

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C07K 1/02

C07K 16/00 A61K 39/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98122531.4

[43]公开日 1999年6月23日

[11]公开号 CN 1220270A

[22]申请日 98.11.20 [21]申请号 98122531.4

[30]优先权

[32]97.11.22 [33]EP [31]97120528.1

[32]98.2.19 [33]EP [31]98102846.7

[71]申请人 贝林格尔曼海姆股份有限公司

地址 联邦德国曼海姆

[72]发明人 克劳斯·海勒布兰德

阿波朗·帕帕迪米特里奥

格哈德·温特

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 黄益芬

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 稳定蛋白质的改进方法

[57]摘要

一种可防止药用蛋白冻干剂在重组时形成蛋白聚集物的改进方法,其中含水的蛋白缓冲液经冷冻、融解、分装成注射剂量,并将这些分装制剂冻干,其特征 在于,该含水的蛋白缓冲液含有磷酸钾缓冲液作缓冲物质,溶液中钾离子:钠离子比例为至少 10:1,该方法可用于生产稳定的药用组合物冻干剂。

ISSN 1000-8424

权 利 要 求 书

1. 用于防止药用蛋白冻干剂加水溶解时形成蛋白聚集物的改进方法, 该药用组合物中蛋白含水缓冲溶液经冷冻, 融解, 分装成注射剂量, 并将这些
- 5 分装制剂冻干, 其中蛋白含水缓冲溶液含有磷酸钾缓冲液作缓冲物质, 溶液中钾离子: 钠离子比例为 10:1 或更高。
 2. 权利要求 1 的方法, 其中分装制剂的缓冲液浓度为 10-300mmol/l。
 3. 权利要求 12 的方法, 其中分装制剂的重组溶液的渗摩尔浓度为 100-500mOsm, 优选 300 ± 50 mOsm。
- 10
 4. 权利要求 1-3 中的方法, 其中含水缓冲溶液 pH 范围为 6-8。
 5. 权利要求 1-4 中的方法, 其中含水缓冲溶液含有非离子去污剂。
 6. 权利要求 1-5 中的方法, 其中含水缓冲溶液含有浓度为 10-100mg/ml 的糖。
 7. 权利要求 1-6 中的方法, 其中蛋白质为一种抗体。
- 15
 8. 含有低聚集物的可溶性固态保存蛋白, 其基本上是无定型的, 含有该蛋白的冰冻溶液, 用磷酸钾缓冲液作缓冲物质, 溶液中钾离子: 钠离子比例至少 10:1。
 9. 权利要求 8 的固态保存蛋白, 其中保存态是用冻干方法制备的。
 10. 权利要求 8 或 9 中的固态保存蛋白, 其中该蛋白是一种抗体。
- 20
 11. 含水缓冲溶液 pH 值范围为 6-8 的药用蛋白组合物, 其中该溶液含有磷酸钾缓冲液作为缓冲物质, 并且:
 - a) 钾离子: 钠离子比例为 10:1 或更高。
 - b) 缓冲液浓度为 10-300mmol/l。
 12. 权利要求 11 的药用组合物, 其中该蛋白是一种抗体。

说明书

稳定蛋白质的改进方法

5 本发明涉及冷冻或冻干过程或低温保存过程中稳定蛋白质的改进方法。

蛋白质诸如酶或抗体及其片段等是不稳定的，易于失活，和/或当储存于低温(低于 0 °C)，特别是在反复冻融过程中易于形成可溶或不可溶的聚集物。由于形成颗粒，这些聚集物发生明显变化，形成浑浊物。但这种聚集物和/或颗粒形式在药用组合物中是不允许的，或者至少应当含量甚微。药用组合物制剂应是澄清溶液，若是冻干制剂，当重组(加水溶解)时应形成无颗粒的澄清溶液，不含可溶性蛋白聚集物。

已知有许多方法和添加剂可用于溶液中蛋白的稳定。例如，EP-A 0 599 344 中描述了加入诸如 HSP 25 的热激蛋白来提高蛋白稳定性。EP-A 0 318 081 报道了添加由聚环氧丙烷和聚环氧乙烷组成的嵌段共聚物和磷脂以提高抗体稳定性。含氮基质的盐如含精氨酸、胍或咪唑在 EP-A 0 025 275 中用于稳定免疫球蛋白。其他适于用作稳定化添加剂的有聚醚(EP-A 0 018 609)、甘氨酸、白蛋白和硫酸葡聚糖(美国专利 4 808 705)、去污剂如 Tween® 20(DE 26 52 636, GB 8514349)、伴侣蛋白如 Gro EL(Mendoza, J.A. Biotechnol. Tech. 15 10(1991) 535-540)、柠檬酸缓冲液(WO 93 22335)或螯合剂(WO 91 15509)。虽然这些添加剂可使蛋白质在水溶液中达到一定稳定度，但以前的方法中没有一种方法可适用于反复冻融时稳定蛋白质，以达到适用于临床目的的在再冻融、0 °C 以下低温保存或冻干后再加水溶解时不形成可溶性或不溶性聚集物，或仅有可忽略的痕量聚集物。

