



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118829726 A

(43) 申请公布日 2024.10.22

(21) 申请号 202380025476.8

(22) 申请日 2023.03.08

(30) 优先权数据

10-2022-0029068 2022.03.08 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2023/003188 2023.03.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/172070 KO 2023.09.14

(71) 申请人 科纳斯特股份有限公司

地址 韩国大邱广域市

(72) 发明人 崔治民 柳忠善 金成姬

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

专利代理师 韩香花 庞东成

(51) Int.Cl.

C12N 9/96 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

权利要求书1页 说明书22页

(54) 发明名称

包含胶原酶、钙、组氨酸及甘氨酸的组合物及胶原酶的稳定化方法

(57) 摘要

本发明提供一种酶的稳定化方法,包括向包含作为酶的胶原酶(Collagenase)、作为辅酶的钙、组氨酸(Histidine)以及甘氨酸(Glycine)的组合物及胶原酶追加组氨酸及甘氨酸来制备组合物的步骤。根据上述本发明的酶组合物及酶的稳定化方法,可以提供如下剂型:可以最小化或抑制酶的凝集,即使长期保管时也不降低冷冻干燥的酶的浓度,液态复原时间和含湿度优秀,酶的活性也优秀。

1. 一种组合物,其特征在于,包含:
作为酶的胶原酶(Collagenase);
作为辅酶的钙;
作为剂型添加剂的组氨酸(Histidine);以及
作为剂型添加剂的甘氨酸(Glycine)。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,以组合物的总重量为基准,上述胶原酶的含量为0.3重量百分比至20.8重量百分比。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,以钙盐形式包含上述钙。
4. 根据权利要求1或3所述的组合物,其特征在于,以组合物的总重量为基准,上述钙或钙盐的含量为0.4重量百分比至28重量百分比。
5. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,以组合物的总重量为基准,上述组氨酸的含量为0.4重量百分比至29.9重量百分比。
6. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,以组合物的总重量为基准,上述甘氨酸的含量为15重量百分比至94.6重量百分比。
7. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,还包含海藻糖(Trehalose)作为剂型添加剂。
8. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,还包含聚山梨醇酯-20(polysorbate20: PS20)作为表面活性剂(Surfactant)。
9. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述组合物的pH为6.0至7.0。
10. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述组合物为冷冻干燥的剂型。
11. 一种溶液,其特征在于,通过混合权利要求10所述的冷冻干燥的组合物与稀释液来制备。

包含胶原酶、钙、组氨酸及甘氨酸的组合物及胶原酶的稳定化方法

技术领域

[0001] 本发明涉及包含胶原酶、钙、组氨酸及甘氨酸的组合物及酶的稳定化方法,更具体地,涉及通过包含胶原酶、钙、组氨酸及甘氨酸来增大稳定性的组合物及利用其的胶原酶的稳定化方法。

背景技术

[0002] 胶原为哺乳动物有机体的主要结构成分,构成动物体的皮肤及其他部分的总蛋白质含量的大部分。在人类中,这在伤口治疗过程及自然老化过程中尤为重要。烧伤、手术、感染及事故等多种皮肤外伤的特征在于,经常给胶原带来纤维的不规则积聚及增加的蛋白多糖含量。在受损或受破坏的正常组织的交替以外,治疗过程中时常形成新组织的过度且形状受损的沉着。这是因为过度的胶原沉着导致胶原合成与胶原分解之间的失衡。

[0003] 大多数疾病及疾患与过度的胶原沉着及胶原中丰富纤维组织的不规则积聚相关。这样的疾病及疾患概括性地称为“胶原介导的疾病”。胶原酶(collagenase)用来治疗多种胶原介导的疾病。胶原酶为具有消化胶原的特定能力的酶。

[0004] 治疗中使用的胶原酶可以从包括哺乳动物(例如,人类)、甲壳动物(例如,蟹、虾等)、菌类及细菌(例如,由梭菌属、链霉菌属、假单胞菌属或弧菌属发酵而成)在内的多种供应源获得。胶原酶可以通过基因工程处理。未纯化的胶原酶的一普通的供应源为细菌发酵工程,具体地,通过溶组织梭菌(*C.histoliticum*)的发酵来获得。从溶组织梭菌获得的未纯化的胶原酶可以利用大多数色谱技术来纯化。

[0005] 另一方面,包含酶的蛋白质会因生理不稳定性(例如,变性、凝集物的形成等)及水解、氧化及脱酰胺化等化学不稳定性而最终可丧失产物的生物活性。蛋白质的稳定性还受到pH、温度、保存期间及冷冻-解冻周期的数量等因素的影响。

[0006] 为了保障稳定性,治疗用蛋白制剂通常以在使用前溶解在单独包装的水溶性稀释剂(diluent,根据情况的不同还称为“溶剂”)中的冷冻干燥的蛋白质或包含用于提高稳定性的添加剂的蛋白质溶液的方式来供应。例如,提出的方案有在配制蛋白质溶液时有效的游离氨基酸(例如,亮氨酸、色氨酸、丝氨酸、精氨酸及组氨酸)等添加剂。当前市面上可利用的一部分蛋白质制剂包含蛋白质作为稳定剂。例如,在蛋白质溶液中,人血清白蛋白或纯化的明胶用来抑制化学及物理变化。但是,这些蛋白质的添加包括用来去除病毒污染的复杂的过程。

[0007] 并且,尽管冷冻干燥是用来保障稳定性的又一种方法,但该过程增加制备成本,冷冻干燥的蛋白质必须在使用前溶解,具有因不适当的给药而增加的风险。冷冻干燥的目的在于,有害的物理或化学反应经常在水性相中发生,因此从制剂中去除水分。即,因水性的液体中稳定性降低,因此进行冷冻干燥,但即使冷冻干燥也存在上述问题,在保管的稳定性上也存在问题。

[0008] 另一方面,在以作为酶的胶原酶为对象来制备液体剂型的情况下,存在因急性应

激(Acute stress)而产生水溶性凝集物的问题。并且,即使冷冻干燥也存在浓度降低的问题,会延缓液态复原(Reconstitution)时间或提高含湿度,在一部分情况下还具有降低酶活性的缺点,因此,存在难以配制为粉末状的问题。进而,胶原酶需要钙作为辅酶,若加入钙来制备胶原酶冷冻干燥粉末,则无法正常制备冷冻粉末,还会发生无法正常保存为我们所希望的胶原酶的规格的问题,从而使粉末状剂型的开发难上加难。

[0009] 因此,目前大部分上市的胶原酶剂型将胶原酶冷冻干燥粉末与含钙的缓冲液分别装入不同的小瓶中来出库后,在使用之前将它们混合制备为注射用成品来使用。即,若将钙包含在胶原酶中来制备冷冻干燥粉末,则无需额外制备含钙的缓冲液,为了制备注射用成品,在使用前只简单地使用注射用水(water for injection)即可,从而具有可以显著降低制备成本的优点。然而,这种技术的开发目前仍有不足。

[0010] 于是,本发明中将开发并提供不发生上述问题的“钙添加胶原酶冷冻干燥粉末”的技术。

[0011] 主要的现有的相关专利有PCT国际专利公报第W0 2020-142701号(2020年07月09日公开)。

发明内容

[0012] 所要解决的课题

[0013] 本发明的目的在于,开发并提供如下粉末剂型:尽管通过加入钙来制备胶原酶冷冻干燥粉末,但通过加入本发明中所考虑的各种剂型添加剂来使胶原酶的凝集最小化,即使在长期保管时也不降低冷冻干燥的酶的浓度,液态复原时间(溶解时间)和含湿度优秀,还能够优秀地保持及复原酶的活性。

