



(21) 申請案號：110141717 (22) 申請日：中華民國 110 (2021) 年 11 月 09 日
 (51) Int. Cl. : *A61K38/18 (2006.01)* *A61K47/12 (2006.01)*
A61K9/08 (2006.01) *A61K9/19 (2006.01)*
 (30) 優先權：2020/11/16 美國 63/114,044
 (71) 申請人：雅祥生技醫藥股份有限公司 (中華民國) EUSOL BIOTECH CO., LTD. (TW)
 臺北市松山區民生東路 3 段 135 號 6 樓
 (72) 發明人：黃金鼎 HUANG, JIN-DING (TW)
 (74) 代理人：鄭志玲
 申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：8 共 23 頁

(54) 名稱

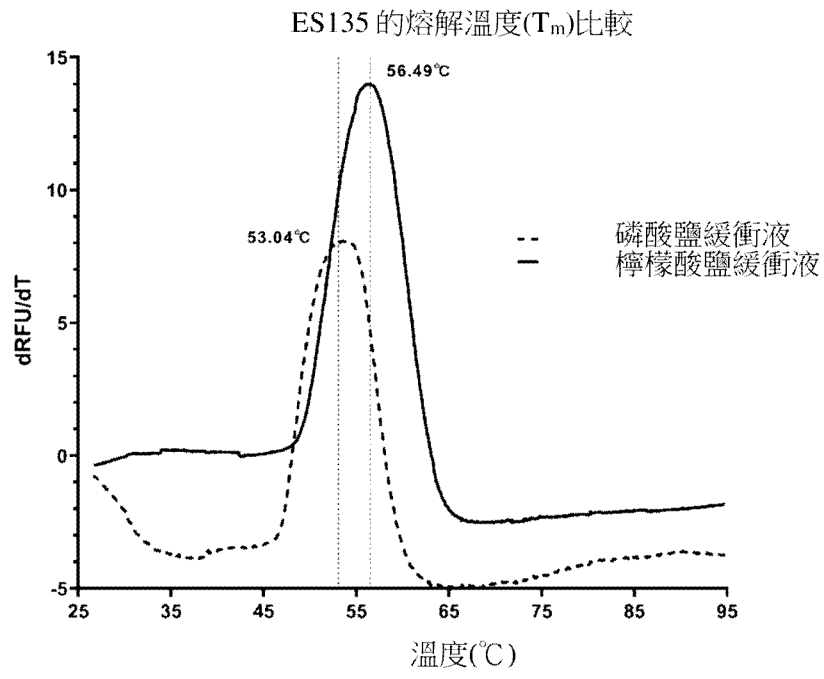
穩定的酸性纖維母細胞生長因子組合物

(57) 摘要

本發明提供一種穩定的酸性纖維母細胞生長因子 (aFGF) 組合物或一種用於穩定該包含 aFGF 的醫藥組合物之方法。該組合物包含 aFGF、檸檬酸化合物以及其他賦形劑。本發明還提供提高 aFGF 於液體制劑或凍乾製劑形式的穩定性以增加儲存穩定性之方法。

A stabilized aFGF composition or a method for stabilization of the pharmaceutical composition comprising aFGF are provided. The composition comprises aFGF, a citric acid compound and other excipients. The method for improving stability of aFGF in the form of a liquid formulation or a lyophilized formulation so as to increase storage stability is also provided.

指定代表圖：



【圖8】

【發明摘要】

【中文發明名稱】 穩定的酸性纖維母細胞生長因子組合物

【英文發明名稱】 STABILIZED AFGF COMPOSITIONS

【中文】

本發明提供一種穩定的酸性纖維母細胞生長因子（aFGF）組合物或一種用於穩定該包含aFGF的醫藥組合物之方法。該組合物包含aFGF、檸檬酸化合物以及其他賦形劑。本發明還提供提高aFGF於液體製劑或凍乾製劑形式的穩定性以增加儲存穩定性之方法。

【英文】

A stabilized aFGF composition or a method for stabilization of the pharmaceutical composition comprising aFGF are provided. The composition comprises aFGF, a citric acid compound and other excipients. The method for improving stability of aFGF in the form of a liquid formulation or a lyophilized formulation so as to increase storage stability is also provided.

【指定代表圖】 圖8

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 穩定的酸性纖維母細胞生長因子組合物

【英文發明名稱】 STABILIZED AFGF COMPOSITIONS

【技術領域】

【0001】 本非臨時申請係根據美國專利法第119(a)條(35 U.S.C. §119(a))之規定，主張於2020年11月16日提出之美國專利臨時申請第63/114,044號的優先權，其全部內容透過引用方式併入本文。

【0002】 本發明涉及一種穩定的aFGF組合物或一種穩定包含aFGF的醫藥組合物之方法。

【先前技術】

【0003】 酸性纖維母細胞生長因子（acidic fibroblast growth factor，aFGF，亦稱為FGF1）最初係為分離自神經組織（包括全腦及下視丘）的單鏈蛋白。已知aFGF在體外可促進多種類型的細胞增殖及分化，在醫藥領域中具有良好的應用（如，傷口癒合、毛髮生長以及神經元生長）。迄今，艾夫吉夫（AiFuJiFu）為目前市場上唯一一種重組人類aFGF（recombinant human aFGF，rhaFGF）商品化藥品，其於2006年在中國獲准用於治療燒燙傷及其他皮膚損傷。艾夫吉夫由含有rhaFGF、人類白蛋白、甘露醇，以及磷酸鹽緩衝液的凍乾粉所組成，並重新配製用於局部噴霧。

【0004】 ES135為一種aFGF的變異體，目前在台灣由雅祥生技醫藥股份有限公司（Eusol Biotech）進行用於脊髓損傷治療的第三期臨床試驗

(ClinicalTrials.gov編號：NCT03229031)。ES135目前的配方中亦使用磷酸鹽緩衝液。然而，ES135製劑的穩定性測試顯示，於25°C下存放1個月時藥物原料發生沉澱的情況（並伴隨蛋白質濃度的降低），HPIEC法所測得的ES135純度也降低約50%。由於ES135的配方在常溫下並不穩定，其儲存溫度應嚴格控制於-70°C以保持長期穩定性，但這會導致需要高成本的冷鏈運輸。鑑於上述情況，穩定性是日前ES135製劑的主要問題。

