[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 38/38 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810231594.1

[43] 公开日 2009 年 6 月 10 日

[11] 公开号 CN 101450205A

[22] 申请日 2008.12.31

[21] 申请号 200810231594.1

[71] 申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450001 河南省郑州市郑州国家高新技术产业开发区银屏路 38 号

[72] 发明人 王云龙 韩 洁 陈小科 李玉林 李智涛

权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

一种猪用融合蛋白制剂

[57] 摘要

含有用猪血清白蛋白与猪或人干扰素人工结合的融合蛋白、精氨酸或赖氨酸等稳定剂、氯化钠、以及缓冲剂的冻干制剂，它由浓度不超过 10mg/mL 的融合蛋白的水溶液制备得到，和/或用于制备再溶解后融合蛋白的浓度不超过 10mg/mL 的水溶液，并且保存稳定性优良。

1、 一种猪血清白蛋白与猪或人干扰素的融合蛋白的冻干制剂，其特征为：含有融合蛋白、防止融合蛋白生成聚集体的稳定剂、氯化钠、以及缓冲剂，这种冻干制剂由融合蛋白的浓度不超过 10mg/mL 的水溶液制备得到，且用于制备再溶解后融合蛋白的浓度不超过 10mg/mL 的水溶液。

2、 如权利要求 1 所述的冻干制剂，其中，稳定剂选自精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、硫酸化多糖类、以及这些物质的可药用盐构成的组，其使用量足以防止 FPP 在冻干时和／或冻干后保存时生成聚集体。

3、 如权利要求 1 所述的冻干制剂，其中，缓冲剂为磷酸盐。

4、 如权利要求 1 所述的冻干制剂，其中，冻干前和／或再溶解后的水溶液具有注射剂适宜的 pH，其 pH 在 5.8 至 7.8 的范围。

5、 如权利要求 1 所述的冻干制剂，其中，冻干前和／或再溶解后的水溶液具有注射剂适宜的渗透压比，其渗透压比在 1 至 2 的范围。

6、 如权利要求 1 所述的冻干制剂，它可以进一步含有聚氧乙烯醚类表面活性剂。

7、 如权利要求 1 所述的冻干制剂，它在小瓶或安瓿瓶中制备。

一种猪用融合蛋白制剂

技术领域

本发明涉及一种猪用融合蛋白的冻干制剂，属药物制剂领域。

发明背景

在《一种猪用融合蛋白的制备方法》专利（申请号 200810014768.3）中，我们公开了利用融合技术得到的猪血清白蛋白与干扰素的融合蛋白（The fusion protion of porcine：在本发明中，以下略作 FPP）。这种融合蛋白既能延长干扰素在血浆中的半衰期，又能保持干扰素的生物学活性，并且融合蛋白是在毕赤酵母中进行分泌表达，纯化较为简单，为防治猪病毒性疾病提供了新的手段。

可是，FPP 的等电点偏酸，其水溶液制剂在偏酸或接近中性时溶解性急剧降低，在低温或者室温保存时，该制剂容易出现凝集、混浊或凝胶化。另外，该制剂的物理化学稳定性低，容易降解或形成聚集体。再者，FPP 的水溶液制剂在振动或搅拌后的发泡会造成药物制剂的品质下降，药效减低。因此，从生物活性的角度来说，FPP 制剂以冻干制剂为佳。

为了克服 FPP 水溶液制剂的上述缺陷，在申请号 200810014768.3 的专利中，对 FPP 冻干制剂的药物载体进行了初步探讨，典型的载体为水、盐、糖类、醇类或氨基酸，但未能对其作进一步研究。

按一般的冻干制剂工艺，为了得到良好的形态，多采用高蛋白浓度的水溶液进行制备。但是，当制剂的水溶液浓度较高时，在保存中容易出现聚集体，效果反而不佳。并且，FPP 是具有较强生理活性的物质，作为医药使用时，仅需较低的浓度。因此，需要开发在低浓度水溶液时 FPP 不易生成聚集体，且长期保存稳定性优良的冻干制剂的制备方法。

并且，如果这种冻干制剂的缓冲液选择不当，复溶后，溶液的渗透压高，可导致给药部位出现炎症反应、溶血现象和产生疼痛等；如果盐、糖、醇、大分子化合物、金属离子等稳定剂，氨基酸、表面活性剂等防聚集剂，聚乙二醇等低温保护剂选择不当，也会影响药效，需要进行研究。

