



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106535918 B

(45) 授权公告日 2021.01.01

(21) 申请号 201580039834.6

(73) 专利权人 改革生物制药有限公司

(22) 申请日 2015.06.22

地址 美国马萨诸塞州

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 D·S·索恩 P·伍思里奇

申请公布号 CN 106535918 A

R·C·波蒂利亚 R·P·马奥尼
M·穆迪

(43) 申请公布日 2017.03.22

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

(30) 优先权数据

代理人 郭名悦 屈小春

62/014,784 2014.06.20 US

(51) Int.CI.

62/083,623 2014.11.24 US

A61K 38/00 (2006.01)

62/136,763 2015.03.23 US

A61K 47/18 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 47/12 (2006.01)

2017.01.22

A61K 47/60 (2017.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

审查员 王李娜

PCT/US2015/036899 2015.06.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/196187 EN 2015.12.23

权利要求书1页 说明书30页

(54) 发明名称

用于蛋白质制剂的降粘赋形剂化合物

(57) 摘要

本发明包括允许递送浓缩的蛋白质溶液的制剂及其生产方法。与传统蛋白质溶液相比，本发明的方法可产生较低粘度液体制剂或在所述液体制剂中的较高浓度的治疗性或非治疗性蛋白质。

1. 一种液体制剂, 其包含治疗性蛋白质和降粘的量的咖啡因, 其中 (i) 所述制剂的粘度比对照制剂的粘度小至少30% 并且小于100cP, (ii) 所述制剂含有至少100mg/mL的所述蛋白质, 并且 (iii) 所述咖啡因的降粘的量为22mg/ml或更少;

其中所述对照制剂不包含咖啡因, 但以干重计在其它方面与所述液体制剂相同。

2. 根据权利要求1所述的液体制剂, 其中所述蛋白质为抗体。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的制剂, 其中所述制剂含有至少200mg/mL的所述蛋白质。

4. 根据权利要求1至2中任一项所述的制剂, 其中所述制剂含有至少300mg/mL的所述蛋白质。

5. 根据权利要求1至2中任一项所述的液体制剂, 其中咖啡因与进一步降低所述制剂的粘度的第二赋形剂化合物组合。

6. 根据权利要求5所述的制剂, 其中所述第二赋形剂化合物选自由以下组成的组: 茶碱、酪胺、普鲁卡因、利多卡因、咪唑、阿斯巴甜、糖精、乙酰氨基磺酸钾、烟酰胺和异烟酰胺。

7. 根据权利要求1至2中任一项所述的制剂, 其还包含选自由以下组成的组的添加剂:防腐剂、表面活性剂、糖、精氨酸、脯氨酸、透明质酸酶、稳定剂和缓冲剂。

8. 根据权利要求7所述的制剂, 其中所述糖是多糖。

9. 根据权利要求1所述的制剂, 其中所述咖啡因的降粘的量为15mg/ml或更少。

10. 液体制剂在制备用于治疗哺乳动物中的疾病或病症的药物中的用途, 其中所述液体治疗性制剂选自权利要求1-9中所述液体制剂中的任一种。

11. 根据权利要求10所述的用途, 其中所述药物通过皮下注射、肌内注射或静脉内注射施用。

用于蛋白质制剂的降粘赋形剂化合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2014年6月20日提交的美国临时申请序列号62/014,784、2014年11月24日提交的美国临时申请号62/083,623和2015年3月23日提交的美国临时申请序列号62/136,763的权益。每个以上申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0003] 应用领域

[0004] 本申请整体涉及用于递送生物聚合物的制剂。

[0005] 背景

[0006] 生物聚合物可用于治疗性或非治疗性目的。基于生物聚合物的治疗剂(诸如抗体或酶制剂)广泛用于治疗疾病中。非治疗性生物聚合物(诸如酶、肽和结构蛋白)在非治疗性应用(诸如家庭、营养、商业和工业用途)方面具有效用。

[0007] 用于治疗性应用中的生物聚合物必须配制成为允许它们引入体内以用于治疗疾病。例如,有利的是在某些情况下通过皮下(SC)或肌内(IM)途径递送抗体和蛋白质/肽生物聚合物制剂,而不是通过静脉内(IV)注射施用这些制剂。虽然为了使用SC或IM注射来实现较好的患者依从性和舒适性,注射器中的液体体积通常限于2至3cc,并且制剂的粘度通常低于约20厘泊(cP),以便制剂可使用常规医疗装置和小口径针头来递送。但是这些递送参数并不总是非常符合所递送的制剂的剂量要求。

[0008] 例如,抗体可能需要以高剂量水平递送以发挥其预期的治疗效果。使用受限的液体体积来递送高剂量水平的抗体制剂可能需要递送媒介物中的抗体浓度较高,有时超过150mg/mL的水平。在此剂量水平下,蛋白质溶液的粘度-对-浓度曲线超出其线性-非线性过渡时期,使得制剂的粘度随着浓度增加而显著上升。然而,增加的粘度与标准SC或IM递送系统是不相容的。基于生物聚合物的治疗剂的溶液也易于出现稳定性问题,诸如沉淀、浑浊(hazing)、乳光、变性和凝胶形成即可逆或不可逆的聚集。稳定性问题限制了溶液的保质期或者需要特殊处理。

[0009] 一种生产用于注射的蛋白质制剂的方法是将治疗性蛋白质溶液转化成可被重构以形成适于SC或IM递送的悬浮液的粉末。冻干是生产蛋白质粉末的标准技术。冷冻干燥、喷雾干燥以及甚至沉淀、随后进行的超临界流体萃取已经用来产生用于后续重构的蛋白质粉末。粉末状悬浮液在再溶解之前的粘度低(与相同总剂量下的溶液相比),并且因此可适于SC或IM注射,前提条件是颗粒足够小以适合通过针头。然而,存在于粉末中的蛋白质晶体具有触发免疫应答的固有风险。再溶解之后的不确定的蛋白质稳定性/活性引起另外的顾虑。本领域仍需要生产用于治疗性目的的低粘度蛋白质制剂同时避免由蛋白质粉末悬浮液引入的限制的技术。

[0010] 除了上述蛋白质的治疗性应用之外,生物聚合物(诸如酶、肽和结构蛋白)可用于非治疗性应用。这些非治疗性生物聚合物可由许多不同的途径产生,例如来源于植物来源、动物来源或由细胞培养物产生。

[0011] 非治疗性蛋白质可作为颗粒或粉末材料或作为溶液或分散体(通常于水中)来生产、运输、储存和处理。用于非治疗性应用的生物聚合物可为球状或纤维状蛋白质,并且这

些材料的某些形式可具有有限的水中溶解度或在溶解后表现出高粘度。这些溶液特性可对非治疗性材料的配制、处理、储存、泵送和性能提出挑战,因此需要降低粘度并改善非治疗性蛋白质溶液的溶解度和稳定性的方法。

[0012] 蛋白质是复杂的生物聚合物,各自具有独特折叠的3-D结构和表面能图(疏水区/亲水性区和电荷)。在浓缩的蛋白质溶液中,这些大分子可强烈地相互作用并且甚至以复杂的方式进行闭锁,这取决于它们的确切形状和表面能分布。强烈的特异性相互作用的“热点(Hot-spots)”致使蛋白质群集,从而增加了溶液粘度。为了解决这些顾虑,许多赋形剂化合物用于生物治疗性制剂中,旨在通过阻止局部相互作用和群集来降低溶液粘度。这些尝试是分别调整的、常常以经验为主、有时通过计算机模拟来指导。可提供赋形剂化合物的组合,但是再次优化所述组合必须以经验为主地并基于具体情况而进行。

[0013] 本领域仍需要用于在非线性条件下降低给定浓度的蛋白质制剂的粘度的真正普遍的方法。本领域另外需要在保存蛋白质的活性的同时实现所述降粘。还期望使降粘系统适应于与具有可调的和持续的释放曲线的制剂一起使用,并且适应于与适于贮库注射的制剂一起使用。

[0014] 发明概述

[0015] 在实施方案中,本文公开了包含蛋白质和赋形剂化合物的液体制剂,所述赋形剂化合物选自由以下组成的组:受阻胺、阴离子芳族化合物、官能化氨基酸、寡肽、短链有机酸和低分子量脂族多元酸,其中所述赋形剂化合物以降粘的量添加。在实施方案中,所述蛋白质为聚乙二醇化蛋白质,并且所述赋形剂为低分子量脂族多元酸。在实施方案中,所述制剂为药物组合物,并且治疗性制剂包含治疗性蛋白质,其中所述赋形剂化合物为药学上可接受的赋形剂化合物。在实施方案中,所述制剂为非治疗性制剂,并且所述非治疗性制剂包含非治疗性蛋白质。在实施方案中,所述降粘的量将所述制剂的粘度降低至比对照制剂的粘度小的粘度。在实施方案中,制剂的粘度比对照制剂的粘度小至少约10%,或者比对照制剂的粘度小至少约30%,或者比对照制剂的粘度小至少约50%,或者比对照制剂的粘度小至少约70%,或者比对照制剂的粘度小至少约90%。在实施方案中,粘度小于约100cP,或者小于约50cP,或者小于约20cP,或者小于约10cP。在实施方案中,赋形剂化合物的分子量<5000Da,或<1500Da或<500Da。在实施方案中,制剂含有至少约25mg/mL的蛋白质,或至少约100mg/mL的蛋白质,或至少约200mg/mL的蛋白质,或至少约300mg/mL的蛋白质。在实施方案中,制剂包含介于约5mg/mL至约300mg/mL之间的赋形剂化合物,或者包含介于约10mg/mL至约200mg/mL之间的赋形剂化合物,或者包含介于约20mg/mL至约100mg/mL之间,或者包含介于约25mg/mL至约75mg/mL之间的赋形剂化合物。在实施方案中,当与对照制剂相比时,所述制剂具有改善的稳定性。在实施方案中,赋形剂化合物为受阻胺。在实施方案中,受阻胺选自由以下组成的组:咖啡因、茶碱、酪胺、普鲁卡因、利多卡因、咪唑、阿斯巴甜、糖精和乙酰氨基磺酸钾。在实施方案中,受阻胺为咖啡因。在实施方案中,受阻胺为可注射性局部麻醉化合物。所述受阻胺可具有独立的药理学特性,并且所述受阻胺可以具有独立的药理学作用的量存在于所述制剂中。在实施方案中,所述受阻胺可以比治疗有效量小的量存在于所述制剂中。所述独立的药理学活性可为局部麻醉活性。在实施方案中,具有具有独立药理学活性的所述受阻胺与进一步降低所述制剂的粘度的第二赋形剂化合物组合。所述第二赋形剂化合物可选自由以下组成的组:咖啡因、茶碱、酪胺、普鲁卡因、利多卡因、咪唑、阿斯巴

甜、糖精和乙酰氨基磺酸钾。在实施方案中,所述制剂可包含选自由以下组成的组的添加剂:防腐剂、表面活性剂、糖、多糖、精氨酸、脯氨酸、透明质酸酶、稳定剂和缓冲剂。

[0016] 本文还公开了治疗哺乳动物中的疾病或病症的方法,所述方法包括:向所述哺乳动物施用液体治疗性制剂,其中所述治疗性制剂包含治疗有效量的治疗性蛋白质,并且其中所述制剂还包含选自由以下组成的组的药学上可接受的赋形剂化合物:受阻胺、阴离子芳族化合物、官能化氨基酸、寡肽、短链有机酸和低分子量脂族多元酸;并且其中所述治疗性制剂对于治疗所述疾病或所述病症是有效的。在实施方案中,所述治疗性蛋白质为聚乙二醇化蛋白质,并且所述赋形剂化合物为低分子量脂族多元酸。在实施方案中,赋形剂为受阻胺。在实施方案中,受阻胺为局部麻醉化合物。在实施方案中,所述制剂通过皮下注射或肌内注射或静脉内注射来施用。在实施方案中,所述赋形剂化合物以降粘的量存在于所述治疗性制剂中,并且所述降粘的量将所述治疗性制剂的粘度降低至比对照制剂的粘度小的粘度。在实施方案中,当与对照制剂相比时,所述治疗性制剂具有改善的稳定性。在实施方案中,赋形剂化合物为基本上纯的。