【0005】 為了提高現有配方的穩定性，本案申請人試圖尋找更有效的成分或組合物來穩定ES135並提高其儲存溫度。先前的研究顯示，高濃度的NaCl可減緩ES135的沉澱。然而，如果滲透壓高於物理極限，則藥物產品中高濃度的NaCl可能會有不良效應。此外，ES135在NaCl溶液中的穩定性有限，需要保存在-20°C（儲存溫度），因此仍不適合商業化。

【0006】 另一方面，在穩定性測試過程中觀察到ES135的脫醯胺作用，即使配方中含有高濃度的NaCl，在室溫下存放1個月也會增加15%以上的脫醯胺ES135。脫醯胺不純物的快速增長也限制了儲存溫度，不適合商業化。

【0007】 因此，仍然需要具有改善穩定性的aFGF（特別是該變異體ES135）製劑。

【發明內容】

【0008】 本發明意外地發現，包含一檸檬酸化合物的檸檬酸鹽緩衝液具有改善包含aFGF（特別是ES135）的醫藥組合物之穩定性的功效。

【0009】 據此，本發明之一方面係提供一種包含aFGF以及一檸檬酸化合物的醫藥組合物。

【0010】於本發明之一具體實施例中，該檸檬酸化合物為檸檬酸或異檸檬酸。

【0011】於本發明之一具體實施例中，該醫藥組合物為一液體或凍乾製劑之形式。

【0012】於本發明之一具體實施例中，該液體製劑中的檸檬酸化合物的濃度範圍為5 mM至75 mM。

【0013】於本發明之一具體實施例中，該液體製劑的pH值介於pH 5.8至pH 7.0的範圍內。

【0014】於本發明之一具體實施例中，該醫藥組合物中的aFGF為具有與SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%相同的胺基酸序列的蛋白質。

【0015】於本發明之一具體實施例中，該醫藥組合物透過皮下、局部、鼻內、靜脈內、肌肉內、神經內、腹膜內、腦室內或鞘內施用。

【0016】於本發明之一具體實施例中，該醫藥組合物為一凍乾製劑之形式。

【0017】於本發明之一具體實施例中，該醫藥組合物進一步包含甘露醇、糖或其組合。

【0018】於本發明之一具體實施例中，該糖選自由海藻糖、蔗糖及其組合所組成之群組。

【0019】本發明之另一方面為提供一種檸檬酸鹽緩衝液在改善醫藥組合物穩定性中的新用途。

【0020】本發明之另一方面為提供一種穩定一包含aFGF（特別是ES135）的醫藥組合物之方法，包括將aFGF與一檸檬酸鹽緩衝液混合以獲得一液體製劑，並可選擇性地凍乾該液體製劑。

【0021】應當理解的是，以上一般描述以及以下詳細描述均僅為示例性及說明性的，而並非對本發明之限制。

【圖式簡單說明】

【0022】圖1所示為溶解於具有不同NaCl濃度的3種不同緩衝系統（5 mM）中的ES135在第3天的穩定性測試中UV360吸收的結果。

【0023】圖2所示為溶解於具有不同NaCl濃度的3種不同緩衝系統（20 mM）中的ES135在第3天的穩定性測試中UV360吸收的結果。

【0024】圖3所示為溶解於3種不同緩衝系統（20 mM）中的ES135在穩定性加速試驗中UV360吸收的結果。

【0025】圖4所示為溶解於具有不同pH值的3種不同緩衝系統（5或20 mM）中的ES135在第3天穩定性測試中脫醯胺程度的結果。

【0026】圖5所示為溶解於2種不同緩衝系統（20 mM磷酸鹽或30 mM檸檬酸鹽）中的ES135在0至90天的穩定性測試中脫醯胺程度的結果。

【0027】圖6所示為溶解於不同濃度的4種鹽類/緩衝溶液中的ES135在第3天的穩定性測試中UV360吸收的結果。

【0028】圖7所示為溶解於具有不同pH值的10 mM檸檬酸鹽緩衝液中的ES135在穩定性加速試驗中UV360吸收的結果。

【0029】圖8所示為溶解於檸檬酸鹽緩衝液以及磷酸鹽緩衝液中的ES135在熱位移測定中熔解溫度（melting temperature）之比較。

【實施方式】

【0030】本文提供包含aFGF及檸檬酸化合物之醫藥組合物。基於如本文所述之研究，發明人已顯示出檸檬酸化合物在穩定該包含aFGF之醫藥組合物的方面具有改善的效果。

【0031】本文使用以下縮寫：

SEC（Size Exclusion Chromatography）：粒徑篩析層析法

RP-HPLC（Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography）：反相高效液相色層分析

HPIEC（High Performance Ion Exchange Chromatography）：高性能離子交換色層分析

aFGF（acidic Human Fibroblast Growth Factor）：酸性人類纖維母細胞生長因子

SDS PAGE（Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis）：十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳

mM：毫莫耳（ 10^{-3} mol/L）

【0032】除非另有定義，本文使用之技術及科學術語與本領域普通技術人員通常理解的含義相同。於本發明之實踐中可使用與本文描述之那些相似或等效的任何方法、裝置及材料。提供以下定義係為了便於理解本文中經常使用之某些術語，而非為了限制本公開之範圍。

【0033】如本文所用，冠詞「一」或「一個」係指該冠詞的一個或多個（亦即，至少一個）語法對象，除非在該冠詞的具體使用中另有說明該冠詞僅具單一的意義。

【0034】如本文所用，「aFGF」乙詞係指一天然存在的、分離的、重組的，或合成產生的aFGF，其包括等位基因變異體、物種同源物，或其任何修飾胜肽。該修飾的胜肽可例如透過如上所定義之aFGF中的一個或多個缺失、插入、取代或其組合所得。於本發明之一具體實施例中，該修飾的aFGF為包含透過從N端刪除20個胺基酸而縮短的天然人類aFGF（長度為154個胺基酸）的胜肽，並在該縮短的天然人類aFGF之前添加丙胺酸。例如，該修飾的aFGF可為由SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列（亦稱為ES135）所組成的胜肽，如美國專利第7,956,033號（美國專利申請序號第12/482,041號）中所述，其內容透過引用方式整體併入本文。

【0035】根據本發明，該aFGF係由以下SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列所組成的蛋白質：

Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu
Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln
Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr
Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu
Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His
Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp。

