

TACI-Fc 融合蛋白药物制剂

技术领域

[01] 本发明涉及一种调控淋巴细胞的发生和分化的融合蛋白药物制剂，属于抗自身免疫疾病药物领域。

背景技术

[02] 淋巴细胞的发生和分化过程受到细胞因子的调控。B 淋巴细胞刺激因子 (B lymphocyte stimulator, 简称 BlyS, 又称 B 细胞激活因子: B cell activating factor, 简称 BAFF) 和增殖诱导配体 (a proliferation-inducing ligand, 简称 APRIL) 是对人体免疫反应具有重要调节作用的细胞因子。它们能够促进 B 淋巴细胞的发育和增殖，提高血液中免疫球蛋白的表达量。BlyS 和 APRIL 对 T 淋巴细胞的成熟亦具有关键的调节作用，故对细胞免疫也具有重要影响。

[03] BlyS 和 APRIL 通过淋巴细胞表面的受体调节淋巴细胞的免疫应答反应。它们与细胞膜受体 TACI (Transmembrane Activator and CAML-interactor) 和 BCMA (B Cell Maturation Antigen) 结合。此外，BlyS 也能与另一个受体 BAFF-R 相结合。B 淋巴细胞表达 TACI、BCMA 和 BAFF-R，成熟的 T 淋巴细胞表达 TACI。BlyS 和 APRIL 通过这些受体的信号传递调节淋巴细胞的活化、增殖和发育，产生免疫反应。此外，对淋巴细胞肿瘤，BlyS 和 APRIL 亦具有促进肿瘤细胞分裂、抑制肿瘤细胞凋亡的作用，因而加快肿瘤的进程。

[04] 多项研究表明：BlyS 和 APRIL 的过量表达是多种自身免疫疾病的原因之一。这些疾病包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、干燥综合征等。临床研究表明，BlyS 的浓度往往与自身免疫疾病的严重程度成正相关。因此，抑制 BlyS 和 APRIL 的产生或降低其体内浓度就成为治疗自身免疫疾病的一个有效途径。同时，由于 BlyS 和 APRIL 可加快 B 淋巴细胞肿瘤的进程，因此抑制 BlyS 和 APRIL 也能用于治疗 B 淋巴细胞肿瘤，例如慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤和 B 淋巴细胞淋巴瘤等。

[05] 由于 TACI 对 BlyS 和 APRIL 具有很高的亲和力，用可溶性 TACI (TACI 的细胞外部分) 阻止 BlyS 和 APRIL 与细胞膜受体 (TACI、BCMA 和 BAFF-R) 之间的相互作用，从而达到阻断 BlyS 和 APRIL 的生物学活性、治疗自身免疫疾病或肿瘤的目的。

多项研究表明, TACI胞外部分与 IgG Fc 片段结合的融合蛋白 (TACI-Fc) 能有效抑制与 BlyS 和 APRIL 相关的疾病。例如: ZymoGenetics 公司与 Merck Serono 公司合作研发的 TACI 融合蛋白 Atacicept 的临床结果显示其针对 SLE、类风湿性关节炎、淋巴瘤等疾病具有治疗作用。

- 5 [06]此外, 专利 CN101323643B 公开了一种由截断的 TACI 与免疫球蛋白 Fc 组成的融合蛋白, 该融合蛋白的 TACI 部分包括来自 TACI 胞外区从氨基酸残基 13 开始的氨基末端区序列, 富半胱氨酸区的全部序列, 和柄区的部分序列, 融合蛋白的免疫球蛋白 Fc 包括铰链区, CH2 区和 CH3 区, TACI 序列与 Fc 序列之间是直接融合, 或经连接序列融合。进一步的, 其中的 TACI
- 10 片段选自 TACI 的第 13 至 108 氨基酸序列或第 13 至 118 氨基酸序列, 其中连接序列为 9Gly, 其中的免疫球蛋白 Fc 片段选自人或动物的免疫球蛋白 Fc, 人或动物的免疫球蛋白选自 IgG, IgM, IgD, IgA, 每种免疫球蛋白类型包括各亚型, 如 IgG1。专利 CN102085368B 公开了上述的 TACI-Fc 融合蛋白用于治疗自身免疫性疾病, 如用于治疗系统性红斑狼疮中。专利申请
- 15 CN201810512508.8 中证明了 TACI-Fc 融合蛋白用于治疗视神经脊髓炎谱系疾病 (NMOSD) 和多发性硬化 (MS) 的应用, 所述 NMOSD 包括视神经脊髓炎、复发性视神经炎、纵向延伸横贯性脊髓炎、视神经脊髓型多发性硬化、长阶段横断性脊髓炎、单侧或双侧视神经炎、伴自身免疫性疾病的视神经炎或脊髓炎、伴有症状性或无症状性脑内病灶的视神经炎或脊髓炎。

