



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103998061 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 20

(21) 申请号 201280062739. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 10. 18

A61K 39/395 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/548, 518 2011. 10. 18 US

61/669, 480 2012. 07. 09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/060745 2012. 10. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/059410 EN 2013. 04. 25

(71) 申请人 科荣生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 马克·曼宁 布莱恩·墨菲

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 巩克栋 杨生平

权利要求书2页 说明书17页

(54) 发明名称

使用木糖醇稳定的依那西普制剂

(57) 摘要

本发明为一种稳定水性药物组合物,其包含依那西普和用以抑制依那西普的不稳定性、错折叠、聚集和/或片段化的稳定剂,其中所述稳定剂包含木糖醇或木糖醇与葡甲胺的结合物。以下讨论中所用的各种技术术语在“定义”部分被限定且贯穿本说明书的其余部分。任选地且优选地不含精氨酸的本发明所述的稳定的依那西普制剂引起长期储存稳定性。

1. 一种稳定的水性药物组合物,其包含依那西普和用以抑制依那西普的不稳定性、错折叠、聚集和 / 或片段化的稳定剂,其中所述稳定剂包含木糖醇或木糖醇与葡甲胺的结合物。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,进一步包含选自缓冲剂、张度改性剂和赋形剂的一种或多种另外的组分。

3. 根据权利要求 2 所述的组合物,其任选地不含或基本不含精氨酸,且引起以至少以下一点为特征的长期储存稳定性:

在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 SEC 分析为:大于约 90% 的单体含量;小于约 3wt% 的聚集体含量;以及小于约 5wt% 的片段 3 含量;和

在 M_3 、 T_2 或 T_4 的 HIC 分析,其中由 HIC 色谱图的峰 1 代表的组分的量小于约 3wt%;由 HIC 色谱图的峰 2 代表的组分的量为大于 80wt%;以及由 HIC 色谱图的峰 3 表示的组分的量小于约 20wt%。

4. 根据权利要求 2 所述的组合物,其任选地不含或基本不含精氨酸,包含约 25 至约 75mg/ml 的依那西普;用以抑制依那西普的不稳定性、聚集和 / 或片段化的稳定剂,其中所述稳定剂为构成所述组合物多至约 10wt% 的量的木糖醇,且其中所述组合物以以下在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 SEC 分析为特征:多于约 80wt% 的单体含量;少于约 3wt% 的聚集体含量;和少于约 6wt% 的片段 3 含量;且具有 6.0 至 6.6 的 pH。

5. 根据权利要求 4 所述的组合物,其引起以以下为特征的长期储存稳定性:

(a) 在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 SEC 分析为:大于约 90wt% 的单体含量;和小于约 3wt% 的聚集体含量;和

(b) 在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 HIC 分析,其中由 HIC 色谱图的峰 1 代表的组分的量小于约 4wt%;由 HIC 色谱图峰 2 代表的组分的量为大于 80wt%;以及由 HIC 色谱图的峰 3 代表的组分的量小于约 20wt%。

6. 根据权利要求 3 所述的组合物,其具有以下在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 HIC 分析,其中由 HIC 色谱图的峰 1 代表的组分的量小于约 1wt%;由 HIC 色谱图的峰 2 表示的组分的量大于约 95wt%;且由 HIC 色谱图的峰 3 代表的组分的量小于约 3wt%。

7. 根据权利要求 3 所述的组合物,其包含:约 25 至 75mg/ml 依那西普;约 1-10wt% 的木糖醇;约 1 至 30mM 的磷酸钠;任选地多至约 5wt% 的葡甲胺;任选地多至约 100mM 的 NaCl;和任选地多至约 5wt% 的蔗糖。

8. 根据权利要求 7 所述的组合物,其包含:约 1-100mM 的 NaCl;约 1 至 5wt% 的蔗糖;且其中所述稳定剂进一步包含所述组合物的约 1-5wt% 的量的葡甲胺。

9. 根据权利要求 7 所述的组合物,其包含约 50mg/ml 的依那西普;约 10wt% 的木糖醇;和 10 至约 30mM 的磷酸钠;其中所述制剂以以下 M_3 或 T_2 或 T_4 的 SEC 分析为特征:多于 85wt% 的单体含量。

10. 根据权利要求 7 所述的组合物,其包含:约 50mg/ml 的依那西普;约 10 至 30mM 的磷酸钠;约 1-3wt% 的木糖醇;和约 1-3wt% 的葡甲胺;其中所述制剂以以下在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 SEC 分析为特征:多于 85wt% 的单体含量。

11. 根据权利要求 7 所述的组合物,其包含:约 50mg/ml 的依那西普;约 10 至 30mM 的磷酸钠;约 1-3wt% 的木糖醇;约 1-3wt% 的葡甲胺;约 1-100mM 的氯化钠;和约 1-4wt% 的

蔗糖 ;其中所述制剂以以下在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 SEC 分析为特征 :多于 85wt% 的单体含量的。

12. 根据权利要求 7 所述的组合物,其包含 :约 50mg/ml 的依那西普 ;约 6wt% 的木糖醇 ;和约 10 至 30mM 的磷酸钠 ;其中所述制剂以以下在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 SEC 分析为特征 :多于 85wt% 的单体含量。

13. 根据权利要求 7 所述的组合物,其包含 :约 50mg/ml 的依那西普 ;约 10 至 30mM 的磷酸钠 ;约 2-3wt% 的木糖醇 ;和约 5% 的蔗糖 ;其中所述制剂以以下在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 SEC 分析为特征 :多于 85wt% 的单体含量。

14. 根据权利要求 3 所述的组合物,其引起以以下为特征的长期储存稳定性 :在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 HIC 分析,其中由 HIC 色谱图的峰 2 代表的组分的量为大于或等于约 95wt% ;且其中,如果峰 3 存在于所述 HIC 色谱图,由峰 3 代表的组分的量小于或等于约 1wt%。

15. 根据权利要求 3 所述的组合物,其在 M_3 或 T_2 或 T_4 每 ml 平均具有不多于约 10000 个尺寸大于 $5\mu m$ 的显微镜下才可见的颗粒。

16. 根据权利要求 7 所述的组合物,其中将葡甲胺,若存在,替换为甘露糖基甘油酸酯、甘露糖基乳酸酯、甘露糖基羟基乙酸酯或二甘油磷酸酯。

17. 根据权利要求 1 所述的组合物,其不含精氨酸,或基本不含精氨酸,其中所述组合物在 M_3 或 T_2 或 T_4 引起符合以下标准之一或两者的长期储存稳定性 :

(A) 堪比或优于在**商标®** Enbrel 下销售的市售依那西普的稳定性,其通过以下测量 :
(i) 在所述组合物 (如本说明书中所定义) 中的聚集体、单体和片段 3 的量的 SEC 分析,和
(ii) 对应 HIC 色谱图 (如本说明书所定义) 的峰 1、2 和 3 的所述组合物中材料的量的 HIC 分析 ;和

(B) 其中 (i) 峰 3 不存在或基本不存在和 (ii) 峰 2 代表多于约 95wt% 组合物的 HIC 色谱图 ;基本上没有对应于聚集体的峰的 SEC 色谱图 ;和其中所述单体含量代表至少约 95wt% 所述组合物的 SEC 色谱图。

使用木糖醇稳定的依那西普制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及用于依那西普的长期储存的使用木糖醇稳定的水性药物组合物,制造所述组合物的方法,其给药方法和含有其的试剂盒。本发明包括不需要精氨酸用于稳定的依那西普制剂。