【0036】於一些具體實施例中，該aFGF的序列與SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或100%相同。於一些具體實施例中，SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列具有一個或多個修飾。例如，如美國專利第9,567,385號（美國專利申請序號第14/508,118號）中所公開的，SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列具有N端磷酸葡萄糖醯化或葡萄糖醯化，其全部內容透過引用方式併入本文。

【0037】如本文所用，「醫藥組合物」乙詞係指最終的劑型，其包含活性成分（例如，aFGF）並且其處於可上市使用之形式。該醫藥組合物可為液體或凍乾形式。

【0038】如本文所用，「檸檬酸化合物」乙詞係指檸檬酸（2-羥基丙烷-1,2,3-三羧酸）、異檸檬酸（1-羥基丙烷-1,2,3-三羧酸）、檸檬酸鹽（如，檸檬酸二氫鈉、檸檬酸氫二鈉、檸檬酸三鈉、檸檬酸二氫鉀、檸檬酸氫二鉀、檸檬酸三鉀，或其水合物形式）或異檸檬酸（如，異檸檬酸二氫鈉、異檸檬酸氫二鈉、異檸檬酸三鈉、異檸檬酸二氫鉀、異檸檬酸氫二鉀、異檸檬酸三鉀，或其水合物形式），或其組合。如上所定義之異檸檬酸可為四種立體異構體之一，包括D-蘇式-異檸檬酸（亦即，(1R,2S)-1-羥基丙烷-1,2,3-三羧酸）、L-赤型-異檸檬酸（亦即，(1R,2R)-1-羥基丙烷-1,2,3-三羧酸）、L-蘇式-異檸檬酸（亦即，(1S,2R)-1-羥基丙烷-1,2,3-三羧酸）、D-赤型-異檸檬酸（亦即，(1S,2S)-1-羥基丙烷-1,2,3-三羧酸），或其組合。該檸檬酸化合物較佳為檸檬酸或異檸檬酸。

【0039】如本文所用，有關包含aFGF的醫藥組合物之「液體」乙詞目的在於包括「水性」乙詞。有關包含aFGF的醫藥組合物之「凍乾」或「凍乾的」等詞目的在於指在減壓下冷凍乾燥多個小瓶，每個小瓶內含有一單位劑量之本發

明的aFGF製劑。進行上述凍乾的凍乾機為市售可購得，且為本領域技術人員可容易操作的。

【0040】 UV 360 nm檢測為混濁度測試方法，係用於測量蛋白質沉澱。由於一些配方中的ES135在幾天內不會產生沉澱；因此，開發另一種用於快速測定製劑穩定性的加速方法。在該加速法中，將96孔盤置於分光光度計中，逐步加熱至特定溫度，ES135開始沉澱的溫度可以反映ES135在配方中的穩定性。

【0041】 以HPIEC法來確定ES135的脫醯胺量。先前的研究顯示，在穩定性研究期間，HPIEC上出現的一個峰繼續增長，之後以質譜法確定該新的脫醯胺產物。HPIEC法為本研究中測定脫醯胺不純物的主要方法。

【0042】 本發明之一具體實施例為包含aFGF以及一檸檬酸化合物的醫藥組合物，其提供改善的穩定性。

【0043】 於本發明之另一具體實施例中，該具有改善穩定性的醫藥組合物包含aFGF以及一檸檬酸化合物。該檸檬酸化合物係選自由檸檬酸及異檸檬酸所組成之群組。該檸檬酸化合物更佳為檸檬酸。檸檬酸化合物（尤其是檸檬酸）可透過防止沉澱來穩定ES135。以下描述用於評估鹽類（作為緩衝系統）對製劑穩定性影響的測試。

【0044】 於本發明之另一具體實施例中，穩定一包含aFGF（特別是ES135）的醫藥組合物之方法包括將aFGF與一檸檬酸鹽緩衝液混合以獲得一液體製劑，並可選擇性地凍乾該液體製劑。

【0045】 換言之，本發明提供一種檸檬酸鹽緩衝液在改善包含aFGF的醫藥組合物之穩定性中的新用途。

【0046】 根據本發明，該醫藥組合物可以一液體製劑之形式製備。於一些具體實施例中，該液體製劑中檸檬酸化合物的濃度範圍為5 mM至75 mM；較佳為5 mM至20 mM。於本發明之一具體實施例中，該檸檬酸化合物的濃度為約5 mM。

【0047】 於一些具體實施例中，該液體製劑的pH範圍為pH 5.8-7.0。合適的pH值包括約pH 5.8、約pH 5.9、約pH 6.0、約pH 6.1、約pH 6.2、約pH 6.3、約pH 6.4、約pH 6.5、約pH 6.6、約pH 6.7、約pH 6.8、約pH 6.9，及約pH 7.0。合適的pH範圍為pH 5.9-7.0；pH 6.0-7.0；pH 6.1-7.0；pH 6.2-7.0；pH 6.3-7.0；pH 6.4-7.0；pH 6.5-7.0；pH 6.6-7.0；pH 6.7-7.0；pH 6.5-6.9；以及pH 6.6-6.8。該pH範圍最佳為pH 6.6-6.8。

【0048】 於本發明之一些具體實施例中，aFGF可為由SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列所組成之ES135，或具有與SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%，或98%相同的胺基酸序列之任一種蛋白。

【0049】 於本發明之一些具體實施例中，該醫藥組合物為一凍乾製劑的形式。具體而言，該凍乾製劑包含一檸檬酸化合物以及aFGF。於一些具體實施例中，該凍乾製劑進一步包含甘露醇、糖，或其組合。該糖較佳選自由海藻糖、蔗糖及其組合所組成之群組。

【0050】 根據本發明，ES135可構成適合於所選擇之施用方式的任何形式。ES135較佳為以皮下、局部、鼻內、靜脈內、肌肉內、神經內、腹膜內、腦室內，或鞘內施用。更佳為以鞘內施用ES135。

【0051】 方法

【0052】 本發明中使用之詳細分析方法如下表1所示。

表 1 本發明所用之分析方法

分析方法的編號	分析方法	功能	描述
1	UV 360 nm 法	混濁度	檢測在液體製劑中 ES135 的沉澱
2	HPIEC 法	脫醯胺作用	測量 ES135 的脫醯胺程度
3	UV 360 nm 法 (加速法)	混濁度	隨著溫度升高檢測在液體製劑中 ES135 的沉澱
4	熱位移分析 (Thermal Shift Assay, TSA)	螢光	檢測在液體製劑中 ES135 的溶解溫度