发明内容

本发明的目的是提供一种 FPP 冻干制剂，该冻干制剂具有优良的保存稳定性，再溶解时不出现凝集、混浊、凝胶化等现象。

本发明的第二个目的是提供成形和复溶性能优良的冻干制剂。

本发明的第三个目的是提供具有适宜的 pH 和渗透压比的冻干制剂。

为达到上述目的，本发明者等人进行了悉心研究。结果表明，将浓度不超过 10mg/mL 的 FPP，在稳定剂、氯化钠、以及缓冲剂存在的条件下进行冻干，能够制备出结块形成性、溶解性、长期保存稳定性良好的冻干制剂，并且在该冻干制剂的制备和保存过程中不生成聚集体，由此冻干制剂再融化后的水溶液不产生凝集、混浊、凝胶化等现象，保证了药物能够充分发挥药效。

本发明提供：

含有 FPP、阻止 FPP 生成聚集体的稳定剂、氯化钠、以及缓冲剂的冻干制剂，且该冻干制剂是从 FPP 浓度不超过 10mg/mL 的水溶液中制备得到。

这些 FPP 冻干制剂在冻干时以及冻干后的长期保存过程中，具有优良的稳定性，不生成 FPP 的聚集体，由冻干制剂再溶解后的水溶液不产生凝集、混浊、凝胶化等现象，甚至在保存该水溶液时也难以生成聚集体。

本发明提供的方案是：

本发明的制剂的水溶液中，所含 FPP 的浓度在 0.1mg/mL 到 10mg/mL 之间，优选 0.5mg/mL—6mg/mL。

本发明的制剂的水溶液在小瓶中或在安瓿瓶中冻干。

本发明的制剂的水溶液的 pH 在 5.8 到 7.8 范围，优选 pH6.2 到 pH7.5 范围。

本发明的制剂所用的稳定剂是从精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、硫酸化多糖类、及它们的可药用盐构成的组合中选出。优选从精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、及它们的可药用盐构成的组合，特别优选从精氨酸、赖氨酸、组氨酸、及它们的可药用盐构成的组合。可药用盐是钠盐、钾盐等碱金属盐。这些稳定剂的用量没有特别的限定，优选按冻干时和 / 或冻干后保存时可防止生成 FPP 聚集体的充分有效的用量，相对于 FPP 的质量，优选 0.01 至 100 倍的质量，最优选 0.1 至 30 倍的质量，在上述制剂中配合使用。

本发明的制剂所用的缓冲剂只要具有调节冻干前及再溶解后水溶液的 pH 和保持 FPP 的溶解性的作用，就没有特别限制。例如，应用磷酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、醋酸缓冲液等，优选使用磷酸缓冲液，特别优选使用磷酸钠缓冲液。其用量相对于再溶解后的水量，在 1mM—100mM 之间。

本发明的制剂在冻干前和/或再溶解后的水溶液优选具有注射剂适宜的渗透压，与生物体几乎等渗，或按注射剂的渗透压比在 1 至 2 之间。氯化钠按达到与生物体等渗的渗透压的量添加，优选的渗透压比为 1 至 2，例如相对于再溶解后的水量为 140mM 的程度。

为防止 FPP 向容器上吸附，加入表面活性剂，优选使用聚山梨醇酯 80、聚山梨醇 20、HCO-60、聚乙二醇等非离子表面活性剂以及它们两种以上组合，最优选使用聚氧乙烯醚表面活性剂（聚山梨醇酯 80 等）。其添加量，优选相对于再溶解后的水重量的 0.001%至 2.0%的范围。

对于本发明的冻干制剂中所含 FPP 中的干扰素的种类没有特殊的限定。例如，来源于动物的，来源于能自发产生干扰素的细胞的，来源于基因重组手段得到的等。

本发明的 FPP 冻干制剂可以含有制剂所必要的其它添加剂，如抗氧化剂、防腐剂、赋形剂、镇痛剂等。

本发明的 FPP 冻干制剂的制备：

将 FPP、稳定剂、氯化钠、以及缓冲剂溶解于注射用蒸馏水中，根据需要添加表面活性剂后，过滤除菌，分装在小瓶或者安瓿瓶等容器中进行冻干。作为冻干的方法，通常由以下三个操作单元组成：

(1) 常压下冷却冻结的冻结过程；

(2) 减压下升华干燥的一次干燥过程；

(3) 减压下除去吸附水和结晶水的二次干燥过程。

本发明的冻干制剂在使用时，加入注射用水等溶剂进行溶解，但 FPP 的浓度不要超过 10mg/mL。使用剂量可通过 FPP 相对于干扰素的效价计算出，同时考虑 FPP 相对于天然干扰素延长的半衰期，按照摩尔数相当即意味着使用较大剂量的 FPP，但使用频率可降低，如一周一次或更少。

本发明的冻干制剂可以通过任何已知的方法给药，例如皮下或肌肉注射、静脉输注、透皮、吸入、口服等方法，优选的方法为注射给药或静脉输注，治疗包括在一段时间内使用单一剂量或复合剂量。