[0017] 本文还公开了在有需要的哺乳动物中减少治疗性蛋白质的注射部位处的疼痛的方法,所述方法包括:通过注射施用液体治疗性制剂,其中所述治疗性制剂包含治疗有效量的治疗性蛋白质,其中所述制剂还包含选自由可注射性局部麻醉化合物组成的组的药学上可接受的赋形剂化合物,其中所述药学上可接受的赋形剂化合物以降粘的量添加到所述制剂;并且其中与施用对照治疗性制剂的情况相比,所述哺乳动物在施用包含所述赋形剂化合物的所述治疗性制剂的情况下经历更少的疼痛,其中所述对照治疗性制剂不含所述赋形剂化合物,并且在其他方面与所述治疗性制剂是相同的。

[0018] 在实施方案中,本文公开了改善液体蛋白质制剂的稳定性的方法,所述方法包括:制备包含治疗性蛋白质和赋形剂化合物的液体蛋白质制剂,所述赋形剂化合物选自由以下组成的组:受阻胺、阴离子芳族化合物、官能化氨基酸、寡肽和短链有机酸和低分子量脂族多元酸,其中与对照液体蛋白质制剂相比,所述液体蛋白质制剂展示出改善的稳定性,其中所述对照液体蛋白质制剂不含有所述赋形剂化合物,并且在其他方面与所述液体蛋白质制剂是相同的。所述液体制剂的稳定性可为冷藏条件稳定性、室温稳定性或高温稳定性。

[0019] 在实施方案中,本文还公开了包含蛋白质和赋形剂化合物的液体制剂,所述赋形剂化合物选自由以下组成的组:受阻胺、阴离子芳族化合物、官能化氨基酸、寡肽、短链有机酸和低分子量脂族多元酸,其中所述赋形剂化合物在所述制剂中的存在使得如由蛋白质扩散相互作用参数kD或第二位力系数B22所测量的蛋白质-蛋白质相互作用特征改善。在实施方案中,所述制剂为治疗性制剂,并且包含治疗性蛋白质。在实施方案中,所述制剂为非治疗性制剂,并且包含非治疗性蛋白质。

[0020] 在实施方案中,本文还公开了改善蛋白质相关过程的方法,所述方法包括:提供以上描述的液体制剂,以及将所述液体制剂用于处理方法中。在实施方案中,所述处理方法包括:过滤、泵送、混合、离心、膜分离、冻干或色谱。

[0021] 详述

[0022] 本文公开了允许递送浓缩的蛋白质溶液的制剂及其生产的方法。在实施方案中,与传统蛋白质溶液相比,本文公开的方法可产生较低粘度的液体制剂或在所述液体制剂中的较高浓度的治疗性或非治疗性蛋白质。在实施方案中,当与传统蛋白质溶液相比时,本文

公开的方法可产生具有改善的稳定性的液体制剂。稳定的制剂是其中所含的蛋白质在储存条件(无论是冷藏条件、室温条件还是高温储存条件)下储存时基本上保持其物理和化学稳定性以及其治疗或非治疗功效的制剂。有利地,稳定的制剂还可提供防止其中溶解的蛋白质聚集或沉淀的保护。例如,冷藏条件可能需要在冰箱或冷冻库中的储存。在一些实例中,冷藏条件可能需要在10°C或更低的温度下的常规冰箱或冷冻库储存。在另外的实例中,冷藏条件需要在约2°C至约10°C的温度下的储存。在其他实例中,冷藏条件需要在约4°C的温度下的储存。在另外的实施例中,冷藏条件需要在诸如约0°C或更低的冷冻温度下的储存。在另一实例中,冷藏条件需要在约-30°C至约0°C的温度下的储存。室温储存条件可能需要在环境温度例如约10°C至约30°C下的储存。高温稳定性(例如,在约30°C至约50°C的温度下)可用作加速老化研究的一部分,以预测在典型环境(10-30°C)条件下的长期储存。

[0023] 聚合物科学和工程领域的技术人员众所周知的是,溶液中的蛋白质倾向于形成缠结,所述缠结可限制缠结链的平移移动性并且干扰蛋白质的治疗性或非治疗性功效。在实施方案中,如本文公开的赋形剂化合物可抑制由于赋形剂化合物与溶液中的靶蛋白之间的特异性相互作用所引起的蛋白质群集。如本文公开的赋形剂化合物可以是天然的或合成的,并且合意地是FDA通常公认为安全(“GRAS”)的物质。

[0024] 1. 定义

[0025] 出于本公开的目的,术语“蛋白质”是指具有足够长的链长以产生离散的三级结构、通常具有1-3000kD之间的分子量的氨基酸序列。在一些实施方案中,蛋白质的分子量在约50-200kD之间;在其他实施方案中,蛋白质的分子量在约20-1000kD之间或在约20-2000kD之间。与术语“蛋白质”相反,术语“肽”是指不具有离散的三级结构的氨基酸序列。多种多样的生物聚合物包括在术语“蛋白质”的范围内。例如,术语“蛋白质”可以是指治疗性或非治疗性蛋白质,包括抗体、适体、融合蛋白、聚乙二醇化蛋白质、合成多肽、蛋白质片段、脂蛋白、酶、结构肽等。

[0026] 作为非限制性实例,治疗性蛋白质可包括哺乳动物蛋白质,诸如激素和激素原(例如,胰岛素和胰岛素原、胰高血糖素、降钙素、甲状腺激素(T3或T4或促甲状腺激素)、甲状旁腺激素、促卵泡激素、黄体化激素、生长激素、生长激素释放因子等);凝血因子和抗凝血因子(例如,组织因子、温韦伯氏因子(von Willebrand's factor)、因子VIIIC、因子IX、蛋白质C、纤溶酶原激活物(尿激酶、组织型纤溶酶原激活物)、凝血酶);细胞因子、趋化因子和炎症介质;干扰素;集落刺激因子;白介素(例如,IL-1至IL-10);生长因子(例如,血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子、血小板源性生长因子、转化生长因子、神经营养生长因子、胰岛素样生长因子等);白蛋白;胶原和弹性蛋白;造血因子(例如,促红细胞生成素、促血小板生成素等);骨诱导因子(例如,骨形态发生蛋白);受体(例如,整联蛋白;钙粘素等);表面膜蛋白;转运蛋白;调节蛋白;抗原蛋白(例如,充当抗原的病毒组分);以及抗体。术语“抗体”在本文中以其最广泛的含义使用,以包括作为非限制性实例的单克隆抗体(包括,例如具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、单链分子、双特异性和多特异性抗体、特异性抗体、双抗体、具有多表位特异性的抗体组合物以及抗体片段(包括,例如Fab、Fv和F(ab')2)。抗体也可被称为“免疫球蛋白”。抗体被理解为针对特异性蛋白质或非蛋白质“抗原”,是生物学上重要的材料;向患者施用治疗有效量的抗体可与抗原复合,从而改变其生物学特性,使得患者经历治疗效果。

[0027] 在实施方案中,蛋白质是聚乙二醇化的,意指它们包含聚(乙二醇) (“PEG”) 和/或聚(丙二醇) (“PPG”) 单元。聚乙二醇化蛋白质或PEG-蛋白质缀合物由于其有益特性诸如溶解度、药代动力学、药物动力学、免疫原性、肾清除率和稳定性而已在治疗性应用中存在效用。聚乙二醇化蛋白质的非限制性实例为聚乙二醇化干扰素(PEG-IFN)、聚乙二醇化抗VEGF、PEG蛋白缀合物药物、Adagen、培门冬酶(Pegaspargase)、聚乙二醇非格司亭(Pegfilgrastim)、聚乙二醇重组尿酸酶(Pegloticase)、培维索孟(Pegvisomant)、聚乙二醇化重组人促红细胞生成素- β (PEGylated epoetin- β) 和聚乙二醇结合赛妥珠单抗(Certolizumab pegol)。

[0028] 聚乙二醇化蛋白质可通过多种方法诸如蛋白质与具有一个或多个反应性官能团的PEG试剂的反应来合成。PEG试剂上的反应性官能团可在靶蛋白位点诸如赖氨酸、组氨酸、半胱氨酸和N端处与蛋白质形成键联。典型的聚乙二醇化试剂具有反应性官能团,诸如与蛋白质上的靶向氨基酸残基具有特异性反应性的醛、马来酰亚胺或琥珀酰亚胺基团。聚乙二醇化试剂可具有约1至约1000个PEG和/或PPG重复单元的PEG链长。聚乙二醇化的其他方法包括糖基聚乙二醇化,在所述糖基聚乙二醇化中蛋白质首先被糖基化,并且然后糖基化残基在第二步中被聚乙二醇化。某些聚乙二醇化过程由酶(如唾液酸转移酶和转谷氨酰胺酶)协助。

[0029] 虽然聚乙二醇化蛋白质可提供优于天然的非聚乙二醇化蛋白质的治疗优点,但是这些材料可能具有使其难以纯化、溶解、过滤、浓缩和施用的物理或化学特性。与天然蛋白质相比,蛋白质的聚乙二醇化可致使溶液粘度更高,并且这通常需要以较低的浓度配制聚乙二醇化蛋白质溶液。

[0030] 期望在稳定的低粘度溶液中配制蛋白质治疗剂,以便它们可以最小注射体积向患者施用。例如,药物的皮下(SC)或肌内(IM)注射通常需要小的注射体积,优选地小于2mL。SC和IM注射途径非常适于自我施用护理,并且与仅在直接医务监督下进行的静脉内(IV)注射相比,这是成本更少并且更容易获得的治疗形式。用于SC或IM注射的制剂需要低溶液粘度,通常低于30cP,并且优选地低于20cP,以允许治疗性溶液容易地流过窄规格针头。小注射体积和低粘度要求的这种组合对聚乙二醇化蛋白质治疗剂在SC或IM注射途径中的使用提出了挑战。

[0031] 具有治疗效果的那些蛋白质可被称为“治疗性蛋白质”;含有治疗有效量的治疗性蛋白质的制剂可被称为“治疗性制剂。”包含在治疗性制剂中的治疗性蛋白质也可被称为“蛋白质活性成分。”通常,治疗性制剂包含治疗有效量的蛋白质活性成分和赋形剂,具有或不具有其他任选组分。如本文所用,术语“治疗性的”包括对现有病症和预防病症两者的治疗。

[0032] “治疗”包括旨在治愈、痊愈、减轻、改善、补救或以其他方式有利地影响病症,包括预防或延迟症状的发作和/或减轻或改善病症的症状。需要治疗的那些患者包括已经具有特定病症的那些患者和期望预防病症的那些患者。病症是改变哺乳动物的稳态健康的任何病状,包括急性或慢性疾病或使哺乳动物易患急性或慢性疾病的病理学病状。病症的非限制性实例包括癌症、代谢病症(例如,糖尿病)、过敏性病症(例如,哮喘)、皮肤学病症、心血管病症、呼吸病症、血液学病症、肌肉骨骼病症、炎性或风湿病学病症、自身免疫性病症、胃肠病症、泌尿病症、性和生殖病症、神经学病症等。出于治疗的目的,术语“哺乳动物”可以是

指被分类为哺乳动物的任何动物,包括人、家养动物、宠物动物、农场动物、运动动物、工作动物等。因此,“治疗”可包括兽医学治疗和人治疗两者。为方便起见,经受所述“治疗”的哺乳动物可被称为“患者。”在某些实施方案中,患者可具有任何年龄,包括子宫内的胎儿动物。

[0033] 在实施方案中,治疗涉及向有需要的哺乳动物提供治疗有效量的治疗性制剂。“治疗有效量”是向有需要的哺乳动物施用的用以实现现有病症的治疗或预期病症的预防(所述治疗或所述预防为“治疗性干预”)的治疗性蛋白质的至少最小浓度。可以作为治疗性制剂中的活性成分包括的各种治疗性蛋白质的治疗有效量可以是本领域熟悉的;或者,对于发现的或在下文中应用于治疗性干预的治疗性蛋白质,治疗有效量可通过由本领域普通技术人员仅仅使用常规实验进行的标准技术来确定。