【0053】 UV 360 nm法

【0054】 使用Epoch™ 2微孔盤分光光度計 (BioTek公司)，透過在波長360 nm處的光散射程度來測量蛋白質的聚集。將300 µl的樣品溶液轉移至96孔盤內，並在特定溫度下隨時間測量波長360 nm處的光密度隨時間的變化。在此期間，聚集分析物的形成為不可逆的。吸收度與混濁度的程度相關，當蛋白質在溶液中沉澱時，混濁度的程度會增加。減去其第一次測量值 (O.D. (T0)) 以消除樣品的背景吸收度。

【0055】 HPIEC法

【0056】 HPIEC法用於確定測試樣品的脫醯胺程度。根據淨電荷變化使用弱陽離子交換管柱分離不純物，並選擇含有1M NaCl的MES緩衝液流洗分析物。將樣品溶液轉移到玻璃小瓶中，並加入100 µl至HPLC系統中。HPIEC法的詳細資訊如表2所列。

表 2 HPIEC 法	
溶劑 A	MES (2-(N-嗎啉代)乙磺酸) 緩衝液
溶劑 B	含 1M NaCl 的 MES 緩衝液
管柱	弱陽離子-交換管柱，分析型，4 x 250 mm
注射體積	100 µl
運行時間	20 分鐘
波長	280 nm
流速	0.5 ml/分鐘
移動相	55% 溶劑 A/ 45%溶劑 B

【0057】 熱位移分析

【0058】 使用具有465 nm激發以及580 nm發射波長的螢光的熱位移分析 (TSA) 來檢測各種配方中ES135的熔解溫度 (melting temperature, T_m)。TSA法係用於比較緩衝系統的有效性。

【0059】 使用LightCycler®480 II，以溫度 (T) 對螢光 (RFU) 的一階導數 ($dRFU/dT$) 曲線中螢光位移的最大變化來確定蛋白質的熔解溫度 (melting temperature, T_m)。將20 μ l含有SYPRO Orange染料 (Sigma-Aldrich公司，型號為S5692) 的樣品溶液轉移到 LightCycler®480 II專用的96孔盤 (Roche公司，型號為04729692001) 中，並將溫度自25°C快速升高到95°C進行處理。SYPRO Orange染料的非活性水性形式與蛋白質的熱暴露疏水區域結合以發出螢光。具有較高 T_m 值的蛋白質被認為具有更好的穩定性。另外分析緩衝液對照組以排除非蛋白質相關的訊號。TSA的詳細資訊如表3所列。

表 3 熱位移分析	
檸檬酸鹽緩衝液	30 mM 檸檬酸鹽，110 mM NaCl，pH 6.5
測試體積	20 μ l
運行時間	30 分鐘
波長	激發 466 nm/發射 580 nm
升降溫速率	0.05°C/秒；25°C至 95°C
檢測速率	連續

【0060】 aFGF製劑之凍乾

【0061】 凍乾機可去除樣品中的水分並提供更好的穩定性。將 1 ml的樣品溶液轉移至2 ml玻璃小瓶中，並於-40°C下冷卻30分鐘。冷凍樣品經過-15°C進行回溫，並在抽真空前冷卻至-40°C。凍乾程序如表4所列。程序完成後，以氮氣填充凍乾室並在氮氣環境下密封塞子。對測試樣品進行乾燥並充入氮氣。

表 4 凍存程序

順序	溫度	時間	真空
1	-40°C 預冷	30 分鐘	無
2	-15°C (回溫)	180 分鐘	無
3	-40°C 預冷	60 分鐘	無
4	-40°C	10 分鐘	< 0.2 托
5	-40 至 -37°C	10 分鐘	< 0.2 托
6	-37°C	1440 分鐘	< 0.2 托
7	-37 至 20°C	570 分鐘	< 0.2 托
8	20°C	480 分鐘	< 0.2 托

(0062) 實施例

(0063) 透過以下實施例更具體地解釋本發明。然而，應當注意的是，本發明不以任何方式限於這些實施例。

(0064) 實施例 1：不同鹽濃度對蛋白質沉澱之影響

(0065) 設計測試 1 來評估具有 NaCl 濃度為 0% 至 0.8% 的不同緩衝液（磷酸鹽、組胺酸，以及檸檬酸鹽），且在一定濃度範圍的緩衝液與 NaCl 下進行測試 2，以比較 IS135 在不同鹽類中的穩定性。測試樣品如表 5 所列，並應用 UV 360 nm 吸收以及 OPIEC 來確定 IS135 的穩定性。透過將 96 孔盤置於 ELISA 讀取儀中，於 25°C 至 65°C 的溫度梯度下對樣品進行加速法，該方法可在數小時內區分測試樣品的穩定性。表 5 總結了測試 1 以及測試 2 中使用的緩衝液及其成分。

表 5 鹽濃度對蛋白質沉澱的效果

測試 1 參數	緩衝液	NaCl
	5 mM 磷酸鹽	0%
	20 mM 磷酸鹽	0.1%
	5 mM 組胺酸	0.4%
	20 mM 組胺酸	0.8%
	5 mM 檸檬酸鹽	
	20 mM 檸檬酸鹽	

共 6 種緩衝液 * 4 種 NaCl 濃度 = 24 種組合物
測試方法：

1. 在第 3 天於室溫下測 UV360 的吸收

2. 於室溫下放置 3 天後進行 HPIEC 分析
3. 加速法 (20 mM 緩衝液, 0.8% NaCl)

測試 2

參數	緩衝液或鹽類	緩衝液/鹽類濃度
	NaCl	0, 25, 74, 151, 450 mM
	磷酸鹽	0, 12, 37, 75, 225 mM
	組胺酸	0, 8, 25, 50, 150 mM
	檸檬酸鹽	0, 4, 12, 24, 75 mM