[0014] 用于解决课题的手段

[0015] 本发明提供一种组合物,包含:作为酶的胶原酶;作为辅酶的钙;作为剂型添加剂的组氨酸(Histidine);作为剂型添加剂的甘氨酸(Glycine)。

[0016] 在本发明的组合物中,优选地,以组合物的总重量为基准,上述胶原酶的含量为0.3重量百分比至20.8重量百分比。

[0017] 在本发明的组合物中,优选地,以钙盐形式包含上述钙。

[0018] 在本发明的组合物中,优选地,以组合物的总重量为基准,上述钙或钙盐的含量为0.4重量百分比至28重量百分比。

[0019] 在本发明的组合物中,优选地,以组合物的总重量为基准,上述组氨酸的含量为0.4重量百分比至29.9重量百分比。

[0020] 在本发明的组合物中,优选地,以组合物的总重量为基准,上述甘氨酸的含量为15重量百分比至94.6重量百分比。

[0021] 优选地,本发明的组合物还包含海藻糖(Trehalose)作为剂型添加剂。

[0022] 优选地,本发明的组合物还包含聚山梨醇酯-20(polysorbate20:PS20)作为表面活性剂(Surfactant)。

[0023] 在本发明的组合物中,优选地,上述组合物的pH为6.0至7.0。

[0024] 在本发明的组合物中,优选地,上述组合物为冷冻干燥的剂型。

[0025] 本发明提供一种通过混合上述冷冻干燥的本发明组合物与稀释液来制备的溶液。

[0026] 发明效果

[0027] 本发明具有如下效果：尽管通过使用本发明中开发的多种剂型添加剂来制备添加钙的状态的胶原酶冷冻干燥粉末，但即使施加急性应激时也能够最小化或抑制水溶性凝集物的产生。并且，具有在长期保管时，不降低冷冻干燥的胶原酶的浓度，高水平低保持酶的活性的效果。同时，本发明的组合物具有可以使使用注射用水溶解冷冻干燥制剂的时间最小化，能够降低冷冻干燥时的含湿度的效果。进而，上述本发明的组合物在使用注射用水溶解冷冻干燥制剂后也可以在常温下延长保持活性的时间，在分割使用液体制剂时也可以长期保持稳定，从而可以在将组合物包装在小瓶中时提高酶的稳定性并使吸附在小瓶中的量最小化。

[0028] 并且，从经济层面来说，本发明的技术无需制备额外的含钙溶液，因此，具有可以更为经济地制备胶原酶剂型的优点。

具体实施方式

[0029] 本发明可以施加多种变换并具有多种实施例，将在附图中例示特定实施例并加以详细说明。但这并不意味着将本发明限定于特定实施形态，应该理解的是，本发明包括本发明的思想及技术范围所包含的所有变换、同等物以及替代物。在本发明的说明过程中，当判断相关公知技术的具体说明有可能不必要地混淆本发明的要旨时，将省略其详细说明。

[0030] 本说明书中使用的术语仅为说明特定实施例而使用，而非出于限定本发明的意图。若上下文没有其他说明，则单数的表达包括复数的表达。在本申请中，“包含”或“具有”等术语应理解为用来表示说明书中记载的特征、数字、步骤、操作、结构要素、配件或它们的组合的存在，而不是预先排除一个以上其他特征、数字、步骤、操作、结构要素、配件或它们的组合的存在或附加可能性。

[0031] 可以在说明多种结构要素的过程中使用“第一”、“第二”等术语，但上述结构要素不限于上述术语。上述术语以将一个结构要素区别于其他结构要素的目的来使用。

[0032] 本发明的一实施方式为一种组合物，包含：作为酶的胶原酶；作为辅酶的钙；作为剂型添加剂的组氨酸；作为剂型添加剂的甘氨酸。

[0033] 胶原酶通过钙离子 (Ca^{2+}) 形成结构稳定性，处于增加亲和度等目的而需要钙离子作为辅酶。钙离子的供应通常通过钙盐来实现，氯化钙为代表性的多为使用的钙盐。然而，氯化钙因本身具有潮解性而具有加入水溶液时妨碍冷冻的特性。因此，在开发氯化钙添加冷冻干燥剂型时，为了提高胶原酶的稳定性，只有开发特殊的剂型才能顺利地进行冷冻过程。并且，只有使用特殊的剂型才能在冷冻后真空状态下进行干燥时克服氯化钙的潮解性并充分地去除水分来完成干燥。

[0034] 由于难以在添加氯化钙的状态下进行冷冻干燥，因此通常将冷冻干燥的胶原酶小瓶与用于溶解其并供应钙离子的溶剂小瓶以分离的形态来提供。在提供两个小瓶的情况下，引起制备成本的上升，而若开发添加氯化钙形态的胶原酶剂型，则具有便于制备并节减制备成本的优点，本发明中将开发该技术。

[0035] 在一实例中，本发明中用作酶的胶原酶，可以为例如胶原酶 I、胶原酶 II 或它们的混合物，但不限于此。

[0036] 优选地，本发明中用作辅酶 (Cofactor) 的钙可以为钙盐，例如，可以为氯化钙

(Calcium chloride)。上述钙起到用于上述胶原酶活性的辅酶作用。即,钙可以作为对于酶的激活剂或保护因子来起作用,1摩尔的酶可以通过0.1摩尔钙离子(Ca^{2+})来稳定胶原酶的活性,4个钙离子可以促进胶原酶与胶原分子的结合。

[0037] 本发明的特征在于,包含作为剂型添加剂的组氨酸及作为剂型添加剂的甘氨酸。

[0038] 本发明中的术语“剂型添加剂”是指能够形成、保持本发明的剂型或者解决在没有该添加剂时可能发生的剂型上的问题的化合物。

[0039] 本发明中用作剂型添加剂的组氨酸起到缓冲液构成成分的作用。优选地,使用L-组氨酸。以往,为了在药物组合物中调节pH而使用多种缓冲液。如在后述的实施例中确认的,本发明人利用磷酸钠(Sodium phosphate)、乙酸钠(Sodium acetate)、琥珀酸盐(Succinate)、组氨酸及Tris作为用于剂型缓冲的缓冲液来进行多种实验。结果,利用磷酸钠作为缓冲液时,观察到磷酸钙等沉淀物,确认到与其他缓冲液相比,利用组氨酸时纯度及效价稳定性最为优秀。

[0040] 本发明中用作剂型添加剂的甘氨酸起到增量剂(Bulking agent)的作用。以往,药物组合物中使用多种糖、氨基糖、糖醇、氨基酸作为增量剂。例如,有葡萄糖、甘露糖、半乳糖、果糖、山梨糖等单糖类,蔗糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖等二糖类,棉子糖等三糖,木糖醇、山梨醇、甘露醇、肌醇等糖醇等。氨基酸主要使用甘氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸等碱性氨基酸。如可以在后述实施例中确认的,本发明人利用甘露醇和甘氨酸作为用于剂型缓冲的增量剂来进行多种实验。结果,确认到使用甘露醇作为增量剂时具有在温度加速条件下发生减少浓度、延缓液态复原时间、高含湿度、增加高分子量物质(HMWS)(%)及增加微粒浓度等问题,与其他增量剂相比,而利用甘氨酸时纯度及效价稳定性最为优秀。即,本发明的特征在于,包含甘氨酸作为剂型添加剂,可以使使用注射用水时冷冻干燥制剂液态复原的时间最小化,还具有可以在冷冻干燥时降低含湿度的效果。

[0041] 并且,在一实例中,本发明还可以包含海藻糖作为剂型添加剂。用作剂型添加剂的海藻糖起到张力调节剂的作用。优选地,使用海藻糖二水合物(Trehalose dihydrate)。通常,张力调节剂在药物组合物中具有保护剂的功能,是指为增加活性物质在干燥过程或之后的稳定性或者为干式粉末长期储存而添加的化合物或物质。适当的保护剂通常易溶于溶液,不会变稠或因与水接触而被中和。

[0042] 例如,适当的保护剂包括:人和牛的血清白蛋白、蛋清、明胶、免疫球蛋白、乳清蛋白(whey protein)、大豆蛋白、酪氨酸盐(caseinate)、明胶、免疫球蛋白等蛋白质;单糖类(半乳糖、D-甘露糖、山梨糖等)、二糖类(乳糖、海藻糖、蔗糖等)等碳水化合物;谷氨酸钠(monosodium glutamate)、赖氨酸、甘氨酸、丙氨酸、精氨酸、组氨酸等氨基酸以及疏水性氨基酸(色氨酸、酪氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等);甜菜碱等甲胺;硫酸镁等赋形剂盐;三元以上的糖(sugar)醇等多元醇(polyol)(例如,甘油、赤藓糖醇、丙三醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨醇、甘露醇);丙二醇;聚乙二醇;普流罗尼(pluronic);表面活性剂;以及它们的混合物。但不限于此。

[0043] 如可以在后述实施例中确认的,本发明人利用氯化钠(NaCl)、山梨醇(Sorbitol)及海藻糖作为渗透调节剂来进行多种实验。结果,确认到利用氯化钠或山梨醇作为渗透调节剂时,因减少有效成分的浓度或含量,或者分解有效成分而降低稳定性,而利用海藻糖时,即使在最高的温度中保管也保持稳定性。海藻糖为2个分子的葡萄糖通过 $\alpha(1\rightarrow1)\alpha$ 糖苷