背景技术

[0002] 多肽在其使用之前通常必须被储存。当被储存一段时期时,多肽在溶液中通常不稳定 (Manning 等人,1989,Pharm. Res. 6:903-918)。为延长其保质期,已经开发了另外的处理步骤,诸如干燥,如冷冻干燥。然而,冻干的药物组合物较不方便使用。

[0003] 为改善多肽稳定性的典型实践可通过改变所述制剂元素的浓度,或通过添加赋形剂以改性所述制剂来解决(参见,例如,美国专利第 5580856 和 6171586 号)。然而,添加剂的使用仍然可导致失活的多肽。另外,在冷冻干燥的情况下,再水化步骤可通过,例如,聚集或变性导致所述多肽的失活 (Hora 等人,1992, Pharm. Res., 9:33-36;Liu 等人,1991,Biotechnol. Bioeng, 37:177-184)。多肽的聚集是不期望的,因为其可导致免疫原性 (Cleland 等人,1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems, 10:307-377;和 Robbins 等人,1987, Diabetes, 36:838-845)。

[0004] 用以改善多肽稳定性的另一个途径是使用在特定浓度的 L- 精氨酸(美国专利第 7,648,702 号)。

[0005] 在使用前存储长达两年的一种多肽是依那西普 (Enbrel[®], Immunex 公司),其为由连接至人 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体融合多肽。其由 934 个氨基酸组成,并具有近 150 千道尔顿的表观分子量 (Physicians Desk Reference, 2002, MedicalEconomics 公司)。依那西普的 Fc 组分含有人 IgG1 的重链恒定结构域 2 (CH2), 重链恒定结构域 3 (CH3) 和铰链区,但无重链恒定结构域 1 (CH1)。Fc 结构域可含有一个或所有以上描述的结构域。依那西普通常通过在中国仓鼠卵巢 (CHO) 哺乳动物细胞表达系统中的重组 DNA 技术来生产。

[0006] 本发明提供允许其长期储存的依那西普新型稳定液体制剂。

发明内容

[0007] 本发明为一种稳定的水性药物组合物,其包含依那西普和用以抑制依那西普的不稳定性、错折叠、聚集和 / 或片段化的稳定剂,其中所述稳定剂包含木糖醇或木糖醇与葡甲胺的结合物。

[0008] 以下讨论中所用的各种技术术语在以下题为“定义”的部分被限定且贯穿本说明书的其余部分。

[0009] 任选且优选地不含精氨酸的本发明所述稳定的依那西普制剂引起以至少以下一点为特征的长期储存稳定性:(1) 在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 SEC 分析为:大于约 90% 的单体含量;小于约 3wt% 的聚集体含量;以及小于约 5wt% 的片段 3 含量;和 (2) 在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 HIC

分析,其中由 HIC 色谱图的峰 1 代表的组分的量小于约 3wt. % ;由 HIC 色谱图的峰 2 代表的组分的量为大于 80wt % ;以及由 HIC 色谱图的峰 3 表示的组分的量小于约 20wt %。

[0010] 在所述稳定制剂的优选方面,所述制剂引起以以下为特征的长期储存稳定性:在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 HIC 分析,其中由 HIC 色谱图的峰 2 代表的组分的量为大于或等于约 95wt % ;且其中,如果峰 3 存在于所述 HIC 色谱图,由峰 3 代表的组分的量小于或等于约 3wt %。

[0011] 如以上概括的稳定的依那西普制剂,任选地并优选地,不含精氨酸,或基本不含精氨酸。

[0012] 本发明所述制剂具有优异稳定性,如在 5℃ 下存储一、二或三个月后进行的 SEC(排阻色谱)和 HIC(疏水作用色谱)分析所测定。这些制剂堪比或优于其中精氨酸为必需组分的市售依那西普制剂。因此本发明还涉及如上归纳的稳定的依那西普制剂,其不含精氨酸或基本不含精氨酸,且其中所述组合物在 M_3 或 T_2 或 T_4 评价,引起满足以下标准之一或两者的长期储存稳定性:(A) 堪比或优于在商标® Enbrel 下销售的市售依那西普的稳定性,这通过 (i) 在所述组合物(如本说明书中所定义)中的聚集体、单体和片段 3 的量的 SEC 分析,和 (ii) 对应 HIC 色谱图(如本说明书所定义)的峰 1、2 和 3 的所述组合物中的材料的量的 HIC 分析来测量;和 (B) 其中 (i) 峰 3 不存在或基本不存在和 (ii) 峰 2 代表多于约 95wt % 组合物的 HIC 色谱图;基本上没有对应于聚集体的峰的 SEC 色谱图;和其中单体含量代表至少约 95wt % 所述组合物的 SEC 色谱图。

[0013] 在一个优选的方面,本发明的制剂包含约 25 至约 75mg/ml 的依那西普;用以抑制依那西普的不稳定性、聚集和/或片段化的稳定剂,其中所述稳定剂为含量组成所述组合物多至约 10wt % 的木糖醇,且其中所述组合物以在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 SEC 分析为特征:多于约 80wt % 的单体含量;少于约 3wt % 的聚集体含量;和少于约 6wt % 的片段 3 含量;且具有 6.0 至 6.6 的 pH。满足这些分析标准的制剂不需要精氨酸用于稳定。

[0014] 在一个优选的实施方案中,所述稳定的依那西普制剂进一步以以下为特征:(a) 在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 SEC 分析为大于约 90wt % 的单体含量;和小于约 3wt % 的聚集体含量;和 (b) 在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 HIC 分析,其中由 HIC 色谱图的峰 1 代表的组分的量小于约 4wt % ;由 HIC 色谱图峰 2 代表的组分的量为大于 80wt % ;以及由 HIC 色谱图的峰 3 代表的组分的量小于约 20wt %。满足这些分析标准的制剂不需要精氨酸用于稳定。

[0015] 本发明所述依那西普组合物进一步给予提供含有可接受水平的显微镜下才可见的颗粒的制剂的能力。因此,本发明还涉及稳定的依那西普制剂,其在 M_3 或 T_2 或 T_4 每 ml 平均具有不多于约 10000 个尺寸大于 5 μ m 的显微镜下才可见的颗粒。

[0016] 本发明所述的稳定的依那西普组合物进一步以以下为特征:(a) 在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 SEC 分析为大于约 90wt % 的单体含量;和小于约 3wt % 的聚集体含量;和 (b) 在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 HIC 分析,其中由 HIC 色谱图的峰 1 代表的组分的量小于约 3wt % ;由 HIC 色谱图峰 2 代表的组分的量为大于 80wt % ;以及由 HIC 色谱图的峰 3 代表的组分的量小于约 20wt % ,且其中所述制剂不含或基本不含精氨酸。

[0017] 所述制剂的稳定性可进一步以以下为特征:所述组合物,任选地不含或基本不含精氨酸,表现以下在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 HIC 分析,其中由 HIC 色谱图的峰 1 代表的组分的量小于约 1 % ;由 HIC 色谱图的峰 2 代表的组分的量为大于约 95wt % ;且由 HIC 色谱图的峰 3 代表的组分的量小于约 3wt %。

[0018] 优选地不含或基本不含精氨酸的本发明优选的稳定的组合物表现出以下在 M_3 或 T_2 或 T_4 的 HIC 分析, 其中由 HIC 色谱图的峰 1 代表的组分的量小于约 2%, 或优选地小于约 1%; 由 HIC 色谱图的峰 2 表示的组分的量大于约 95wt%, 优选大于约 97%; 且由 HIC 色谱图的峰 3 代表的组分的量小于约 1wt%, 优选 0 至 1%。满足这些分析要求的制剂不需要精氨酸。

