

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5570988号  
(P5570988)

(45) 発行日 平成26年8月13日(2014.8.13)

(24) 登録日 平成26年7月4日(2014.7.4)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 38/22	(2006.01)	A 61 K 37/24
A 61 K 47/48	(2006.01)	A 61 K 47/48
A 61 K 9/08	(2006.01)	A 61 K 9/08
A 61 K 47/34	(2006.01)	A 61 K 47/34
A 61 K 47/12	(2006.01)	A 61 K 47/12

請求項の数 20 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-522361 (P2010-522361)
(86) (22) 出願日	平成20年8月27日 (2008.8.27)
(65) 公表番号	特表2010-536929 (P2010-536929A)
(43) 公表日	平成22年12月2日 (2010.12.2)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2008/061232
(87) 國際公開番号	W02009/027437
(87) 國際公開日	平成21年3月5日 (2009.3.5)
審査請求日	平成23年3月7日 (2011.3.7)
(31) 優先権主張番号	07115047.8
(32) 優先日	平成19年8月27日 (2007.8.27)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁 (EP)

前置審査

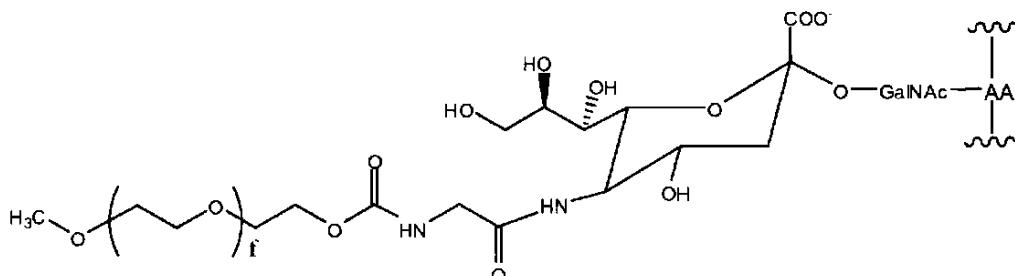
(73) 特許権者	509350608 ラティオファーム ゲーエムベーハー ドイツ国 ウルム グラフ・アルコ-スト ラッセ 3
(74) 代理人	100105957 弁理士 恩田 誠
(74) 代理人	100068755 弁理士 恩田 博宣
(74) 代理人	100142907 弁理士 本田 淳
(72) 発明者	ヒンデラー、ヴァルター ドイツ連邦共和国 63110 ロドガウ デカン-シュスター-シュトラーセ 2 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G-C S F 結合体の液体調製物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性成分としての、下記式を有するポリマー G - C S F 結合体と、  
【化 1】

10

(式中、AAはG-C S Fのトレオニン133(N末端メチオニンが存在する場合トレオニン134)であり、fは1~2500から選択された整数である)