具体实施方式

以下列举实施例详细说明本发明，但本发明并不限定于这些实施例。

实施例 1：FPP 冻干制剂，基础比较例

用含有 140mM 氯化钠、0.01%聚山梨醇酯 80 的 10mM 的磷酸缓冲液（pH7.0）溶解 FPP，并使 FPP 终浓度为 1mg/mL。调节此溶液的 pH 后，过滤除菌，无菌条件下在每小瓶中分装 2mL，常规冻干。

实施例 2：FPP 冻干制剂，FPP 浓度比较例

在例 1 中，用不同浓度的 FPP 加入量，代替浓度为 1mg/mL 的 FPP 水溶液，分别得到 FPP 终浓度为 0.1、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8、2.1、2.4、2.7、3.0、3.3、3.6、3.9、4.2、4.5、4.8、5.1、5.4、5.7、6.0、6.3、6.6、6.9、7.2、7.5、7.8、8.1、8.4、8.7、9.0、9.5、10.0（mg/mL）的水溶液。调节此溶液的 pH 后，过滤除菌，无菌条件下在每小瓶中分装 2mL，常规冻干。

实施例 3：FPP 冻干制剂，pH 比较例

在例 1 中，用不同 pH 的 10mM 磷酸缓冲液，代替 pH7.0 的 FPP 水溶液，分别得到 pH 为 5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0 的水溶液。过滤除菌后，无菌条件下在每小瓶中分装 2mL，常规冻干。

实施例 4：FPP 冻干制剂，氯化钠含量比较例

在例 1 中，用不同含量的氯化钠加入量，代替含量为 140mM 氯化钠的 FPP 水溶液，分别得到氯化钠含量为 100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300（mM）的水溶液。调节此溶液的 pH 后，过滤除菌，无菌条件下在每小瓶中分装 2mL，常规冻干。

实施例 5：FPP 冻干制剂，稳定剂种类及含量比较例

在例 1 中，加入 10mM、50mM、100mM、150mM、200mM 含量的氨基酸如精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、半胱氨酸、脯氨酸、谷氨酸钠、天冬氨酸钠、甘氨酸、丙氨酸及硫酸葡聚糖钠，分别得到不同含量、不同氨基酸种类的水溶液。调节溶液的 pH 后，过滤除菌，无菌条件下在每小瓶中分装 2mL，常规冻干。

实施例 6：FPP 冻干制剂，缓冲剂种类比较例

在例 1 中，用不同含量的柠檬酸缓冲液、醋酸缓冲液代替磷酸缓冲液，得到的水溶液调节 pH 后，过滤除菌，无菌条件下在每小瓶中分装 2mL，常规冻干。

实施例 7：FPP 冻干制剂，优化例

用含有 140mM 氯化钠、100mM 精氨酸，0.01%聚山梨醇酯 80 的 10mM 的磷酸缓冲液（pH6.5）溶解 FPP，并使 FPP 终浓度为 1mg/mL，过滤除菌后，得

到 FPP 水溶液。调节此溶液的 pH 后，无菌条件下在每小瓶中分装 2mL，常规冻干。

实验例 1：对 FPP 溶解度的评价

(1) FPP 溶解度的评价方法

在试管中称量 FPP，加入含有各种浓度的氯化钠以及稳定剂、0.01％聚山梨醇酯 80 的 10mM 磷酸钠缓冲液后，恒温保持 24 小时，离心分离未溶解的 FPP（15，000rpm，10 分钟），取上清作为试样。用亲水性 Durapore 滤膜 Millipore GV（0.22μm）过滤，适当稀释，用紫外吸收法定量测定得到的溶液中的 FPP 浓度，以计算 FPP 的饱和溶解度。

紫外吸收法定量测定的具体方法是：

将待测的蛋白质溶液稀释到光密度在 0.2 至 2.0 之间，在波长 280nm 和 260nm 处以相应的溶剂作空白对照，分别测定待测样品的光密度值（OD_{280} 和 OD_{260}）。应用 280nm 和 260nm 的吸收差法经验公式直接计算出蛋白质浓度。

蛋白质浓度（mg/mL）=$1.45\times OD_{280}-0.74\times OD_{260}$

(2) pH 对 FPP 溶解度的影响

采用实施例 3 的方法配制 pH 不同的溶液，在 4℃以及 20℃按（1）的方法检测 FPP 的溶解度，其结果是，随着 pH 的降低，FPP 的溶解度缓慢增加，pH5.0 或以下溶解度显著上升。并且在任何情况下，随着温度上升，溶解度也相应增加。

(3)氯化钠浓度对 FPP 溶解度的影响

采用实施例 4 的方法配制含有不同浓度的氯化钠的溶液，在 4℃以及 20℃按（1）的方法检测 FPP 的溶解度，其结果是，随着氯化钠浓度的上升，FPP 的溶解度显著增加。并且在任何情况下，随着温度上升，溶解度也相应增加。