測試方法：

1. 在第 3 天於室溫下測 UV360 的吸收
 2. 於室溫下放置 3 天後進行 HPIEC 分析
-

【0066】 結果如圖1及圖2所示，證明在包含aFGF的醫藥組合物中使用檸檬酸鹽緩衝液比其他緩衝液（亦即，磷酸鹽以及組胺酸緩衝液）在防止沉澱方面提供更好的效果。

【0067】 在測試1中建立加速法。如圖3所示，在較窄的溫度範圍內，測試樣品的UV 360 nm吸收迅速增加。加速法可指示ES135的變性，該方法有助於區分幾天內不會沉澱的製劑的穩定性。加速法的結果顯示，檸檬酸鹽緩衝液是ES135的最佳緩衝液，結果與圖1及圖2所示的結果一致。

【0068】 實施例2：不同鹽類對蛋白質脫醯胺之影響

【0069】 以HPIEC法確定測試1的脫醯胺程度。如圖4所示，脫醯胺程度與pH值相關；然而，在相應的pH值下，磷酸鹽緩衝液比檸檬酸鹽緩衝液導致更高的脫醯胺程度。

【0070】 測量20 mM磷酸鹽緩衝液以及30 mM檸檬酸鹽緩衝液的依時間進程的脫醯胺程度。如圖5所示，在0至90天的相應時間點，磷酸鹽緩衝液比檸檬酸鹽緩衝液導致更高的脫醯胺程度。

【0071】 實施例3：不同緩衝液之穩定作用

【0077】 實施例6：凍乾產品的配方

【0078】 穩定劑與填充劑對凍乾藥物產品相當重要。當水從液體製劑中移出時，穩定劑如碳水化合物可透過在周圍區域提供-OH基團來穩定蛋白質。填充劑如甘露醇可支撐凍乾藥物產品的結構。測試了兩種穩定劑（海藻糖以及蔗糖）與一種填充劑（甘露醇）用於ES135製劑的凍乾。凍乾製劑的4個代表性實施例如表7所列。在方法中描述製備凍乾製劑的詳細程序。

表 7 凍乾製劑的代表性實施例

編號	pH	aFGF (mg/ml)	檸檬酸鹽 (mM)	甘露醇 (mg/ml)	海藻糖 (mg/ml)	蔗糖(mg/ml)
1	6.6	1	5	0	50	0
2	6.6	1	5	15	50	0
3	6.6	2	10	15	50	0
4	6.6	1	5	0	0	50

【0079】 結論為，加入檸檬酸化合物作為緩衝系統顯著地提高了包含aFGF的醫藥組合物的穩定性。此外，本發明之醫藥組合物可進一步加工為凍乾形式。

【0080】 雖然本發明之前述書面敘述使本領域普通技術人員能夠製作並使用目前被認為是最佳模式的內容，但本領域普通技術人員將瞭解並理解本文之具體實施例、方法以及實施例的變化、組合以及等效物。因此，本發明不應受上述具體實施例、方法以及實施例之限制，而是受本發明之範圍與精神內的所有具體實施例及方法之限制。

【符號說明】 無

序列表

- <110> 雅祥生技醫藥股份有限公司
 <120> 穩定的酸性纖維母細胞生長因子組合物
 <130> IE0206/EUS0007TW
 <150> US 63/114,044
 <151> 2020-11-16
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 衍生自智人纖維母細胞生長因子(α -FGF)的胜肽
 <400> 1

Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His
 1 5 10 15

Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg
 20 25 30

Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu
 35 40 45

Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr
 50 55 60

Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys
 85 90 95

His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys
 100 105 110

Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu
 115 120 125

Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
 130 135

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種提高穩定性的醫藥組合物，包含酸性纖維母細胞生長因子（acidic fibroblast growth factor，aFGF）以及一檸檬酸化合物。

【請求項2】 如請求項1之醫藥組合物，其中該檸檬酸化合物為檸檬酸或異檸檬酸。

【請求項3】 如請求項1之醫藥組合物，其中該醫藥組合物為一液體製劑之形式。

【請求項4】 如請求項3之醫藥組合物，其中該液體製劑中的檸檬酸化合物的濃度範圍為5 mM至75 mM。

【請求項5】 如請求項3之醫藥組合物，其中該液體製劑的pH值介於pH 5.8至pH 7.0的範圍內。

【請求項6】 如請求項1之醫藥組合物，其中aFGF為具有與SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%相同的胺基酸序列的蛋白質。

【請求項7】 如請求項1之醫藥組合物，其中aFGF為由SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列所組成的蛋白質。

【請求項8】 如請求項1之醫藥組合物，其中該組合物透過皮下、局部、鼻內、靜脈內、肌肉內、神經內、腹膜內、腦室內或鞘內施用。

【請求項9】 如請求項1之醫藥組合物，其中該醫藥組合物為一凍乾製劑之形式。

【請求項10】 如請求項9之醫藥組合物，進一步包含甘露醇、糖，或其組合。

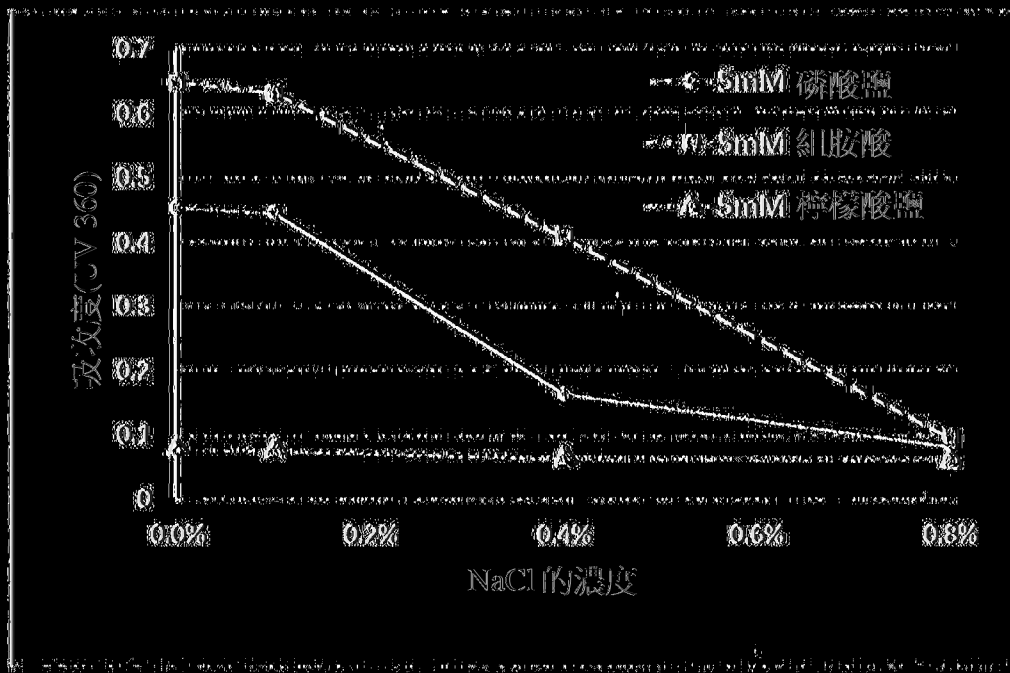
【請求項11】 如請求項10之醫藥組合物，其中該糖係選自由海藻糖、蔗糖及其組合所組成之群組。