[0034] 用于非治疗目的(即,不涉及治疗的目的)(诸如家庭、营养、商业和工业应用)的那些蛋白质可被称为“非治疗性蛋白质。”含有非治疗性蛋白质的制剂可被称为“非治疗性制剂”。非治疗性蛋白质可以来源于植物来源、动物来源或由细胞培养物产生;它们还可为酶或结构蛋白。非治疗性蛋白质可用于家庭、营养、商业和工业应用,诸如催化剂、人和动物营养、加工助剂、清洁剂和废物处理。

[0035] 非治疗性生物聚合物的一个重要类别为酶。酶具有许多非治疗性应用,例如作为催化剂、人和动物营养成分、加工助剂、清洁剂和废物处理剂。酶催化剂用来加速各种化学反应。用于非治疗用途的酶催化剂的实例包括过氧化氢酶、氧化还原酶、转移酶、水解酶,裂解酶、异构酶和连接酶。酶的人和动物营养用途包括营养保健品、蛋白质的营养来源、微量营养素的螯合或受控递送、消化助剂和补充剂;这些可来源于淀粉酶、蛋白酶、胰蛋白酶、乳糖酶等。酶加工助剂用来在操作(烘焙、酿造、发酵、果汁加工和酿酒)中改善食品和饮料产品的生产。这些食品和饮料加工助剂的实例包括淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、葡聚糖酶、脂肪酶和乳糖酶。酶还可用于生物燃料的生产中。例如,用于生物燃料的乙醇可通过生物质原料(诸如纤维素和木质纤维素材料)的酶促降解来辅助。用纤维素酶和木质素酶进行的所述原料材料的处理将生物质转化成可发酵成燃料的底物。在其他商业应用中,酶用作用于洗衣、洗碗、表面清洁和设备清洁应用的洗涤剂、清洁剂和染色提升助剂(stain lifting aid)。用于此目的的典型酶包括蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶和脂肪酶。此外,非治疗性酶用于各种商业和工业过程中,诸如用纤维素酶进行的纺织品软化、皮革加工、废物处理、污染沉淀物处理、水处理、纸浆漂白和纸浆软化和脱粘。用于这些目的的典型酶为淀粉酶、木聚糖酶、纤维素酶和木质素酶。

[0036] 非治疗性生物聚合物的其他实例包括纤维状或结构蛋白,诸如角蛋白、胶原、明胶、弹性蛋白、丝心蛋白、肌动蛋白、微管蛋白或其水解形式、降解形式或衍生形式。这些材料用于制备和配制食品成分,诸如明胶、冰淇淋、酸奶和糖果;它们还作为增稠剂、流变改性剂、口感改善剂以及作为营养蛋白质的来源添加到食品。在化妆品和个人护理用品工业中,胶原、弹性蛋白、角蛋白和水解角蛋白广泛地用作皮肤护理和毛发护理制剂中的成分。非治疗性生物聚合物的其他实例为乳清蛋白,诸如 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白和血清白蛋白。这些乳清蛋白作为来自乳品操作的副产物大规模地生产,并且已经用于多种非治疗性应用。

[0037] 2. 治疗性制剂

[0038] 在一方面,本文公开的制剂和方法提供了包含治疗有效量的治疗性蛋白质和赋形

剂化合物的具有改善或降低的粘度的稳定性液体制剂。在实施方案中,制剂可改善稳定性,同时提供了可接受的活性成分浓度和可接受的粘度。在实施方案中,当与对照制剂相比时,制剂提供稳定性的改善;出于本公开的目的,对照制剂为含有蛋白质活性成分的制剂,除了缺乏赋形剂化合物之外,所述对照制剂以干重计在各方面均与所述治疗性制剂相同。在实施方案中,与对照制剂相比,稳定性改善的含有蛋白质的制剂呈较低百分比的可溶性聚集体、微粒、亚可见颗粒或凝胶形成的形式。

[0039] 应当理解,液体蛋白质制剂的粘度可受多种因素影响,所述多种因素包括但不限于:蛋白质本身(例如,酶、抗体、受体、融合蛋白等)的性质;其尺寸、三维结构、化学组成和分子量;其在制剂中的浓度;除了蛋白质之外的制剂的组分;所需的pH范围;制剂的储存条件;以及向患者施用制剂的方法。最适合与本文所述的赋形剂化合物一起使用的治疗性蛋白质优选地为基本上纯的,即不含污染性蛋白质。在实施方案中,“基本上纯的”治疗性蛋白质是包含至少90重量%,或优选至少95重量%,或更优选至少99重量%的治疗性蛋白质的蛋白质组合物,全部基于组合物中治疗性蛋白质和污染性蛋白质的总重量。出于清楚的目的,作为赋形剂添加的蛋白质不旨在包括于此定义中。本文所述的治疗性制剂旨在用作药物级制剂,即旨在用于治疗哺乳动物的制剂,所述制剂的形式使得可实现蛋白质活性成分的所需治疗功效,并且不含对制剂待施用到的哺乳动物有毒的组分。

[0040] 在实施方案中,治疗性制剂含有至少25mg/mL的蛋白质活性成分。在其他实施方案中,治疗性制剂含有至少100mg/mL的蛋白质活性成分。在其他实施方案中,治疗性制剂含有至少200mg/mL的蛋白质活性成分。在其他实施方案中,治疗性制剂溶液含有至少300mg/mL的蛋白质活性成分。通常,本文公开的赋形剂化合物以约5与约300mg/mL之间的量添加到治疗性制剂。在实施方案中,赋形剂化合物可以约10至约200mg/mL的量添加。在实施方案中,赋形剂化合物可以约20至约100mg/mL的量添加。在实施方案中,赋形剂可以约25至约75mg/mL的量添加。

[0041] 当与制剂中的蛋白质活性成分组合时,针对特定的有利特性选择具有各种分子量的赋形剂化合物。以下提供了包含赋形剂化合物的治疗性制剂的实例。在实施方案中,赋形剂化合物的分子量<5000Da。在实施方案中,赋形剂化合物的分子量<1000Da。在实施方案中,赋形剂化合物的分子量<500Da。

[0042] 在实施方案中,本文公开的赋形剂化合物以降粘的量添加到治疗性制剂。在实施方案中,降粘的量是当与对照制剂相比时将制剂粘度降低至少10%的赋形剂化合物的量;出于本公开的目的,对照制剂为含有蛋白质活性成分的制剂,除了缺乏赋形剂化合物之外,所述制剂以干重计在各方面均与所述治疗性制剂相同。在实施方案中,降粘的量是当与对照制剂相比时将制剂粘度降低至少30%的赋形剂化合物的量。在实施方案中,降粘的量是当与对照制剂相比时将制剂粘度降低至少50%的赋形剂化合物的量。在实施方案中,降粘的量是当与对照制剂相比时将制剂粘度降低至少70%的赋形剂化合物的量。在实施方案中,降粘的量是当与对照制剂相比时将制剂粘度降低至少90%的赋形剂化合物的量。

[0043] 在实施方案中,降粘的量产生具有小于100cP的粘度的治疗性制剂。在其他实施方案中,治疗性制剂的粘度小于50cP。在其他实施方案中,治疗性制剂的粘度小于20cP。在其他实施方案中,治疗性制剂的粘度小于10cP。如本文所用的术语“粘度”是指当通过本文公开的方法测量时的动态粘度值。

[0044] 根据本公开的治疗性制剂具有某些有利的特性。在实施方案中，治疗性制剂耐受剪切降解、相分离、浑浊、沉淀和变性。在实施方案中，与对照制剂相比，治疗性制剂被更有效地加工、纯化、储存、注射、给药、过滤和离心。在实施方案中，以高浓度的治疗性蛋白质向患者施用治疗性制剂。在实施方案中，向患者施用治疗性制剂，所述患者具有比在缺乏治疗性赋形剂的类似制剂情况下将经历的更少的不适感。在实施方案中，治疗性制剂作为贮库注射施用。在实施方案中，治疗性制剂延长治疗性蛋白在体内的半衰期。如本文公开的治疗性制剂的这些特征将允许在临床情况下通过肌内或皮下注射施用所述制剂，所述临床情况即下述情况：其中患者接受肌内注射将包括使用通常用于IM/SC目的的小口径针头和使用可耐受的（例如，2-3cc）注射体积，并且其中这些条件使得有效量的制剂以单次注射施用在单次注射部位处。相比之下，使用常规制剂技术对相当剂量的治疗性蛋白质的注射将受常规制剂的较高粘度限制，使得常规制剂的SC/IM注射将不适于临床情况。

[0045] 在实施方案中，治疗性赋形剂具有针对抗氧化性损伤而稳定化治疗性蛋白质的抗氧化特性。在实施方案中，治疗性制剂在环境温度下储存，或者在冰箱条件下储存延长的时间而没有治疗性蛋白质效力的明显损失。在实施方案中，将治疗性制剂干燥储存直到其被需要；然后将其用适当的溶剂例如水重构。有利地，如本文所述的那样制备的制剂可在长时间段，数月至数年内是稳定的。当需要特别长的储存期时，制剂可保存在冷冻库中（并且稍后再活化），而无需担心蛋白质变性。在实施方案中，制剂可制备用于不需要制冷的长期储存。

[0046] 用于制备治疗性制剂的方法可为本领域技术人员所熟悉。本发明的治疗性制剂可例如通过在将治疗性蛋白质添加到溶液之前或之后向制剂中添加赋形剂化合物来制备。治疗性制剂可例如通过以第一（较低）浓度组合治疗性蛋白质和赋形剂来产生，然后通过过滤或离心进行处理以产生第二（较高）浓度的治疗性蛋白质。治疗性制剂可用具有离液剂、成序剂（kosmotrope）、水溶助长剂和盐的一种或多种赋形剂化合物来制成。治疗性制剂可使用诸如封装、分散、脂质体、囊泡形成等技术用一种或多种赋形剂化合物来制成。用于制备包含本文公开的赋形剂化合物的治疗性制剂的方法可包括组合赋形剂化合物。在实施方案中，组合赋形剂可产生粘度较低、稳定性改善或注射部位疼痛减少的益处。其他添加剂可在治疗性制剂的制造期间引入其中，包括防腐剂、表面活性剂、糖、蔗糖、海藻糖、多糖、精氨酸、脯氨酸、透明质酸酶、稳定剂、缓冲剂等。如本文所用，药学上可接受的赋形剂化合物是无毒且适合于动物和/或人施用的赋形剂化合物。

[0047] 3. 非治疗性制剂

[0048] 在一方面，本文公开的制剂和方法提供了包含有效量的非治疗性蛋白质和赋形剂化合物的具有改善或降低的粘度的稳定性液体制剂。在实施方案中，制剂改善了稳定性，同时提供了可接受的活性成分浓度和可接受的粘度。在实施方案中，当与对照制剂相比时，制剂提供稳定性的改善；出于本公开的目的，对照制剂为含有蛋白质活性成分的制剂，除了缺乏赋形剂化合物之外，所述对照制剂以干重计在各方面均与所述非治疗性制剂相同。

[0049] 应当理解，液体蛋白质制剂的粘度可受多种因素影响，所述多种因素包括但不限于：蛋白质本身（例如，酶、结构蛋白、水解度等）的性质；其尺寸、三维结构、化学组成和分子量；其在制剂中的浓度；除了蛋白质之外的制剂的组分；所需的pH范围；用于制剂的储存条件。

[0050] 在实施方案中,非治疗性制剂含有至少25mg/mL的蛋白质活性成分。在其他实施方案中,非治疗性制剂含有至少100mg/mL的蛋白质活性成分。在其他实施方案中,非治疗性制剂含有至少200mg/mL的蛋白质活性成分。在其他实施方案中,非治疗性制剂溶液含有至少300mg/mL的蛋白质活性成分。通常,本文公开的赋形剂化合物以约5与约300mg/mL之间的量添加到非治疗性制剂。在实施方案中,赋形剂化合物以约10至约200mg/mL的量添加。在实施方案中,赋形剂化合物以约20至约100mg/mL的量添加。在实施方案中,赋形剂以约25至约75mg/mL的量添加。

[0051] 当与制剂中的蛋白质活性成分组合时,针对特定的有利特性选择具有各种分子量的赋形剂化合物。以下提供了包含赋形剂化合物的非治疗性制剂的实例。在实施方案中,赋形剂化合物的分子量<5000Da。在实施方案中,赋形剂化合物的分子量<1000Da。在实施方案中,赋形剂化合物的分子量<500Da。