界面活性剤としてのポリソルベート20およびポリソルベート80の少なくとも一方と

、 張性改変剤としてのソルビトールおよびマンニトールの少なくとも一方と、 緩衝剤としての酢酸塩と、ナトリウムとを含み、他の賦形剤を含ます、

4.5~5.5の範囲のpHを有する水性製剤。

【請求項 2】

20

前記界面活性剤は、0.0001% (w/v) ~ 0.05% (w/v) の濃度で存在する請求項1に記載の水性製剤。

【請求項3】

pHは4.7 ~ 5.3の範囲にある請求項1または2に記載の水性製剤。

【請求項4】

pHは4.9 ~ 5.1の範囲にある請求項1 ~ 3のいずれか一項に記載の水性製剤。

【請求項5】

前記緩衝剤が2 ~ 50 mmol/lの濃度で存在する請求項1 ~ 4のいずれか一項に記載の水性製剤。

【請求項6】

前記張性改变剤は1 ~ 10%の濃度で存在する請求項1 ~ 5のいずれか一項に記載の水性製剤。

【請求項7】

pHがNaOHを使用して調節される請求項1 ~ 6のいずれか一項に記載の水性製剤。

【請求項8】

ポリマーG-CSF結合体が1 ~ 20 mg/mlの濃度で存在する請求項1 ~ 7のいずれか一項に記載の水性製剤。

【請求項9】

ポリマーG-CSF結合体が8 ~ 12 mg/mlの濃度で存在する請求項1 ~ 8のいずれか一項に記載の水性製剤。

【請求項10】

水性製剤を1 : 2 ~ 1 : 8に希釀した、請求項1 ~ 9のいずれか一項に記載の水性製剤から得られる希釀水性製剤。

【請求項11】

請求項1 ~ 10のいずれか一項に記載の水性製剤を備えた医薬容器。

【請求項12】

注射器、ガラス瓶、輸液ボトル、アンプルまたはカルプルである請求項11に記載の医薬容器。

【請求項13】

針保護システムを備えた注射器である請求項11または12に記載の医薬容器。

【請求項14】

注入ペン内のカルプルである請求項11または12に記載の医薬容器。

【請求項15】

請求項1 ~ 9のいずれか一項に記載の水性製剤を製造する方法であって、

活性薬剤としてのポリマーG-CSF結合体を、4.5 ~ 5.5の範囲のpHを有するとともに、界面活性剤としてのポリソルベート20およびポリソルベート80の少なくとも一方と、張性改变剤としてのソルビトールおよびマンニトールの少なくとも一方と、緩衝剤としての酢酸塩と、ナトリウムとを含み、他の賦形剤を含まない水性製剤へと調合することを含む方法。

【請求項16】

好中球減少症の治療または予防に使用するための請求項1 ~ 10のいずれか一項に記載の水性製剤。

【請求項17】

神経障害の治療または予防に使用するための請求項1 ~ 10のいずれか一項に記載の水性製剤。

【請求項18】

骨髄移植に使用するための請求項1 ~ 10のいずれか一項に記載の水性製剤。

【請求項19】

幹細胞動員のための請求項1 ~ 10のいずれか一項に記載の水性製剤。

【請求項20】

10

20

30

40

50

小児への投与のための請求項10に記載の水性製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリマーと結合された顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチドを含み、4.5～5.5の範囲のpH値を有する液体の医薬組成物に関する。組成物はさらに、界面活性剤と、任意選択で1または複数の他の医薬として許容される賦形剤とを含む。さらに、本発明の組成物は、緩衝液として酒石酸またはその塩を含まなければコハク酸およびその塩も含まず、安定剤としてのアミノ酸も含まない。組成物は良好な貯蔵安定性を示し、顆粒球コロニー刺激因子製剤が有用な治療と考えられる疾患および医学的適応の予防および治療に特に有用である。

【背景技術】

【0002】

顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は、造血前駆細胞の増殖ならびに分化および成熟した好中球の活性化を刺激する造血増殖因子である。G-CSFは、インビトロおよびインビボにおける好中球の増殖を支援することができる。G-CSFのヒト型は、1986年に日本とアメリカの基によりクローニングされた(非特許文献1)。天然ヒト糖タンパク質は、2つの形式で存在し、一方は174個のアミノ酸を有し、他方は177個のアミノ酸を有する。存在量が多く、より活性の強い174アミノ酸型が組換えDNA技術により医薬の開発に使用してきた。

【0003】

大量の組換えG-CSFが、組換え大腸菌(*Escherichia coli*)で生産され、化学療法で誘発される好中球減少症に苦しむ癌患者を治療するために臨床の用途でうまく使用されている。大腸菌によって生産されたG-CSFは、N末端に余分なメチオニンを1つ含む175個のアミノ酸からなるポリペプチド鎖である。このタンパク質は、大腸菌内でG-CSF遺伝子を発現させ、そのタンパク質産物を精製することにより生産されている。かかるタンパク質産物は、5つのシステイン残基を有し、そのうち4つがジスルフィド結合に関する疎水性タンパク質である。自由な1つのシステイン残基は通常、溶液の保存時のより高分子量の凝集体の形成に関与する。タンパク質の凝集体は、タンパク質の主要な配列中の内部メチオニン残基の酸化によって生じるタンパク質の酸化型からも形成され得る。4つのメチオニン残基のうち、一つはN末端に位置し、他の3つは内部に位置する。122の位置に酸化メチオニンを含むタンパク質の酸化型は、127または138の位置に酸化メチオニンを含む型および天然タンパク質から、標準の逆相HPLC分離法により分離することが可能である(かかる位置は175アミノ酸からなるメチオニル-G-CSFに対して計算)。