- 20 [07] 目前已经上市的其他抗体药物和融合蛋白的制剂部分配方如下:

商品名	通用名	辅料成分
Humira	adalimumab	甘露醇、聚山梨酯 80
Taltz	ixekizumab	无水柠檬酸、聚山梨酯 80、氯化钠、枸橼酸钠二水物
Trulicity	dulaglutide	无水柠檬酸、甘露醇、聚山梨酯 80、二水柠檬酸三钠
Erelzi	etanercept-szss	柠檬酸、柠檬酸钠、氯化钠、蔗糖、赖氨酸
Amevive	alefacept	一水合柠檬酸、甘氨酸、柠檬酸钠、蔗糖
Nulojix	belatacept	磷酸二氢钠、氯化钠、蔗糖
Tanzeum	albiglutide	甘露醇、聚山梨酯 80、磷酸钠、海藻糖二水合物
Benlysta	Belimumab	氯化钠、L-盐酸精氨酸、L-组氨酸盐酸盐、L-组氨酸、聚山梨酯 80

[08]从上述抗体制剂和融合蛋白的辅料成份组成中也能看出，融合蛋白和抗体制剂组成具有其独特性。一方面，源于单克隆抗体类药物脆弱的稳定性和结构复杂性，导致制造和储存这类药物具有极大的挑战。由于抗体的异质性结构，特别是互补决定区（CDR）和 Fc 糖基化，不同单克隆抗体的制剂开发每一项都是需要基于个案开展。在开发抗体制剂时，存在抗体构象、胶体或化学结构方面的挑战，如氧化，异构化，脱酰胺，聚集，变性和断裂等。当暴露于不同的温度和湿度，pH 和应力条件下，mAb 立体结构可能会改变，特别是在高变区（HVR）。不良产品可能表现出活性降低，更重要的是，免疫原性增加会危及患者。因此，选择最佳辅料来保护抗体是至关重要的。

（文献 1：Monoclonal antibodies: formulations of marketed products and recent advances in novel delivery system ,Yanan Cui 等, Drug Development and Industrial Pharmacy,第 43 卷, 第 4 期, 第 519—530 页, 2017 年）。另一方面，融合蛋白制品易于聚集，稳定性比较差，从而引起不良的免疫反应或干扰纯化过程一直是该领域亟待解决的难题，而且，影响融合蛋白聚集的因素也比较复杂，分为外部因素和内部因素，外部因素主要有温度、物理压力以及溶剂因素（pH、离子强度、浓度、金属离子等）；内部因素主要有融合蛋白结构特点、敏感残基以及非配对的半胱氨酸等；这些因素均会影响融合蛋白的聚集情况，从而影响其稳定性和保存时间。因此，针对融合蛋白的辅料选择，需要大量的实验探索（文献 2:Production Challenges for Complex Biologics:Fusion Proteins,StefanR. Schmidt, American Pharmaceutical Review, 第 1-5 页, 2017 年）

[09]因此，本发明的目的在于：通过对生物制剂可用辅料进行大范围的筛选和浓度范围研究，得到一种 TACI-Fc 融合蛋白的制剂组合，实现以下技术效果：使 TACI-Fc 融合蛋白能够在冻干前后溶解良好，不溶性微粒和可见异物符合人用注射液标准，同时在冻干和保存过程中长期保持稳定，复溶后也不易发生聚合或降解，保持良好的生物活性。

发明内容

[10] 本发明涉及一种 TACI-Fc 融合蛋白的含水液体药物制剂，其包含 TACI-Fc 融合蛋白、非还原性糖、和氨基酸；所述非还原性糖选自甘露醇、蔗糖、海藻糖及其组合；所述氨基酸选自组氨酸、丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、谷氨酸及其组合。

[11] 在一些实施方案中，其中所述组氨酸为盐酸组氨酸，其浓度为 1-100mmol/L，优选 5-50mmol/L，5-20mmol/L，8-12 mmol/L，或约 10mmol/L；所述精氨酸为盐酸精氨酸，其浓度为 10-160mmol/L，优选 20-120mmol/L，50-100mmol/L，70-95mmol/L，75—90 mmol/L 或约 90 mmol/L 或约 75 mmol/L。。

[12] 在一些实施方案中，其中所述蔗糖浓度为 1-300mmol/L，优选 5-200mmol/L，10-100mmol/L，35-45 mmol/L，或约 40mmol/L。

[13] 在一些实施方案中，其中所述甘露醇浓度为 10-300mmol/L，优选 10-200mmol/L，60-150mmol/L，85-125 mmol/L，90-120mmol/L，或约 120 mmol/L，或约 90 mmol/L。