【請求項12】 一種檸檬酸鹽緩衝液在提高一包含aFGF的醫藥組合物之穩定性中的用途。

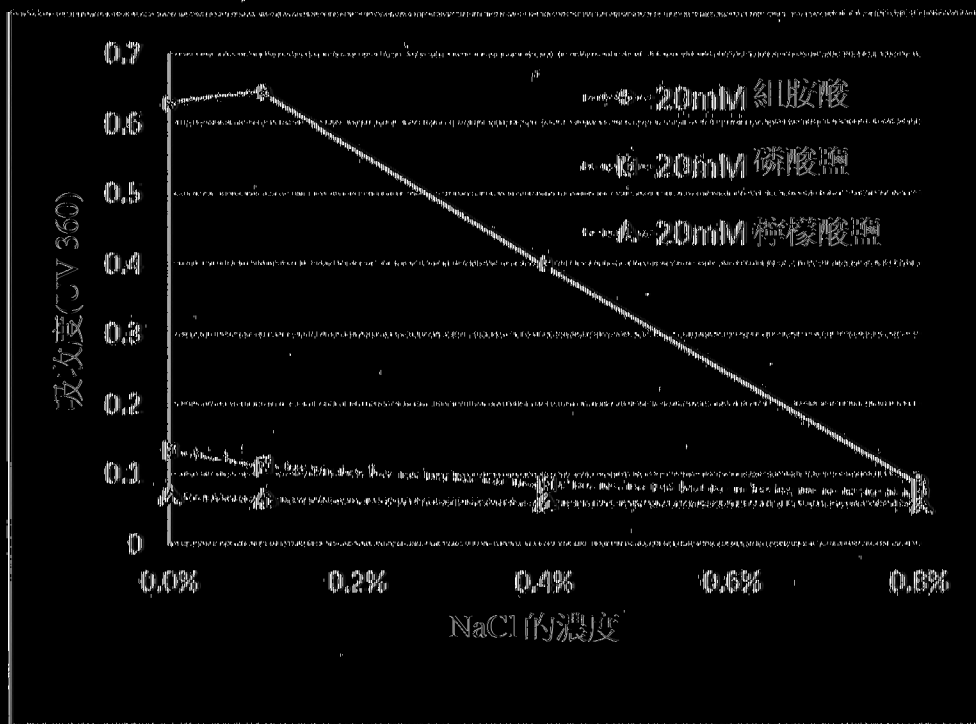
【請求項13】 一種穩定一包含aFGF的醫藥組合物之方法，包括將aFGF與一檸檬酸鹽緩衝液混合以獲得一液體製劑。

【請求項14】 如請求項13之方法，進一步包括凍乾該液體製劑之步驟。

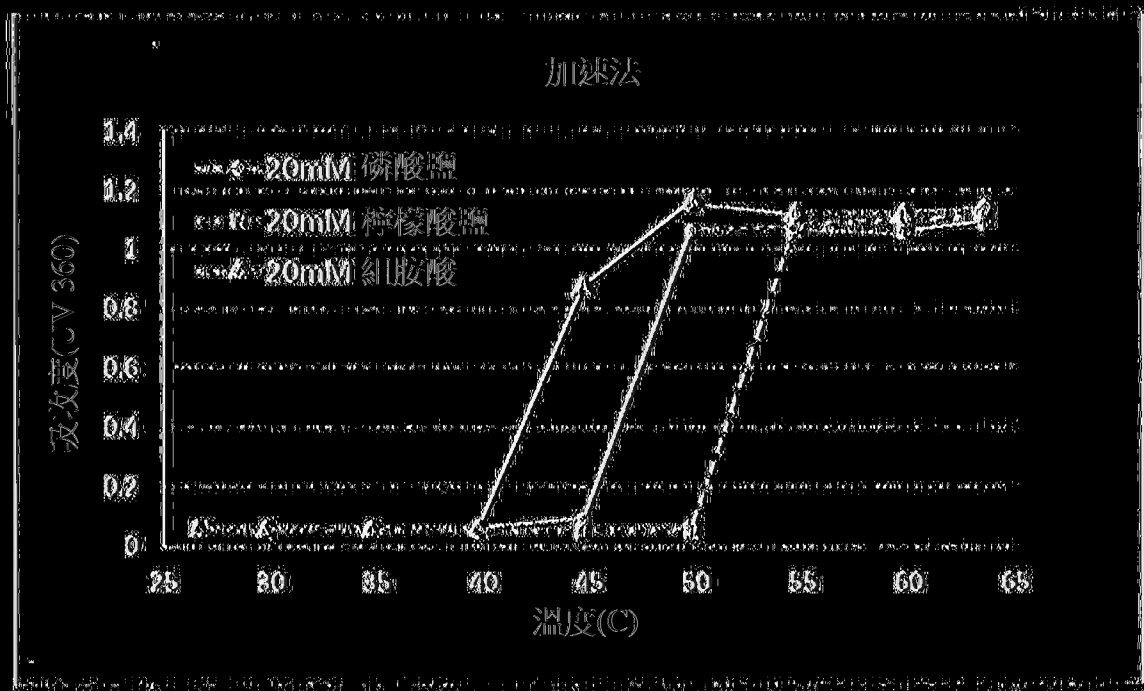
(發明圖式)