[0019] 除木糖醇外, 所述稳定的依那西普制剂可含有其他任选的组分葡甲胺、蔗糖和氯化钠。因此, 本发明还涉及包含约 25 至 75mg/ml 的依那西普; 约 1-10wt% 木糖醇; 约 1 至 30mM 的磷酸钠; 任选地多至约 5wt% 的葡甲胺; 任选地多至约 5mM 的 NaCl; 和任选地多至约 5wt% 的蔗糖的组合物。

[0020] 不同于以含精氨酸的制剂形式提供的市售依那西普, 我们出乎意料的发现, 鉴于美国专利第 7648702 号, 本文所描述和示例的依那西普的制剂实施方案不需要精氨酸用于长期稳定, 尽管如果需要仍然可以加入精氨酸。提供不使用精氨酸稳定的依那西普制剂的能力, 通过提供患者和医疗提供者与需要精氨酸用以稳定的目前商业依那西普制剂 (即, **Enbrel®**) 相比较可在较低成本获得的依那西普替代制剂, 表现出对于医疗系统的潜在显著利益。

[0021] 如本文所用的术语“不稳定性”或类似术语表示依那西普单体在储存中进行各种不期望的转化的趋势。此种转化包括低聚物和高分子量聚集体 (下文术语“聚集体”) 的形成, 其中多个基本完整的依那西普单体通过各种非共价键吸引 (例如, 静电相互作用) 互相不可逆结合。在储存中不期望的转化还可包括所述依那西普单体降解成更小的片段和 / 或被断开的形式。理想地, 依那西普的制剂应尽可能最小化所述制剂在储存中导致依那西普的聚集体、错折叠蛋白、低聚物和 / 或片段形成的趋势。减少不需要的聚集体或片段形成的能力带来的重要利益为所述药物潜在毒性和 / 或免疫原性的减小。

[0022] 本发明所述的依那西普制剂, 其任选地且优选地不含或基本上不含精氨酸。所述术语“基本上不含精氨酸”意在指精氨酸, 即使存在, 也不有助于所述制剂中依那西普单体的稳定至如此程度以致本领域技术人员会判断其存在从稳定的角度而言是有利或必要的。

[0023] 这些和其它方面将从以下描述中变得明显, 尽管在不背离本公开内容的新概念的精神和范围 7 时的情况下可进行其中的变化和修饰 7。

[0024] 应当理解的是前述通用描述和以下具体描述仅为示例性和解释性的且并不限制要求保护的本发明。

[0025] 发明详述

[0026] 现详细描述本发明的各种实施方案。如说明书所用并贯穿权利要求, “一个 (a)”, “一个 (an)”, 和 “所述 (the)” 的含义包括复数引用, 除非上下文中清楚地另有指示。同样, 如说明书所用并贯穿权利要求, “在……之中 (in)” 的含义包括 “在……之中 (in)” 和 “在……之上 (on)”, 除非上下文清楚地另有指示。另外, 此说明书中所用的一些术语在以下更具体地定义。

[0027] 定义

[0028] 在此说明书中所用的术语通常在本发明的上下文之内, 以及使用各个术语的特定上下文中具有其领域内的普通含义。用来描述本发明的特定术语在下文或者在说明书的其它地方进行讨论, 以向从业者提供关于本发明的描述的另外指导。提供了特定术语的同义

词。一个或更多同义词的叙述不排除其它同义词的使用。在包括本文所讨论的任意术语的实例的此说明书中任何位置实例的使用仅为说明性的,而绝不限制本发明或任意示例性术语的范围和含义。本发明不限于在本说明书中给出的各种实施方案。

[0029] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语具有与此发明属于的领域的普通技术人员之一通常理解的相同的含义。在冲突的情况下,将以本文件,包括定义为准。

[0030] “左右 (around)”,“约 (about)”或“近似 (approximately)”一般意思是给定值或范围的 20% 以内,10% 以内,5,4,3,2 或 1% 以内。给定的数量是近似的,意味着所述术语“左右 (around)”,“约 (about)”或“近似 (approximately)”如果未明确陈述可进行推断。

[0031] 所述术语“依那西普”或“依那西普单体”或“单体”与 **Enbrel®** 同义。其指一种多肽,是由连接至人 IgG1 的 Fc 部分的人 75 千道尔顿 (p75) 的肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 的胞外配体结合部分组成的二聚融合多肽。其由 934 个氨基酸组成,并具有近 150 千道尔顿的表观分子量。出于本申请的目的,所述术语“依那西普”还包含具有没有显著影响依那西普的功能、效力、或亲合力的在氨基酸结构中的较小修改 (包括氨基酸的缺失,添加和 / 或取代) 的依那西普。所述术语“依那西普”包含的 **Enbrel®** 的所有形式和制剂,包括但不限于浓缩制剂,可注射的即用制剂;与水、醇、和 / 或其它成分重新组成的制剂,以及其它。

[0032] 所述术语“糖”指单糖、二糖和多糖。糖的实例包括但不限于蔗糖、海藻糖、右旋糖及其它。

[0033] 所述术语“葡甲胺”指具有化学式 $\text{H}_3\text{NHCH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$ 的化合物,以成为 1- 脱氧 -1- 甲胺基山梨醇;N- 甲基 -d- 葡萄糖胺;和 1- 脱氧 -1- 甲氨基 -D- 葡萄糖醇。

[0034] 所述术语“甘露糖基甘油酸酯”、“甘露糖基乳酸酯”、“甘露糖基羟基乙酸酯”和“二甘油磷酸酯”为领域内熟知的且具有其通常接受的含义。以下参考文献描述详细描述这些化合物:Faria 等人, Carbohydrate Res. 2008, 343 :3025-3033 ;Borges 等人, Extremophiles 2002, 6:209-216 ;Faria 等人, ChemBioChem 2003, 4:734-741 ;Sawangwan 等人, Biotechnol. J. 2010, 5:187-191 ;和 Pais 等人, J. Mol. Biol. 2009, 394:237-250。本申请通过引用并入这些参考文献中含义的这些化合物的描述。

[0035] 所述术语“多元醇”指含有多个羟基基团的醇。多元醇的实例包括但不限于甘露醇、山梨醇及其它。

[0036] 所述术语“长期储存”应理解为意味着所述药物组合物可储存三个月或更长,六个月或更长,以及优选地一年或更长。长期储存还应理解为意味着所述药物组合物作为液体在 2-8℃ 储存,或者例如在 -20℃ 或更低温冻结。还可想到所述组合物可被冻结和解冻多于一次。

[0037] 关于长期储存所述术语“稳定 (stable)”或“稳定的 (stabilized)”应理解为意味着所述药物组合物中含有的依那西普相对在储存开始所述组合物的活性,不损失其活性多于 20%,或更优选地 15%,或甚至更优选 10%,以及最优选 5%。

[0038] 所述术语“哺乳动物”包括但不限于人类。

[0039] 所述术语“药学上可接受的载体”指无毒的固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料、制剂辅助剂或任意常规类型的赋形剂。药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度下对受体无毒,且与所述制剂的其他成分相容。

[0040] 所述术语“组合物”指通常含有载体,诸如本领域内常规且适合进入受试者内给予

用于治疗、诊断或预防目的药学上可接受载体或赋形剂的混合物。其可包括细胞培养,其中所述多肽或多核苷酸存在于所述细胞内或所述培养基内。例如,用于口服给予的组合物可形成溶液剂、混悬剂、片剂、丸剂、胶囊剂、缓释制剂、口腔冲洗剂或粉末剂。