[14] 在一些实施方案中，所述 TACI-Fc 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。所述蛋白由 TACI 第 13-118 位氨基酸和经优化的降低了 ADCC 和 CDC 效应的 Fc 片段组成。

[15] 在 SEQ ID NO.1 所示的 TACI-Fc 融合蛋白中，为避免因膜结合性 BLyS 或增殖诱导配体（诱导配体（A Proliferation-Inducing Ligand，APRIL）而产生的抗体依赖的细胞介导毒性（抗体依赖的细胞介导毒性（ADCC）效应，源自 IgG1 的 Fc 片段进行了序列优化。其中 Fc 片段中的 CH2 区域中第 120~123 位氨基酸由 亮氨酸（亮氨酸（L）-亮氨酸（L）-甘氨酸（G）-甘氨酸（G）突变为 丙氨酸（A）-谷氨酸（E）-甘氨酸（G）-丙氨酸（A）以减少 Fc γ 受体的亲和力。此外，Fc 序列的 CH2 区域也进行了突变（216~217 位氨基酸残基由丙氨酸（A）-脯氨酸（P）突变为 丝氨酸（S）-丝氨酸（S）以减少补体结合或固定，从而降低补体依赖的细胞毒性（CDC）效应。

[16] SEQ ID NO:1 的序列如下：

25 001 SRVDQEERFP QGLWTGVAMR SCPEEQYWD P LLGTCMSCKT ICNHQSQR TC
051 AAFCRSLSCR KEQGKFYDHL LRDCISCASI CGQHPKQCA Y FCENKLRSPV
101 NLPPELDKTH TCPPCPAPEA EGAPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV
151 DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPRE E QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL
201 NGKEYKCKVS NKALPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS
30 251 LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK

301 SRWQQGNVFS CSVMEALHN HYTQKSLSLS PGK

[17] 在液体制剂中，因 Fc 铰链区形成链间二硫键，两个 TACI-Fc 融合蛋白单体可形成双链结构。

5 [18] 在一些实施方案中，其中所述 TACI-Fc 融合蛋白的浓度为 5-240mg/ml；优选其浓度为约 50mg/ml 至约 100mg/ml；最优选浓度约 80mg/ml 至约 100mg/ml。

[19] 在一些实施方案中，其中所述非还原性糖为 90-120mmol/L 的甘露醇和/或 35-45mmol/L 蔗糖、所述氨基酸为 75-125mmol/L 的盐酸精氨酸和/或
10 8-12mmol/L 的盐酸组氨酸，所述 TACI-Fc 融合蛋白的浓度为 80-100mg/ml；盐酸组氨酸浓度进一步优选为约 10 mmol/L。

[20] 在一些实施方案中，其含约 1%至约 10% (w/v, g/100ml) TACI-Fc 融合蛋白，优选包含约 6-10% (w/v, g/100ml) TACI-Fc 融合蛋白。

[21] 在一些实施方案中，其中所述非还原性糖为约 90mmol/L 的甘露醇和约
15 40mmol/L 蔗糖、所述氨基酸为约 90mmol/L 的盐酸精氨酸和约 10mmol/L 的盐酸组氨酸，所述 TACI-Fc 融合蛋白的浓度为约 80mg/ml。

[22] 在一些实施方案中，其中所述非还原性糖为约 120mmol/L 的甘露醇和约 40mmol/L 蔗糖、所述氨基酸为约 75 mmol/L 的盐酸精氨酸和约 10mmol/L 的盐酸组氨酸，所述 TACI-Fc 融合蛋白的浓度为约 80mg/ml。

20 [23] 在一些实施方案中，所述制剂的 pH 为 4.0 至 8.0，优选 4.5 至 7.0、5.0 至 6.0，或约 5.5。溶液 pH 值通过 NaOH 或盐酸调节。

[24] 另一方面，本发明涉及一种冻干药物制剂，所述制剂通过冷冻干燥所述的含水液体药物制剂获得。

[25] 在一些冻干药物制剂实施方案中，所述含水液体药物制剂含有约
25 90mmol/L 的甘露醇、约 40mmol/L 蔗糖、约 90mmol/L 的盐酸精氨酸、约 10mmol/L 的盐酸组氨酸和约 80mg/ml 的 TACI-Fc 融合蛋白，pH 为 5.0 至 6.0。

[26] 在一些冻干药物制剂实施方案中，其所述含水液体药物制剂含有约 120mmol/L 的甘露醇、约 40mmol/L 蔗糖、约 75 mmol/L 的盐酸精氨酸、

约 10mmol/L 的盐酸组氨酸和约 80mg/ml 的 TACI-Fc 融合蛋白, pH 为 5.0 至 6.0。

[27] 在一些冻干药物制剂实施方案中, 其中所述含水液体药物制剂中非还原性糖为甘露醇和蔗糖, 其浓度分别为约 16.4mg/ml 和约 13.7mg/ml; 所述含水液体药物制剂中氨基酸为盐酸精氨酸和盐酸组氨酸, 其浓度分别为约 19.0mg/ml 和约 2.1mg/ml。