键连接而形成的非还原糖。由于这样的结合,海藻糖对酸水解具有非常强的抵抗性,即使在高的温度和酸性条件下也示出具有稳定性。

[0044] 在一实例中,本发明的组合物的pH可以为6.0至7.0。如上所述,本发明的特征在于,包含组氨酸作为缓冲液(Buffer),本发明人确认到组合物的pH可以随着所使用的缓冲液的种类的不同而不同。因此,当本发明的组合物的pH为6.0至7.0时,纯度及效价稳定性最为优秀。

[0045] 据此,在本发明的组合物中,缓冲液只要是能够与组氨酸相似地具有6.5左右的pH值的就不受特别限制,可以替代或追加使用除组氨酸以外的其他种类的缓冲液。例如,可以为pH 6.5使用的缓冲液还有2-吗啉乙磺酸(MES)、Bis-Tris、N-(2-乙酰氨基)亚氨基二乙酸(ADA)、ACES、哌嗪-1,4-二乙磺酸(PIPES)、3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸(MOPSO)、1,3-二[三(羟甲基)甲氨基]丙烷(Bis-Tris Propane)等。

[0046] 在一实例中,本发明的组合物可以包含聚山梨醇酯-20作为表面活性剂。

[0047] 通常,药物组合物中使用表面活性剂。追加表面活性剂时,可以通过减少界面间的张力来减少蛋白质的分解倾向,或者可以通过减少存在于界面的蛋白质的量来溶解蛋白质。并且,表面活性剂的添加还可以从表面诱导变性及凝集中保护蛋白质。

[0048] 因此,本发明的组合物可以不受特别限制地使用本发明所属技术领域中的多种表面活性剂。例如,可以包含聚山梨醇酯20或80(PS20或PS80)、泊洛沙姆188(普兰尼克68)、聚氧乙烯-聚氧丙烯聚合物、例如吐温20(Tween,注册商标)或亲水性聚氧乙烯头基与疏水性脂肪酸尾形成的非离子性等表面活性剂。本发明人在测试多种表面活性剂后,确认到聚山梨醇酯-20(PS20)最为有效。

[0049] 在一实例中,本发明的组合物可以为冷冻干燥的剂型。并且,上述组合物可以为用于冷冻干燥剂型的稳定化。

[0050] 上述冷冻干燥剂型为包含作为酶的胶原酶、作为辅酶的钙、作为剂型添加剂的组氨酸及作为剂型添加剂的甘氨酸的组合物被冷冻干燥的固体剂型。

[0051] 并且,本发明中上述组合物可以为将冷冻干燥的溶液的剂型或者从冷冻干燥的组合物与稀释液制备的溶液的剂型。即,可以为除酶、组氨酸及甘氨酸以外还包含溶剂的冷冻干燥前的溶液,或者将冷冻干燥的固体制剂溶于稀释液来制备的液体制剂。上述稀释液可以为注射用水。在一实例中,上述溶液中的胶原酶的浓度可以根据所使用的适应症以多种浓度来溶液化,例如,可以溶液化为2.9mg/mL、2.3mg/mL、0.225mg/mL的浓度。

[0052] 在包含酶的组合物为冷冻干燥的固体制剂的情况下,有关酶活性的稳定性优秀。在包含酶的组合物为液体制剂的情况下,与固体制剂相比,虽然酶活性的稳定度减少,但本发明的组合物即使在液体制剂中也保持酶活性的稳定度。即,根据本发明,在使用注射用水使冷冻干燥制剂液态复原后在常温下也可以延长保持活性的时间,因此,在分割使用液体制剂时也可以长期保持稳定性,可以在将组合物小瓶包装时提高酶的稳定性并减少吸附于小瓶的量。

[0053] 在一实例中,以组合物的总重量为基准,本发明中上述胶原酶的含量可以为0.3重量百分比至20.8重量百分比。或者,每个3cc小瓶中可以包含0.09mg至9mg的酶。所添加的胶原酶的量可以根据适应症多种多样地变化来使用。但应以能够发挥其效果为前提,在不发生副作用的范围内使用。

[0054] 在一实例中,以组合物的总重量为基准,上述钙或钙盐的含量可以为0.4重量百分比至28重量百分比。或者,每个3cc的小瓶中可以包含0.132mg至13.2mg的钙或钙盐。若钙或钙盐的含量小于上述范围,会因辅酶功能不足而降低酶的活性度,若大于上述范围,则具有会产生过多的沉淀物或凝集物的缺点。

[0055] 在一实例中,以组合物的总重量为基准,上述组氨酸的含量可以为0.4重量百分比至29.9重量百分比。或者,每个3cc的小瓶中可以包含0.144mg至14.4mg的组氨酸。若组氨酸的含量小于上述范围,则会因组合物的pH变化而降低效价稳定性,若大于上述范围,则具有会产生过多的沉淀物或凝集物的缺点。

[0056] 在一实例中,相对于组合物的总重量,上述甘氨酸的含量可以为15重量百分比至94.6重量百分比。或者,每个3cc的小瓶中可以包含2.25mg至225mg的甘氨酸。若甘氨酸的含量小于上述范围,则会在高温中长期保管时降低稳定性,若大于上述范围,则具有会产生过多的沉淀物或凝集物的缺点。

[0057] 在一实例中,相对于组合物的总重量,上述海藻糖的含量可以为3.3重量百分比至77.4重量百分比。或者,每个3cc的小瓶中可以包含0.90mg至90mg的海藻糖。若海藻糖的含量小于上述范围,则会因对酸水解的抵抗性变弱而在高温中长期保管时降低稳定性,若大于上述范围,则具有会产生过多的沉淀物或凝集物的缺点。

[0058] 在一实例中,相对于组合物的总重量,上述聚山梨醇酯-20的含量可以为0.03重量百分比至2.5重量百分比。或者,每个3cc的小瓶中可以包含0.009mg至0.9mg的聚山梨醇酯-20。若聚山梨醇酯-20的含量小于上述范围,则会很快发生酶的变性,若大于上述范围,则具有会产生过多的沉淀物或凝集物的缺点。

[0059] 本发明的另一实施形态为一种胶原酶的稳定化方法,包括:通过向作为酶的胶原酶、作为辅酶的钙追加作为剂型添加剂的组氨酸及作为剂型添加剂的甘氨酸来制备组合物的步骤;以及冷冻干燥上述制备的组合物的步骤。

[0060] 首先,通过向作为酶的胶原酶追加组氨酸及甘氨酸来制备组合物。以组合物的总重量为基准,优选地,上述胶原酶的含量为0.3重量百分比至20.8重量百分比,以组合物的总重量为基准,优选地,追加0.4重量百分比至29.9重量百分比的上述组氨酸,以组合物的总重量为基准,追加15重量百分比至94.6重量百分比的上述甘氨酸。

[0061] 本发明中使用的酶、辅酶、组氨酸、甘氨酸、海藻糖、聚山梨醇酯-20 (PS20) 与上述内容相同。可以通过追加作为剂型添加剂的组氨酸及甘氨酸来使组合物在固体状或液体状时保持酶的稳定性。

[0062] 而且,冷冻干燥上述制备的组合物。冷冻干燥可以通过本发明所属技术领域中已知的任意方法来进行。

[0063] 然后,可以通过将上述冷冻干燥的组合物溶解在稀释液中来制备溶液。在将本发明的组合物形成为液体制剂的情况下,仍保持酶的活性。

[0064] 这样的本发明提供酶的稳定化方法,包括向酶追加组氨酸及甘氨酸来制备组合物的步骤。根据本发明的上述酶的稳定化方法,可以提供如下剂型:可以最小化或抑制酶的凝集,即使长期保管时也不降低冷冻干燥的酶的浓度,液态复原时间和含湿度优秀,酶的活性也优秀。

[0065] 通过下述实施例可以更好地理解本发明,下述实施例仅用于例示本发明的目的,

而不是要限制由随附的发明要求保护范围限定的保护范围。

[0066] 实施例1:原料(material)的准备

[0067] 本实施例中使用胶原酶作为药理有效成分(API)酶。即,分别准备重组胶原酶I(Collagenase I,CNXT1)和重组胶原酶II(Collagenase II,CNXT2),获得CNXT1原液和CNXT2原液后将它们混合来制备胶原酶混合溶液(CNT201)。

[0068] 具体地,上述重组胶原酶I(CNXT1)和重组胶原酶II(CNXT2)分别通过如下方式制备:将包含编码外来蛋白质(胶原酶I即胶原酶II)的基因的表达载体导入大肠杆菌细胞株来获得转化体,利用该转化体表达外来蛋白质后,经过培养、回收即纯化工序制备高纯度的胶原酶I及胶原酶II溶液。在上述过程中纯化工序的最后步骤中,向之前步骤中获得的重组胶原酶I(CNXT1)和重组胶原酶II(CNXT2)分别替换混合组氨酸与氯化钙的缓冲液,从而获得如下CNXT1原液及CNXT2原液。