25 在 EP-A 0 314 095 中报道了一种诸如因子 VIII 的血浆蛋白冻干剂，它含组氨酸缓冲液作为缓冲物质，氯化钙作为添加剂，并处于高离子强度下(0.35-1.2mmol/l)。

EP-A 0 315 968 中报道了在含有 0.15-15mmol/l 氯化钠或氯化钾，0.1-10mmol/l 盐酸赖氨酸和 0.2-5mmol/l 组氨酸作缓冲离子的血浆蛋白如因子 VIII 的冻干制剂。不过，当冻干蛋白制剂加水溶解时组氨酸缓冲液并不适用于稳定蛋白和防止聚集物和颗粒的形成。

因而，本发明的目的便是要提供一种可显著抑制药用蛋白冻干制剂加水溶解时产生聚集物或形成颗粒的方法。

由此，本发明涉及一种防止药用蛋白组合物(优选抗体)自冻干制剂溶解时形成蛋白聚集物的改进方法，其中将这种蛋白冻干制剂的缓冲蛋白水溶液
5 冷冻，解冻，分装成注射剂量的小份，这些小份分装在含有磷酸钾缓冲液作为缓冲物质，钾离子与钠离子比例为 10:1 或更高的水溶液中冻干。因此水性缓冲液优选必须不含钠离子的。

本发明可使药用蛋白组合物，尤其是趋于形成二聚体或多聚体的蛋白如抗体，在中性 pH 范围(pH 6-8, 优选 pH 6.5-7.5)内形成稳定的药用组合物。诸
10 如抗体的蛋白在中性 pH 范围内趋于形成聚集物，尤其是当溶液冷冻(也可以冻干)一次或几次，然后解冻时更是如此。

药用组合物在 pH 6-8 范围内、浓度 10-300mmol/l(优选 50-250mmol/l)、其中有最可能低量的钠离子存在的磷酸钾缓冲液中是特别有效的。溶液中合
15 适的钾: 钠比例为 10:1 或更大。最为理想的是在该药物组合物中仅以磷酸钾缓冲液作缓冲物质，不加钠盐(如 NaCl)。在这种情况下，该药用组合物几乎不含钠离子或仅含不会在反复冻融过程中形成蛋白的聚集物的极少量钠离子。

已经证明，若仅用磷酸钾缓冲液作缓冲物质，在生产过程中至少冷冻一
20 次的蛋白溶液制成的冻干制剂可加水溶解而不产生浑浊。通常的缓冲液如磷酸钠缓冲液、组氨酸缓冲液或柠檬酸缓冲液会在这一过程中形成主要含蛋白的聚集物，从而导致一定程度的浑浊。冻干蛋白溶液在大约-15 °C 以下已完全冰冻，其低共熔点高于大约-15 °C，因此可在这一温度下(或更低温度，优选-20 °C)保存。由于溶液仅在温度低于其低共熔点以下温度下才会完全冰冻，这意味着在含有钠离子的磷酸钾缓冲液中的蛋白在冷冻保存过程中以及
25 在冻/融过程中会比在不含钠离子或钠离子浓度较低的缓冲液中经受更大应激。对于本发明而言，这种应激在上述制剂中可避免，从而抑制了聚集物或颗粒形成。这种方法可使蛋白溶液在-20 °C 下稳定保存，从而节约成本。在冷冻过程中，与磷酸钠缓冲液不同，磷酸钾缓冲液仅有很少的 pH 值变化(优选最多 ± 1 pH 单位，更优选最多 ± 0.5 pH 单位)。

已经证明，为有效防止颗粒形成，磷酸钾缓冲液浓度至少应在
30 10mmol/l，优选 50mmol/l 或更高。由于该渗摩尔浓度在药用组合物(优选加

水溶解的溶液)中不能太高(最好在生理范围内, 优选加水溶解后大约 300mOsm(\pm 20mOsm), 100-500mOsm 范围内也是合适的), 缓冲物质浓度或缓冲物质和盐的总浓度不应高于 250-300mmol/l。在分装制剂中缓冲液浓度优选 50-250mmol/l。但在生产分装试剂的溶液(大批量)中较高浓度缓冲液和/或盐类是容许的。