(4)各种稳定剂对 FPP 溶解度的影响

采用实施例 5 的方法配制含有不同浓度的、不同稳定剂种类的溶液。在 96 孔微量滴定板中每孔分别加入 200 uL，4℃保存 48 小时后，通过浊度测定仪测定其浊度，以反映 FPP 的溶解度，溶液的溶解度越低，溶液的浊度越高。

对于添加物研究的结果表明，下述物质对 FPP 溶解度的保持具有稳定作用。

①氨基酸类：精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸钠、天冬氨酸钠、谷氨酰胺、半胱氨酸、脯氨酸（0.05M 时具有效果）

②多糖类：硫酸葡聚糖（0.1%时具有效果）

实验例 2：冻干前后的 FPP 水溶液的性状

为了测定冻干过程中 FPP 的物理稳定性的变化，将冻干前的 FPP 水溶液以及冻干后直接用纯化水再溶解的 FPP 水溶液于 4℃保存 24 小时后，目测观察溶液的性状，同时也对冻干制剂再溶解所需的时间以及渗透压比进行测定。

此实验剔除了混浊、难溶，以及渗透压比偏离较大的配方。

实验例 3：冻干制剂保存复溶后的性状

将实验例 2 中筛选的配方，制备冻干制剂之后，于 25℃、40℃、50℃保存 1 个月后，再次测定溶液的性状，同时也对冻干制剂再溶解所需的时间以及渗透压比进行测定。

此实验剔除了保存后产生混浊、难溶，以及渗透压比偏离较大的配方。

实验例 4：冻干制剂中聚集体含量变化

对于实施例 3 筛选的配方，制备冻干制剂之后，凝胶过滤法测定冻干后（原始值）、以及 25℃、40℃， 50℃保存 1 个月后的冻干制剂中聚集体含量与 FPP 含量的比。观察到随着保存温度的上升，聚集体有生成增加的倾向，但是添加精氨酸、赖氨酸以及组氨酸后，即使高温保存，也仅生成很少量的聚集体（聚集体生成率：40℃时约 3%或以下，50℃时约 5—9%或以下），并且物理化学性质稳定。

实验例 5：pH 对聚集体生成的影响

对于实施例 3 筛选的配方，制备不同 pH 的冻干制剂之后，凝胶过滤法测定冻干后（原始值）、以及 25℃、40℃， 50℃保存 1 个月后的冻干制剂中聚集体含量与 FPP 含量的比。观察到 pH 偏碱配方的冻干制剂在 50℃保存时，随着时间的延长，聚集体的生成增多；而 pH 在 6.5 或以下的制剂中聚集体生成少，在弱酸性 pH 区域可使稳定性提高。

实验例 6：冻干制剂的生物活性变化（比活性）

按照实验例 1—5 的筛选，得到实施例 7 的配方，制得的冻干制剂在 25℃、50℃保存 2 个月，或在 10℃、25℃保存 1.5 年。将其冻干制剂再溶解后的水溶液的生物活性按下述方法进行测定。

生物活性的测定方法

采用 PK-15（猪肾细胞）细胞-VSV(水泡性口炎病毒)系统微量细胞病变抑制

法测定其活性（方法见《中国生物制品规程》2000 版）：

用冻干制剂再溶解后的水溶液作为测试品，以相应剂量的干扰素作为标准品，待 PK-15 细胞在 96 孔板上贴壁长成 70%丰度单层后，分别加入 10 倍稀释的测试品或标准品，每个稀释度接 6 孔，阴性对照孔只加测试品或标准品不加病毒，阳性对照是只加病毒不加测试品或标准品，孵育 24h 后，加入 100 $TCID_{50}$ 的 VSV 病毒进行攻毒，48h 后观察可见阳性对照孔出现病变，阴性对照孔细胞状态良好。观察细胞孔典型病变的稀释度，并将测试品的比活性除以标准品的比活性，得到效价（%）。

结果：测试品与标准品均在 10^{-7} 倍稀释度孔中发现水泡性口炎病毒在 PK-15 细胞上的典型病变，稀释度高于 10^{-7} 时，细胞都严重病变。

结论：依实施例 7 的配方制得的冻干制剂即使高温保存，生物活性也几乎没有变化，具有稳定的生物活性。

产业上的实用性

本发明的冻干制剂可用于制备临床上有用的含有 FPP 的水溶液，并且该制剂在冻干时及冻干后的保存时聚集体生成少，稳定性优良。此外，该制剂还具有冻干时具有良好的结块形成性，再溶解性优良的特征，进而可用于制备具有注射剂适宜的 pH 和渗透压比的制剂。