[0069] (1) CNXT1原液:2.03mg/mL的CNXT1(重组胶原酶I)、10mM的L组氨酸(L-Histidine)、10mM的氯化钙,pH 7.0。

[0070] (2) CNXT2原液:1.97mg/mL的CNXT2(重组胶原酶II)、10mM的L组氨酸、10mM的氯化钙,pH 7.0。

[0071] 然后,以蛋白质重量为基准,将上述CNXT1原液与CNXT2原液以相同的量混合来制备胶原酶的浓度为2.00mg/mL的混合溶液(CNT201)。

[0072] 此外,CNT201的剂型即成分中使用的化学成分及原料如下。

[0073] (1)L-组氨酸(L-Histidine):J.T.Baker公司,Cat#2080-05,Batch#0000181214

[0074] (2)氯化钙二水合物(Calcium Chloride Dihydrate):西格玛公司(Sigma),Cat#12022-1KG,Lot#BCCB9183

[0075] (3)超精制聚山梨醇酯20(Super Refined Polysorbate 20):禾大公司(Croda),Cat#SR40606,Batch#0001204756

[0076] (4)超精制聚山梨醇酯80(Super Refined Polysorbate 80):禾大公司Cat#SR48833,Batch#0001603779

[0077] (5)泊洛沙姆188(Poloxamer 188):品谱公司(Spectrum),Cat#P1169,Batch#2EK0152

[0078] (6)甘氨酸:J.T.Baker公司,Cat#0581-01,Batch#0000226798

[0079] (7)琥珀酸(Succinic Acid):西格玛公司,Cat#398055-1KG,SLBZ5010

[0080] (8)甘露醇(Mannitol):J.T.Baker公司,Cat#2553-01,Batch#0000253262

[0081] (9)琥珀酸二钠六水合物(Sodium Succinate dibasic hexahydrate):西格玛公司,Cat#S2378-1KG,Lot#SLBX5905

[0082] (10)海藻糖二水合物:Pfanstiehl公司,Cat#T-104-4,Lot#404441A

[0083] (11)氯化钠(Sodium Chloride):EMD Millipore公司,Cat#1.06604.5000,Lot#K51865804002

[0084] (12)冰醋酸(Glacial Acetic Acid):EMD Millipore公司,Cat#AX0073-9,Lot#49287

[0085] (13)三(羟甲基)氨基甲烷(Tromethamine(Tris)):J.T.Baker公司,Cat#4102-01,Batch#0000229888

- [0086] (14) 咪唑 (Imidazole): 西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich), Cat#I2399-100G, Lot#SLCG0769
- [0087] (15) 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES): VWR公司, Cat#0511-250G, Lot#18G1856652
- [0088] (16) 叠氮化钠 (Sodium Azide): VWR, Cat#0639-250G, Lot#0386C067
- [0089] (17) N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸 (Tricine): 西格玛奥德里奇公司, Cat#5704-04-1, Lot#SLCC2910
- [0090] (18) 氯化钙: 西格玛奥德里奇公司, Cat#10043-52-4, Lot#SLBT0806
- [0091] (19) FA-亮氨酸甘氨酸脯氨酸丙氨酸-OH (FALGPA): Bachem AG公司, Cat#M1385.0100, Lot#1075966
- [0092] (20) 乙酸钠三水合物 (Sodium Acetate Trihydrate): J.T.Baker公司, Cat#JT3461-1, Lot#0000130474
- [0093] (21) 山梨醇: EMD Millipore公司, Cat#1.11597.1003, Lot#M835497840
- [0094] (22) 磷酸二氢钠一水合物 (Sodium Phosphate Monobasic Monohydrate): J.T.Baker公司, Cat#3802-01, Batch#0000126400
- [0095] (23) 磷酸氢二钠二水合物 (Sodium Phosphate Dibasic Dihydrate): 西格玛奥德里奇公司, Cat#04272-1KG, Lot#BCCB8057
- [0096] 实施例2: 液体剂型的制备
- [0097] 利用上述实施例1中准备的胶原酶混合溶液 (CNT201) 制备用于胶原酶的液体剂型。
- [0098] 具体地, 准备8个放入7.8mL的胶原酶浓度为2.0mg/mL的混合溶液的透析盒 (Slide-A-Lyzer透析盒 (Dialysis Cassette), 3500MWC0) 后, 向下述表1所示的F1至F8的剂型缓冲液各装入一个来等待平衡。混合溶液通过各透析盒的透析膜交换为各个剂型。经过充分的时间来结束平衡后, 从各透析盒中回收胶原酶溶液, 加入与各溶液一致的剂型缓冲剂来将胶原酶浓度稀释为0.232mg/mL。剂型缓冲剂利用作为缓冲液 (Buffer) 的10mM的乙酸钠、组氨酸或Tris、作为张力调节剂 (Tonicity modifier) 的150mM的氯化钠 (NaCl) 或5%的山梨醇、作为辅酶的10mM的氯化钙 (CaCl₂)、作为表面活性剂的0.01%的聚山梨醇酯-20, 不包含增量剂。
- [0099] 作为对照组的F13通过使用包含10mM的L-组氨酸、10mM的氯化钙的pH7.0的缓冲液稀释胶原酶混合溶液 (CNT201) 使胶原酶浓度为0.232mg/mL后, 加入10%的PS20储存溶液使PS20为0.01%来制备。
- [0100] [表1]

[0101]

剂型编号 (Form. No.)	剂型代码 (Form. Code)	剂型类型 (Form. Type)	缓冲液 (10mM)	pH	渗透调节剂	氯化钙	增量剂	药理有效成分 (mg/mL)	表面活性剂
F1	A5.5N	液体 (Liquid)	乙酸钠	5.5	150mM的氯化钠	10mM	N/A	0.232	0.01%的PS20
F2	A5.5S	液体	乙酸钠	5.5	5%的山梨醇	10mM	N/A	0.232	0.01%的PS20
F3	H6N	液体	组氨酸	6.0	150mM的氯化钠	10mM	N/A	0.232	0.01%的PS20
F4	H6S	液体	组氨酸	6.0	5%的山梨醇	10mM	N/A	0.232	0.01%的PS20
F5*	H6.5N	液体	组氨酸	6.5	150mM的氯化钠	10mM	N/A	0.232	0.01%的PS20
F6*	H6.5S	液体	组氨酸	6.5	5%的山梨醇	10mM	N/A	0.232	0.01%的PS20
F7*	T7N	液体	Tris	7.0	150mM的氯化钠	10mM	N/A	0.232	0.01%的PS20
F8*	T7S	液体	Tris	7.0	5%的山梨醇	10mM	N/A	0.232	0.01%的PS20
F13	CTRL	0.232mg/mL的CNT201, 10mM的L-组氨酸, 10mM的氯化钙, pH 7.0, 0.01%的PS20							

[0102] 注:1)Form.为剂型(Formulation)的简写。2)在剂型F5-F8中,虽然使用磷酸钠作为缓冲液,但观察到形成氯化钙沉淀,因此,将缓冲液从磷酸钠更换为组氨酸或tris来制备。

[0103] 然后,检验各剂型的渗透压、pH、浓度。

[0104] 然后,将各液体剂型在无菌BSC中使用0.2 μ m的PES膜灭菌过滤后,向3cc的灭菌玻璃小瓶中各装入1.0mL。然后,使用压接塞密封上述小瓶并贴上标签。

[0105] 实施例3:冷冻干燥剂型的制备

[0106] 在本实施例中,利用上述实施例1中准备的胶原酶混合溶液(CNT201)来制备用于胶原酶的冷冻干燥剂型。在实施透析之前,加入10%的PS20储存溶液来使PS20为0.01%。

[0107] 具体地,准备4个放入7.8mL的胶原酶浓度为2.0mg/mL的混合溶液的透析盒(Slide-A-Lyzer透析盒,3500MWC0)后,向下述表2所示的F9至F12的剂型缓冲液各装入一个来等待平衡。经过时间后,从各透析盒中回收胶原酶溶液,加入与各溶液一致的剂型缓冲剂来将胶原酶浓度稀释为0.232mg/mL。剂型缓冲剂利用作为缓冲液的10mM的琥珀酸盐(Succinate)或组氨酸、作为渗透调节剂的1.0%的海藻糖、作为辅酶的10mM的氯化钙、作为增量剂的4.0%的甘露醇或2.5%的甘氨酸、作为表面活性剂的0.01%的聚山梨醇酯-20。