[0052] 在实施方案中,本文公开的赋形剂化合物以降粘的量添加到非治疗性制剂。在实施方案中,降粘的量是当与对照制剂相比时将制剂粘度降低至少10%的赋形剂化合物的量;出于本公开的目的,对照制剂为含有蛋白质活性成分的制剂,除了缺乏赋形剂化合物之外,所述制剂以干重计在各方面均与所述治疗性制剂相同。在实施方案中,降粘的量是当与对照制剂相比时将制剂粘度降低至少30%的赋形剂化合物的量。在实施方案中,降粘的量是当与对照制剂相比时将制剂粘度降低至少50%的赋形剂化合物的量。在实施方案中,降粘的量是当与对照制剂相比时将制剂粘度降低至少70%的赋形剂化合物的量。在实施方案中,降粘的量是当与对照制剂相比时将制剂粘度降低至少90%的赋形剂化合物的量。

[0053] 在实施方案中,降粘的量产生具有小于100cP的粘度的非治疗性制剂。在其他实施方案中,非治疗性制剂的粘度小于50cP。在其他实施方案中,非治疗性制剂的粘度小于20cP。在其他实施方案中,非治疗性制剂的粘度小于10cP。如本文所用的术语“粘度”是指动力粘度值。

[0054] 根据本公开的非治疗性制剂可具有某些有利的特性。在实施方案中,非治疗性制剂耐受剪切降解、相分离、浑浊、沉淀和变性。在实施方案中,与对照制剂相比,治疗性制剂可被更有效地加工、纯化、储存、泵送、过滤和离心。

[0055] 在实施方案中,非治疗性赋形剂具有针对抗氧化性损伤而稳定化非治疗性蛋白质的抗氧化特性。在实施方案中,非治疗性制剂在环境温度下储存,或者在冰箱条件下储存延长的时间而没有非治疗性蛋白质效力的明显损失。在实施方案中,将非治疗性制剂干燥储存直到其被需要;然后可将其用适当的溶剂例如水重构。有利地,如本文所述的那样制备的制剂在长时间段,数月至数年内是稳定的。当需要特别长的储存期时,制剂保存在冷冻库中(并且稍后再活化),而无需担心蛋白质变性。在实施方案中,制剂制备用于不需要制冷的长期储存。

[0056] 用于制备包含本文公开的赋形剂化合物的非治疗性制剂的方法可为技术人员所熟悉。例如,可在将非治疗性蛋白质添加到溶液之前或之后向制剂中添加赋形剂化合物。非治疗性制剂可以第一(较低)浓度产生,然后通过过滤或离心进行处理以产生第二(较高)浓度。非治疗性制剂可用具有离液剂、成序剂、水溶助长剂和盐的一种或多种赋形剂化合物来制成。非治疗性制剂可使用诸如封装、分散、脂质体、囊泡形成等技术用一种或多种赋形剂化合物来制成。其他添加剂可在非治疗性制剂的制造期间引入其中,包括防腐剂、表面活性

剂、稳定剂等。

[0057] 4. 赋形剂化合物

[0058] 本文描述了几种赋形剂化合物,各自适合与一种或多种治疗性或非治疗性蛋白质一起使用,并且各自允许制剂被制成使得所述制剂含有高浓度的蛋白质。以下描述的赋形剂化合物一些类别是:(1)受阻胺;(2)阴离子芳族化合物;(3)官能化氨基酸;以及(4)寡肽。不受理论的束缚,本文所述的赋形剂化合物被认为与治疗性蛋白质的以其他方式参与颗粒间(即蛋白质-蛋白质)相互作用的某些片段、序列、结构或部分缔合。这些赋形剂化合物与治疗性或非治疗性蛋白质的缔合可掩盖蛋白质间相互作用,使得蛋白质可以高浓度配制而不引起溶液粘度过大。有利地,赋形剂化合物可为水溶性的,因此适合与水性媒介物一起使用。在实施方案中,赋形剂化合物的水中溶解度>10mg/mL。在实施方案中,赋形剂化合物的水中溶解度>100mg/mL。在实施方案中,赋形剂化合物的水中溶解度>500mg/mL。有利地,对于治疗性蛋白质,赋形剂化合物可来源于为生物学上可接受的和非免疫原性的并且因此适于药物用途的材料。在治疗性实施方案中,赋形剂化合物可在体内代谢以产生生物相容的和非免疫原性的副产物。

[0059] a. 赋形剂化合物类别1:受阻胺

[0060] 治疗性或非治疗性蛋白质的高浓度溶液可用受阻胺小分子作为赋形剂化合物来配制。如本文所用,术语“受阻胺”是指符合以下实例的含有至少一个大体积或空间位阻基团的小分子。受阻胺可以游离碱形式、质子化形式或两者的组合使用。在质子化形式中,受阻胺可与阴离子抗衡离子诸如氯化物、氢氧化物、溴化物、碘化物、氟化物、乙酸盐、甲酸盐、磷酸盐、硫酸盐或羧酸盐缔合。可用作赋形剂化合物的受阻胺化合物可含有仲胺、叔胺、季铵、吡啶鎓、吡咯烷酮、吡咯烷、哌啶、吗啉或胍鎓基团,使得赋形剂化合物在中性pH的水性溶液中具有阳离子电荷。受阻胺化合物还含有至少一个大体积或空间位阻基团,诸如环芳基、脂环族基、环己基或烷基。在实施方案中,空间位阻基团本身可为胺基,诸如二烷基胺、三烷基胺、胍鎓、吡啶鎓或季铵基团。不受理论的束缚,受阻胺化合物被认为通过阳离子π相互作用与蛋白质的芳族部分诸如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸缔合。在实施方案中,受阻胺的阳离子基团可对蛋白质中的芳族氨基酸残基的富含电子的π结构具有亲和力,使得它们可屏蔽蛋白质的这些部分,从而减少此类屏蔽的蛋白质缔合和聚集的趋势。

[0061] 在实施方案中,受阻胺赋形剂化合物具有包含以下的化学结构:咪唑、咪唑啉或咪唑烷基团或其盐,诸如咪唑、1-甲基咪唑、4-甲基咪唑、氯化1-己基-3-甲基咪唑鎓、组胺、4-甲基组胺、α-甲基组胺、倍他司汀(betahistine)、β-丙氨酸、2-甲基-2-咪唑啉、氯化1-丁基-3-甲基咪唑鎓、尿酸、尿酸钾、倍他唑(betazole)、肌肽、阿斯巴甜、糖精、乙酰氨基磺酸钾、黄嘌呤、茶碱、可可碱、咖啡因和鹅肌肽。在实施方案中,受阻胺赋形剂化合物选自由以下组成的组:二甲基乙醇胺、二甲基氨基丙胺、三乙醇胺、二甲基苄基胺、二甲基环己胺、二乙基环己胺、二环己基甲胺、六亚甲基双胍、聚(六亚甲基双胍)、咪唑、二甲基甘氨酸、胍丁胺、二氮杂双环[2.2.2]辛烷、四甲基乙二胺、N,N-二甲基乙醇胺、磷酸乙醇胺、葡糖胺、氯化胆碱、磷酸胆碱、烟酰胺、异烟酰胺、N,N-二乙基烟酰胺、烟酸钠盐、酪胺、3-氨基吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、3-吡啶甲醇、烟酰胺腺苷二核苷酸、生物素、吗啉、N-甲基吡咯烷酮、2-吡咯烷酮、普鲁卡因、利多卡因、双氰胺-牛磺酸加合物、2-吡啶乙胺、双氰胺-苄胺加合物、双氰胺-烷基胺加合物、双氰胺-环烷基胺加合物和双氰胺-氨甲基膦酸加合物。在实施方案中,

符合本公开的受阻胺化合物配制为质子化铵盐。在实施方案中，符合本公开的受阻胺化合物与作为抗衡离子的无机阴离子或有机阴离子一起配制为盐。在实施方案中，治疗性或非治疗性蛋白质的高浓度溶液与作为赋形剂化合物的咖啡因与苯甲酸、羟基苯甲酸或苯磺酸的组合一起配制。在实施方案中，受阻胺赋形剂化合物在体内被代谢产生生物相容性副产物。在一些实施方案中，受阻胺赋形剂化合物以约250mg/ml或更少的浓度存在于制剂中。在另外的实施方案中，受阻胺赋形剂化合物以约10mg/ml至约200mg/ml的浓度存在于制剂中。在另一些方面，受阻胺赋形剂化合物以约20至约120mg/ml的浓度存在于制剂中。

[0062] 在实施方案中，某些受阻胺赋形剂化合物可具有其他药理学特性。作为实例，黄嘌呤是一类具有独立的药理学特性的受阻胺，所述独立的药理学特性包括在全身性吸收时的刺激特性和支气管扩张剂特性。代表性黄嘌呤包括咖啡因、氨茶碱、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、副黄嘌呤、己酮可可碱、可可碱、茶碱等。甲基化黄嘌呤被认为影响心脏收缩力、心率和支气管扩张。在一些实施方案中，黄嘌呤赋形剂化合物以约30mg/ml或更少的浓度存在于制剂中。

[0063] 具有独立的药理学特性的另一类受阻胺为可注射性局部麻醉化合物。可注射性局部麻醉化合物是具有(a)亲脂性芳族环，(b)中间体酯或酰胺键和(c)仲胺或叔胺的三组分分子结构的受阻胺。这类受阻胺被认为通过抑制钠离子的流入来中断神经传导，从而诱导局部麻醉。局部麻醉化合物的亲脂性芳族环可由碳原子(例如，苯环)形成，或者其可包含杂原子(例如，噻吩环)。代表性可注射性局部麻醉化合物包括但不限于阿米卡因、阿替卡因、布比卡因、布他卡因、布坦卡因、氯普鲁卡因、可卡因、环美卡因(cyclomethcaine)、二甲卡因、依替卡因(editocaine)、海克卡因(hexylcaine)、异布卡因(isobucaine)、左布比卡因(levobupivacaine)、利多卡因、间布他明(metabutethamine)、美布卡因(metabutoxycaine)、卡波卡因(mepivacaine)、美普卡因、丙氧卡因、丙胺卡因、普鲁卡因、哌罗卡因、丁卡因、三甲卡因等。可注射性局部麻醉化合物可在蛋白质治疗性制剂中具有多种益处，诸如粘度降低、稳定性改善和注射后疼痛减少。在一些实施方案中，局部麻醉化合物以约50mg/ml或更少的浓度存在于制剂中。

[0064] 在实施方案中，具有独立的药理学特性的受阻胺用作根据本文所述的制剂和方法的赋形剂化合物。在一些实施方案中，具有独立的药理学特性的赋形剂化合物以不具有药理学作用和/或非治疗有效的量存在。在其他实施方案中，具有独立的药理学特性的赋形剂化合物以确实具有药理学作用和/或治疗有效的量存在。在某些实施方案中，具有独立的药理学特性的受阻胺与已被选择来降低制剂粘度的另一种赋形剂化合物组合使用，其中具有独立的药理学特性的受阻胺用来赋予其药理学活性的益处。例如，可注射性局部麻醉化合物可用来降低制剂粘度，并且还用来在注射制剂后减少疼痛。注射疼痛的减少可由麻醉特性引起；当通过赋形剂降低粘度时，也可能需要较低的注射力。可替代地，当与降低制剂粘度的另一种赋形剂化合物组合时，可注射性局部麻醉化合物可用来在制剂注射期间赋予所需要的减少局部知觉的药理学益处。

[0065] b. 赋形剂化合物类别2: 阴离子芳族化合物

[0066] 治疗性或非治疗性蛋白质的高浓度溶液可与作为赋形剂化合物的阴离子芳族小分子化合物一起配制。阴离子芳族赋形剂化合物可含有芳族官能团，诸如苯基、苄基、芳基、烷基苄基、羟基苄基、酚基、羟基芳基、杂芳基或稠合芳基。阴离子芳族赋形剂化合物还可含

有阴离子官能团,诸如羧酸盐、氧化物、酚盐、磺酸盐、硫酸盐、膦酸盐、磷酸盐或硫化物。虽然阴离子芳族赋形剂可被描述为酸、钠盐或其他,但是应当理解,赋形剂可以多种盐形式使用。不受理论的束缚,阴离子芳族赋形剂化合物被认为是大体积的空间位阻分子,其可与蛋白质的阳离子区段缔合,使得它们可以屏蔽蛋白质的这些部分,从而降低使含蛋白质的制剂粘稠的蛋白质分子间的相互作用。