【0004】

大腸菌発現系で合成された組換えヒトG-CSFは、フィルグラスチム(国際一般名称、INN)と呼ばれる。フィルグラスチムの構造は天然糖タンパク質とわずかに異なる。組換えヒトG-CSFの別の型はレノグラスチム(INN)と呼ばれ、これはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞で合成される。フィルグラスチムとレノグラスチムは欧洲ではそれぞれ商標名Neupogen(登録商標)およびGranocyteで取引されている。

【0005】

しかしながら、上記の組換えヒトG-CSFの市販型は、薬効が短く、白血球減少症状態の間は一日に二回以上投与しなければならないことが多い。循環半減期が長い分子であれば、白血球減少症を緩和するのに必要な投与回数を減少させ、かつ結果として伝染病を予防するだろう。現在利用可能な組換えヒトG-CSF製品に関する別の問題は、用量依存的な骨痛の発生である。骨痛は組換えヒトG-CSFによる治療の重大な副作用として患者に経験されるため、このような作用が本質的ないか、または骨痛を引き起こさないかまたは少なくとも減少させるのに十分少ない用量で有効な、組換えヒトG-CSF製品

10

20

30

40

50

を提供することは望ましい。したがって、改良型組み換えG-CSF分子およびG-CSF分子を安定した使用する準備ができた調製物として含む製剤が明らかに必要とされている。

#### 【0006】

G-CSF変異型におけるヒトG-CSFのタンパク質工学変異型が、例えば特許文献1~11に報告されている。

未変性ポリペプチドと比較してヒトG-CSFおよび他のポリペプチドに、少なくとも1つの追加の炭水化物鎖を導入する修飾も報告されている（特許文献12）。さらに、ポリ（エチレングリコール）（PEG）基の取り付けを含む未変性ヒトG-CSFのポリマー修飾が報告され、研究されている（特許文献13~17）。

10

#### 【0007】

これらのタンパク質がポリマー分子に結合されたときにタンパク質の安定性を改善され、かつこれらのタンパク質に対する免疫応答が減少することが一般に受け入れられている。特許文献18は、PEGで修飾された生理活性タンパク質で免疫原性と抗原性が現象し、血流中の循環が非結合タンパク質よりもかなり長くなる、つまりクリアランス速度が減少することを示している。

#### 【0008】

糖タンパク質治療薬の薬物動態特性を改良するためのペプチドバックボーンへの合成ポリマーの取り付けは当該技術分野では周知である。ペプチドに結合される代表的なポリマーはPEGである。ペプチド治療薬を誘導体化するためのPEGの使用は、ペプチドの免疫原性を減少させることができることが実証された。例えば、特許文献19は、PEGまたはポリ（プロピレングリコール）（PPG）に結合された酵素とペプチドホルモン等の非免疫原性ポリペプチドを開示している。免疫原性の減少に加えて、問題のポリペプチドのPEG結合体の大きさが増加するため血液循環中のクリアランス時間が延長される。

20

#### 【0009】

ペグフィルフィルグラスチム（INN）は、組換えメチオニルヒトG-CSF（フィルグラスチム）と、一つの20kDaモノメトキシ-PEG分子との共有結合による結合体である。モノメトキシ-PEG分子はフィルグラスチムのN末端のメチオニル残基に共有結合で結合される。ペグフィルグラスチムは欧州では商標名Neulastaで取引されている。