[0041] 所述术语“药物组合物”和“制剂”可交换使用。

[0042] 所述术语“治疗”指用于哺乳动物中疾病的治疗药的任意给予或应用,并包括抑制所述疾病、控制其发展、减轻所述疾病,例如通过引起消退,或恢复或修复损失、缺失或缺陷功能;或刺激低效率过程。所述术语包括获得期望的药学的和/或生理学的效果,覆盖哺乳动物中病理学病况或不适的任意治疗。所述效果,在完全或部分预防不适或其症状方面可为预防性的,和/或在部分或完全治疗不适和/或归因于所述不适的不良影响方面可为治疗性的。其包括:(1)在对所述不适有倾向但尚未有症状的受试者中预防所述不适发生或复发,(2)抑制所述不适诸如控制其发展,(3)停止或终止所述疾病或至少其相关症状,以使得所述宿主不在遭受所述不适或其症状,诸如引起所述不适或其病症的消退,例如,通过恢复或修复损失、缺失或缺陷功能,或刺激低效率过程,或者(4)减轻、缓和或改善所述不适或与其相关的症状,其中改善用于广义以指至少一个参数诸如炎症、疼痛和/或肿瘤尺寸量级的减小。

[0043] 所述术语“疾病”指需要医药介入或对于其医药介入是期望的任意病况、感染、不适或症状。这种医药介入可包括治疗、诊断和/或预防。

[0044] 所述术语“治疗上有效量”指当向活体受试者给予时在所述活体受试者上达到期望效果的量。例如,用于向活体受试者给予的治疗有效量的本发明所述多肽为预防和/或治疗整合素 $\alpha v \beta 3$ -介导疾病的量。该确切量将取决于所述治疗的目的,且由本领域技术人员使用已知技术将可确定。如本领域内已知,对系统相对局部递送、年龄、体重、总体健康、性别、饮食、给予时间、药物相互作用和所述病况的严重程度的调节是必须的,且由本领域技术人员使用常规实验可确定。

[0045] 所述术语“ T_1 ”指依那西普制剂已在 40°C 被储存约一周的时间点。

[0046] 所述术语“ T_2 ”指依那西普制剂已在 40°C 被储存约两周的时间点。

[0047] 所述术语“ T_4 ”指依那西普制剂已在 40°C 被储存约四周的时间点。

[0048] 所述术语“ M_3 ”总共指三个时间点,具体指对依那西普制剂在 5°C 的存储温度下在约一个、约两个或约三个月储存时间后观察到的分析结果。例如,本文对在 M_3 进行的分析的引用应理解为意味着这种分析在依那西普制剂已被储存选自约一个、约两个或约三个月的时间的时间点进行。因此,如果在对应至少一个以下储存持续时间:在 5°C 储存近似一个月、近似两个月或近似三个月的时间点观察到所需值,则满足本文的要求即在 M_3 依那西普制剂引起特定分析值或测量值。

[0049] 所述术语“峰 1”、“峰 2”和“峰 3”当在本文中结合 HIC 色谱结果的讨论结合使用时,指与在美国专利 7,294,481 中所讨论的相同的峰 1、2 和 3。

具体实施方式

[0050] 当含有依那西普 (Enbrel®),包括依那西普的水性和冻干制剂的药物组合物被长期储存时,依那西普的活性可能会因所述依那西普单体通过聚集和/或化学降解包括片段和低聚物形成的不稳定而丢失或减少。因此,本发明提供了允许依那西普稳定长期储存

的依那西普的水性制剂的几个实施方案,使得依那西普,不管以液体或冻结状态,在存储的过程中均是稳定的。所提供的制剂包括但不限于不含精氨酸且不需要任何额外步骤诸如再水化的制剂。

[0051] 以下更详细地解释这些实施方案。

[0052] 依那西普

[0053] 本发明的所有组合物均包含依那西普 (**Enbrel®**)。如本申请的背景部分所解释,依那西普为由连接至人 IgG1 的 Fc 部分的人 75 千道尔顿 (p75) 肿瘤坏死因子受体的胞外配体结合部分组成的二聚体融合多肽。依那西普由 934 个氨基酸组成。所述依那西普的 Fc 组分含有人 IgG1 的重链恒定结构域 2(CH2),重链恒定结构域 3(CH3) 和铰链区。Fc 结构域可含有一个或所有以上描述的结构域。

[0054] 在发明的本药物组合物中适于储存的依那西普可由表达依那西普的活体宿主细胞诸如抗体情况下的杂交瘤,或在融合多肽或抗体情况下经基因工程以产生多肽的的宿主细胞来生产。基因工程细胞方法以产生多肽为本领域熟知。参见例如,Ausubel 等人., eds. (1990), Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, 纽约)。这种方法包括将编码且允许所述多肽表达的核苷酸引入活体宿主细胞。这些宿主细胞可为细菌细胞、真菌细胞或优选地培养生长的动物细胞。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:HB101、DH5. alpha、GM2929、JM109、KW251、NM538、NM539 和任意不能裂解外来 DNA 的大肠杆菌菌株。可以使用的真菌宿主细胞包括但不限于酿酒酵母、毕赤酵母和曲霉菌属细胞。可以使用的动物细胞系的一些实例为 CHO、VERO、BHK、HeLa、Cos、MDCK、293、3T3 和 W138。新动物细胞系可使用本领域技术人员熟知的方法(例如,通过转化、病毒感染和/或选择)来建立。任选地,依那西普可由所述宿主细胞分泌至培养基。

[0055] 所表达的依那西普的纯化可通过任意标准方法进行。当细胞内产生依那西普时,该颗粒片段被移除例如通过离心或超滤。当依那西普被分泌入所述培养基时,这种表达系统的上清液可首先使用标准多肽浓缩过滤器进行浓缩。还可加入蛋白酶抑制剂来抑制蛋白水解,且可包括抗生素以预防微生物的生长。

[0056] 依那西普可使用例如羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析和亲和色谱、以及已知或有待发现的纯化技术,包括但不限于蛋白 A 色谱、离子交换柱分馏、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅色谱、肝素 **SEPHAROSE®** 色谱法、阴离子或阳离子交换树脂色谱(诸如聚天冬氨酸柱)、层析聚焦、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀的任意结合来纯化。

[0057] 使用木糖醇稳定的依那西普

[0058] 本发明提供包含依那西普和用以抑制依那西普片不稳定性、聚集、错折叠和/或段化的稳定剂的稳定水性药物组合物,其中所述稳定剂包含木糖醇或木糖醇与葡甲胺的组合。

[0059] 不希望囿于任意特殊理论,木糖醇被认为减少依那西普以不期望的三元或四元复合物形式缔合的趋势,且因此,减少依那西普的聚集。可假定地,木糖醇作为构象稳定剂,从而减少依那西普聚集的趋势。所述聚集的减少被认为持续长时间,例如两年或更多。木糖醇的稳定效果包括但不限于聚集的减少,还可涉及依那西普稳定的其它方面。