对于本发明, 若在药用组合物中需要加入盐类添加剂以调节离子强度, 较为有利的也是不使用钠盐或使用显著低于钾盐浓度的钠盐浓度。这样, 合适的做法是加入钾盐如氯化钾以取代通常的氯化钠。不过, 已经证明, 低浓度钠盐(大约 10mmol/l 或更低)并不改变规定的钾离子与钠离子比例为 10:1 或更高的比值。加入钙盐如氯化钙是不可行的, 因为磷酸钙会因此而发生沉淀。这样, 除了形成浑浊, 本发明中磷酸钾的缓冲效果也消失了。

本发明方法应予以防止形成的不溶性聚集物应理解为大小至少为 1 μ m 但可达 10 μ m 的蛋白聚集物。其颗粒可用颗粒计数的适当方法如 PSS(Particle sizing System USA)计数器 Accusizer 700 测定。用本发明的一种改进方法得到的结果是浓度在 2-400 μ m/ml 的颗粒数 <3000 或 10-400 μ m/ml 的为 2000 或更少。美国药典(US-Pharmacopieia)规定每个注射剂量药用组合物中大于 10 μ m 的颗粒最多可容许 6000 个, 而大于 25 μ m 的颗粒可容许 600 个。这种结果在本发明中可用简单方法达到。

蛋白(多肽)在本发明中可理解为蛋白质或蛋白质片段或化学修饰的蛋白质。适用于稳定蛋白的药用组合物优选的是抗体、抗体融合蛋白(如免疫毒素)、酶和蛋白激素(如促红细胞生成素)、促生长抑制素、胰岛素、细胞分裂素、干扰素、或纤溶酶原激活物。

本发明分装制剂的含义就是等分的蛋白溶液, 适于作药用组合物, 可先作进一步处理(添加容许的药用物质)。这种制剂主要是病人注射用。可被磷酸钾缓冲液稳定的药用组合物 pH 范围优选微酸性、中性、微碱性(大约 pH 6-8, 优选 pH7)。

本发明优选的是加非离子去污剂(如 Tween 80), 优选重量百分浓度至多 0.1%, 至少 0.01%。

另外, 最好加冷冻保护剂或玻璃形成剂如非还原剂性糖(优选蔗糖或海藻糖), 浓度以至少 10mg/ml 较为有利, 优选大约 30-100mg/ml。

由此, 本发明的主题是要得到低聚集物的可熔固体储存形式的蛋白, 这

种蛋白基本上是无定型的，由该蛋白的冻溶液制成，磷酸钾缓冲液作为主要的缓冲物质，该溶液中钾离子：钠离子比例至少 10:1。

除了钾离子与残留量钠离子的浓度以外，钾离子与钠离子的比应当至少在 10:1，优选至少 50:1。最好使用不含钠离子的磷酸钾缓冲液。

- 5 在本发明另一优选的实施方案中，药用组合物含有的蛋白已由体外培养产生(如重组产物或杂交瘤细胞株培养产生单克隆抗体)。这种情况下较为合适的是在第一次加入盐和/或缓冲液时加入磷酸钾缓冲液，或在后来分离纯化过程中再用缓冲液处理。这样可使蛋白提取物在 0℃ 以下稳定保存。再用缓冲液处理是指通过透析进行离子交换。由于这些组分并不用于临床，在分装前的蛋白提纯和分离过程中，缓冲液或盐浓度事实上可达 50-100mmol/l。但是，注射用制剂合适的渗透摩尔浓度需要在分装前调整好。

以下的实施例、文献和图表用于进一步阐明了本发明，而发明的保护范围由专利权利要求确定。上述方法的实施例即使修改后仍被认为是本发明的范围以内。

- 15 图 1 显示不同缓冲液和盐溶液的低共熔点。
图 2 显示冰冻过程中磷酸盐缓冲液的 pH 值变化。
图 3 显示经剪切或冻/融应激后一种抗体(抗 L - 选择素)溶液在不同缓冲液(A、B、C)中颗粒形成情况。

A: AB 在 10mmol/l 磷酸钾缓冲液中，150mmol/l NaCl, pH7；

- 20 B: AB 在 100mmol/l 磷酸钾缓冲液中，pH7.2；

C: AB 在 100mmol/l 磷酸钾缓冲液中，0.01% 重量百分比 Tween[®]80, pH7.2；

a: 离心(起始物质)；

b: 剪切应激后(30 秒搅拌)；

- 25 c: 六次冻/融循环后 (-20℃)；

图 4 显示经剪切或冻/融应激后一种抗 HBV 抗体溶液在不同缓冲液(A、B、C)中颗粒形成情况。

A: AB 在 10mmol/l 磷酸钾缓冲液中，150mmol/l NaCl, pH6.5；

B: AB 在 100mmol/l 磷酸钾缓冲液中，pH7.2；

- 30 C: AB 在 100mmol/l 磷酸钾缓冲液中，0.01% 重量百分比 Tween80[®], pH7.2；

- a:离心(起始物质);
- b:剪切后(30 秒搅拌);
- c:六次冻/融循环后 (-20 °C);