30

#### 【0010】

ペプチドへのPEGおよびその誘導体の取り付けの基本的形式は、ペプチドのアミノ酸残基を介した非特異的結合である（例えば特許文献20~24を参照されたい）。ペプチドへのPEGの取り付けの別の形式は、糖タンパク質のグリコシル基の非特異的酸化による（例えば特許文献25を参照されたい）。

#### 【0011】

これらの非特異的方法では、PEGはペプチドバックボーン上の反応性残基に対してランダムな非特異的方法で加えられる。PEG分子のランダムな付加には、最終産物が均質性を欠く、ペプチドの生物活性または酵素活性が減少する可能性があるといったことを含む欠点がある。ここ数年の間に、ペプチドに合成ポリマーまたは他の標識を取り付けるためのより部位特異的な方法が開発され、酵素の作用によって特異的に結合された均質なペプチド治療材がインビトロで生産できることが判明している。これらの酵素に基づく結合体は、位置選択性および立体選択性の利点を有する。結合ペプチドの合成に使用される酵素の主な2つのクラスは、グリコシルトランスフェラーゼ（例えばシアリルトランスフェラーゼ、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ）およびグリコシダーゼである。これらの酵素は、治療剤部分を有するよう後に修飾可能な糖の特異的取り付けのために使用することができる。代わりに、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾グリコシダーゼを使用して、直接修飾糖をペプチドバックボーンに変換してもよい（例えば特許文献26~31を参照されたい）。化学的合成成分と酵素的合成成分を組み合わせる方法も知られている（例えば特許文献29を参照され

40

50

たい)。

【0012】

G-CSFのようなポリペプチド、PEGのようなポリマー部分と結合させる様々な方法が周知であり、先行技術に広範囲に記載されている。糖PEG化G-CSF製剤が、例えば特許文献10に記載されている。G-CSFとPEG部分間の結合体の調製に関する別の特許出願は、特許文献11である。この方法では、結合体がその間に介在するインタクトなグリコシル連結基で連結され、G-CSFポリペプチドおよび修飾基に共有結合で取り付けられる。結合体は、グリコシル化G-CSFポリペプチドと、グリコシルトランスフェラーゼの作用により非グリコシル化G-CSFポリペプチドとのいずれもから形成される。グリコシルトランスフェラーゼは、ポリペプチド上のアミノ酸またはグリコシル残基上に修飾糖部分をライゲートする。特許文献10および特許文献11の開示は、本発明に関連して明示的に引用される。  
10

【0013】

PEGに加えて、他のポリマー部分も、G-CSFおよび他の治療剤タンパク質との有用な結合体として記載されている。特許文献32は、特に、生体適合性ポリマー誘導体との生物学的に活性なタンパク質の結合により生産された生体適合性タンパク質高分子化合物を示す。使用される生体適合性ポリマーは反応性が非常に高い分岐ポリマーであり、得られる結合体はポリマー誘導体およびタンパク質間に長いリンカーを備えている。特許文献32によると、生体適合性ポリマーの例にはPEG、PPG、ポリオキシエチレン(POE)、ポリトリメチレンエチレングリコール、ポリ乳酸およびその誘導体、ポリアクリル酸エステルおよびその誘導体、ポリアミノ酸、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリ(L-リジン)、ポリアルキレンオキシド(PAO)、多糖等の水溶性ポリマー、デキストラン、ならびにポリビニルアルコールおよびポリアクリルアミド等の免疫原のポリマーが含まれる。  
20

【0014】

特許文献33は、特定の種類の化学結合を介して薬学的に純粋な合成親水性ポリマーに生物学的に不活性なポリマーまたはポリマー誘導体を共有結合で結合させることにより形成される生体適合性ポリマー結合体を開示している。天然高分子およびその誘導体として、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、B、およびCのようなプロテオグリカン、キチン、ヘパリン、ヘパリン硫酸塩、シクロデキストラン等のデキストラン、ヒドロキシエチルセルロース、セルロースエーテルおよびスター、トリグリセリド等の脂質、およびリン脂質が開示される。  
30