[0060] 包括木糖醇用于稳定的一种优选的稳定的依那西普制剂为其中由木糖醇和葡甲胺的结合物提供稳定的一种。

[0061] 本发明所述的药物组合物可通过将纯化的依那西普与木糖醇、或与葡甲胺连同木糖醇结合来制备。进一步,可按需加入缓冲剂、张度改性剂和另外的赋形剂和其它通常使用的非活性成分。简单起见,在本说明书中稍后将更全面地讨论这些。本领域普通技术人员将理解所述组合物中要包括的各种组分的结合可以以任意合适的顺序完成。例如,所述缓冲剂可最先、中间或最后加入,以及所述张度改性剂可最先、中间或最后加入。本领域普通技术人员还将理解这些化学品中的一些在某些组合中可不相容,并因此容易使用具有相似性质但在所述相关混合物中相容的不同化学品代替。

[0062] 本发明的木糖醇稳定的依那西普制剂可包含约 25 至 75mg/ml 的依那西普;约 1-10wt% 的木糖醇;约 1 至约 30mM 的磷酸钠;任选地多至约 5wt% 的葡甲胺;任选地约 5mM 的 NaCl;和任选地多至约 5wt% 的蔗糖,

[0063] 除木糖醇外,额外含有葡甲胺、氯化钠和蔗糖的木糖醇稳定的依那西普制剂可含有约 1-100mM 的 NaCl;约 1 至 5wt% 的蔗糖;且葡甲胺含量为所述组合物的约 1-5wt%。

[0064] 为替代葡甲胺,本发明可想到使用甘露糖基甘油酸酯、甘露糖基乳酸酯、甘露糖基羟基乙酸酯和二甘油磷酸酯。

[0065] 另一实施方案中,木糖醇稳定的依那西普制剂可包含约 25 至约 75mg/ml 的依那西普,用以抑制依那西普的不稳定性、聚集和 / 或片段化的稳定剂,其中所述稳定剂为组成所述组合物多至约 10wt% 的量的木糖醇,且其中所述组合物以以下为特征:约 80wt% 至约 95wt% 的单体含量的在 T_2 的 SEC 分析;少于约 4wt% 且优选少于 3wt% 的聚集体含量的在 T_2 的 SEC 分析;基少于约 8wt% 且优选少于 6wt% 的片段 3 含量的在 T_2 的 SEC 分析;其中所述组合物具有约 6.0 至约 7.0 的 pH,更优选约 6.0 至约 6.6 且最优选约 6.3 至约 6.5。

[0066] 在稳定的依那西普制剂诸如上述含有木糖醇或木糖醇连同葡甲胺的那些,所述制剂更优选地以以下为特征:

[0067] (a) 在 T_4 的 SEC 分析为大于约 90、91、92、93、94、95、96 或 97wt% 的单体含量;和少于约 3、2 或 1wt% 的聚集体含量;和

[0068] (b) 在 T_2 的 HIC 分析,其中由 HIC 色谱图的峰 1 代表的组分的量少于约 3、2 或 1wt%;由 HIC 色谱图的峰 2 代表的组分的量多于 80、81、82、83、84 或 85wt%;以及由 HIC 色谱图峰 3 代表的组分的量少于约 20、19、18、17、16、15、14、或 13wt%;和

[0069] (c) 在 T_4 的 HIC 分析,其中由 HIC 色谱图的峰 1 代表的组分的量少于约 3、2 或 1wt%;由 HIC 色谱图峰 2 代表的组分的量多于 80、81、82、83、84 或 85wt%;以及由 HIC 色谱图峰 3 代表的组分的量少于 20、19、18、17、16、15、14、或 13wt%。

[0070] 术语“SEC”、“ T_2 ”、“ T_4 ”“HIC”单体含量”“聚集体”和“片段 3”“峰 1”、“峰 2”和“峰 3”在以下实施例中定义。

[0071] 含有木糖醇或木糖醇连同葡甲胺的特别优选的制剂以具有以下在 T_4 或 T_2 的 HIC 分析为特征:其中由 HIC 色谱图的峰 1 代表的组分的量少于约 1%;由 HIC 色谱图的峰 2 代表的组分的量多于约 95wt%,优选多于约 99wt%;且由 HIC 色谱图的峰 3 代表的组分的量少于约 1wt%。具体的木糖醇稳定的制剂在详细的实施例中提供。

[0072] 尽管本发明不排除精氨酸的使用,根据本发明包含木糖醇用于稳定的依那西普制剂不需要精氨酸用于稳定,且因此优选地不含或基本不含精氨酸。

[0073] 所提供的药物组合物的其它组分

[0074] 本发明的制剂还可包括缓冲剂、张度改性剂、赋形剂、药学上可接受的载体和药物组合物通常使用的其它非活性成分。简单起见,在本说明书中稍后将更全面地讨论这些。

[0075] 缓冲剂保持 pH 在期望范围内。合适的缓冲剂包括组氨酸、磷酸钾、柠檬酸、马来酸钠或钾、醋酸铵、三-(羟甲基)氨基甲烷(tris)、各种形式的醋酸盐和二乙醇胺。所述制剂中所述缓冲剂的浓度优选地在约 1mM 至约 1M 之间,更优选约 10mM 至约 200mM 制剂。缓冲剂为本领域熟知的且通过已知方法制造以及可从商业供应商获得。

[0076] 适合的缓冲剂的实例为磷酸盐、组氨酸、柠檬酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、醋酸盐、三-(羟基)-氨基甲烷(tris)、碳酸氢盐。

[0077] 在一个优选的实施方案中,所述缓冲盐为磷酸钠。

[0078] 在一个优选的实施方案中,所述药物组合物的 pH 在或接近生理水平。因此,优选地,所提供的组合物的 pH 在约 5.8 至约 8.4 之间;甚至更优选,在约 6.2 和约 7.4 之间。本领域技术人员将理解所述 pH 可按需调节以最大化在某种制剂中依那西普的稳定性和溶解性。因此,pH 在生理范围之外 pH 但对于患者尚可容许的依那西普制剂,也在本发明所述的范围之外。

[0079] 张度改性剂为有助于溶液重量摩尔渗透压浓度的分子。药物组合物的重量摩尔渗透压浓度优选地被调节以最大化所述活性组分的稳定性和/或以最小化给药对患者的不适。通常优选的是药物组合物与血清等渗,即具有同样或相似的重摩尔渗透压浓度,其可通过张度改性剂的加入达成。

[0080] 在一个优选的实施方案中,所提供制剂的重量摩尔渗透压浓度从约 180 至约 420mOsm。然后,应当理解的是,按照具体情况要求,所述重量摩尔渗透压浓度可更高或更低。

[0081] 适用于修饰重量摩尔渗透压浓度的张度改性剂的实例包括但不限于氨基酸(不包括精氨酸)(例如半胱氨酸、组氨酸和甘氨酸)、盐(例如,氯化钠、氯化钾和柠檬酸钠)和/或糖类(例如,蔗糖、葡萄糖和甘露醇)、和/或糖类(例如,蔗糖、葡萄糖和甘露醇)。

[0082] 优选的张度改性剂为甘氨酸、丙氨酸、氯化钠、氯化钾和硫酸钠。

[0083] 在一个优选的实施方案中,所述制剂中所述张度改性剂的浓度优选地在约 1mM 至约 1M 之间,更优选地约 10mM 至约 200mM。张度改性剂为本领域熟知的且可通过已知方法制造和可从商业供应商获得。

[0084] 赋形剂,还被称为化学添加剂、共溶质或共溶剂,其当在溶液(以及在干燥或冻结形式)中时稳定所述多肽,也可被添加至药物组合物。赋形剂为本领域熟知且可通过已知方法制造和可从商业供应商获得。