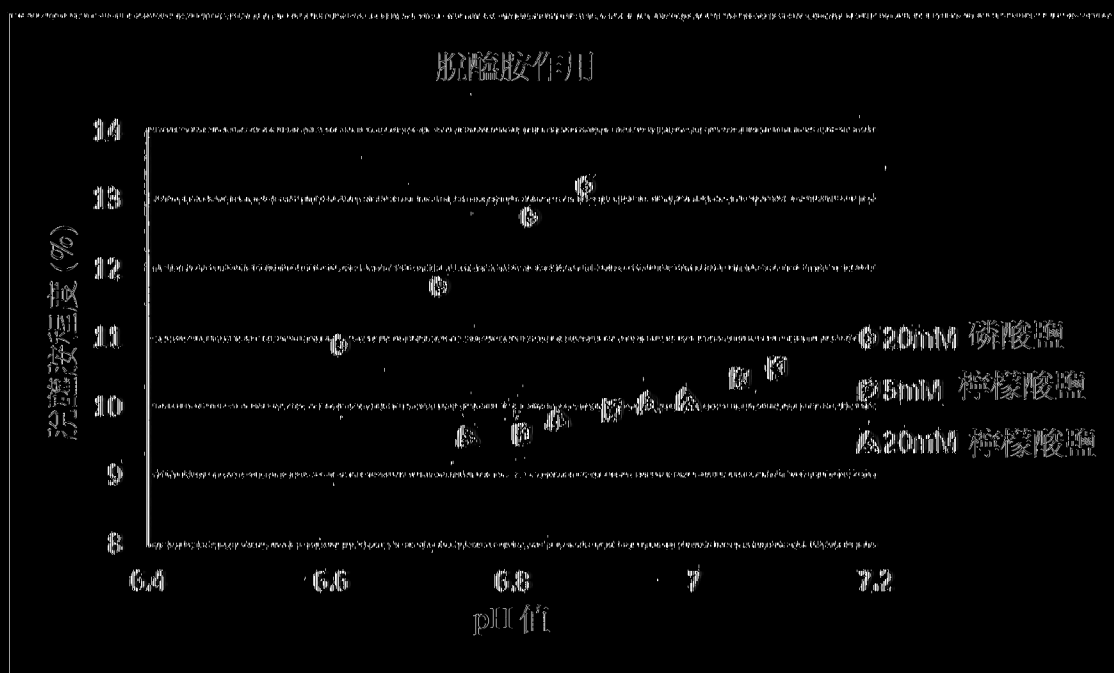
(圖1)



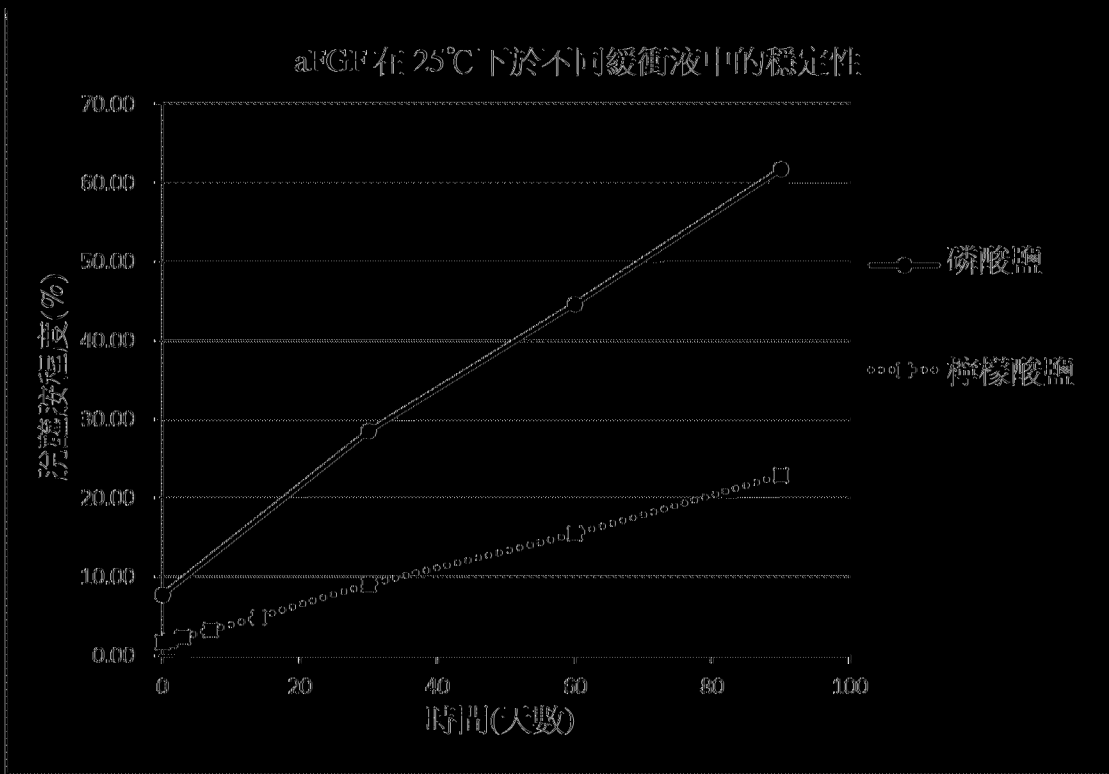
(圖2)



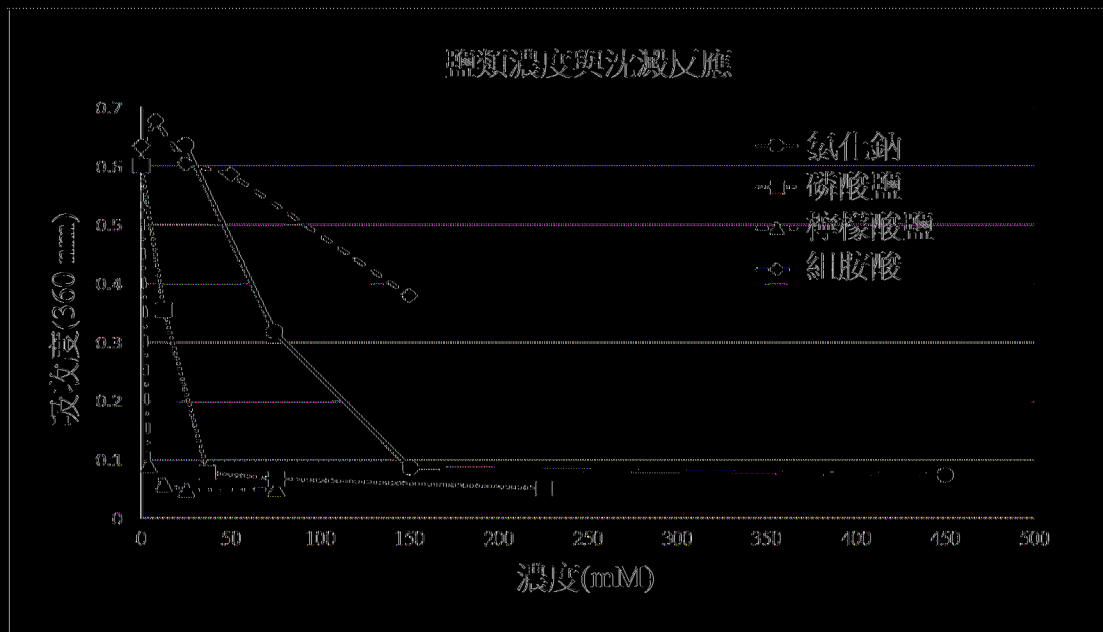
(圖3)