【0015】

特許文献15は、N末端化学修飾タンパク質化合物およびその製造方法について記載している。詳細には、G-CSFのN末端に水溶性ポリマーを結合させることにより生じたG-CSF組成物について記載している。特許文献15に列挙された水溶性ポリマーの例は、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれでもよい)、ポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、PPGホモポリマー、ポリ酸化プロピレン/エチレンオキシドコポリマー、またはポリオキシエチレン化ポリオールである。  
40

【0016】

特許文献34は、2つ以上のポリペプチド分子が結合されたポリマー担体分子を含む、アレルゲン性が減少されたポリペプチド結合体について記載している。これらの結合体は、ポリマー担体分子を活性化させ、2つ以上のポリペプチド分子を活性化されたポリマー担体分子と反応させ、かつ結合体上の残りの活性基をブロックすることにより生産される。特許文献34は、少なくとも2つの異なる取り付け基を含むポリオール、ポリアミン、ポリカルボン酸およびヘテロポリマー等の天然または合成のホモポリマーを含む様々なポリマー担体分子を列挙している。例を挙げると、星状体PEG、分岐PEG、ポリビニル  
50

アルコール、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドンおよびポリ-D,L-アミノ酸がある。特許文献34の結合体は、カルボキシメチルデキストラン等のデキストラン、ヒドロキシエチルセルロースまたはヒドロキシプロピルセルロース等のセルロース、キトサンの水和溶解物、ヒドロキシエチルスターーチまたはヒドロキシプロピルスターーチ、グリコーゲン、アガロース、グアガム、イヌリン、プルラン、キサンタンガム、カラゲーニン、ペクチン、アルギン酸等も含む。

#### 【0017】

特許文献35は、スターーチ由来の修飾多糖にタンパク質を結合する方法に関する。タンパク質と多糖（すなわちヒドロキシアルキルスターーチ）との間の結合作用は、ヒドロキシアルキルスターーチ分子の末端アルデヒド基の化学修飾によって生じる末端アルデヒド基と、タンパク質の官能基との間で形成される共有結合による連結である。タンパク質の反応基として、アミノ基、チオ基およびカルボキシ基が開示される。10

#### 【0018】

特許文献36は、ヒドロキシアルキルスターーチ(HAS)とG-CSFタンパク質の結合体の調製物であって、ポリマーまたはその誘導体の少なくとも1つの官能基がタンパク質の少なくとも1つの官能基と反応し、それによって共有結合による連結を形成している結合体の製剤について記載している。ポリペプチドのHAS化、好ましくはHES化についての他の先行技術文書は特許文献37~41である。

#### 【0019】

G-CSF等の治療剤ポリペプチドのクリアランス時間を延長し、かつ免疫原性を減少させるために、ポリマー部分でかかる治療剤ポリペプチドを修飾するいくつかのアプローチが先行技術に記載されているが、そのようポリマー-G-CSF結合体の有利な製剤の開発についてはほとんど研究が行われていないようである。20

#### 【0020】

上述のNeulasta(登録商標)製品は、皮下注射用の液体組成物である。その製剤は、ペグフィルグラスチム、酢酸ナトリウム、ソルビトール、ポリソルベート20および注射用の水を含み、4.0のpHを有する(<http://www.neulasta.com>およびROTELISTE 2007を参照)。Neulasta(登録商標)とNeupogen(登録商標)製品(いずれもAmgenにより販売)は、緩衝液、賦形剤および溶液のpH値に関してほぼ同一である。Neupogen(登録商標)は、フィルグラスチム(ペグフィルグラスチムの代わり)、酢酸ナトリウム、ソルビトール、ポリソルベート80および注射用の水を含み、4.0のpHを有する(<http://www.neupogen.com>およびROTELISTE 2007を参照)。30