[0067] 在实施方案中,阴离子芳族赋形剂化合物的实例包括诸如以下的化合物:水杨酸、氨基水杨酸、羟基苯甲酸、氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、苯磺酸、羟基苯磺酸、萘磺酸、萘二磺酸、对苯二酚磺酸(hydroquinone sulfonic acid)、对氨基苯磺酸、香草酸、香草醛、香草醛-牛磺酸加合物、氨基酚、邻氨基苯甲酸、肉桂酸、香豆酸、单磷酸腺苷、吲哚乙酸、尿酸钾、呋喃二羧酸、呋喃-2-丙烯酸、2-呋喃丙酸、苯丙酮酸钠、羟基苯丙酮酸钠、二羟基苯甲酸、三羟基苯甲酸、连苯三酚、苯甲酸以及上述酸的盐。在实施方案中,阴离子芳族赋形剂化合物以电离盐形式配制。在实施方案中,阴离子芳族化合物配制为受阻胺的盐,诸如二甲基环己基铵羟基苯甲酸盐。在实施方案中,阴离子芳族赋形剂化合物与各种抗衡离子诸如有机阳离子一起配制。在实施方案中,治疗性或非治疗性蛋白质的高浓度溶液与阴离子芳族赋形剂化合物和咖啡因一起配制。在实施方案中,阴离子芳族赋形剂化合物在体内被代谢产生生物相容性副产物。

[0068] c. 赋形剂化合物类别3:官能化氨基酸

[0069] 治疗性或非治疗性蛋白质的高浓度溶液可与一种或多种官能化氨基酸一起配制,其中单个官能化氨基酸或包含一种或多种官能化氨基酸的寡肽可用作赋形剂化合物。在实施方案中,官能化氨基酸化合物包含可经水解或代谢产生氨基酸的分子(“氨基酸前体”)。在实施方案中,官能化氨基酸可含有芳族官能团,诸如苯基、苄基、芳基、烷基苄基、羟基苄基、羟基芳基、杂芳基或稠合芳基。在实施方案中,官能化氨基酸化合物可含有酯化氨基酸,诸如甲基酯、乙基酯、丙基酯、丁基酯、苄基酯、环烷基酯、甘油基酯、羟乙基酯、羟丙基酯、PEG酯和PPG酯。在实施方案中,官能化氨基酸化合物选自由以下组成的组:精氨酸乙酯、精氨酸甲酯、精氨酸羟乙基酯和精氨酸羟丙基酯。在实施方案中,官能化氨基酸化合物是处于中性pH的水性溶液中的带电离子化合物。例如,单个氨基酸可以通过形成酯(如乙酸酯或苯甲酸酯)来衍生,并且水解产物将是均为天然材料的乙酸或苯甲酸,加上氨基酸。在实施方案中,官能化氨基酸赋形剂化合物在体内被代谢产生生物相容性副产物。

[0070] d. 赋形剂化合物类别4:寡肽

[0071] 治疗性或非治疗性蛋白质的高浓度溶液可与作为赋形剂化合物的寡肽一起配制。在实施方案中,寡肽被设计成使得结构具有带电部分和大体积部分。在实施方案中,寡肽由2与10之间个肽亚单元构成。寡肽可以是双功能的,例如与非极性氨基酸偶联的阳离子氨基酸,或与非极性氨基酸偶联的阴离子氨基酸。在实施方案中,寡肽由2与5之间个肽亚单元构成。在实施方案中,寡肽为同源肽,诸如聚谷氨酸、聚天冬氨酸、聚赖氨酸、聚精氨酸和聚组氨酸。在实施方案中,寡肽具有净阳离子电荷。在其他实施方案中,寡肽为杂肽,诸如Trp2Lys3。在实施方案中,寡肽可具有交替结构,诸如ABA重复模式。在实施方案中,寡肽可含有阴离子氨基酸和阳离子氨基酸,例如Arg-Glu。不受理论的束缚,寡肽包含可以降低导致高粘度溶液的分子间相互作用的这种方式与蛋白质缔合的结构;例如,寡肽-蛋白质缔合可为电荷-电荷相互作用,留下了略微非极性的氨基酸以破坏蛋白质周围的水合层的氢键,

从而降低粘度。在一些实施方案中,寡肽赋形剂以约50mg/ml或更小的浓度存在于组合物中。

[0072] e. 赋形剂化合物类别5:短链有机酸

[0073] 如本文所用,术语“短链有机酸”是指C2-C6有机酸化合物及其盐、酯或内酯。此类别包括饱和的和不饱和的羧酸、羟基官能化羧酸,以及直链、支链或环状的羧酸。在实施方案中,短链有机酸中的酸基为羧酸、磺酸、膦酸或其盐。

[0074] 除了以上四种赋形剂类别之外,治疗性或非治疗性蛋白质的高浓度溶液还可与作为赋形剂化合物的短链有机酸(例如,山梨酸、戊酸、丙酸、己酸和抗坏血酸的酸或盐形式)一起配制。这种类别中的赋形剂化合物的实例包括山梨酸钾、牛磺酸、丙酸钙、丙酸镁和抗坏血酸钠。

[0075] f. 赋形剂化合物类别6:低分子量脂族多元酸

[0076] 治疗性或非治疗性聚乙二醇化蛋白质的高浓度溶液可与能够降低溶液粘度的某些赋形剂化合物一起配制,其中所述赋形剂化合物为低分子量脂族多元酸。如本文所用,术语“低分子量脂族多元酸”是指具有<约1500的分子量,并且具有至少两个酸基的有机脂族多元酸,其中酸基被认为是供质子部分。酸基的非限制性实例包括羧酸基、膦酸基、磷酸基、磺酸基、硫酸基、硝酸基和亚硝酸基。低分子量脂族多元酸上的酸基可呈阴离子盐形式,诸如羧酸盐、膦酸盐、磷酸盐、磺酸盐、硫酸盐、硝酸盐和亚硝酸盐;它们的抗衡离子可为钠、钾、锂和铵。可用于与如本文所述的聚乙二醇化蛋白相互作用的低分子量脂族多元酸的具体实例包括马来酸、酒石酸、戊二酸、丙二酸、柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、天冬氨酸、谷氨酸、阿仑膦酸、依替膦酸及其盐。呈阴离子盐形式的低分子量脂族多元酸的其他实例包括磷酸盐(PO_4^{3-})、磷酸氢盐(HPO_4^{3-})、磷酸二氢盐(H_2PO_4^-)、硫酸盐(SO_4^{2-})、硫酸氢盐(HSO_4^-)、焦磷酸盐($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$)、碳酸盐(CO_3^{2-})和碳酸氢盐(HCO_3^-)。阴离子盐的抗衡离子可为Na、Li、K或铵离子。这些赋形剂还可与赋形剂组合使用。如本文所用,低分子量脂族多元酸还可为其中存在与第一酸基相邻的羟基的 α -羟基酸,例如乙醇酸、乳酸和葡萄糖酸及其盐。在实施方案中,低分子量脂族多元酸呈带有多于两个酸基的低聚形式,例如聚丙烯酸、聚磷酸盐、多肽及其盐。在一些实施方案中,低分子量脂族多元酸赋形剂以约50mg/ml或更小的浓度存在于组合物中。

[0077] 5. 蛋白质/赋形剂溶液:特性和过程

[0078] 在某些实施方案中,治疗性或非治疗性蛋白质的溶液与以上鉴定的赋形剂化合物诸如受阻胺、阴离子芳族化合物、官能化氨基酸、寡肽、短链有机酸一起配制,以使得如由蛋白质扩散相互作用参数(kD)或第二位力系数(B22)所测量的蛋白质-蛋白质相互作用特征改善。如本文所用,由制剂使用以上鉴定的赋形剂化合物实现的蛋白质-蛋白质相互作用特征的“改善”意指蛋白质-蛋白质相互作用的降低。kD和B22的这些测量可使用工业中的标准技术来进行,并且可以是改善的溶液特性或蛋白质在溶液中的稳定性的指示物。例如,高的负kD值可指示蛋白质具有强吸引的相互作用,并且这可以导致聚集、不稳定性和流变学问题。当在某些以上鉴定的赋形剂化合物存在下配制时,相同的蛋白质可具有较低的负kD值或接近或高于零的kD值。

[0079] 在实施方案中,某些上述赋形剂化合物诸如受阻胺、阴离子芳族化合物、官能化氨基酸、寡肽、短链有机酸和/或低分子量脂族多元酸用于改善蛋白质相关过程,诸如含蛋白

质的溶液的制造、处理、无菌灌装、纯化和分析,使用了下述处理方法:诸如,过滤、注射、转移、泵送、混合、通过热传递进行的加热或冷却、气体转移、离心、色谱、膜分离、离心浓缩、切向流过滤、径向流过滤、轴向流过滤、冻干和凝胶电泳,诸如。由于在制造、处理、纯化和分析步骤期间溶液中蛋白质的粘度较低、溶解度改善或稳定性改善,这些过程和处理方法可具有改善的效率。另外,由于蛋白质的结垢减少、变性减少、粘度较低和溶解度改善,可通过使用以上鉴定的赋形剂而有利于设备相关过程,诸如蛋白质处理设备的清理、灭菌和维护。

[0080] 与上述赋形剂化合物一起配制的治疗性蛋白质的高浓度溶液可使用预填充的注射器来向患者施用。

实施例

[0081] 材料:

- [0082] • 牛丙种球蛋白 (BGG), 纯度>99%, Sigma Aldrich
- [0083] • 组氨酸, Sigma Aldrich
- [0084] • 除非另外说明,否则以下实施例中描述的其他材料来自Sigma Aldrich。

[0085] 实施例1:含有赋形剂化合物和测试蛋白质的制剂的制备

[0086] 使用赋形剂化合物和测试蛋白质制备制剂,其中测试蛋白质旨在模拟将在治疗性制剂中使用的治疗性蛋白质或将在非治疗性制剂中使用的非治疗性蛋白质。用不同赋形剂化合物于50mM组氨酸盐酸盐中制备所述制剂以用于按以下方式进行的粘度测量。首先通过以下方式制备组氨酸盐酸盐:将1.94g组氨酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 溶解在蒸馏水中并用1M盐酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 将pH调节至约6.0,并且然后在容量瓶中用蒸馏水稀释至250mL的最终体积。然后将赋形剂化合物溶解于50mM组氨酸HCl中。以下实施例4、5、6和7中提供了赋形剂的列表。在一些情况下,在溶解于50mM组氨酸HCl中之前,将赋形剂化合物调节至pH 6。在这种情况下,首先将赋形剂化合物以约5重量%溶解于去离子水中,并且用盐酸或氢氧化钠将pH调节至约6.0。然后将制备的盐溶液置于约150华氏度(约65°C)下的对流实验室烘箱中以使水蒸发并且分离固体赋形剂。一旦已经在50mM组氨酸HCl中制备了赋形剂溶液,就将测试蛋白(牛丙种球蛋白 (BGG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))以每1mL赋形剂溶液约0.336g BGG的比率进行溶解。这产生了约280mg/mL的最终蛋白质浓度。将BGG在具有赋形剂的50mM组氨酸HCl中的溶液配制于20mL小瓶中,并使其在定轨摇床工作台上以100rpm震荡过夜。然后将BGG溶液转移到2mL微量离心管,并且在IEC MicroMax微量离心机中以2300rpm离心10分钟以除去夹带的空气,之后进行粘度测量。

[0087] 实施例2:粘度测量

[0088] 用DV-IIT LV锥板式粘度计 (Brookfield Engineering, Middleboro, MA) 进行如实实施例1所述的那样制备的制剂的粘度测量。粘度计配备有CP-40锥体,并且在3rpm和25°C下操作。将制剂以0.5mL的体积装载到粘度计中,并且使其在给定的剪切速率和温度下孵育3分钟,随后进行二十秒的测量收集期。然后,随后进行2个另外的步骤,包括1分钟的剪切孵育和随后二十秒的测量收集期。然后将所收集的三个数据点求平均并记录为样品的粘度。