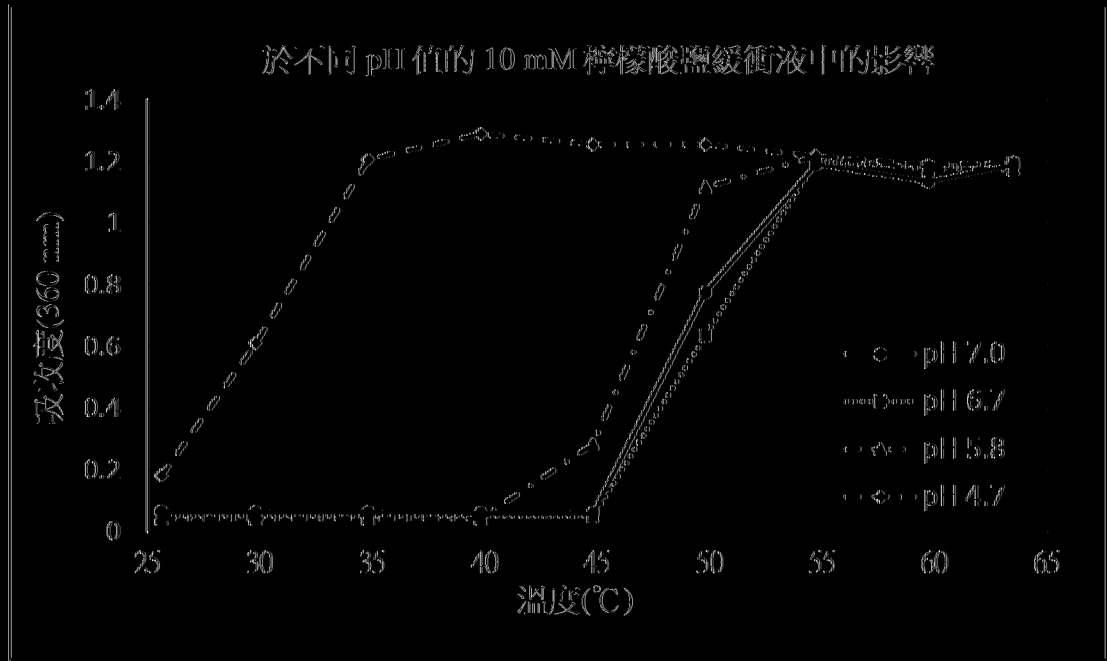
(圖4)



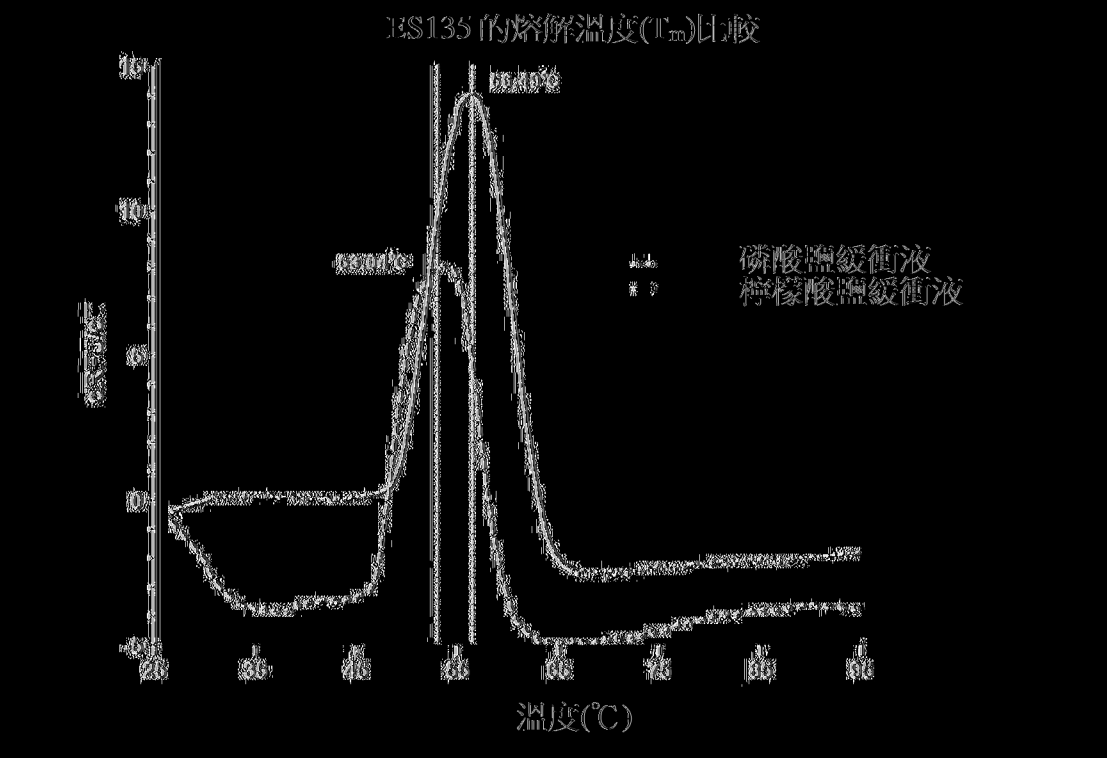
(圖5)



(圖6)



(圖7)



(圖8)