[28] 在一些冻干药物制剂实施方案中, 其中所述含水液体药物制剂中非还原性糖为甘露醇和蔗糖, 其浓度分别为约 21.9mg/ml 和约 13.7mg/ml; 所述含水液体药物制剂中氨基酸为盐酸精氨酸和盐酸组氨酸, 其浓度分别为约 15.8mg/ml 和约 2.1mg/ml。

[29] 本发明进一步涉及所述的药物制剂在制备治疗自身免疫疾病药物中的用途, 所述自身免疫疾病包括: 系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、视神经脊髓炎谱系疾病 (NMOSD)、多发性硬化 (MS) 和干燥综合征。其中所述视神经脊髓炎谱系疾病包括视神经脊髓炎、复发性视神经炎、纵向延伸横贯性脊髓炎、视神经脊髓型多发性硬化、长阶段横断性脊髓炎、单侧或双侧视神经炎、伴自身免疫性疾病的视神经炎或脊髓炎、伴有症状性或无症状性脑内病灶的视神经炎或脊髓炎。所述淋巴瘤包括: 慢性淋巴细胞白血病, 多发性骨髓瘤, B 淋巴细胞淋巴瘤。

[30] 本发明还涉及制备一种 TACI-Fc 融合蛋白药物制剂的方法, 包括: (1) 制备上述药物制剂; (2) 评估该制剂中 TACI-Fc 融合蛋白的稳定性。

[31] 另一方面, 本申请还涉及一种制备如上所述的药物制剂的方法, 所述步骤包括: 包括蛋白原液的获得、预冻、一次干燥、二次干燥以及分装。

[32] 在某些实施方案中, 所述蛋白原液的获得步骤包括:

[33] 1. 培养能够表达 TACI-Fc 融合蛋白的基因重组 CHO 细胞, 待细胞活率达到可接受的下限值时, 采用离心或过滤的方法将细胞分离, 取上清;

2. 利用 Protein A 亲和层析柱进行第一步纯化, 洗脱获得的目的蛋白进行超滤浓缩, 上复合型填料层析柱进行第二步纯化, 收集目的蛋白峰, 然后上第三步柱以目的蛋白穿透模式进行第三步纯化;

[34] 在某些实施方案中, 蛋白原液的获得步骤进一步包括: 纯化后的蛋白检测合格后, 与 “5× 制剂缓冲液” 混合, 进行超滤浓缩, 即为蛋白原液;

[35]在某些实施方案中，获得的蛋白原液还需要用不含蛋白的制剂缓冲液准确稀释至所需的蛋白浓度，即为蛋白溶液半成品，然后用西林瓶分装，进行真空冷冻干燥。本申请取得的主要技术效果为：经过高度纯化以后的 TACI-Fc 蛋白纯度达到非还原 SDS-PAGE 99%以上，并且，其中 CHO 细胞宿主蛋白、CHO 细胞宿主 DNA、细菌内毒素等指标符合《中国药典》（2005 版）标准。本申请获得含有 TACI-Fc 融合蛋白的药物制剂在含水量、颗粒物数量、可见异物及不溶性微粒数量均达到了优良的标准，并且药物制剂具有长期保存稳定性。

附图说明

[36]图 1：水分含量测定，结果表明：配方 11、12、13 冻干粉极易吸水，水分含量不符合要求，配方 3-配方 9 符合含水量检测的要求。

[37]图 2：可见异物检查测定，结果表明：配方 3 和 4 不满足可见异物检测的要求。

[38]图 3：不溶性微粒检查测定，结果表明：配方 3 和 4 不满足不溶性微粒检查的要求。

具体实施方式

[39] 实施例 1：TACI-Fc 融合蛋白的获得与纯化

[40] 用 Qiagen 公司 RNA 提纯试剂盒从人外周血单个核细胞提纯总 RNA。然后用逆转录酶从 RNA 合成 cDNA。再用引物（正：AGCCGTGTGGACCAGGAGG 反：GAGCTCTGGTGGGAAGGTTCACTG）利用聚合酶链反应扩增获得所需要的 TACI 片断。免疫球蛋白 Fc 片断从已克隆的经序列优化的降低了 ADCC 和 CDC 效应的 IgG1 Fc 质粒经 PCR 扩增获得。最后用 PCR 将 TACI 和 Fc 序列相融合，从而构建成 TACI-Fc 融合蛋白质的 DNA 序列（其氨基酸序列为 SEQ ID NO.1），用 TA cloning 试剂盒，把 TACI 和 Fc 的 PCR 产物分别克隆入 pCR2.1 质粒，转染 E.coli，选取白色菌落，加入 LB 培养基，培养过夜。再用 Qiagen 质粒提取试剂盒提取质粒，经酶切和测序鉴定 TACI 和 Fc 序列。最后，采用拼接 PCR 方法把 TACI 和 IgG Fc cDNA 连接在一起。将 TACI-Fc 片段插入表达质粒中。将重组质粒转染 E.coli，选取阳性菌落，提取质粒后经酶切和测序鉴定目的序列。