[0085] 适合的赋形剂的实例包括但不限于糖/多醇诸如:蔗糖、乳糖、甘油、木糖醇、山梨醇、甘露醇、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,聚(乙烯基醇),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 和甘油)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:吐温®-80(聚山梨醇酯 80)、吐温®-20(聚山梨醇酯 20)、SDS、聚山梨醇酯、泊洛沙姆;以及各种赋形剂诸如:磷酸钾、醋酸钠、硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、三甲胺 N-氧化物、甜菜碱、金属离子(如锌、钙、和镁)、

CHAPS、单月桂酸酯、2-O-β-甘露糖甘油酯或上述的任意组合。

[0086] 优选的赋形剂为蔗糖、乳糖、甘油、木糖醇、山梨醇、甘露醇、麦芽糖、肌醇、海藻糖、葡萄糖、牛血清白蛋白 (BSA)、人血清白蛋白 (HSA)、重组白蛋白、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、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐、肌氨酸、SDS、聚山梨醇酯 20、聚山梨酯 80、泊洛沙姆 188、三甲胺 N-氧化物、甜菜碱、锌离子、钙离子、镁离子、CHAPS、蔗糖单月桂酸酯和 2-O-β-甘露糖甘油酯。

[0087] 本发明的制剂中一种或更多赋形剂的浓度优选地在约 0.001 至 5 重量百分数之间,更优选地约 0.1 至 2 重量百分数。

[0088] 治疗方法

[0089] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗哺乳动物的方法,其包括向哺乳动物给予治疗有效量的本发明所述的药物组合物,其中所述哺乳动物具有可使用依那西普有益地治疗的疾病或不适。

[0090] 在一个优选的实施方案中,所述依那西普源自与要用所述组合物治疗的相同种类的哺乳动物。

[0091] 在一个优选的实施方案中,所述哺乳动物为人类。

[0092] 可用所提供的组合物治疗的疾病或不适包括但不限于类风湿关节炎、银屑病性关节炎、强直性脊椎炎、韦格纳氏病(肉芽肿病)、克罗恩病(或炎症性肠疾病)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、丙型肝炎、子宫内膜异位、哮喘、恶病质、银屑病和特应性皮炎。可用本发明所述组合物治疗的其它疾病或不适包括在 W000/62790、W001/62272、美国专利申请第 2001/0021380 号和美国专利 7,648,702B2 中所描述的那些,其相关部分通过引用并入本文。

[0093] 所提供的药物组合物可通过系统注射,诸如静脉注射;或通过向相关位点的注射或施用,诸如当该位点暴露于手术时通过直接注射或直接施用至所述位点;或通过局部施用向需要治疗的受试者给药。

[0094] 在一个实施方案中,本发明提供治疗和/或预防风湿性关节炎的方法,包含向需要其的哺乳动物给予治疗上有效量的所提供的依那西普组合物之一。

[0095] 在所提供的组合物中所述治疗上有效量的依那西普将取决于要治疗的病况、所述病况的严重程度、先前的治疗、以及患者的临床历史和对所述治疗药剂的应答。适当剂量可根据主治医生的判断进行调节,从而将其一次或经一系列的给药给予患者。

[0096] 在一个实施方案中,每成人剂量的有效依那西普的量为约 1-500mg/m² 或约 1-200mg/m²,或约 1-40mg/m² 或约 5-25mg/m²。

[0097] 或者,也可给予固定剂量,其量可为 2-500mg/剂量,2-100mg/剂量或约 10-80mg/剂量。

[0098] 如果该剂量将每周给予多于一次,示例性的剂量范围与之前描述的剂量范围相同或更低,且优选地以 25-100mg/剂量的每剂量范围给予每周两次或更多次。

[0099] 在另一个实施方案中,用于注射给药的可接受剂量含有 80-100mg/剂量,或者含有 80mg 每剂量。

[0100] 该剂量可每周、每两周、或每几周(例如 2 至 8 周)给予。

[0101] 在一个实施方案中,依那西普以 25 至 75mg/ml 通过单次皮下 (SC) 注射给予。

[0102] 在一些实例中,患者病况的改善将通过每周一至三次持续至少三周给予多至约 100mg 剂量的所述药物组合物来获得。延续更长时期的治疗对引起期望程度的改善可为必要的。对于不能治愈的慢性病况该疗法可无限期继续。对于儿科患者 (年龄 4-17),合适的疗法可涉及每周一次或多次给予 0.4mg/kg 至 5mg/kg 剂量的依那西普。

[0103] 在另一个实施方案中,本发明的药物制剂可以以散装制剂制备,且照此,所述药物组合物的组分被调节至高于给药所需并在给药前适当地稀释。

[0104] 所述药物组合物可作为单一治疗剂或按需与另外的治疗结合给予。因此,在一个实施方案中,所提供的治疗和 / 或预防方法与给予治疗上有效量的另一活性剂结合使用。所述其它活性剂可在给予本发明所述药物组合物之前、期间或之后给予。另一活性剂可以提供组合物的一部分,或者,作为单独的制剂给药。

[0105] 所提供的药物组合物的给药可以以各种方式实现,包括肠胃外经口、口腔、舌下、鼻、直肠、腹膜内、皮内、透皮、皮下、静脉内、动脉内、心内、心室内、颅内、气管内、鞘内给予,肌肉注射,玻璃体内注射和局部应用。

[0106] 本发明所述的药物组合物尤其用于胃肠外给药,即皮下、肌肉、静脉内、腹膜内、脑脊髓内、关节内,滑膜内,玻璃体内,和 / 或鞘内。胃肠外给药可通过弹丸注射或持续输注。用于注射的药物组合物可以以单位剂量的形式存在,例如,在安瓿瓶中或在多剂量容器中,连同所添加的防腐剂。另外,已发展许多最新的药物递送方法,且本发明所述的药物组合物适合使用这些新方法给药,例如 **Inject-ease®**、**Genject®**、注射器笔诸如 **GenPen®** 和无针器械诸如 **MediJector®** 和 **BioJector®**。本药物组合物还可适合于尚待发现的给药方法。也参见 Langer, 1990, Science, 249:1527-1533。

[0107] 所提供的药物组合物还可制成贮库制剂。这种长效制剂可通过植入 (例如皮下或肌肉) 或通过肌肉注射给予。因此,例如,所述制剂可使用适合的聚合聚集或疏水材料 (例如作为溶于可接受的油的乳剂) 或离子交换树脂修饰,或成为难溶衍生物,例如作为难溶性盐。

[0108] 若吸引,所述药物组合物可存在于可含有一个或更多含有所述活性成分的单位剂量形式的小瓶、包装或分散器械中。在一个实施方案中,所述分散器械可包含具有单次剂量即用液体制剂的注射器。所述注射器可随附给药说明。

[0109] 在另一个实施方案中,本发明涉及试剂盒或容器,其含有本发明的水性药物组合物。在所述水性药物组合物中所述多肽的浓度可在一个宽的范围内变化,但通常在从约 0.05 至约 20000 微克每毫升 ($\mu\text{g/ml}$) 水性制剂的范围内。所述试剂盒还可随附使用说明。