[0089] 实施例3:蛋白质浓度测量

[0090] 通过在UV/VIS光谱仪 (Perkin Elmer Lambda 35) 中测量蛋白质溶液在280nm波长处的吸光度来测定实验溶液中蛋白质的浓度。首先,用pH 6下的50mM组氨酸缓冲液将仪器

校准至零吸光度。接着,用相同的组氨酸缓冲液将蛋白质溶液稀释300倍,并记录280nm处的吸光度。通过使用 $1.264\text{mL}/(\text{mg} \times \text{cm})$ 的消光系数值计算溶液中蛋白质的最终浓度。

[0091] 实施例4:具有受阻胺赋形剂化合物的制剂

[0092] 如实施例1所述的那样制备含有280mg/mL BGG的制剂,其中一些样品含有添加的赋形剂化合物。在这些测试中,将二甲基环己胺(DMCHA)、二环己基甲胺(DCHMA)、二甲基氨基丙胺(DMAPA)、三乙醇胺(TEA)、三甲基乙醇胺(DMEA)和烟酰胺的盐酸盐作为受阻胺赋形剂化合物的实例来测试。还将DMCHA和牛磺酸-双氰胺加合物的羟基苯甲酸盐作为受阻胺赋形剂化合物的实例来测试。如实施例2所述的那样测量每种蛋白质溶液的粘度,并且结果呈现于下表1中,显示了添加的赋形剂化合物在降低粘度方面的益处。

[0093] 表1

测试号	添加的赋形剂	赋形剂浓度 (mg/mL)	粘度 (cP)	粘度降低量
4.1	无	0	79	0%
4.2	DMCHA-HCl	28	50	37%
4.3	DMCHA-HCl	41	43	46%
4.4	DMCHA-HCl	50	45	43%

测试号	添加的赋形剂	赋形剂浓度 (mg/mL)	粘度 (cP)	粘度降低量
4.5	DMCHA-HCl	82	36	54%
4.6	DMCHA-HCl	123	35	56%
4.7	DMCHA-HCl	164	40	49%
4.8	DMAPA-HCl	87	57	28%
4.9	DMAPA-HCl	40	54	32%
4.10	DCHMA-HCl	29	51	35%
4.11	DCHMA-HCl	50	51	35%
4.14	TEA-HCl	97	51	35%
4.15	TEA-HCl	38	57	28%
4.16	DMEA-HCl	51	51	35%
4.17	DMEA-HCl	98	47	41%
4.20	DMCHA-羟基苯甲酸盐	67	46	42%
4.21	DMCHA-羟基苯甲酸盐	92	42	47%
4.22	实施例8的产物	26	58	27%
4.23	实施例8的产物	58	50	37%
4.24	实施例8的产物	76	49	38%
4.25	实施例8的产物	103	46	42%
4.26	实施例8的产物	129	47	41%
4.27	实施例8的产物	159	42	47%
4.28	实施例8的产物	163	42	47%
4.29	烟酰胺	48	39	51%
4.30	N-甲基-2-吡咯烷酮	30	45	43%
4.31	N-甲基-2-吡咯烷酮	52	52	34%

[0095]

[0096] 实施例5:具有阴离子芳族赋形剂化合物的制剂

[0097] 如实施例1所述的那样制备具有280mg/mL BGG的制剂,其中一些样品含有添加的

赋形剂化合物。如实施例2所述的那样测量每种溶液的粘度，并且结果呈现于下表2中，显示了添加的赋形剂化合物在降低粘度方面的益处。

[0098] 表2

测试号	添加的赋形剂	赋形剂浓度 (mg/mL)	粘度(cP)	粘度降低量
[0099]	5.1	无	0	0%
	5.2	氨基苯甲酸钠	43	39%
	5.3	羟基苯甲酸钠	26	37%
	5.4	磺胺酸钠	44	38%
	5.5	磺胺酸钠	96	47%
	5.6	吲哚乙酸钠	52	27%
	5.7	吲哚乙酸钠	27	1%
	5.8	香草酸、钠盐	25	29%
	5.9	香草酸、钠盐	50	37%
	5.10	水杨酸钠	25	28%
	5.11	水杨酸钠	50	34%
	5.12	单磷酸腺苷	26	41%
	5.13	单磷酸腺苷	50	16%
	5.14	苯甲酸钠	31	23%
	5.15	苯甲酸钠	56	22%

[0100] 实施例6:具有寡肽赋形剂化合物的制剂

[0101] 寡肽($n=5$)由NeoBioLab Inc.合成，纯度>95%，其中N端作为游离胺，并且C端作为游离酸。二肽($n=2$)由LifeTein LLC合成，纯度为95%。如实施例1所述的那样制备具有280mg/mL BGG的制剂，其中一些样品含有作为添加的赋形剂化合物的合成寡肽。如实施例2所述的那样测量每种溶液的粘度，并且结果呈现于下表3中，显示了添加的赋形剂化合物在降低粘度方面的益处。

[0102] 表3

[0103]

测试号	添加的赋形剂	赋形剂浓度 (mg/mL)	粘度(cP)	粘度降低量
6.1	无	0	79	0%
6.2	ArgX5	100	55	30%
6.3	ArgX5	50	54	32%
6.4	HisX5	100	62	22%
6.5	HisX5	50	51	35%
6.6	HisX5	25	60	24%
6.7	Trp2Lys3	100	59	25%
6.8	Trp2Lys3	50	60	24%
6.9	AspX5	100	102	-29%
6.10	AspX5	50	82	-4%
6.11	二肽 LE (Leu-Glu)	50	72	9%
6.12	二肽 YE (Tyr-Glu)	50	55	30%
6.13	二肽 RP (Arg-Pro)	50	51	35%
6.14	二肽 RK (Arg-Lys)	50	53	33%
6.15	二肽 RH (Arg-His)	50	52	34%
6.16	二肽 RR (Arg-Arg)	50	57	28%
6.17	二肽 RE (Arg-Glu)	50	50	37%
6.18	二肽 LE (Leu-Glu)	100	87	-10%
6.19	二肽 YE (Tyr-Glu)	100	68	14%
6.20	二肽 RP (Arg-Pro)	100	53	33%
6.21	二肽 RK (Arg-Lys)	100	64	19%
6.22	二肽 RH (Arg-His)	100	72	9%
6.23	二肽 RR	100	62	22%

测试号	添加的赋形剂	赋形剂浓度 (mg/mL)	粘度(cP)	粘度降低量
[0104]	(Arg-Arg)			
	6.24	二肽 RE (Arg-Glu)	100	66

[0105] 实施例8: 胍基牛磺酸赋形剂的合成

[0106] 按照美国专利号2,230,965中描述的方法制备胍基牛磺酸。将3.53份牛磺酸(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO)与1.42份双氰胺(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO)混合,并在研钵和研杵中研磨直至获得均匀混合物。接着,将混合物置于烧瓶中,并且在200°C下加热4小时。产物未进行进一步纯化即使用。

[0107] 实施例9: 含有赋形剂化合物的蛋白质制剂

[0108] 使用赋形剂化合物和测试蛋白质制备制剂,其中测试蛋白质旨在模拟将在治疗性制剂中使用的治疗性蛋白质或将在非治疗性制剂中使用的非治疗性蛋白质。用不同赋形剂化合物于50mM水性组氨酸盐酸盐缓冲液溶液中制备所述制剂以用于按以下方式进行的粘度测量。首先通过以下方式制备组氨酸盐酸盐缓冲溶液:将1.94g组氨酸(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO)溶解在蒸馏水中并用1M盐酸(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO)将pH调节至约6.0,并且然后在容量瓶中用蒸馏水稀释至250mL的最终体积。然后将赋形剂化合物溶解于50mM组氨酸HCl缓冲溶液中。表4中提供了赋形剂化合物的列表。在一些情况下,将赋形剂化合物溶解于50mM组氨酸HCl中,并且将所得溶液的pH用少量浓缩氢氧化钠或盐酸进行调节以实现pH 6,之后进行模型蛋白的溶解。在一些情况下,在溶解于50mM组氨酸HCl中之前,将赋形剂化合物调节至pH 6。在这种情况下,首先将赋形剂化合物以约5重量%溶解于去离子水中,并且用盐酸或氢氧化钠将pH调节至约6.0。然后将制备的盐溶液置于约150华氏度(65°C)下的对流实验室烘箱中以使水蒸发并且分离固体赋形剂。一旦已经在50mM组氨酸HCl中制备了赋形剂溶液,就将测试蛋白牛丙种球蛋白(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO)以实现约280mg/mL的最终蛋白质浓度的比率进行溶解。将BGG在具有赋形剂的50mM组氨酸HCl中的溶液配制于20mL小瓶中,并使其在定轨摇床工作台上以100rpm震荡过夜。然后将BGG溶液转移到2mL微量离心管,并且在IEC MicroMax微量离心机中以2300rpm离心10分钟以除去夹带的空气,之后进行粘度测量。

[0109] 用DV-IIT LV锥板式粘度计(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)进行如上所述的那样制备的制剂的粘度测量。粘度计配备有CP-40锥体,并且在3rpm和25°C下操作。将制剂以0.5mL的体积装载到粘度计中,并且使其在给定的剪切速率和温度下孵育3分钟,随后进行二十秒的测量收集期。然后,随后进行2个另外的步骤,包括1分钟的剪切孵育和随后二十秒的测量收集期。然后将所收集的三个数据点求平均并记录为样品的粘度。相对于不具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度将具有赋形剂的溶液的粘度归一化。归一化的粘度是具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度与不具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度的比率。

[0110] 表4

测试号	添加的赋形剂	赋形剂浓度(mg/mL)	归一化的粘度(cP)	粘度降低量
9.1	DMCHA-HCl	120	0.44	56%
9.2	烟酰胺	50	0.51	49%
9.3	异烟酰胺	50	0.48	52%
9.4	酪胺 HCl	70	0.41	59%
9.5	组胺 HCl	50	0.41	59%
9.6	咪唑 HCl	100	0.43	57%
9.7	2-甲基-2-咪唑啉 HCl	60	0.43	57%
9.8	氯化 1-丁基-3-甲基咪唑鎓	100	0.48	52%
9.9	普鲁卡因 HCl	50	0.53	47%

测试号	添加的赋形剂	赋形剂浓度(mg/mL)	归一化的粘度(cP)	粘度降低量
9.10	3-氨基吡啶	50	0.51	49%
9.11	2,4,6-三甲基吡啶	50	0.49	51%
9.12	3-吡啶甲醇	50	0.53	47%
9.13	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	20	0.56	44%
9.15	苯丙酮酸钠	55	0.57	43%
9.16	2-吡咯烷酮	60	0.68	32%
9.17	吗啉 HCl	50	0.60	40%
9.18	胍丁胺硫酸盐	55	0.77	23%
9.19	碘化 1-丁基-3-甲基咪唑鎓	60	0.66	34%
9.21	L-鹅肌肽硝酸盐	50	0.79	21%
9.22	氯化 1-己基-3-甲基咪唑鎓	65	0.89	11%
9.23	N,N-二乙基烟酰胺	50	0.67	33%
9.24	烟酸，钠盐	100	0.54	46%
9.25	生物素	20	0.69	31%

[0113] 实施例10:含有赋形剂组合和测试蛋白质的制剂的制备

[0114] 使用主要赋形剂化合物、次要赋形剂化合物和测试蛋白质制备制剂,其中测试蛋白质旨在模拟将在治疗性制剂中使用的治疗性蛋白质或将在非治疗性制剂中使用的非治疗性蛋白质。主要赋形剂化合物选自如下表5中所列的具有阴离子和芳族官能性的化合物。次要赋形剂化合物选自在pH 6下具有非离子或阳离子电荷并且具有咪唑啉或苯环的化合物,如下表5中所列的。在50mM组氨酸盐酸盐缓冲溶液中制备这些赋形剂的制剂以用于按以下方式进行的粘度测量。首先通过以下方式制备组氨酸盐酸盐:将1.94g组氨酸(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)溶解在蒸馏水中并用1M盐酸(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)将pH调节至约6.0,并且然后在容量瓶中用蒸馏水稀释至250mL的最终体积。然后将单独的主要或次要赋形剂化合物溶解于50mM组氨酸HCl中。将主要赋形剂和次要赋形剂的组合溶解于50mM组氨酸HCl中,并且将所得溶液的pH用少量浓缩氢氧化钠或盐酸进行调节以实现pH 6,之后进行模型蛋白的溶解。一旦已经如以上所述的那样制备了赋形剂溶液,就将测试蛋白(牛丙种球蛋白(BGG)(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO))以实现约280mg/mL的最终蛋白质浓度的比率溶解到每种测试溶液中。将BGG在具有赋形剂的50mM组氨酸HCl中的溶液配制于20mL小瓶中,并使其在定轨摇床工作台上以100rpm震荡过夜。然后将BGG溶液转移到2mL微量离心管,并且在IEC MicroMax微量离心机中以2300rpm离心10分钟以除去夹带的空气,之后进行粘度测量。