#### 【0021】

本発明は、ポリマーG-CSF結合体の特性を考慮するように特に開発されたポリマーG-CSF結合体を含む液体医薬組成物に関する。非結合G-CSFを含む製剤に関する先行技術ではいくつかのアプローチが報告されているが、ポリマーG-CSF結合体の有用な製剤についてはほとんど知られていない。

#### 【0022】

非結合G-CSFに対して開発された医薬組成物がいくつか特許文献で提示されており、それは非結合G-CSFがPEG-G-CSF結合体と置換された製剤を包含するように報告されているが、非G-CSFのみに対して準備し、試験しているのは明白である。40

#### 【0023】

例えば、特許文献42は、組成物が4.0を超えるpH値を有し、さらに酸を含むが界面活性剤を含まない、G-CSFを含む安定した医薬組成物について記載している。特許文献42に記載された医薬組成物は、明らかに非結合G-CSFに対して開発されており、明細書には同じまたは改良された生物学的活性を示すPEG等で化学修飾されたG-CSFを含むことが述べられている。

#### 【0024】

別の例は、特許文献43であり、これもG-CSFを含む安定した水性組成物に関する50

。組成物は、緩衝液としてのコハク酸または酒石酸もしくはその塩を含み、4.0～5.8の範囲の好ましいpHを有する。明細書によれば、G-CSFタンパク質は、例えば酵素グリコシル化または化学的PEG化により、合成的に修飾してもよい。

#### 【0025】

特許文献44は、安定剤としてトリプトファンを含む安定したタンパク質調合を開示している。タンパク質のリストは、G-CSFと、PEGまたはその同等物で化学修飾したG-CSFとを包含している。G-CSF調製物は好ましくは5.7のpH、より好ましくは6.0～6.7のpHを有する。

#### 【0026】

別の実施例は特許文献45であり、これは活性成分として生理活性タンパク質と、平滑剤として少なくとも1つの糖とを含み、6.5～7.4のpHを有する注射可能な医薬調製物について記載している。この場合でも、PEGまたはその同等物で化学修飾されたG-CSFも含まれている。

10

#### 【0027】

特許文献46は、少なくとも1つのアミノ酸またはその塩、好ましくはメチオニンを安定剤として含むG-CSF溶液製剤について記載している。G-CSF溶液製剤は、好ましくは5.7のpHを有し、より好ましくは5.5～6.8のpHを有する。ここでも、PEGまたはその同等物で化学修飾されたG-CSFも含まれている。

#### 【0028】

しかしながら、先行技術に開示された調製物はいずれも特異的なポリマーG-CSF結合体の調製物ではない。それどころか、特許文献に記載された溶液は単に非G-CSFについてのみ開発され、試験されている。