[0110] 本发明更特别地描述于以下实施例,其仅意在说明,因为其中许多改进和变化对本领域技术人员将是明显的。

[0111] 实施例

[0112] 使用木糖醇稳定的依那西普

[0113] 优选不含精氨酸,使用木糖醇稳定的依那西普制剂可使用以下概括描述的程序进行制备和测试。

[0114] 称量各个固体制剂组分至给定体积的制剂缓冲剂所需的量。这些组分被合并入能

够装载和测量所述给定体积的制剂缓冲剂的烧杯或容器。相当于近似 3/4 所述目的给定制剂缓冲剂的近似 3/4 体积的去离子水被加入所述烧杯,随后将所述组分溶解。所述缓冲剂的 pH 被使用 1M 氢氧化钠或 1M 盐酸调节至目的制剂的 pH。然后通过加入去离子水使最终的制剂缓冲剂体积上升至所述目的体积。依那西普蛋白质溶液放置于透析材料袋(诸如 Thermo Scientific Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit10,000MWC0)中,其随后与所需的制剂缓冲剂在 4℃ 接触放置 12 小时。制剂缓冲体积与蛋白溶液体积的比应不小于 1000:1。所述透析袋和其含有的蛋白溶液随后在第二份个同样体积的制剂缓冲剂中在 4℃ 放置另外 12 小时。将所得到的蛋白溶液从所述透析材料外罩袋中移出,且所述蛋白的浓度使用紫外线光谱测定。使用离心(诸如 Amicon Ultra 10,000MWC0 离心浓缩机)和/或用制剂缓冲剂稀释将蛋白浓度调节至期望水平。

[0115] 可通过排阻色谱 (SEC)、变性 SEC (dSEC)、疏水作用色谱 (HIC)、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对所述组合物测试长期稳定性,以及在不同时间点的结合和生物活性。所述生物活性可通过任意数量的熟知试验测量。

[0116] 例如,排阻色谱技术描述于 Hawe 等人, Pharm. Res. 2011, 28:2302 和/或 van Marrschalkerweerd 等人, Eur. J. Pharm. Biopharm. 2011, 78:213。相似地,变性排阻色谱、疏水作用色谱和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对于本领域普通技术人员也是熟知的。

[0117] 所述组合物被认为在两年或更长的时期将是稳定的。以下示例的组合物不含有精氨酸。

[0118] (制剂 1:17)

[0119]

成分	浓度
依那西普(活性成分)	50mg/ml
磷酸钠, pH6.3(非活性)	25mM
木糖醇(非活性)	10% (w/v)

[0120] (制剂 2:10)

[0121]

成分	浓度
依那西普(活性成分)	50mg/ml
磷酸钠, pH6.31(非活性)	25mM
木糖醇(非活性)	6% (w/v)

[0122] (制剂 2:11)

[0123]

成分	浓度
依那西普（活性成分）	50mg/ml
磷酸钠, pH6.3（非活性）	25mM
葡萄糖（非活性）	2.5%（w/v）
蔗糖（非活性成分）	5%（w/v）

[0124] （制剂 2:18）

[0125]

成分	浓度
依那西普（活性成分）	50mg/ml
磷酸钠, pH6.4（非活性）	25mM
木糖醇（非活性）	2.5%（w/v）
葡甲胺（非活性）	2.5%（w/v）

[0126] （制剂 2:19）

[0127]

成分	浓度
依那西普（活性成分）	50mg/ml
磷酸钠, pH6.24（非活性）	10mM
木糖醇（非活性）	2.5%（w/v）
葡甲胺（非活性）	2.5%（w/v）
NaCl（非活性）	2.5%（w/v）
蔗糖（非活性）	1%（w/v）

[0128] 实施例 2

[0129] 依那西普的制备

[0130] 步骤 1:细胞扩增。在本领域内已知的方式中,使用表达依那西普融合蛋白的 CHO 细胞克隆进行对生成对于生产生物反应器的接种足够的有效数目的细胞必需的细胞扩增。此表达过程的产物（所收获的细胞培养液）是正确折叠的依那西普以及不正确折叠和 / 或聚集的依那西普连同另外的杂质的混合物。将包含这种蛋白混合物的所收获的细胞培养液进行洗涤剂病毒灭活。

[0131] 步骤 2:亲和色谱。对于在以上步骤 1 中所收获的细胞培养液以熟知的方式使用常规蛋白 A 亲和柱进行亲和色谱。产物回收率为近似 85%。所获得的产物为包含正确折叠依那西普、不正确折叠依那西普和 / 或正确和 / 或不正确折叠依那西普的聚集体、或蛋白片段的复合蛋白混合物。从此蛋白 A 亲和柱纯化步骤获得的产物被调节至 pH3.5 然后进行病毒灭活步骤。病毒灭活后将该产物调节至 pH5.5 并以已知方式使用商业获得的囊式过滤器的进一步净化。

[0132] 步骤 3A。混合模式阳离子交换色谱。使用 31.8L (45cm 直径 × 20cm 床高度) 的填充床 GE Healthcare Capto MMC 色谱柱来纯化在上述步骤 2 中获得的产物。在使用前,所述柱子使用 2CV pH5.5 的 25mM 醋酸盐平衡且用 2CV 的 0.1N NaOH、1M NaCl 消毒,并用 2CV pH5.5 的 25mM 醋酸盐、0.7M NaCl 中和。然后使用 8-10CV pH5.5 的 25mM 醋酸盐平衡所述柱子直到流出物为 pH5.5 且 3.5mS/cm。将来自以上步骤 2 的蛋白 A 集液 (pool) 使用 WFI 稀释至 ≤ 6mS/cm 并施加至每个循环多至 15g/L 媒介的柱负载。所述柱子在 200cm/h 的线性速度下操作以给出 6 分钟滞留时间。装载后,所述柱子使用 2CV pH5.5 的 25mM 醋酸盐洗涤。随后用 8.5CV, 15% 至 85% 梯度的 25mM pH5.5 的醋酸盐至 25mM 醋酸盐, 0.7M NaCl, pH5.5 洗脱产物。产物收集始于 0.150D (A280, 1.0cm 路径长度) 且收集止于 50% 最大峰值。洗脱液体积为近似 5CV。使用 2CV pH8.0 的 10mM 的 Tris、1M NaCl 从所述柱子脱除剩余的产物和污染物并丢弃。从该混合模式柱子获得的产物使用 Millipore Opticap XL10, 0.22 μm Durapore 囊式过滤器 (0.69m²) 进行过滤。从此步骤获得的产物表现出约 70% 的在步骤 2 中获得的蛋白 A 材料的回收率。

[0133] 步骤 3B。混合模式阴离子交换色谱。使用 27.0L (45cm 直径 × 17cm 床高度) 的填充床 GE Healthcare Capto Adhere 色谱柱以进一步纯化在以上步骤 3A 中获得的产物。使用前,使用 2CV pH8.0 的 25mM Tris 平衡所述柱子,以及使用 2CV 的 0.1N NaOH、1M NaCl 消毒并使用 2CV pH8.0 的 25mM Tris 中和和平衡。产物装载前,使用 3CV pH8.0 的 10mM Tris 平衡所述柱子。来自以上步骤 3A 的 Capto MMC 集液使用每 Kg 集液 ~ 0.045kg 的 1M Tris (pH8.3) 调节至 pH8.1。将来自以上步骤 3A 中的产物使用 WFI 进行连续 1:3.8 稀释以调节导电率至 12.0mS/cm 和 pH8.0。随后将所获得的材料施加至多至 15g/L 媒介的柱负载。所述柱子在 170cm/h 的线性速度下操作以给出 6 分钟的滞留时间。装载后,使用 2CV pH8.0 的 25mM Tris 洗涤该柱子。随后用 10CV 梯度 (20% 至 90%) 的 25mM Tris, pH8.0 至 10mM Tris, 1M NaCl, pH8.0 洗脱产物。产物收集始于 0.150D (A280, 1.0cm 路径长度) 并且收集止于 25% 最大峰值。洗脱液体积为 4-6CV。所洗脱的产物使用商业可获得的囊式过滤器过滤,随后以已知方式进行病毒灭活和切向流过滤步骤。从步骤 3B (包括最终病毒和切向流过滤步骤) 的总产物回收率为近似 68%。在过滤步骤前测量的产物回收率为约 75%。在来自此步骤的洗脱片段上获得的 HIC 数据的图示示于图 12。