将质粒转染 CHO 细胞，所述基因重组 CHO 细胞在标准条件下培养，待培养基中的营养物质耗尽、细胞不再进一步生长时放罐，采用离心或过滤的方法将细胞分离出去，取上清液，TACI-Fc 蛋白存在于上清液中，上 Protein A 亲和层析柱进行第一步纯化，洗脱下来的目的蛋白再超滤浓缩至目的蛋白浓度 30-50mg/ml，上复合型填料层析柱进行第二步纯化，收集目的蛋白峰，然后上第三步柱以目的蛋白穿透模式进行第三步纯化，纯化后的蛋白经过各项指标检测合格后，与“5×制剂缓冲液”按照 4:1 的体积比例混合，然后进行超滤浓缩，蛋白浓度达到约 100mg/ml，此即为蛋白原液，在 -80℃ 长期保存。

辅料筛选

[41] 通过前期的大量信息分析及试验筛选，初步确定出蔗糖、甘露醇、甘油、组氨酸、精氨酸、聚山梨酯 80（即吐温 80，Tween80）等辅料作为进一步的筛选候选辅料，并进一步开展如下测试。

[42] 实施例 2：精氨酸促进 TACI-Fc 蛋白溶解作用的研究

[43] TACI-Fc 蛋白在不含精氨酸的缓冲液（例如 20mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 120mmol/L NaCl, pH5.5）中，蛋白浓度在 5mg/ml 以上，在 4℃ 冰箱内放置一夜，在容器底部就会出现絮状沉淀，轻轻摇动沉淀会漂浮起来，无法进行可见异物和不溶性微粒检查，蛋白的浓度越高，蛋白沉淀越严重。初步试验研究发现，向蛋白溶液中添加盐酸精氨酸可以使沉淀迅速消失。

[44] 进一步实验：1) 将纯化以后的 TACI-Fc 蛋白 7290mg 透析到 10mmol/L 组氨酸 (pH5.5) 缓冲液中，蛋白浓度 5mg/ml；2) 然后将蛋白溶液分成 9 组，每组 7 份，共 63 份，每一组中的 7 份蛋白含量分别为 10、20、40、100、160、200、300mg，9 组分别添加 1mol/L 盐酸精氨酸(pH5.5)溶液至盐酸精氨酸终浓度分别为 0、10、20、30、40、50、75、100、125mmol/L，然后用孔径为 30KD 的离心超滤管进行浓缩，至最终体积为 2ml，先观察蛋白是否有明显沉淀，有明显沉淀的，不再进一步操作，直接在表格中记录“—”，沉淀不明显的，在超净台内用 0.22μm 针头式无菌滤器过滤至无菌的 2ml 西林瓶内，用无菌的胶塞封口，扎铝盖，置于 4℃ 冰箱内保存 24 小时，观察是否有沉淀产生。

[45] 检查标准：在 YB-II 型澄明度检测仪下观察，完全澄清或白点数目不超过 3 个记为“-”，有沉淀者，按照沉淀多少分别记为“+”、“++”、“+++”等，“+”

号越多表示沉淀越多。实验结果参见表 1，实验结果表明：盐酸精氨酸的最佳浓度在 75 mmol/L-125 mmol/L 之间。

[46]

[47] 表 1. 盐酸精氨酸浓度对 TACI-Fc 蛋白溶解度的影响

		盐酸精氨酸浓度 (mmol/L)								
		0	10	20	30	40	50	75	100	125
蛋白浓度 (mg/ml)	5	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	+++	+	-	-	-	-	-	-	-
	50	—	++	+	-	-	-	-	-	-
	80	—	—	++	+	+	+	-	-	-
	100	—	—	—	++	++	++	-	-	-
	150	—	—	—	—	++	++	+	-	-

5

[48] 实施例 3：甘露醇浓度对冻干粉的水分含量和外观影响的确定

[49] 通过与实施例 2 类似的步骤，我们考察含有不同浓度的 TACI-Fc 融合蛋白在不同浓度甘露醇存在的条件下制备冻干粉后的水分含量和外观情况。实验表明：当甘露醇含量低于 60mmol/L 时会影响冻干粉的水份含量和外观。