5 图 5 显示在 0 °C 下经冷冻保存后蛋白溶液(实施例 3 中 人源抗体 IgG)的可溶性聚集物的颗粒大小排阻的 HPLC 分析结果。

A: AB 在 10mmol/l 磷酸钾缓冲液中, 150mmol/l NaCl, pH7.0 ;

B: AB 在 100mmol/l 磷酸钾缓冲液中, pH7.2 ;

实施例 1

不同缓冲液和盐溶液中低共熔温度

10 从图 1 可清楚看出氯化钠缓冲液的低共熔温度大约 10 °C, 要比不含氯化钠而含氯化钾的缓冲液的低。由于溶液在低于低共熔温度下才能完全冰冻, 这意味着在冰冻保存(通常为-20 °C)和冻/融过程中蛋白在含有氯化钠的磷酸缓冲液中要比在不含氯化钠的缓冲液中经受更大应激。在本发明以上所述

15 的制剂由于抑制聚集物和颗粒形成而避免了这种应激。这种制剂使得在-20 下蛋白溶液得以稳定保存, 从而节约成本。

实施例 2

磷酸盐缓冲液冷冻过程中缓冲液 pH 值的变化

从图 2 可清楚看到在冰冻过程中由于磷酸氢二钠沉淀, 含氯化钠的磷酸缓冲液的 pH 值大大降低。不含氯化钠的磷酸钾缓冲液的 pH 值保持稳定。

20 实施例 3

经剪切或冻/融应激后蛋白溶液中颗粒的形成

对一种人源 IgG(抗 L-选择素抗体)溶液在不同缓冲液(A, B, C)中进行了颗粒含量分析(Accu sizer, 颗粒分析系统, USA)。

A: AB 在 10mmol/l 磷酸钾缓冲液中, 150mmol/l NaCl, pH7 ;

25 B : AB 在 100mmol/l 磷酸钾缓冲液中, pH7.2 ;

C: AB 在 100mmol/l 磷酸钾缓冲液中, 0.01 % 重量百分比 Tween[®] 80, pH7.2 ;

- a:离心(起始物质);
- b:剪切应激后(30 秒搅拌);
- 30 c:六次冻/融循环后 (-20 °C);

图 3 中数据每个样品为 0.7ml 。

由图 3 可清楚看出，本发明中由于使用了不含钠盐的磷酸钾缓冲液，颗粒形成得以抑制。这种效果可由加入非离子去污剂而增强(Tween[®] 80, 0.01 % 重量比)。

实施例 4

5 经剪切或冻/融应激后蛋白溶液形成颗粒情况

对一种抗 HBV 抗体溶液在不同缓冲液(A, B, C)中进行了颗粒含量分析 (Accu sizer, 颗粒分析系统, USA)。

A: AB 在 10mmol/l 磷酸钾缓冲液中, 30mmol/l NaCl, pH6.5 ;

B : AB 在 100mmol/l 磷酸钾缓冲液中, pH7.2 ;

10 C: AB 在 100mmol/l 磷酸钾缓冲液中, 0.01 % 重量百分比 Tween[®] 80, pH7.2 ;

a:离心(起始物质);

b:剪切应激后(30 秒搅拌);

c:六次冻/融循环后 (-20 °C);

15 图 3 数据每个样品为 0.7ml

由图 4 可见，本发明中由于使用了不含钠盐的磷酸钾缓冲液，颗粒形成得以抑制。这种效果可由加入非离子去污剂而增强。

实施例 5

20 在 0 °C 以下温度保存蛋白溶液(即实施例 3 中的人源抗体 IgG)时防止可溶性聚集物的形成

蛋白溶液在-20 °C 低温保存数周: A)10mM 磷酸钾, 150mM 氯化钠, pH7.0; B)100mM 磷酸钾, pH7.2。使用 HPLC 大小排阻法分析可溶性聚集物和原蛋白。本发明中, 在不含氯化钠的缓冲液中蛋白聚集物要明显少于含有氯化钠的缓冲液。这一切均是由于不含氯化钠的缓冲液的 pH 值变化基本上被抑制, 保存温度也明显低于低共熔点温度。(参阅实施例 1, 2)。

25

实施例 6

冻/融应激后蛋白溶液颗粒的形成

30 对不同缓冲液中的抗体如 MABL - 选择素、MAB HBV、MAB PDGF-R 和 MAB LNGF-R, 在冻/融应激前后的颗粒组成作分析(Accu sizer, 颗粒分析系统)(结果见表一, C_{prot}: 蛋白浓度)。颗粒大小在 2-400/ml。

