本发明或本发明的方面描述为包含特定要素、特征等时，本发明或本发明的方面的某些实施方案由此类要素、特征等组成或基本上由此类要素、特征等组成。为简单起见，本文中未具体陈述关于此方面的那些实施方案。还应注意，术语“包含”欲为开放式的且允许包括另外的要素或步骤。

[0078] 当给出范围时，端点也包括在内。此外，应了解，除非另外指明或从上下文和/或本领域普通技术人员的了解中显而易见，否则以范围形式表述的值可采取本发明的不同实施方案中规定范围内的任何特定值或子范围，除非本文另外明确规定，否则达范围下限的十分之一。

[0079] 术语“约”或“大约”可意指在本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内，该范围将部分地取决于测量或测定值的方式，如测量系统的限制。例如，按照本领域中的实践，“约”可意指在1个或不止1个标准差内。作为另外一种选择，“约”可意指给定值的最多20%、最多10%、最多5%或最多1%的范围。作为另外一种选择，该术语可意指在值的某一数量级内，例如在5倍内或在2倍内。当在本申请和权利要求书中描述特定的值时，除非另外指明，否则应假设术语“约”在特定值的可接受误差范围内。

[0080] 另外，应了解，落在现有技术范围内的本发明的任何特定实施方案可明确地从任一个或多个权利要求项中排除。由于此类实施方案被视为是本领域普通技术人员已知的，因此即使本文未明确表明排除在外，也可将它们排除。本发明方法的任何特定实施方案可因任何原因从任何一个或多个权利要求项中排除，不论是否与存在现有技术相关。