10 [50] 实施例 4：蔗糖对 TACI-Fc 融合蛋白保护作用的影响

[51] 通过实验考察含有不同蔗糖浓度的药物制剂冻干粉在 4℃、25℃和 35℃条件下的稳定性，实验表明：当冻干原液中蔗糖浓度低于 10mmol/L 时，将使得原液在冻干过程中损失 TACI-Fc 融合蛋白活性，无法起到有效的冻干保护作用。

[52] 实施例 5：验证配方溶液配制

[53] 在上述试验的基础上，设计多种制剂配方进行进一步检测。

[54] 盐酸组氨酸溶液的配制：

按表 2 中配方配制配方编号 1-13 的 1×制剂缓冲液。以表 2 中 1 号配
方为例：

- 1) 通过计算盐酸组氨酸称 2.10g，甘露醇称 0g，盐酸精氨酸称 15.80g，蔗糖称 54.77g，将上述物料加入洁净的 1L 烧杯中；
- 2) 加入适量的注射用水溶解，溶解后调节 pH 值；
- 3) 根据溶液密度运用称重法定容，定容后再微调 pH 至 5.5。

其他配方根据各组份用量按照上述步骤进行配制。

[55] 透析缓冲液配制：10mmol/L 盐酸组氨酸 pH5.5。

[56] 制剂缓冲液配制：

[57] 1×制剂缓冲液：按照制剂缓冲液配方表（表 2）配制；

[58] 5×制剂缓冲液：配方如表 3 所示，其中盐酸组氨酸浓度为 10mmol/L，
盐酸精氨酸浓度为 CArg×5mmol/L，甘露醇浓度为 CMan×5 mmol/L，蔗糖
浓度为 CSuc×5 mmol/L，pH 固定 5.5。其中 CArg、CMan 和 CSuc 分别代
表 1×制剂缓冲液中相应配方的精氨酸、甘露醇和蔗糖的浓度。

[59] 以上溶液均用 6mol/L 氢氧化钠或 6mol/L 盐酸调节溶液 pH 值，用孔径
不大于 10KD 的超滤膜超滤去除内毒素后使用。

表 2. 1×制剂缓冲液配方表

配 方 编 号	盐酸组 氨酸 (mmol/L)	甘露醇 (mmol/L)	盐酸精 氨酸 (mmol/L)	蔗糖 (mmol/L)	pH	渗透压 (mOsm/L)
1	10	0	75	160	5.5	330
2	10	0	160	0	5.5	330
3	10	160	75	0	5.5	330
4	10	150	75	10	5.5	330
5	10	120	90	10	5.5	330

6	10	90	105	10	5.5	330
7	10	60	120	10	5.5	330
8	10	120	75	40	5.5	330
9	10	90	90	40	5.5	330
10	10	60	105	40	5.5	330
11	10	90	75	70	5.5	330
12	10	60	90	70	5.5	330
13	10	60	75	100	5.5	330

配方设计说明：

1、盐酸组氨酸是 pH 缓冲剂，通过早期试验验证，采用 10mmol/L；
基于上述各实施例确定各配方中甘露醇最低 60mmol/L，盐酸精氨酸最低 75mmol/L，蔗糖最低 10mmol/L。

2、甘露醇、盐酸精氨酸和蔗糖各取 4 个浓度进行组合，甘露醇取 60、90、120 和 150mmol/L，精氨酸取 75、90、105 和 120mmol/L，蔗糖取 10、40、70、100mmol/L，共有 10 种不同的组合（配方 4-13）；另外，配方 1 只含盐酸精氨酸和甘露醇、配方 2 只含盐酸精氨酸、配方 3 只含盐酸精氨酸和蔗糖。

表 3. 5×制剂缓冲液配方表

配方编号	盐酸组氨酸 (mmol/L)	甘露醇 (mmol/L)	盐酸精氨酸 (mmol/L)	蔗糖 (mmol/L)	pH
1	10	0	375	800	5.5
2	10	0	800	0	5.5
3	10	800	375	0	5.5
4	10	750	375	50	5.5
5	10	600	450	50	5.5
6	10	450	525	50	5.5
7	10	300	600	50	5.5
8	10	600	375	200	5.5
9	10	450	450	200	5.5
10	10	300	525	200	5.5
11	10	450	375	350	5.5
12	10	300	450	350	5.5
13	10	300	375	500	5.5