显然, 本发明使用了不含氯化钠的磷酸钾缓冲液可显著抑制颗粒的形

成，这种效果可通过加入非离子去污剂而增强。

Table 1

MAB L-选择素缓冲液	蛋白浓度 [mg/ml]	应激前颗粒数/ml 2-400 μ m	六次冻/融后颗粒数/ml 2-400 μ m
10 mM KP, 150 mM NaCl, pH7.2	21.40	875	6245
100mM KP, 0.01 % 重量 Tween80, pH7.2	18.50	276	332

MAB HBV 缓冲液	蛋白浓度 [mg/ml]	应激前颗粒数/ml 2-400 μ m	六次冻/融后颗粒数/ml 2-400 μ m
10 mM KP, 30 mM NaCl, pH6.6	17.85	544	19085
100mM KP, 0.01 % 重量 Tween80, pH7.2	18.30	740	695

5

MAB PDGD-R 缓冲液	蛋白浓度 [mg/ml]	应激前颗粒数/ml 2-400 μ m	六次冻/融后颗粒数/ml 2-400 μ m
10 mM KP, 150mM NaCl, pH7.2	1.70	130	33793
50mMKP, 0.01 % Tween80, pH7.2	1.70	691	677

MAB LNGF-R 缓冲液	蛋白浓度 [mg/ml]	应激前颗粒数/ml 2-400 μ m	六次冻/融后颗粒数/ml 2-400 μ m
10 mM KP, 150 mM NaCl, pH7.2	1.70	690	28915
50 mM KP, 0.01 % Tween80, pH7.2	1.70	1164	1257