[0115] 用DV-IIT LV锥板式粘度计(Brookfield Engineering,Middleboro,MA)进行如上所述的那样制备的制剂的粘度测量。粘度计配备有CP-40锥体,并且在3rpm和25℃下操作。将制剂以0.5mL的体积装载到粘度计中,并且使其在给定的剪切速率和温度下孵育3分钟,随后进行二十秒的测量收集期。然后,随后进行2个另外的步骤,包括1分钟的剪切孵育和随后二十秒的测量收集期。然后将所收集的三个数据点求平均并记录为样品的粘度。相对于不具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度将具有赋形剂的溶液的粘度归一化,并且汇总在下表5中。归一化的粘度是具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度与不具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度的比率。实例显示,初级赋形剂和次级赋形剂的组合可比单一赋形剂产生更好的结果。

[0116] 表5

测试号	主要赋形剂		次要赋形剂		归一化的粘度
	名称	浓度(mg/mL)	名称	浓度(mg/mL)	
10.1	水杨酸	30	无	0	0.79
10.2	水杨酸	25	咪唑	4	0.59
10.3	4-羟基苯	30	无	0	0.61

[0117]

		甲酸				
[0118]	10.4	4-羟基苯 甲酸	25	咪唑	5	0.57
	10.5	4-羟基苯 磺酸	31	无	0	0.59
	10.6	4-羟基苯 磺酸	26	咪唑	5	0.70
	10.7	4-羟基苯 磺酸	25	咖啡 因	5	0.69
	10.8	无	0	咖啡 因	10	0.73
	10.9	无	0	咪唑	5	0.75

[0119] 实施例11:含有赋形剂组合和测试蛋白质的制剂的制备

[0120] 使用主要赋形剂化合物、次要赋形剂化合物和测试蛋白质制备制剂,其中测试蛋白质旨在模拟将在治疗性制剂中使用的治疗性蛋白质或将在非治疗性制剂中使用的非治疗性蛋白质。主要赋形剂化合物选自如下表6中所列的具有阴离子和芳族官能性的化合物。次要赋形剂化合物选自在pH 6下具有非离子或阳离子电荷并且具有咪唑啉或苯环的化合物,如下表6中所列的。在蒸馏水中制备这些赋形剂的制剂以用于按以下方式进行的粘度测量。将主要赋形剂和次要赋形剂的组合溶解于蒸馏水中,并且将所得溶液的pH用少量浓缩氢氧化钠或盐酸进行调节以实现pH 6,之后进行模型蛋白的溶解。一旦已经在蒸馏水中制备了赋形剂溶液,就将测试蛋白(牛丙种球蛋白(BGG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))以实现约280mg/mL的最终蛋白质浓度的比率进行溶解。将BGG在具有赋形剂的蒸馏水中的溶液配制于20mL小瓶中,并使其在定轨摇床工作台上以100rpm震荡过夜。然后将BGG溶液转移到2mL微量离心管,并且在IEC MicroMax微量离心机中以2300rpm离心10分钟以除去夹带的空气,之后进行粘度测量。

[0121] 用DV-IIT LV锥板式粘度计(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)进行如上所述的那样制备的制剂的粘度测量。粘度计配备有CP-40锥体,并且在3rpm和25℃下操作。将制剂以0.5mL的体积装载到粘度计中,并且使其在给定的剪切速率和温度下孵育3分钟,随后进行二十秒的测量收集期。然后,随后进行2个另外的步骤,包括1分钟的剪切孵育和随后二十秒的测量收集期。然后将所收集的三个数据点求平均并记录为样品的粘度。相对于不具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度将具有赋形剂的溶液的粘度归一化,并且汇总在下表6中。归一化的粘度是具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度与不具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度的比率。实例显示,初级赋形剂和次级赋形剂的组合可比单一赋形剂产生更好的结果。

[0122] 表6

测试号	主要赋形剂		次要赋形剂		归一化的粘度
	名称	浓度 (mg/mL)	名称	浓度 (mg/mL)	
[0123]	11.1	水杨酸	20	无	0.96
	11.2	水杨酸	20	咖啡因	0.71
	11.3	水杨酸	20	烟酰胺	0.76
	11.4	水杨酸	20	咪唑	0.73

[0124] 实施例12:含有赋形剂化合物和PEG的制剂的制备

[0125] 材料:所有材料均购自Sigma-Aldrich (St.Louis, MO)。使用赋形剂化合物和PEG制备制剂,其中PEG旨在模拟将在治疗性制剂中使用的治疗性聚乙二醇化蛋白质。通过将等体积的PEG溶液与赋形剂溶液混合来制备所述制剂。将两种溶液在pH为7.3的Tris缓冲液中制备,所述Tris缓冲液由10mM Tris、135mM NaCl、1mM反式肉桂酸组成。

[0126] 通过将3g平均Mw~1,000,000的聚(环氧乙烷) (Aldrich目录号372781) 与97g Tris缓冲溶液混合来制备PEG溶液。将混合物搅拌过夜以完全溶解。

[0127] 赋形剂溶液制备的实例如下:通过将0.4g柠檬酸 (Aldrich目录号251275) 溶解于5mL的Tris缓冲溶液中并且用最小量的10M NaOH溶液将pH调节至7.3来制备大约80mg/mL的柠檬酸在Tris缓冲液中的溶液。

[0128] 通过将0.5mL的PEG溶液与0.5mL的赋形剂溶液混合并且通过使用涡旋混合数秒来制备PEG赋形剂溶液。通过将0.5mL的PEG溶液与0.5mL的Tris缓冲溶液混合来制备对照样品。

[0129] 实施例13:含有赋形剂化合物和PEG的制剂的粘度测量

[0130] 用DV-IIT LV锥板式粘度计 (Brookfield Engineering, Middleboro, MA) 进行所制备的制剂的粘度测量。粘度计配备有CP-40锥体,并且在3rpm和25°C下操作。将制剂以0.5mL的体积装载到粘度计中,并且使其在给定的剪切速率和温度下孵育3分钟,随后进行二十秒的测量收集期。然后,随后进行2个另外的步骤,包括1分钟的剪切孵育和随后二十秒的测量收集期。然后将所收集的三个数据点求平均并记录为样品的粘度。

[0131] 结果呈现于表7中,显示了添加的赋形剂化合物在降低粘度方面的作用。

[0132] 表7

测试号	赋形剂	赋形剂浓度(mg/mL)	粘度(cP)	粘度降低量
13.1	无	0	104.8	0%
13.2	柠檬酸 Na 盐	40	56.8	44%
13.3	柠檬酸 Na 盐	20	73.3	28%
13.4	磷酸甘油	40	71.7	30%
13.5	磷酸甘油	20	83.9	18%
13.6	乙二胺	40	84.7	17%
13.7	乙二胺	20	83.9	15%
13.8	EDTA/K 盐	40	67.1	36%
13.9	EDTA/K 盐	20	76.9	27%
13.10	EDTA/Na 盐	40	68.1	35%
13.11	EDTA/Na 盐	20	77.4	26%
13.12	D-葡萄糖酸/K 盐	40	80.32	23%
13.13	D-葡萄糖酸/K 盐	20	88.4	16%
13.14	D-葡萄糖酸/Na 盐	40	81.24	23%
13.15	D-葡萄糖酸/Na 盐	20	86.6	17%
13.16	乳酸/K 盐	40	80.42	23%
13.17	乳酸/K 盐		85.1	19%
13.18	乳酸/Na 盐	40	86.55	17%
13.19	乳酸/Na 盐	20	87.2	17%
13.20	依替膦酸酸/K 盐	24	71.91	31%
13.21	依替膦酸酸/K 盐	12	80.5	23%
13.22	依替膦酸/Na 盐	24	71.6	32%
13.23	依替膦酸/Na 盐	12	79.4	24%

[0135] 实施例14:具有1条PEG链/BSA分子的聚乙二醇化BSA的制备

[0136] 向烧杯中添加200mL磷酸盐缓冲盐水(Aldrich目录号P4417)和4g BSA(Aldrich目录号A7906),并且用磁棒混合。接着,添加400mg甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺,MW=5,000,(Aldrich目录号63187)。使反应混合物在室温下反应过夜。第二天,添加20滴HCl 0.1M以终止反应。通过清楚地显示聚乙二醇化BSA的SDS-Page和SEC来表征反应产物。将反应混合物置于截留分子量(MWCO)为30,000的Amicon离心管中,并且浓缩至几毫升。接着,将样品用pH为大约6的50mM组氨酸缓冲液稀释20倍,随后进行浓缩直至获得高粘度流体。通过测量280nm处的吸光度并使用针对BSA的0.6678的消光系数来获得蛋白质溶液的最终浓度。结果表明,溶液中BSA的最终浓度为342mg/mL。

[0137] 实施例15:具有多条PEG链/BSA分子的聚乙二醇化BSA的制备

[0138] 通过将0.5g的BSA与100mL的缓冲液混合来制备BSA(AldrichA7906)在磷酸盐缓冲液(25mM,pH为7.2)中的5mg/mL溶液。接着,添加1g甲氧基PEG丙醛(Mw=20,000)(JenKem

Technology, Plano, TX75024), 随后添加0.12g氰基硼氢化钠(Aldrich 156159)。使反应物在室温下进行过夜。第二天, 将反应混合物用Tris缓冲液(10mM Tris、135mM NaCl, pH=7.3)稀释13倍, 并且使用MWCO为30,000的Amicon离心管进行浓缩, 直至达到大约150mg/mL的浓度。

[0139] 实施例16: 具有多条PEG链/溶菌酶分子的聚乙二醇化溶菌酶的制备

[0140] 通过将0.5g的溶菌酶与100mL的缓冲液混合来制备溶菌酶(Aldrich L6876)在磷酸盐缓冲液(25mM, pH为7.2)中的5mg/mL溶液。接着, 添加1g甲氧基PEG丙醛(Mw=5,000)(JenKem Technology, Plano, TX 75024), 随后添加0.12g氰基硼氢化钠(Aldrich 156159)。使反应物在室温下进行过夜。第二天, 将反应混合物用磷酸盐缓冲液(25mM, pH为7.2)稀释49倍, 并使用MWCO为30,000的Amicon离心管进行浓缩。通过测量280nm处的吸光度并使用针对溶菌酶的2.63的消光系数来获得蛋白质溶液的最终浓度。溶液中溶菌酶的最终浓度为140mg/mL。

[0141] 实施例17: 赋形剂对具有1条PEG链/BSA分子的聚乙二醇化BSA的粘度的影响

[0142] 通过将6或12毫克的赋形剂盐添加到0.3mL的聚乙二醇化BSA溶液来制备聚乙二醇化BSA(来自以上实施例14)与赋形剂的制剂。通过轻轻震荡将溶液混合, 并且通过配备有A10通道(100微米深度)的RheoSense microVisc以500/s的剪切速率测量粘度。在环境温度下完成粘度计测量。

[0143] 结果呈现于表8中, 显示了添加的赋形剂化合物在降低粘度方面的作用。

[0144] 表8

测试号	赋形剂	赋形剂浓度 (mg/mL)	粘度(cP)	粘度降低量
[0145]	17.1	无	228.6	0%
	17.2	硫酸化 α -环糊精Na盐	151.5	34%
	17.3	乙酸钾	89.5	60%

[0146] 实施例18: 赋形剂对具有多条PEG链/BSA分子的聚乙二醇化BSA的粘度的影响

[0147] 通过将8毫克的赋形剂盐添加到0.2mL的聚乙二醇化BSA溶液来制备聚乙二醇化BSA(来自以上实施例15)与作为赋形剂的柠檬酸Na盐的制剂。通过轻轻震荡将溶液混合, 并且通过配备有A10通道(100微米深度)的RheoSense microVisc以500/s的剪切速率测量粘度。在环境温度下完成粘度计测量。结果呈现于表9中, 显示了添加的赋形剂化合物在降低粘度方面的作用。