[0108] [表2]

剂型编号	剂型代码	剂型类型	缓冲液 (10mM)	pH	渗透调节剂	氯化钙	增量剂	药理有效成分 (mg/mL)	表面活性剂
[0109] F9	LS5.5M	冷冻干燥 (Lyophilization)	琥珀酸盐	5.5	1.0%的海藻糖	10mM	4.0%的甘露醇	0.232	0.01%的PS20
F10	LS5.5G	冷冻干燥	琥珀酸盐	5.5	1.0%的海藻糖	10mM	2.5%的甘氨酸	0.232	0.01%的PS20
F11	LH6.5M	冷冻干燥	组氨酸	6.5	1.0%的海藻糖	10mM	4.0%的甘露醇	0.232	0.01%的PS20
F12	LH6.5G	冷冻干燥	组氨酸	6.5	1.0%的海藻糖	10mM	2.5%的甘氨酸	0.232	0.01%的PS20

[0110] 然后,检验各剂型的渗透压、pH、浓度。

[0111] 然后,将各液体剂型在无菌BSC中使用0.2 μ m的PES膜灭菌过滤后,向3cc的灭菌玻璃小瓶中各装入1.0mL。

[0112] 然后,经过如下冷冻干燥过程。即,使用冷冻干燥排气塞(vent stopper)部分密封上述小瓶后按照下述表3记载的条件进行冷冻干燥。

[0113] [表3]

步骤 (Step)	温度 (Temperature)	时间 (Time)	升降温速率 (Ramp Rate)	腔室内压力 (Chamber Pressure)
上样 (Loading)	5°C	N/A	N/A	N/A
冷冻 (Freezing)	5°C到-50°C	110分钟 (min)	0.5°C/分钟	N/A
保持 (Holding)	-50°C	120分钟	N/A	N/A
[0114] 重结晶 (Recrystallization)	-50°C到-15°C	70分钟	0.5°C/分钟	N/A
	-15°C	120分钟	N/A	N/A
	-15°C到-25°C	20分钟	0.5°C/分钟	N/A
初次干燥 (Primary Drying)	-25°C	3000分钟	N/A	100mT
二次干燥 (Secondary Drying)	25°C到25°C	100分钟	0.5°C/min	100mT
	25°C	600分钟	N/A	100mT

[0115] 冷冻干燥后,使用氮气再次填充腔室后使用塞将上述小瓶以与~580托(Torr)进行部分真空处理。然后,使用压接塞密封冷冻干燥的玻璃小瓶并贴上标签。为了在T=0时实施的冷冻干燥前(pre-lyo)分析,在冷冻干燥处理前单独保管及冷冻追加的小瓶。

[0116] 实验例1:分析方法及分析项目

[0117] 对于根据上述实施例2及实施例3制备的液体制剂及冷冻干燥剂型,利用如下11种分析方法,评估液体剂型及冷冻干燥剂型对于急性应激(Acute stress)及加速稳定性(Accelerated Stability)的影响力及效果。

[0118] 1.1:目视检查(Visual Inspection)

[0119] 以黑色和白色为背景,在白色光源(13W的荧光灯)下实施目视检查。所有的剂型在所有时间点使用数码相机记录。

[0120] 液体剂型按照液体剂型原样,冷冻干燥剂型按照冷冻干燥剂型原样进行目视检查。

[0121] 1.2:浓度测量(Concentration Measurement)

[0122] 利用 $1.315\text{mg/mL}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ 的E.C.分析有关通过使用Implen Pearl纳米光谱仪(Nano Spectrometer)获得的 A_{280} 的CNT201的浓度。

[0123] 冷冻干燥剂型在溶于Milli-Q水(water)来复原为液态后测量。

[0124] 1.3:pH

[0125] 利用采用95%或以上的校正梯度的3种pH标准溶液(pH 4、pH 7、pH 10)校正的SympHonypH计(pH Meter)(VWR Scientific公司,catalog#SB70P)实施pH分析。各剂型样品不随温度来调整,在pH测量前与室温平衡。

[0126] 冷冻干燥剂型在溶于Milli-Q水来复原为液态后测量。

[0127] 1.4:渗透压

[0128] 使用Model 2020冰点渗透压测定仪(Freezing Point Osmometer)(Advanced Instruments公司)测量 $T=0$ 时的渗透压浓度。

[0129] 冷冻干燥剂型在溶于Milli-Q水来复原为液态后测量。

[0130] 1.5:体积排阻-高效液相色谱法(SE-HPLC,Size Exclusion-High Performance Liquid Chromatography)

[0131] 在如下条件下进行体积排阻-高效液相色谱法。

[0132] 冷冻干燥剂型在溶于Milli-Q水来复原为液态后测量。

[0133] [表4]

体积排阻-高效液相色谱法参数 (SE-HPLC Method Parameters) (Agilent 1100)	
柱 (Column)	Tosoh TSKgel G2000SW _{XL} , 7.8mm×30cm, 5 μ m, P/N 08540
保护柱 (Guard Column)	Tosoh TSKgel SW _{XL} Guard, 6.0mm×4 cm, 7 μ m, P/N 08543
流动相 (Mobile Phase)	50mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸, 1mM的氯化钙, 0.2M的氯化钠, 0.05%的叠氮化钠, pH 7.0
流量 (Flow Rate)	0.5mL/分钟
运行时间 (Run Time)	50分钟 (minutes)
样品温度 (Sample Temperature)	5 $^{\circ}$ C
柱温度	25 $^{\circ}$ C

[0134]

	(Column Temperature)	
	注射体积 (Injection Volume)	100 μ L
[0135]	注射负荷 (Injection Load)	23.2 μ g ((0.232 mg/mL)
	紫外线检测 (UV Detection)	280nm

[0136] 1.6:效价测定 (Potency Assay)

[0137] 以如下条件进行效价测定。

[0138] 冷冻干燥剂型在溶于Milli-Q水来复原为液态后测量。

[0139] [表5]

效价测定方法参数 (Potency Assay Method Parameters)	
仪器 (Instrument)	BIO-TEK Synergy TM MHT
激活缓冲液 (Activating Buffer)	1mM FALGPA, 50mM N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸, 10mM 氯化钙, 0.4 M的氯化钠, pH 7.5
DP浓度 (Concentration)	0.075-0.300mg/mL*
上样体积 (Load Volume)	10 μ L
缓冲液体积 (Buffer Volume)	190 μ L
[0140] 振动时间 (Shaking Time)	10秒钟 (sec)
检测波长 (Detection Wavelength)	345 (nm)
运行时间	7分钟**
测定间隔 (Measurement Interval)	1分钟
* 在所有测试中, DP都在0.232mg/mL的条件下分析。在整个研究中, 该基本浓度在用于确定酶活性的实际变化的计算中使用, 而非实验中。	
** 运行时间设定为7分钟。	

[0141] 1.7:FlowCAM

[0142] FlowCAM颗粒显像系统结合光学、电子工程学及遗传工程学来自动分析颗粒。光学系统在通过流通池 (flow cell) 时用来捕捉有关流体中颗粒的实时图像。显像软件用来评估颗粒的大小和形态。在分析前对所有样品剂型在75托的压力下进行30分钟的分析及脱气。冷冻干燥剂型在溶于Milli-Q水来复原为液态后测量。

[0143] 1.8:液态复原时间 (Reconstitution Time)

[0144] 向装有冷冻干燥剂型的小瓶加入1.0mL的灭菌过滤的Milli-Q水的同时, 启动计时器并轻轻摇晃小瓶。液态复原, 即, 溶解结束的时间点可以视为轻轻摇晃时饼材完全消失的时间点。

[0145] 1.9:含湿度 (Moisture Content) (卡尔费休滴定 (Karl-Fischer Titration))

[0146] 为了在冷冻干燥剂型中分析含湿度, 使用了卡尔费休 (Karl Fisher) 滴定仪C20

(梅特勒托利多公司(Mettler Toledo))。为了确定系统准确度,使用Aqua aStar干燥炉1%标准水(Water Oven Standard 1%)或AquaStar干燥炉5%标准乳糖(Lactose Oven Standard 5%)。为了分析,在去除小瓶的盖子之前,预先在常温下保管样品小瓶。在各分析中使用约30-50mg的物质。

[0147] 1.10:准常温(Sub-Ambient)差示扫描量热法(DSC)

[0148] 使用具有中间冷却器II(Intercooler II)的Pyris Diamond DSC在-60°C的温度下冷冻约10 μ L的各样品。以5°C每分钟的温度调节速度(ramp rate)加热样品直至解冻,记录解冻过程中的热流。