说明书附图

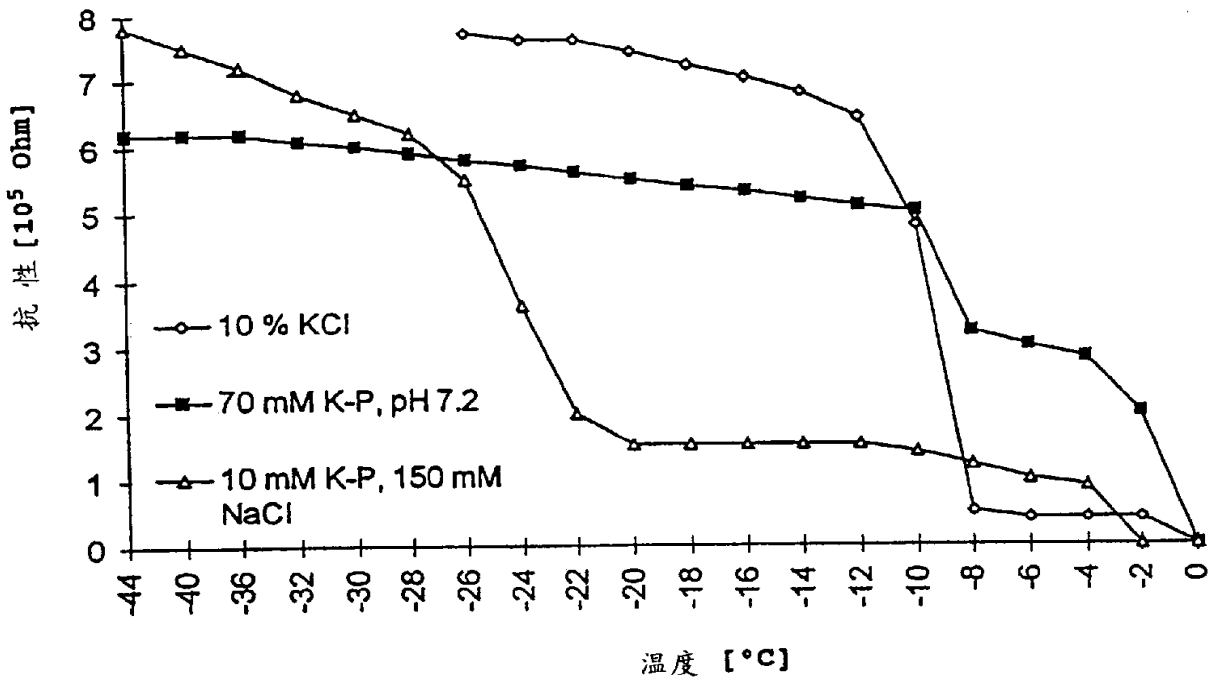


图 1

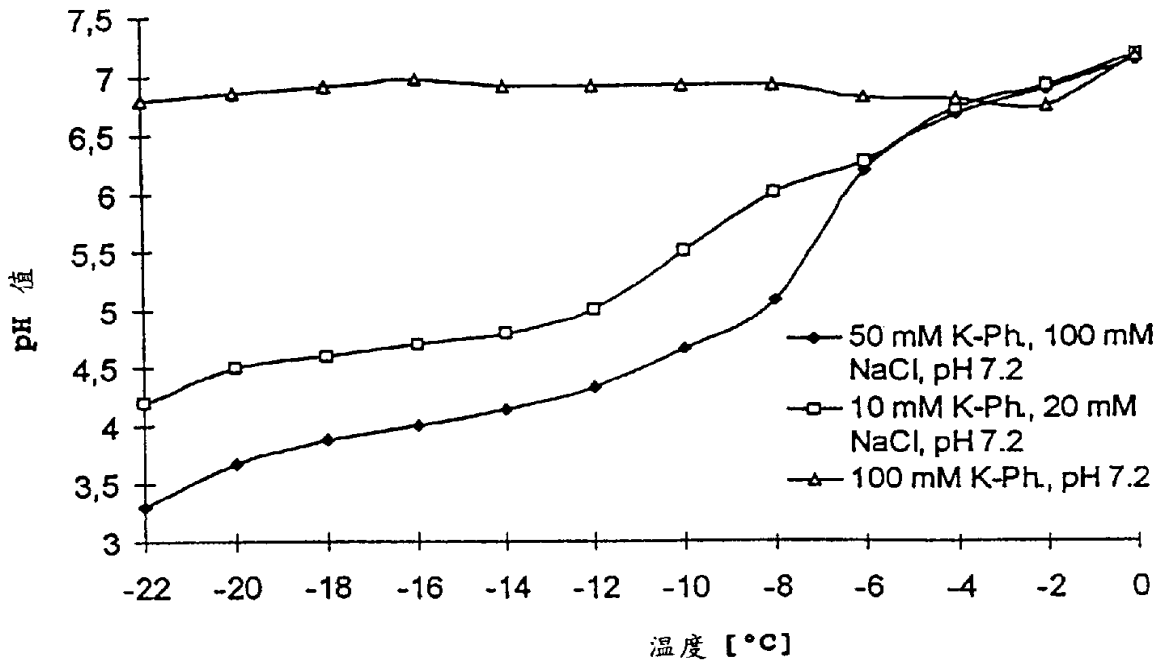


图 2