[0148] 表9

测试号	添加的赋形剂	赋形剂浓度 (mg/mL)	粘度(cP)	粘度降低量
[0149]	18.1	无	56.8	0%
	18.2	柠檬酸Na盐	43.5	23%

[0150] 实施例19: 赋形剂对具有多条PEG链/溶菌酶分子的聚乙二醇化溶菌酶的粘度的影

响

[0151] 通过将6毫克的赋形剂盐添加到0.3mL的聚乙二醇化溶菌酶溶液来制备聚乙二醇化溶菌酶(来自以上实施例16)与作为赋形剂的乙酸钾的制剂。通过轻轻震荡将溶液混合，并且通过配备有A10通道(100微米深度)的RheoSense microVisc以500/s的剪切速率测量粘度。在环境温度下完成粘度计测量。结果呈现于下表中，显示了添加的赋形剂化合物在降低粘度方面的益处。

[0152] 表10

[0153]

测试号	赋形剂	赋形剂浓度 (mg/mL)	粘度 (cP)	粘度降低量
19.1	无	0	24.6	0%
19.2	乙酸钾	20	22.6	8%

[0154] 实施例20:含有赋形剂组合的蛋白质制剂

[0155] 使用赋形剂化合物或两种赋形剂化合物的组合和测试蛋白质制剂，其中测试蛋白质旨在模拟将在治疗性制剂中使用的治疗性蛋白质。用不同赋形剂化合物于20mM组氨酸缓冲液中制备这些制剂以用于按以下方式进行的粘度测量。将赋形剂组合溶解于20mM组胺(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO)中，并且将所得溶液的pH用少量浓缩氢氧化钠或盐酸进行调节以实现pH 6，之后进行模型蛋白的溶解。在下表11中列出了此实施例的赋形剂化合物。一旦已经制备了赋形剂溶液，就将测试蛋白(牛丙种球蛋白或“BGG”(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO))以实现约280mg/mL的最终蛋白质浓度的比率进行溶解。将BGG在赋形剂溶液中的溶液配制于5mL无菌聚丙烯管中，并使其在定轨摇床工作台上以80-100rpm震荡过夜。然后将BGG溶液转移到2mL微量离心管，并且在IEC MicroMax微量离心机中以2300rpm离心10分钟以除去夹带的空气，之后进行粘度测量。

[0156] 用DV-IIT LV锥板式粘度计(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)进行如上所述的那样制备的制剂的粘度测量。粘度计配备有CP-40锥体，并且在3rpm和25°C下操作。将制剂以0.5mL的体积装载到粘度计中，并且使其在给定的剪切速率和温度下孵育3分钟，随后进行二十秒的测量收集期。然后，随后进行2个另外的步骤，包括1分钟的剪切孵育和随后二十秒的测量收集期。然后将所收集的三个数据点求平均并记录为样品的粘度。相对于不具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度将具有赋形剂的溶液的粘度归一化，并且将这些结果示出在下表11中。归一化的粘度是具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度与不具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度的比率。

[0157] 表11

测试号	赋形剂 A		赋形剂 B		归一化的粘度
	名称	浓度 (mg/mL)	名称	浓度 (mg/mL)	
[0158]	20.1	无	0	无	1.00
	20.2	阿斯巴甜	10	无	0.83
		糖精	60	无	0.51
	20.4	乙酰氨基磺酸钾	80	无	0.44
	20.5	茶碱	10	无	0.84
	20.6	糖精	30	无	0.58
	20.7	乙酰氨基磺酸钾	40	无	0.61
	20.8	咖啡因	15	牛磺酸	15
	20.9	咖啡因	15	酪胺	15
					0.67

[0159] 实施例21: 用于降低粘度和减少注射疼痛的含有赋形剂的蛋白质制剂

[0160] 使用赋形剂化合物、第二赋形剂化合物和测试蛋白质制剂，其中测试蛋白质旨在模拟将在治疗性制剂中使用的治疗性蛋白质。第一赋形剂化合物赋形剂A选自具有局部麻醉特性的化合物的组。第一赋形剂赋形剂A和第二赋形剂赋形剂B列于表12中。使用赋形剂A和赋形剂B按以下方式在20mM组氨酸缓冲液中制备这些制剂，使得可测量它们的粘度。将表12中公开的量的赋形剂溶解于20mM组胺(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)中，并且将所得溶液的pH用少量浓缩氢氧化钠或盐酸进行调节以实现pH 6，之后进行模型蛋白的溶解。一旦已经制备了赋形剂溶液，就将测试蛋白(牛丙种球蛋白或“BGG”(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))以实现约280mg/mL的最终蛋白质浓度的比率溶解在赋形剂溶液中。将BGG在赋形剂溶液中的溶液配制于5mL无菌聚丙烯管中，并使其在定轨摇床工作台上以80-100rpm震荡过夜。然后将BGG-赋形剂溶液转移到2mL微量离心管，并且在IEC MicroMax微量离心机中以2300rpm离心约10分钟以除去夹带的空气，之后进行粘度测量。

[0161] 用DV-II T LV锥板式粘度计(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)进行如上所述的那样制备的制剂的粘度测量。粘度计配备有CP-40锥体，并且在3rpm和25°C下操作。将制剂以0.5mL的体积装载到粘度计中，并且使其在给定的剪切速率和温度下孵育3分钟，随后进行二十秒的测量收集期。然后，随后进行2个另外的步骤，包括1分钟的剪切孵育和随后二十秒的测量收集期。然后将所收集的三个数据点求平均并记录为样品的粘度。相对于不具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度将具有赋形剂的溶液的粘度归一化，并且将这些结果示出在下表12中。归一化的粘度是具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度与不具有赋形剂的模型蛋白质溶液的粘度的比率。

[0162] 表12

测试号	赋形剂 A		赋形剂 B		归一化的粘度
	名称	浓度 (mg/mL)	名称	浓度 (mg/mL)	
[0163]	21.1 无	0	无	0	1.00
	21.2 利多卡因	45	无	0	0.73
	21.3 利多卡因	23	无	0	0.74
	21.4 利多卡因	10	咖啡因	15	0.71
	21.5 普鲁卡因 HCl	40	无	0	0.64
	21.6 普鲁卡因 HCl	20	咖啡因	15	0.69

[0164] 实施例22:含有赋形剂化合物和PEG的制剂

[0165] 使用赋形剂化合物和PEG制备制剂,其中PEG旨在模拟将在治疗性制剂中使用的治疗性聚乙二醇化蛋白质,并且其中以如表13中所列的量提供所述赋形剂化合物。通过将等体积的PEG溶液与赋形剂溶液混合来制备这些制剂。将两种溶液在DI水中制备。

[0166] 通过将16.5g平均Mw~100,000的聚(环氧乙烷)(Aldrich目录号181986)与83.5g DI水混合来制备PEG溶液。将混合物搅拌过夜以完全溶解。

[0167] 赋形剂溶液通过这种一般方法并且如下表13所详述的那样来制备:通过将0.05g磷酸钾溶解在5mL DI水中来制备磷酸三钾(Aldrich目录号P5629)在DI水中的大约20mg/mL溶液。通过将0.5mL的PEG溶液与0.5mL的赋形剂溶液混合并且通过使用涡旋混合数秒来制备PEG赋形剂溶液。通过将0.5mL的PEG溶液与0.5mL的DI水混合来制备对照样品。测量粘度并且将结果记录于下表13中。

[0168] 表13

测试号	赋形剂	赋形剂浓缩 (mg/mL)	粘度(cP)	粘度降低量(%)
[0169]	22.1 无	0	79.7	0
	22.2 柠檬酸Na盐	10	74.9	6.0
	22.3 磷酸钾	10	72.3	9.3
	22.4 柠檬酸Na盐/磷酸钾	10/10	69.1	13.3
	22.5 硫酸钠	10	75.1	5.8
	22.6 柠檬酸Na盐/硫酸钠	10/10	70.4	11.7

[0170] 实施例23:具有赋形剂的蛋白质溶液的处理改善

[0171] 通过将0.25g固体BGG(Aldrich目录号G5009)与4mL缓冲溶液混合来制备两种BGG溶液。对于样品A:缓冲溶液为20mM组氨酸缓冲液(pH=6.0)。对于样品B:缓冲溶液为含有15mg/mL咖啡因(pH=6)的20mM组氨酸缓冲液。通过将样品置于以100rpm设定的定轨摇床中

来进行固体BGG的溶解。观察到含有咖啡因赋形剂的缓冲样品使蛋白质更快地溶解。对于具有咖啡因赋形剂的样品(样品B),在15分钟内实现了BGG的完全溶解。对于没有咖啡因的样品(样品A),溶解需要35分钟。

[0172] 接着,将样品置于具有30,000截留分子量的2个单独的Amicon Ultra 4离心过滤器装置中,并将样品在2,500rpm下以10分钟间隔离心。记录每10分钟离心运行后所回收的滤液体积。表14中的结果显示样品B的滤液回收更快。此外,样品B随着每次附加的运行保持浓缩,但是样品A达到最大浓度点并且进一步的离心产生进一步的样品浓度。

[0173] 表14

离心时间(min)	收集的样品A 滤液(mL)	收集的样品B滤 液(mL)
10	0.28	0.28
20	0.56	0.61
30	0.78	0.88
40	0.99	1.09
50	1.27	1.42
60	1.51	1.71
70	1.64	1.99
80	1.79	2.29
90	1.79	2.39
100	1.79	2.49

[0175] 实施例24:含有多种赋形剂的蛋白质制剂

[0176] 此实施例显示作为赋形剂的咖啡因和精氨酸的组合如何对降低BGG溶液的粘度具有有益影响。通过将0.18g固体BGG(Aldrich目录号G5009)与pH 6下的0.5mL 20mM组氨酸缓冲液混合来制备四种BGG溶液。每种缓冲溶液含有如下表中所述的不同的赋形剂或赋形剂组合。如先前实施例所述的那样测量溶液的粘度。结果显示,受阻胺赋形剂咖啡因可与已知赋形剂诸如精氨酸组合,并且所述组合比单独赋形剂本身具有更好的降粘特性。

[0177] 表15

样品	添加的赋形剂	粘度(cP)	粘度降低量(%)
A	无	130.6	0
B	咖啡因(10 mg/ml)	87.9	33
C	咖啡因(10 mg/ml)/精氨酸(25 mg/ml)	66.1	49
D	精氨酸(25 mg/ml)	76.7	41

[0179] 将精氨酸添加到BGG在pH 6下的组氨酸缓冲液中的280mg/mL溶液。如表16中所示,在高于50mg/mL的水平下,添加更多的精氨酸未进一步降低粘度。

[0180] 表16

添加的精氨酸(mg/mL)	粘度(cP)	粘度降低量(%)
0	79.0	0%

53	40.9	48%
79	46.1	42%
105	47.8	40%
132	49.0	38%
158	48.0	39%
174	50.3	36%
211	51.4	35%

[0182] 将咖啡因添加到BGG在pH 6下的组氨酸缓冲液中的280mg/mL溶液。如表17中所示，在高于10mg/ml的水平下，添加更多的咖啡因未进一步降低粘度。

[0183] 表17

[0184] 添加的咖啡因 (mg/mL)	粘度 (cP)	粘度降低量 (%)
0	79	0%
10	60	31%
15	62	23%
22	50	45%

[0185] 等效方案

[0186] 虽然本文已经公开了本发明的具体实施方案，但是以上说明书是说明性的，并非限制性的。虽然已经具体显示并且参考其优选实施方案描述了本发明，但是本领域技术人员会理解可以在形式和细节中作多种改变而不脱离由附加的权利要求涵盖的本发明的范畴。在阅读本说明书之后，本发明的许多变化对于本领域技术人员而言将变得显而易见。除非另外指明，否则如本说明书和权利要求书中所用的表示反应条件、成分的量等的所有数字应理解为在所有情况下都由术语“约”来修饰。因此，除非有相反的指示，否则本文所陈述的数值参数均是近似值，所述近似值可根据本发明要寻求获得的所需特性而变化。