20

#### 【先行技術文献】

##### 【特許文献】

##### 【0029】

【特許文献1】国際公開第01/87925号

【特許文献2】欧州特許出願公開第0456200A号

【特許文献3】米国特許第6,166,183号

【特許文献4】米国特許第6,004,548号

【特許文献5】米国特許第5,580,755号

30

【特許文献6】米国特許第5,582,823号

【特許文献7】米国特許第5,675,941号

【特許文献8】米国特許第5,416,195号

【特許文献9】米国特許第5,399,345号

【特許文献10】国際公開第2005/055946号

【特許文献11】国際公開第2006/074467号

【特許文献12】米国特許第5,218,092号

【特許文献13】米国特許第5,824,778号

【特許文献14】米国特許第5,824,784号

【特許文献15】国際公開第96/11953号

40

【特許文献16】国際公開第95/21629号

【特許文献17】国際公開第94/20069号

【特許文献18】国際公開第94/28024号

【特許文献19】米国特許第4,179,337号

【特許文献20】米国特許第4,088,538号

【特許文献21】米国特許第4,496,689号

【特許文献22】米国特許第4,414,147号

【特許文献23】米国特許第4,055,635号

【特許文献24】国際公開第87/00056号

【特許文献25】国際公開第94/05332号

50

- 【特許文献 26】米国特許第 6,399,336 号  
 【特許文献 27】米国特許出願公開第 2003/0040037 号  
 【特許文献 28】米国特許出願公開第 2004/0132640 号  
 【特許文献 29】米国特許出願公開第 2004/0137557 号  
 【特許文献 30】米国特許出願公開第 2004/0126838 号  
 【特許文献 31】米国特許出願公開第 2004/0142856 号  
 【特許文献 32】国際公開第 02/09766 号  
 【特許文献 33】国際公開第 94/01483 号  
 【特許文献 34】国際公開第 97/30148 号  
 【特許文献 35】国際公開第 03/074087 号 10  
 【特許文献 36】国際公開第 2005/014050 号  
 【特許文献 37】国際公開第 2005/014655 号  
 【特許文献 38】国際公開第 2005/092390 号  
 【特許文献 39】国際公開第 2007/031266 号  
 【特許文献 40】国際公開第 2005/092928 号  
 【特許文献 41】国際公開第 2005/092391 号  
 【特許文献 42】国際公開第 2005/042024 号  
 【特許文献 43】国際公開第 2005/039620 号  
 【特許文献 44】欧州特許出願公開第 1 260 230 A1 号  
 【特許文献 45】欧州特許出願公開第 1 336 410 A1 号 20  
 【特許文献 46】欧州特許出願公開第 1 329 224 A1 号  

【非特許文献】  
 【0030】  
 【非特許文献 1】Nagata et al. (1986) Nature 319: 415 - 418  
 【発明の概要】  
 【発明が解決しようとする課題】  
 【0031】  
 本発明の根底にある課題は、結合体に適合され、かつ高温（通常 2 ~ 8 の冷蔵庫よりも高い温度）で安定なポリマー G - C S F を提供することにある。さらに、本発明の目的は、調製のいかなる段階でも再構成を必要とせず、かつ患者に投与されたときにできるだけ炎症を引き起こさない医薬組成物を提供することにある。 30  
 【課題を解決するための手段】  
 【0032】  
 これらの問題は、ポリマー G - C S F 結合体を含み、4.5 ~ 5.5 の範囲の pH を有する医薬水性組成物の提供により、本発明に従って解決される。本発明の水性調製物は、界面活性剤と、任意選択で 1 または複数の他の医薬として許容される賦形剤とを含む。好ましい実施形態では、組成物は安定剤として、アミノ酸またはその誘導体もしくは塩を含まず、緩衝液として酒石酸またはその塩も、コハク酸またはその塩も含まない。  
 【0033】  
 5.0 に 4.5 ~ 5.5 の範囲の pH 値、好ましくは 5.0 の pH を有するポリマー G - C S F 結合体の組成物の調合は、結合体の結合の酸加水分解を防ぐという驚くべきことが判明した。この pH 範囲は、冷蔵庫の温度（2 ~ 8）よりも高い、特に室温（つまり 25 未満）、さらにはより高温（例えば 40）における溶液の安定性を改善する。これは、延長された期間の間、活性を有意に損なわず、また品質を有意に低下させずに組成物を貯蔵できることを意味する。 40  
 【0034】  
 さらに、貯蔵安定性とは別に、本発明の組成物は、4.0 の pH を有する比較組成物に対して利点を有する。というのも、酸性が少ない組成物は患者に投与した場合に引き起こす炎症が少ないためである。  
 【発明を実施するための形態】 50

## 【0035】

別段の定めがない限り、以下の定義を本明細書において発明を説明するために使用される種々の用語の意味および範囲を例証および説明するために、以下の定義を示す。

用語「ポリマー G - C S F」は、ポリマーの官能基とポリペプチドの官能基との間の共有結合による連結により結合体が形成される、G - C S F ポリペプチドとポリマーとの間の結合体を指す。結合体は 1 または複数のポリマー部分を含んでよい。