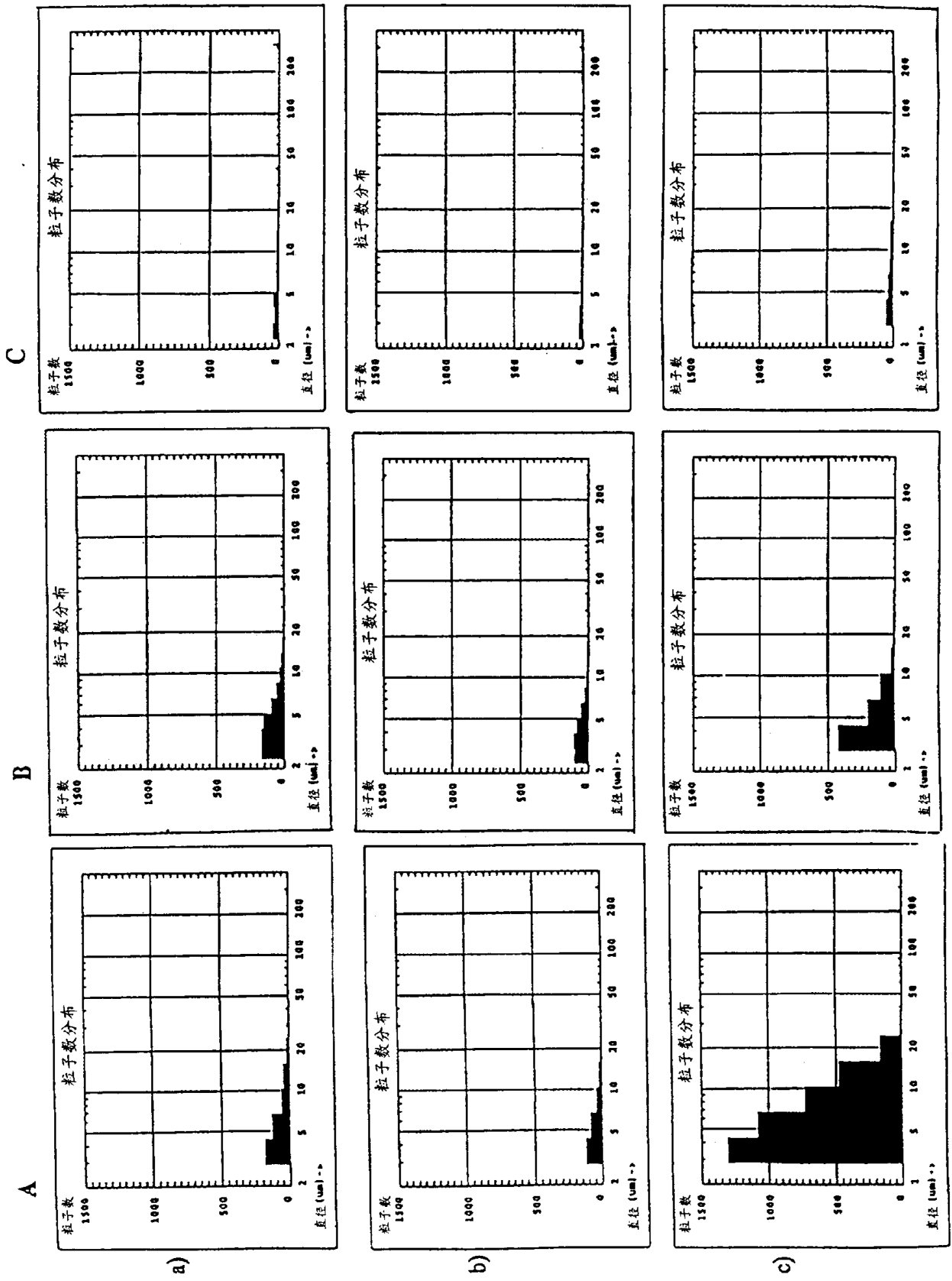


图 3

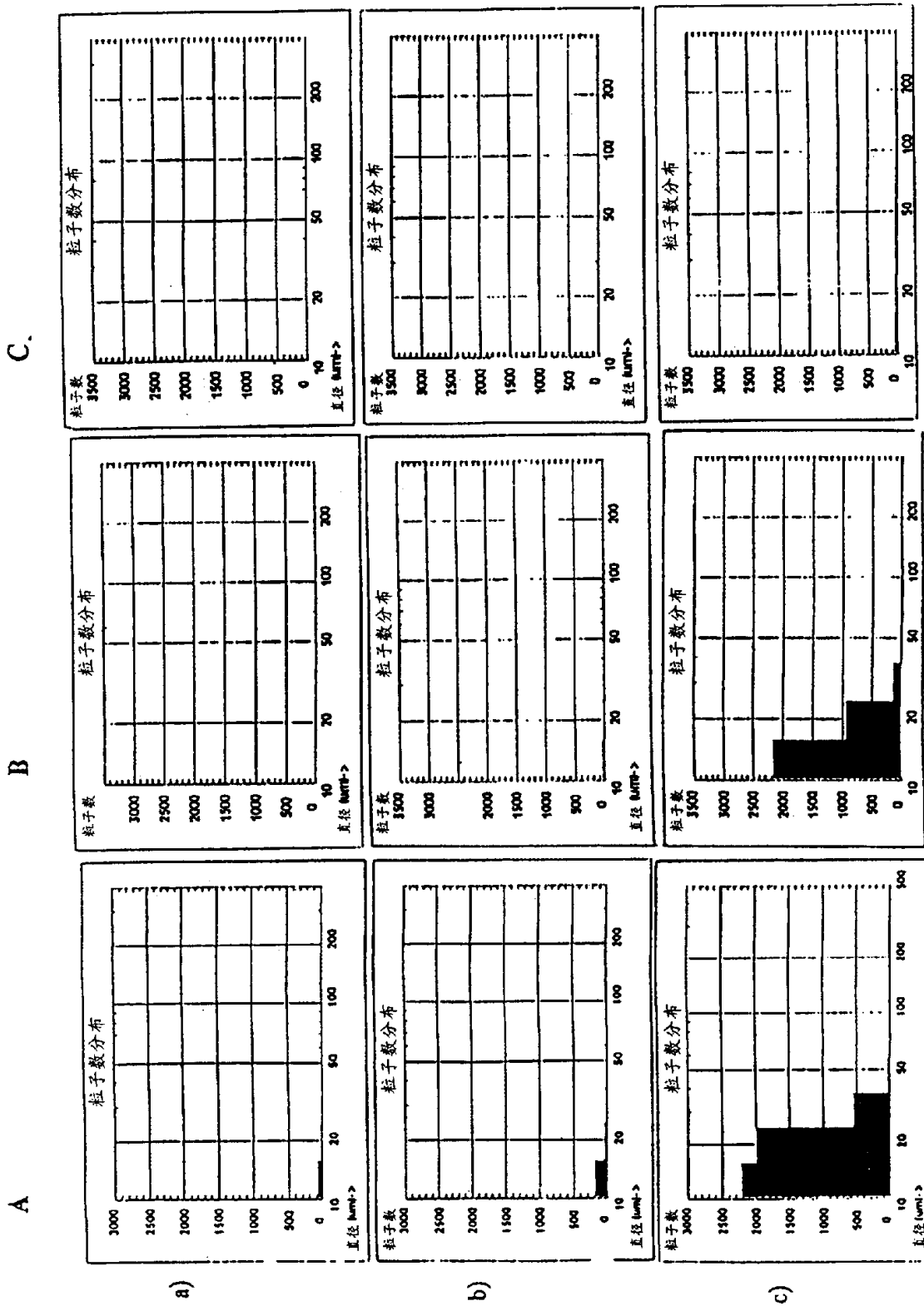
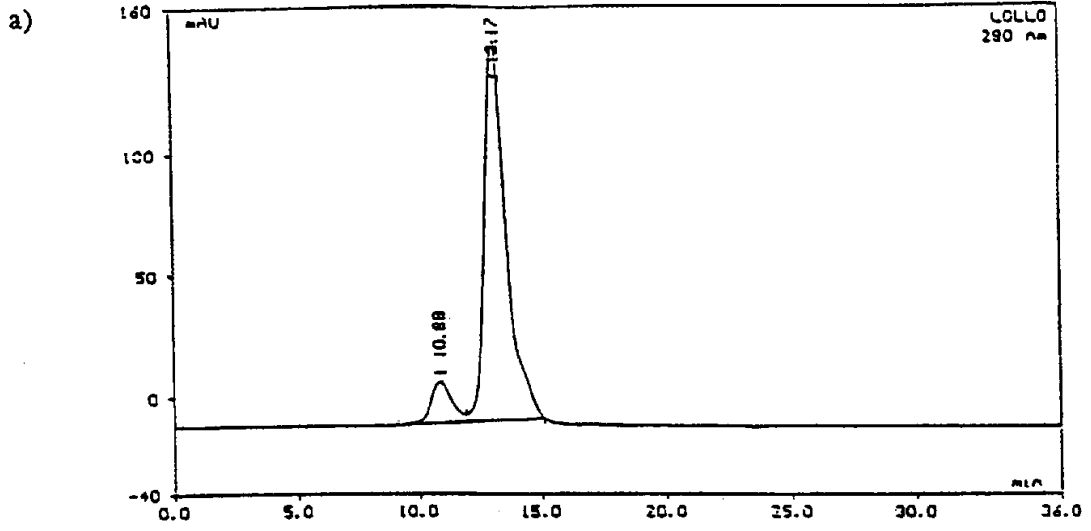