实施例 6：真空冷冻干燥

将蛋白原液从-80℃ 冰箱内取出融化，用“1×制剂缓冲液”准确稀释至

蛋白浓度 80mg/ml，用无菌、无热源的标准 2ml 冻干西林瓶分装，每支 1ml，进行真空冷冻干燥。

冻干条件：

预冻：温度-45℃，时间 5 小时；

5 一次干燥：温度-26℃，时间 40 小时，真空度 10-15Pa；

二次干燥：温度 25℃，时间 10 小时，真空度 10-15Pa。

冻干后在真空状态下压胶塞，从冻干机中取出后扎铝盖。

实施例 7：冻干粉外观及水分含量检查

10 冻干粉外观合格标准：颜色均匀，孔隙致密，保持冻干前的体积、形状基本不变，呈块状或海绵状团块结构。

表 4. 冻干粉外观检查结果

配方 编号	盐酸组 氨酸 (mmol/L)	甘露醇 (mmol/L)	盐酸精 氨酸 (mmol/L)	蔗糖 (mmol/L)	外观*
1	10	0	75	160	--
2	10	0	160	0	-
3	10	160	75	0	++
4	10	150	75	10	++
5	10	120	90	10	++
6	10	90	105	10	+
7	10	60	120	10	+
8	10	120	75	40	++
9	10	90	90	40	++
10	10	60	105	40	-
11	10	90	75	70	+
12	10	60	90	70	+
13	10	60	75	100	-

15 注：“--”表示团块萎缩至冻干前体积的一半以下；“-”表示有萎缩，但团块的体积大于冻干前的一半；“+”表示仅仅边缘部分有轻微萎缩，团块

体积与冻干前基本相同；“++”表示完全无萎缩，团块体积与冻干前相同。

实验结果参见表 4，结果表明：配方 1、配方 2、配方 10 和配方 13 冻干粉外观不符合要求，淘汰。其他配方的冻干粉外观符合要求。

水分含量测定检测标准：

- 5
- 冻干粉的水分含量采用 SF-6 型微量水分测定仪（卡尔-费休库仑电量法）测定，合格标准是不大于 3%。

表 5. 水分含量测定结果

配方 编号	组氨酸 (mmol/L)	甘露醇 (mmol/L)	精氨酸 (mmol/L)	蔗糖 (mmol/L)	含水量 (%)
3	10	160	75	0	0.5
4	10	150	75	10	0.8
5	10	120	90	10	1.2
6	10	90	105	10	1.3
7	10	60	120	10	1.3
8	10	120	75	40	1.1
9	10	90	90	40	1.2
11	10	90	75	70	4.3
12	10	60	90	70	3.9
13	10	60	75	100	6.4

- 10
- 实验结果表明：配方 11、12、13 冻干粉极易吸水，水分含量不符合要求，配方 3-配方 9 符合含水量检测的要求。

实施例 8：可见异物和不溶性微粒检查

冻干粉用无菌注射用水复溶，每支体积 1ml，复溶前先破真空，然后再沿瓶内壁缓慢加水。

- 15
- 可见异物检查采用 YB-II 型澄明度检测仪，按照《中国药典》（2005 版）附录 VB“可见异物检查法-灯检法”及国家食品药品监督管理局“关于印发可见异物检查法补充规定的通知”[国食药监注[2005]37 号]中的相关

规定进行，每个配方检查 20 支，计算每支可见异物的平均含量。

可见异物检查合格标准：检查的 5 支（瓶）供试品中，均不得检出玻璃屑、纤维、色点、色块等外来可见异物，检出其他可见异物（白点、细小蛋白絮状物或蛋白颗粒）不得超过 3 个。

5 不溶性微粒检查采用 ZWJ-3 型不溶性微粒检测仪，按照《中国药典》（2005 年版）二部附录 IX C“不溶性微粒检查法-光阻法”进行，检查每毫升蛋白溶液中 10 微米以上和 25 微米以上不溶性微粒数量，每个配方检查 3 支，计算每支不溶性微粒的平均含量。

10 不溶性微粒检查合格标准：每个供试品容器中含 10um 以上的微粒不得过 6000 粒，含 25um 以上的微粒不得过 600 粒。

表 6. 可见异物及不溶性微粒检查结果

配方 编号	组氨酸 (mmol/L)	甘露醇 (mmol/L)	精氨酸 (mmol/L)	蔗糖 (mmol/L)	可见异 物数量	不溶性 微粒数 量 (>10um)	不溶性 微粒数 量 (>25um)
1	10	0	75	160	2	2263	273
2	10	0	160	0	1	1252	178
3	10	160	75	0	20	12845	1294
4	10	150	75	10	12	9578	985
5	10	120	90	10	1	1574	109
6	10	90	105	10	1	1483	193
7	10	60	120	10	0	1206	143
8	10	120	75	40	1	1012	129
9	10	90	90	40	0	985	116
10	10	60	105	40	1	939	98
11	10	90	75	70	1	895	129
12	10	60	90	70	0	902	137
13	10	60	75	100	2	1594	201