[0134] 分析:在此实施例中获得的最终过滤产物被发现具有由 HIC 测定的大于约 90wt% 正确折叠依那西普;由 HIC 测定的少于 5wt% 不正确折叠的依那西普形式;由 HIC 分析测定的少于约 3wt% 的断开物质 (被认为是依那西普片段,其中 TNFR 部分被截短),以及由排阻色谱测定的多于 95wt% 正确和不正确折叠依那西普的合并量。

[0135] 依那西普制剂分析

[0136] A. 热稳定性储存

[0137] 透析和浓缩后,将以上示例的依那西普制剂样品在生物安全柜中无菌过滤。使用无菌的移液管和高压蒸汽处理的移液管尖头,将依那西普制剂样品转移至预先标签的且高压蒸汽处理的 1mL 冻干小瓶。小瓶使用无菌的丁基塞塞住并用铝帽夹住。然后所有小瓶被转移至热稳定性烤箱。样品经受两种热稳定性方案:(1) 在 40℃ 下两周,和 (2) 在 25℃ 四周。贯穿此说明书,这两个温度方案分别表示为“T₂”和“T₄”。

[0138] B. 排阻色谱 (SEC)

[0139] 本文所公开的依那西普制剂使用排阻色谱 (SEC) 熟知技术进行,其中分析物按照尺寸分离的高性能液相色谱方法进行分析(参见 Rogner, M. (2000). *Size Exclusion Chromatography. Protein Liquid Chromatography*. M. Kastner. Amsterdam, Elsevier. 61:89-145)。为了评价以上描述的依那西普样品的热稳定性,通过基于文献 (van Maarschalkerweerd, A., G. J. Wolbink, 等人 (2011) "Comparison of analytical methods to detect instability of etanercept during thermal stress testing." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78(2):213-221.) 的 SEC 方法检查所述样品。所述流动相缓冲剂被制备为含有 50mM 磷酸钠单碱一水合物和 150mM 精氨酸。使用 1M HCl 调节 pH 至 6.5。所有分离均使用成线性连接至 Tosoh TSK-Gel G4000SW×17.8mm×30cm (cat. no. 8542) 的 Tosoh TSK-Gel SW×16mm×4cm 保护柱 (cat. no. 8543) 进行。为进行分离,使所述柱子至室温 (23℃) 并使用流动相在 0.5mL/min 的流速下平衡。使用自动进样针将 5 微升的 50mg/mL 依那西普制剂注射至所述柱子。该分离在 0.5mL/分钟的流速下经 30 分钟完成。在此期间 280nm 波长下检测柱洗脱液。

[0140] C. 排阻色谱色谱图的整合

[0141] 所有整合使用 Chromeleon software (Dionex) 进行。整合之前,不含依那西普的缓冲剂的 SEC 色谱图被从所有色谱图中减去。所有整合在 12 分钟和 26 分钟的保留时间之间进行。使用七个参数定义峰。检测峰的最小面积被设置为 0.05mAu*min。峰检测的二维敏感度被设置为 0.01mAu 和 75 秒。使用手动整合工具手动地添加峰肩。所有被检测峰以两个步骤手动调节。第一,调节峰基线(该峰的底边界)至水平线。第二,调节所述峰基线的垂直位置至色谱图基线的垂直位置。所述色谱图基线至被定义为不存在分析物的信号。不存在分析物的信号被定义为在 12 分钟保留时间 mAu 中的吸光度。

[0142] D. 依那西普制剂的 SEC 级分

[0143] 在以上描述的依那西普制剂的 SEC 分析中,鉴定并研究了三个 SEC 色谱图部分。按照从所述 SEC 柱子洗脱的顺序被分析的部分为:(1) 代表似乎通过完整依那西普分子之间的非共价静电吸引装配的完整依那西普 TNFR:Fc 融合蛋白的聚集体(下文的“聚集体”或聚集体含量)的高分子量部分;(2) 代表完整的依那西普 TNFR:Fc 融合蛋白(下文指“单体”或“单体含量”)的单体部分;(3) 似乎代表依那西普分子一个片段或众多片段的部分,其中 TNFR:分子融合蛋白已经从单体裂解;所述融合蛋白在该分子的铰链区除丢失 Fab 部分的臂。最常见的片段或被断开的形式,其通过 SEC 测量,被称为片段 3。在进行 SEC 分析中,将观察到聚集体先洗脱,随后是单体,随后是片段 3。

[0144] 以下表格显示由如上描述的 SEC 分析测定的聚集体、单体和片段 3 的相对量。

[0145] 表 1

[0146] 单体的 SEC 分析

[0147] 注意：表 I、II 和 III 所报道的量为重量百分比

[0148] T_0 = 制剂保持 5°C 并在生成 24 小时内分析。

[0149] T_1 = 制剂在 40°C 储存一周。

[0150] T_2 = 制剂在 40°C 储存两周。

[0151]

制剂编号	t_0	t_1	t_2
市售 Enbrel (对比) [1:2]	98.81	92.58	87.64
1:17	98.02	93.90	87.53
2:10	98.09	--	87.56
2:11	98.10	--	88.03
2:18	98.10	--	89.19
2:19	98.19	--	89.63

[0152]

[0153] 表 II

[0154] 聚集体的 SEC 分析

[0155]

制剂编号	t_0	t_1	t_2
市售 Enbrel (对比)	0.09	0.59	1.02
1:17	0.31	0.70	2.17
2:10	0.29	--	2.57
2:11	0.31	--	1.68
2:18	0.29	--	1.53
2:19	0.26	--	1.24

[0156] 表 III

[0157] 片段 3 的分析

[0158]

[0159]

制剂编号	t_0	t_1	t_2
商业 Enbrel (对比)	0.00	3.30	6.29
1:17	0.00	2.33	4.10
2:10	0.00	--	5.10
2:11	0.00	--	5.68
2:18	0.00		4.24
2:19	0.00		4.34

[0160] 依那西普制剂的 HIC 分析

[0161] HIC 色谱可以以领域内已知并大体如美国专利 7, 294, 481 中所描述的方式执行，其通过引用的方式并入本文。样品在 t_0 (在 5°C 制备 24 小时内) 进行评价并在 25°C 储存两

周 (t_2) 后或在 25℃ 储存四周 (t_4) 后再次评价。在本发明的制剂的 HIC 色谱图中, HIC 色谱图的峰 1 被认为是或包括上文 SEC 数据讨论中所称的“片段 3”, 其使用 SEC 鉴定和定量; 峰 2 为上文 SEC 数据讨论中所称的依那西普单体; 峰 3 包括上文 SEC 数据讨论中所称的“聚集体”。应当进一步理解的是, 在此所用的术语“峰 1”、“峰 2”和“峰 3”也构成对通过引用的方式被并入本文的美国专利 7, 294, 481 的图 4 中公开和提及 HIC 峰 1、峰 2 和峰 3 的引用。

[0162] 本发明的其它实施方案从说明书考虑和本文公开的本发明的实践对本领域技术人员将是明显的。说明书和实施例应被认为仅为例示而本发明的真正范围和精神为权利要求所指出。