图 4

A



B

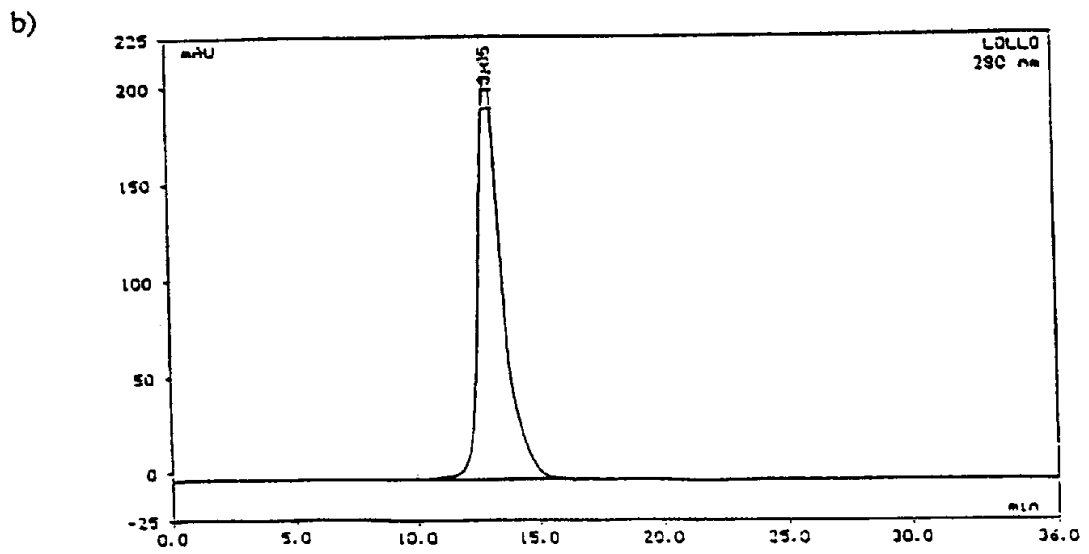


图 5