15 根据表 6 获得的数据可知：配方 3 和 4 不满足可见异物和不溶性微粒检查的要求。

实施例 9. 冻干粉长期（1—12 个月）稳定性考察

冻干粉外观检查淘汰配方 1、2、10、13，水分含量检查淘汰配方 11、12，可见异物和不溶性微粒检查淘汰配方 3 和 4，余下的配方 5、6、7、8、9 进行留样稳定性考察。将各个配方的冻干粉分别置于 37℃、25℃ 和 4℃ 保存，在不同的时间取样进行 SDS-PAGE、反相 HPLC、配体结合法生物活性、水分含量、外观、pH 值、可见异物和不溶性微粒等项目的检查，结果见表 7、表 8 和表 9。

结果表明，蔗糖浓度为 10mmol/L 的配方稳定性较差，蔗糖浓度为 40mmol/L 的配方 8 和配方 9 长期保存的稳定性较好。综合各方面测试，配方 8-9 在含水量、可见异物、外观、不溶性颗粒以及稳定性等项目检测方面均满足要求。

表 7. 37℃ 保存 1 个月稳定性考察结果

配方 编号	非还原 SDS-PAGE(%)	还原 SDS-PAGE(%)	反相 HPLC (%)	活性 (×10 ⁵ U/mg)	含水 量 (%)	外观	可见 异物数 量	pH	不溶性微 粒 (>10um)	不溶性微 粒 (>25um)
5	97	94	92	2.8	1.5	++	1	5.5	928	149
6	97	94	92	2.9	1.4	++	0	5.5	1029	192
7	97	94	92	2.5	1.9	++	1	5.5	1320	103
8	97	94	97	3.9	1.9	++	1	5.5	992	98
9	97	97	97	4.2	1.7	++	0	5.5	1302	136

表 8. 25℃ 保存 3 个月稳定性考察结果

配方 编号	非还原 SDS-PAGE(%)	还原 SDS-PAGE(%)	反相 HPLC (%)	活性 (×10 ⁵ U/mg)	含水 量 (%)	外观	可见 异物数 量	pH	不溶性微 粒 (>10um)	不溶性微 粒 (>25um)
5	97	93	92	2.8	1.3	++	0	5.5	1785	210
6	97	93	92	2.9	1.6	++	0	5.5	1649	191
7	97	93	92	2.5	1.9	++	1	5.5	989	189
8	97	97	97	3.5	1.8	++	1	5.5	1029	164
9	97	97	97	3.8	1.6	++	0	5.5	1258	212

表 9. 4°C 保存 12 个月稳定性考察结果

配方 编号	非还原 SDS-PAGE(%)	还原 SDS-PAGE(%)	反相 HPLC (%)	活性 ($\times 10^5$ U/mg)	含水量 (%)	外观	可见 异物数量	pH	不溶性微粒 ($>10\mu\text{m}$)	不溶性微粒 ($>25\mu\text{m}$)
5	97	92	93	2.1	1.8	++	0	5.5	1398	206
6	97	92	93	1.9	1.6	++	0	5.5	1933	196
7	97	92	93	2.6	1.8	++	0	5.5	1578	156
8	97	97	97	3.6	1.3	++	1	5.5	1765	168
9	97	97	97	4.1	1.6	++	1	5.5	1947	239

综合以上实验数据可知：一方面，非还原性糖、氨基酸大类物质中具体辅料的选择对于最终制剂的影响结果是难以预期的，针对本发明的融合蛋白，需要通过大量的试验针对各方面性能的检测，才能获得一个良好的制剂组合方案，例如：根据实验证据表明：虽然配方 1-13 均含有盐酸组氨酸、甘露醇、盐氨酸精氨酸和蔗糖，但是由于这些成分含量的差异导致最后的含水量、可见异物、外观、不溶性颗粒以及稳定性等项目检测结果差异较大，真正能够通过上述检测的只有配方 8 和配方 9，由此可见，药物制剂辅料成分的种类和含量的选择至关重要，而且可预测性较差。

另一方面，由于抗体的异质性结构，特别是互补决定区（CDR）和 Fc 糖基化，不同单克隆抗体的制剂开发每一项都是需要基于个案开展。在开发抗体制剂时，存在抗体构象、胶体或化学结构方面的挑战，如氧化，异构化，脱酰胺，聚集，变性和碎裂等。综合上述信息可以看出，目前上市的抗体药物和融合蛋白的制剂成分均具有其独特性，本领域技术人员在面临抗体药物的辅料选择时从现有技术的产品中获得的明确教导指示性不足，仍然需要通过大量的试验才能确定合适的制剂方案。本发明正是基于大量和长期的实验研究，才获得了适合 TACI-Fc 融合蛋白制剂组成，其在冻干前后溶解良好，不溶性微粒和可见异物符合人用注射液标准，同时在冻干和保存过程中长期保持稳定，尤其是在 25°C 或 37°C 的高温条件下长期放置，仍然保持了良好的稳定性，所述的冻干制剂在复溶后也不易发生聚合或降解，保持良好的生物活性，取得了预料不到的技术效果。