[0149] 1.11:傅里叶变换红外光谱法(Fourier Transform Infrared Spectroscopy: FTIR)

[0150] FTIR为用来获得气体、液体或固体的红外线吸收光谱的技术。

[0151] IBI使用FTIR-660Plus分光仪来收集样品原料的红外线吸收及波数[cm⁻¹]。该数据提供有关多肽的二级结构的信息。使用FTIR分光仪分析冷冻干燥前的液体剂型、将冷冻干燥粉末溶于Milli-Q水来复原为液态的液体剂型以及冷冻干燥粉末本身。

[0152] 利用如上所述的11种分析方法评估对于急性应激及加速稳定性的影响力及效果,具体的分析项目如下述表6所示。加速稳定性为随着时间(时间序列变化)监测温度的影响的内容,加速稳定性中使用的温度为比适当的保管温度高的温度(加速条件,温度应激(Temperature Stress)),可以利用设定为如此高的温度来快速观察随着时间的变化。

[0153] [表6]

分析方法/分析项目	急性应激			温度应激时间点 (Temperature Stress Time Points)					
	搅拌 (Agitation)	紫外线	再溶解的液体 (Recon. Liquid)	冷冻干燥前	T=0	1周 (wk)	2周	4周	8周
目视 (Visual)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
浓度 (Concentration) (A ₂₈₀)	-	-	X	X	X	X	X	X	X
pH	-	-	X	X	X	X	X	X	X
渗透压 (Osmolality)	-	-	-	X	X	-	-	-	-
SE-HPLC	X	X	X	X	X	X	X	X	X
效价测定 (Potency Assay)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
FlowCAM*	X	-	X	X	X	-	-	X	X
仅适用于冷冻干燥制剂 (For Lyophilized Formulations Only)									
再溶解时间 (Reconstitution Time)	-	-	-	-	X	X	X	X	X
含湿度 (卡尔费休滴定 (KF Titration))	-	-	-	-	X	-	-	-	-
Sub-Ambient DSC	-	-	-	X	-	-	-	-	-
FTIR	-	-	-	X	X	-	-	-	-

[0155] 注：“X”表示进行。

[0156] 根据上述分析,在上述实施例2的F1至F8及F13的液体剂型的情况下,所有样品剂型都因长时间保管时有效成分的含量减少和分解而未确保稳定性。于是,本发明中尝试开发冷冻干燥粉末剂型,利用多种条件的组合来制备冷冻干燥粉末,以确认在何种条件下可以制备正常质量的产品以及如此制备的产品是否能够保持正常质量并长期保持。

[0157] 据此,以具有上述实施例3的F9至F12的冷冻干燥剂型的样品为中心来说明急性应激及加速稳定性(温度应激)评估结果。

[0158] 实验例2:急性应激评估结果

[0159] 在实验室中作用为应激(术语“应激”可以根据情况表达为“胁迫”)的环境因素中,代表性的为搅拌、紫外线、复原为液态。在实际使用环境中,分别相当于物理冲击、暴露在阳光或室内荧光灯下、稀释剂溶解。在实验例2中,由于通常难以通过评估保管期间随着时间的缓慢变化来迅速获得结果,因此,使用通过施加急剧的胁迫来筛选优秀的剂型的方法。

[0160] 在实验例2中,以上述实验例1的方法向本发明的实施例3中制备的冷冻干燥剂型施加急性应激来评估。急性应激以搅拌(Agitation)的影响、紫外线(UV)暴露的影响、液态复原(Reconstitution:Recon.)的影响等三个方面来评估。

[0161] 实验例2-1:搅拌(Agitation)的影响

[0162] 搅拌为用来模拟实际使用环境中的物理冲击的急性应激的一个方法。

[0163] 将具有上述实施例3的剂型的样品小瓶使用Milli-Q水溶解来复原为液态后,以室

温在设定为1000RPM的回旋式搅拌机 (orbital shaker) 中搅拌4小时。同时,将具有同样剂型的其他样品用作对照样品,以不搅拌的方式在室温的静态环境中孵育同样的时间。

[0164] 结果如下述表7所示。

[0165] [表7]

剂型 编号	缓冲液 (10mM)	pH	增量剂	目视分析	SE-HPLC	活性	FlowCAM分 析
F9	琥珀酸 盐	5.5	4.0%的甘露 醇	透明无色,少 数微粒	稍高的HMWS	相似	低的微粒
F10	琥珀酸 盐	5.5	2.5%的甘氨 酸	透明无色,少 数微粒	N/A	相似	低的微粒
F11	组氨酸	6.5	4.0%的甘露 醇	透明无色,少 数微粒	N/A	相似	低的微粒
F12	组氨酸	6.5	2.5%的甘氨 酸	透明无色,少 数微粒	N/A	相似	低的微粒

[0167] 如上述表7所示,目视分析的结果,所有样品与应激条件无关地透明无色。在通过肉眼评估的目视分析中,直接分辨的结果是定性的,因此,颗粒的大小仅在判断是否生成大颗粒的水平上有显著性。通过目视分析无法判断剂型之间的优劣。

[0168] SE-HPLC为能够以定量的方式分析难以通过肉眼确认的凝集物的通常的方法。根据SE-HPLC分析,在F9样品中观察到稍高的高分子量物质 (HMWS, high-molecular-weight species) 凝集。

[0169] 即,比较F9与F10样品来看,在以相同的琥珀酸盐缓冲液具有pH 5.5的剂型条件下,当使用甘露醇作为增量剂时 (F9样品),因通过搅拌引起的剪切力 (shear force) 引起稍微更高的HMWS凝集,但使用甘氨酸时 (F10样品),未观察到这样的凝集。

[0170] 并且,比较F9与F11样品来看,在使用相同的甘露醇作为增量剂的剂型条件下,琥珀酸盐缓冲液及pH5.5剂型观察到稍微更高的HMWS凝集,但在使用组氨酸缓冲液配制为pH 6.5的剂型中,未观察到这样的凝集。

[0171] 此外,根据胶原酶活性分析,所有剂型中示出3.71~4.23FALGPA Units/mg蛋白质的胶原酶活性,在静置对照样品中观察到相似的情况 (3.53~3.86FALGPA Units/mg蛋白质)。并且,根据FlowCAM分析结果,4小时后,所有剂型中都与搅拌应激无关地观察到低的微粒浓度变化。

[0172] 据此,示出作为增量剂,甘氨酸比甘露醇更适合,作为缓冲液,组氨酸比琥珀酸盐更适合。

[0173] 实验例2-2:紫外线 (UV) 暴露的影响

[0174] 为了对上述实施例3的剂型以及在实验前使用水将该剂型复原为液态的剂型模拟在日常的紫外线暴露的环境中,将它们放入25°C的光稳定性腔室 (photostability

chamber) 并暴露在紫外线中。

[0175] 同时,在准备具有相同剂型的其他样品(冷冻干燥剂型和其液态复原溶液)作为对照样品后,设置在通过包裹箔片来隔断光线的样品箱中。将隔断光线的上述剂型在光稳定性腔室中以与暴露的剂型相同的时间来孵育处理。

[0176] 结果如下述表8所示。

[0177] [表8]

剂型 编号	缓冲液 (10mM)	pH	增量剂	目视分析	SE-HPLC	活性
[0178] F9	琥珀酸盐	5.5	4.0%的甘露醇	透明无色, 少数微粒	N/A	相似
F10	琥珀酸盐	5.5	2.5%的甘氨酸	透明无色, 少数微粒	N/A	相似
F11	组氨酸	6.5	4.0%的甘露醇	透明无色, 少数微粒	N/A	相似
F12	组氨酸	6.5	2.5%的甘氨酸	透明无色, 少数微粒	N/A	相似

[0179] 如上述表8所示,目视分析结果,所有样品在紫外线暴露前及紫外线暴露后都透明无色,由少数通过目视确认的颗粒。为了目视分析,冷冻干燥粉末形态的样品使用水来溶解后观察。

[0180] 在SE-HPLC分析中,孵育结束后,所有样品中都与应激条件无关地观察到相似的色谱轮廓。并且,与冷冻干燥条件无关地,紫外线隔断与暴露样品之间未示出显著差异。

[0181] 在胶原酶活性分析中,在紫外线暴露后,所有紫外线暴露冷冻干燥剂型中都观察到与紫外线隔断对照组(3.79~4.12FALGPA Units/mg蛋白质)相似的3.83~4.12FALGPA Units/mg蛋白质的胶原酶活性。

[0182] 实验例2-3:液态复原(Reconstitution)的影响

[0183] 使用1mL的Milli-Q水溶解上述实施例3的各剂型的一个(液态复原),在25°C的温度下保管24小时。其他的样品以并列的方式溶解(液态复原)后在5°C的温度下保管相同的时间。

[0184] 结果如表9所示。

[0185] [表9]

剂型 编号	缓冲液 (10mM)	pH	增量剂	目视分析	浓度	pH	SE-HP LC	活性	FlowCA M
[0186] F9	琥珀酸盐	5.5	4.0%的甘露醇	透明无色, 少数微粒	相似的浓度	无变化	相似的纯度	相似	低的微粒
F10	琥珀酸盐	5.5	2.5%的甘氨酸	透明无色, 少数微粒	相似的浓度	无变化	相似的纯度	相似	低的微粒

[0187]	F11	组氨酸	6.5	4.0%的甘露醇	透明无色,少数微粒	相似 的 浓 度	无 变 化	相似 的 纯 度	相 似	低 的 微 粒
	F12	组氨酸	6.5	2.5%的甘氨酸	透明无色,少数微粒	相似 的 浓 度	无 变 化	相似 的 纯 度	相 似	低 的 微 粒

[0188] 若受到因液态复原引起的溶解的影响而发生经济或分解,则胶原酶的浓度会变化。因此,可以通过测量浓度来知道溶解的影响引起的变化的大小。同样,利用pH的变化、FlowCAM的微粒的增加与否也是能够衡量溶解的影响的测量手段。

[0189] 如上述表9所示,目视分析结果,所有样品在一天后都与保管温度无关地透明无色,通过目视确认到少数的颗粒。

[0190] 根据浓度分析,溶解并暴露在温度应激中一天后,与保管温度无关地,所有剂型中观察到221mg/mL ~ 0.240mg/mL的与目标相似的浓度。

[0191] 根据pH分析,溶解并暴露在温度应激中一天后,与保管温度无关地,所有剂型中观察到与目标pH相同或相似的pH(± 0.1 的小的偏差)。

[0192] 根据SE-HPLC分析,溶解并暴露在温度应激中一天后,与保管温度无关地,所有剂型中观察到相似的色谱轮廓。25°C的所有剂型示出与5°C的样品相似的波峰百分比。

[0193] 根据胶原酶活性分析,溶解并暴露在温度应激中一天后,与保管温度无关地,所有剂型中观察到4.00-4.25FALGPA Units/mg蛋白质的相似的胶原酶活性。

[0194] 根据FlowCAM分析,溶解并暴露在温度应激中一天后,与保管温度无关地,所有剂型中观察到低的微粒浓度变化。

[0195] 实验例3:加速稳定性(Temperature Stress)评估结果

[0196] 使用上述实验例1的方法对本发明的实施例剂型评估加速稳定性(温度应激时间点)。

[0197] 从T=0周开始,将具有上述实施例2及实施例3的剂型的小瓶分别配置在5°C、25°C及40°C的温度下,8周后拿出来进行分析。

[0198] 实验例3-1:根据温度加速条件的目视分析

[0199] 在T=0(时间零点(Time zero))时,所有冷冻干燥前(pre-lyo)的剂型透明无色,没有通过目视确认的颗粒。

[0200] [表10]

剂型编号	缓冲液 (10mM)	pH	增量剂	目视分析				
				Pre-lyo	T=0周	T=8周		
						5°C	25°C	40°C
[0201] F9	琥珀酸盐	5.5	4.0%的甘露醇	透明、无色、未观察到颗粒	透明、无色、未观察到颗粒	透明、无色、观察到少数颗粒		
F10	琥珀酸盐	5.5	2.5%的甘氨酸	透明、无色、未观察到颗粒	透明、无色、未观察到颗粒	透明、无色、观察到少数颗粒		
F11	组氨酸	6.5	4.0%的甘露醇	透明、无色、未观察到颗粒	透明、无色、未观察到颗粒	透明、无色、观察到少数颗粒		
F12	组氨酸	6.5	2.5%的甘氨酸	透明、无色、未观察到颗粒	透明、无色、未观察到颗粒	透明、无色、观察到少数颗粒		

[0202] 包含甘氨酸的冷冻干燥剂型 (F10、F12) 在实验开始的时间点表现出好的外观,但包含甘露醇的冷冻干燥剂型 (F9、F11) 却示出略有收缩的外观。在第八周的时间点,冷冻干燥饼没有显著变化。在所有剂型中,无论冷冻干燥前还是冷冻干燥后马上溶解的冷冻干燥剂型都无色透明且未观察到颗粒。在第八周的时间点,溶解的冷冻干燥剂型虽然仍透明无色,但目视观察到少数颗粒。

[0203] 实验例3-2:根据温度加速条件的浓度分析

[0204] 若受到温度影响而发生凝集或进行分解,则胶原酶的浓度会变化。因此,可以通过测量浓度来知道随着温度影响的变化的大小。

[0205] 在T=0时,所有剂型都示出0.257mg/mL~0.264mg/mL的与目标相似的浓度。从实验开始后到第八周的时间点,大部分剂型在5°C、25°C的环境中示出相似的浓度,但在第八周的时间点,观察到F9~F12的浓度减少。在40°C的温度下,大部分剂型示出比目标低的浓度,其中,F10、F11、F12剂型示出最高的浓度。

[0206] [表11]

剂型编号	缓冲液 (10mM)	pH	增量剂	浓度分析				
				Pre-lyo	T=0周	T=8周		
						5°C	25°C	40°C
[0207] F9	琥珀酸盐	5.5	4.0%的甘露醇	0.185±0.001	0.257±0.003	0.179±0.008	0.195±0.026	0.218±0.017
F10	琥珀酸盐	5.5	2.5%的甘氨酸	0.220±0.012	0.257±0.011	0.194±0.011	0.236±0.011	0.236±0.004
F11	组氨酸	6.5	4.0%的甘露醇	0.236±0.003	0.264±0.007	0.195±0.003	0.264±0.015	0.242±0.003
F12	组氨酸	6.5	2.5%的甘氨酸	0.234±0.013	0.258±0.008	0.202±0.009	0.243±0.006	0.239±0.003

[0208] 尤其,从实验开始到第八周的时间点,F9剂型在5°C、25°C、40°C的温度下都示出比

初始浓度低的浓度。

[0209] 实验例3-3:根据温度加速条件的pH分析

[0210] 根据pH分析,第八周后,与保管温度无关地,所有剂型都在小的偏差(± 0.1)内示出与T=0相似的pH。

[0211] [表12]

剂型编号	缓冲液 (10mM)	pH	增量剂	pH分析				
				Pre-lyo	T=0周	T=8周		
						5°C	25°C	40°C
[0212] F9	琥珀酸盐	5.5	4.0%的甘露醇	5.6	5.7	5.6	5.6	5.6
F10	琥珀酸盐	5.5	2.5%的甘氨酸	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
F11	组氨酸	6.5	4.0%的甘露醇	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6
F12	组氨酸	6.5	2.5%的甘氨酸	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6

[0213] 实验例3-4:根据温度加速条件的渗透压分析

[0214] 渗透压为确认剂型是否正确制备的指标。若与理论值的差异大于实验误差,则为错误的制备。渗透压不是可以检测出温度的影响的试验方法,因此,应该只在冷冻干燥前的溶液和冷冻干燥后T=0时进行测量。

[0215] 根据渗透压浓度分析,T=0时,使用水将所有冷冻干燥剂型(对照组除外)液态复原的溶液的渗透压示出292mOsm/kg ~ 398mOsm/kg的范围。该值示出与冷冻干燥前(pre-lyo)的样品相似的值。

[0216] [表13]

剂型编号	缓冲液 (10mM)	pH	增量剂	渗透压分析					
				理论值 (Theoretical)	Pre-lyo	T=0周	T=8周		
							5°C	25°C	40°C
[0217] F9	琥珀酸盐	5.5	4.0%的甘露醇	299	320	318	N/A	N/A	N/A
F10	琥珀酸盐	5.5	2.5%的甘氨酸	412	408	398	N/A	N/A	N/A
F11	组氨酸	6.5	4.0%的甘露醇	289	305	292	N/A	N/A	N/A
F12	组氨酸	6.5	2.5%的甘氨酸	402	397	382	N/A	N/A	N/A

[0218] 实验例3-5:根据温度加速条件的液态复原(Reconstitution)时间分析

[0219] 测量液态复原时间(即,溶解时间)为可以知道在温度加速条件下随着时间经过的剂型的变化中的一个方法。例如,含湿度相对较高的冷冻干燥剂型随着时间的经过因冷冻干燥饼相互凝聚而变得坚硬,这表现为增加液态复原时间(即,溶解时间)。

[0220] 根据溶解时间分析,第八周后所有剂型都示出快的溶解时间(≤ 10 秒钟),在T=0

时,含甘氨酸的剂型(F10及F12)示出比含甘露醇的剂型(F9及F11)快很多的溶解时间。尽管如此,在第八周所有剂型的溶解时间都小于10秒钟,仅从溶解时间来看,无法判断剂型的优劣,只能判断为都很优秀。

[0221] [表14]

剂型编号	缓冲液 (10mM)	pH	增量剂	液态复原时间分析				
				Pre-lyo	T=0周	T=8周		
						5°C	25°C	40°C
[0222] F9	琥珀酸盐	5.5	4.0%的甘露醇	N/A	34.51	8.28	8.87	2.97
F10	琥珀酸盐	5.5	2.5%的甘氨酸	N/A	7.03	4.13	2.46	2.46
F11	组氨酸	6.5	4.0%的甘露醇	N/A	17.49	4.46	5.82	3.66
F12	组氨酸	6.5	2.5%的甘氨酸	N/A	6.89	2.02	3.35	2.02

[0223] 实验例3-6:根据温度加速条件的含湿度分析

[0224] 含湿度作为冷冻干燥剂型的形成和保持中的重要因素来起作用。剂型成分的组合越优秀,所测量的含湿度越低。在本发明所属技术领域中,大多数情况下将含湿度的基准设置为3.0%以下。

[0225] 根据含湿度分析,T=0时,所有冷冻干燥剂型都示出低的含湿度(<1.5%),甘氨酸剂型(F10及F12)示出比甘露醇剂型(F9及F11)低的含湿度。

[0226] [表15]

剂型编号	缓冲液 (10mM)	pH	增量剂	含湿度分析				
				Pre-lyo	T=0周	T=8周		
						5°C	25°C	40°C
[0227] F9	琥珀酸盐	5.5	4.0%的甘露醇	N/A	1.26	N/A	N/A	N/A
F10	琥珀酸盐	5.5	2.5%的甘氨酸	N/A	0.70	N/A	N/A	N/A
F11	组氨酸	6.5	4.0%的甘露醇	N/A	1.07	N/A	N/A	N/A
F12	组氨酸	6.5	2.5%的甘氨酸	N/A	0.66	N/A	N/A	N/A

[0228] 实验例3-7:根据温度加速条件的FTIR分析

[0229] 根据FTIR分析,T=0时,所有溶解的冷冻干燥剂型都示出与冷冻干燥前(pre-lyo)的样品相似的FTIR光谱。通过此可知冷冻干燥过程中未引起胶原酶的变性。

[0230] 实验例3-8:根据温度加速条件的SE-HPLC分析

[0231] 根据SE-HPLC分析,T=0时所有剂型都示出相似的色谱轮廓。

[0232] [表16]

剂型编号	缓冲液 (10mM)	pH	增量剂	通过SE-HPLC分析的HMWS (%)				
				Pre-lyo	T=0周	T=8周		
						5°C	25°C	40°C
[0233] F9	琥珀酸盐	5.5	4.0%的甘露醇	N/A	0.0	1.1	1.2	2.2
F10	琥珀酸盐	5.5	2.5%的甘氨酸	N/A	0.0	0.6	1.2	2.7
F11	组氨酸	6.5	4.0%的甘露醇	N/A	0.0	0.7	0.8	1.0
F12	组氨酸	6.5	2.5%的甘氨酸	N/A	0.0	0.5	0.5	0.5

[0234] 然后,8周的孵育后,冷冻干燥的琥珀酸盐剂型(F9及F10)中观察到HM WS略有增加。在温度的影响大的25°C和40°C中,HMWS的比例成正比例增加,在相同的缓冲液成分中示出相似的HMWS,因此判断与使用琥珀酸盐的剂型相比,使用组氨酸的剂型在温度加速条件下更有利。所要保持的pH可以根据缓冲液成分的不同而不同,因此,也可以判断组氨酸剂型的pH 6.5比琥珀酸盐剂型的pH5.5更优秀。

[0235] 实验例3-9:根据温度加速条件的胶原酶活性分析

[0236] 根据胶原酶活性分析,T=0时所有剂型都示出2.77~3.33FALGPA Units/mg蛋白质的相似的胶原酶活性,这是略高于分析对照组(2.37FALGPA Units/mg蛋白质)的水平。

[0237] [表17]

剂型编号	缓冲液 (10mM)	pH	增量剂	活性分析(具体活性(Specific Activity)) (FALGPA Unit/mg蛋白质(protein))				
				Pre-lyo	T=0周	T=8周		
						5°C	25°C	40°C
[0238] F9	Succinate	5.5	4.0%的甘露醇	N/A	3.08	3.05	3.18	2.66
F10	Succinate	5.5	2.5%的甘氨酸	N/A	3.23	3.05	3.26	2.96
F11	组氨酸	6.5	4.0%的甘露醇	N/A	3.23	3.22	3.28	3.24
F12	组氨酸	6.5	2.5%的甘氨酸	N/A	3.24	3.17	3.04	3.29

[0239] 而且,经过8周25°C的孵育后,除F13以外的所有剂型都示出与T=0时相似或略低的胶原酶活性(2.49-3.28FALGPA Units/mg蛋白质)。

[0240] 然而,经过8周40°C的孵育后,与所有其他剂型相比,含组氨酸的冷冻干燥剂型(F11、F12)示出最高的胶原酶活性(3.24-3.29FALGPA Units/mg蛋白质)。

[0241] 实验例3-10:根据温度加速条件的FlowCAM分析

[0242] 根据FlowCAM分析,T=0时所有冷冻干燥剂型样品都示出低的微粒浓度变化。

[0243] 8周后,大部分剂型在5°C、25°C中示出低的微粒浓度变化,在40°C中,除F9以外的冷冻干燥剂型(F10-F12)示出相对较低的微粒浓度变化。F12剂型为在-70°C的温度下保管的冷冻干燥前(pre-lyo)剂型,示出相对较高的微粒浓度。相反,F12剂型在冷冻干燥剂型

时,在温度加速条件下示出比F9~F11剂型相对更为优秀的低的微粒浓度变化。

[0244] [表18]

剂型编号	缓冲液 (10mM)	pH	增量剂	颗粒 (Particles) /mL	FlowCAM分析				
					Pre-lyo	T=0周	T=8周		
							5°C	25°C	40°C
F9	Succinate	5.5	4.0%的甘露醇	>5 μ m	55	89	106	213	2030
				>10 μ m	17	34	34	60	178
				>25 μ m	5	5	5	13	13
F10	Succinate	5.5	2.5%的甘氨酸	>5 μ m	63	80	59	73	136
				>10 μ m	34	34	21	38	42
				>25 μ m	5	9	5	5	5
F11	组氨酸	6.5	4.0%的甘露醇	>5 μ m	39	30	241	34	56
				>10 μ m	17	9	93	9	26
				>25 μ m	5	0	9	5	13
F12	组氨酸	6.5	2.5%的甘氨酸	>5 μ m	1227	25	68	30	34
				>10 μ m	152	9	38	9	13
				>25 μ m	5	0	9	5	5

[0246] 根据上述实验例3-1至3-10的加速稳定性评估,比较F9与F10样品来看,使用相同的琥珀酸盐缓冲液,在pH5.5剂型条件下,使用甘露醇作为增量剂时,在温度加速条件下,发生浓度减少、溶解时间延迟、高的含湿度、HMWS(%)增加及微粒浓度增加的问题。由此可知,作为增量剂,甘氨酸比甘露醇更为适合。

[0247] 而且,比较F9与F11样品来看,在使用相同的甘露醇作为增量剂的剂型条件下,使用琥珀酸盐缓冲液配制为pH5.5的剂型在温度加速条件下发生浓度减少、胶原酶活性减少、HMWS(%)增加及微粒浓度增加的问题。由此可知,作为缓冲液,组氨酸比琥珀酸盐更为适合。

[0248] 并且,比较F10与F12来看,在同样适用甘氨酸作为增量剂的剂型条件下,使用琥珀酸盐缓冲液配制为pH5.5的剂型在温度加速条件下发生胶原酶活性减少及HMWS(%)增加。由此可知,作为缓冲液,组氨酸比琥珀酸盐更为适合。

[0249] 在上述内容中,结合特定实施例示出并说明了本发明,但本发明所属技术领域的普通技术人员应该明白的是,在不脱离随附的发明要求保护范围中所述的本发明的技术特征或领域的限度内,本发明可以进行多种多样的制备及变化。