## 【0036】

用語「G - C S F」（または G - C S F ポリペプチドまたは G - C S F タンパク質または G - C S F ベプチド）は、天然ヒト G - C S F（つまり造血前駆細胞の分化および増殖を刺激できるタンパク質）のインビオ生物活性を有するタンパク質を指す。G - C S F は  
、Stute, N., et al. "Pharmacokinetics of subcutaneous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children" (1992) Blood 79 (11), pages 2849-2854.に記載されたアッセイによって G - C S F であると明白に確認することができる。  
10

## 【0037】

例証的実施形態では、G - C S F は配列番号 1 または配列番号 2 のアミノ酸配列を有し、配列番号 1 は、大腸菌で生産されるヒトメチオニル - G - C S F の野生型アミノ酸配列を示し、配列番号 2 は、哺乳動物細胞（例えば CHO 細胞）で生産されるヒト G - C S F のアミノ酸配列を示す。配列番号 1 は第 1 のアミノ酸がメチオニンで、Thr 134 にトレオニン残基を有する 175 アミノ酸の変異型である。配列番号 2 は、先端のメチオニンがないという点を除いて該 175 アミノ酸変異型と同じ配列を有する 174 のアミノ酸変異型であるため、配列は T から始まり、133 位置にトレオニン残基を有する。  
20

## 【0038】

## 配列番号 1

```
M T P L G P A S S L P Q S F L L K C L E Q V R K I Q G D G A A L Q E K L C A T
Y K L C H P E E L V L L G H S L G I P W A P L S S C P S Q A L Q L A G C L S Q L
H S G L F L Y Q G L L Q A L E G I S P E L G P T L D T L Q L D V A D F A T T I W
Q Q M E E L G M A P A L Q P T Q G A M P A F A S A F Q   R R A G G V L V A S H L
Q S F L E V S Y R V L R H L A Q P ( 175 個のアミノ酸 )
```

## 配列番号 2

```
T P L G P A S S L P Q S F L L K C L E Q V R K I Q G D G A A L Q E K L C A T Y
K L C H P E E L V L L G H S L G I P W A P L S S C P S Q A L Q L A G C L S Q L H
S G L F L Y Q G L L Q A L E G I S P E L G P T L D T L Q L D V A D F A T T I W Q
Q M E E L G M A P A L Q P T Q G A M P A F A S A F Q R R A G G V L V A S H L Q S
F L E V S Y R V L R H L A Q P ( 174 個のアミノ酸 )  
30
```

当業者は、本発明はここに示した配列に限定されず、G - C S F の変異型を含むことを容易に理解するだろう。そのような変異型は当該技術分野に周知であり、それらは天然 G - C S F の生物活性を維持しつつ、上記に示したアミノ酸配列に対して 1 または複数のアミノ酸の削除、置換または付加を含み得る。例として、だが全く、G - C S F 変異型は、国際公開第 01 / 87925 号、欧洲出願公開第 0 456 200 A 号、米国特許 6,166,183 号、米国特許 6,004,548 号、米国特許 5,580,755 号、米国特許 5,582,823 号、米国特許 5,675,941 号、米国特許 5,416,195 号、米国特許 5,399,345 号、国際公開第 2005 / 055946 号および国際公開第 2006 / 074467 号に記載されているが、これは本願をそのように限定するものではない。  
40

## 【0039】

G - C S F ポリペプチドはグリコシル化されていてもよいし、グリコシル化されていなくてもよい。好ましい実施形態では、G - C S F ポリペプチドは大腸菌で生産された組換えヒト G - C S F である、つまり、配列番号 1 の上記に示されたアミノ酸配列またはその変異型を有する組換えヒト G - C S F である。

## 【0040】

50

ポリマーは、G - C S F ポリペプチドに共有結合で連結でき、G - C S F ポリペプチドに共有結合で連結されると治療上有用なポリマーG - C S F 結合体が生じるポリマーであれば、いかなるポリマーであってもよい。いくつかの適切なポリマーは、導入部分で既に言及したが、これにはP E G およびP P G 等のポリ(アルキレンエチレングリコール)、ヒドロキシエチルスター(HE S)等のヒドロキシアルキルスター、およびポリマーポリマーポリペプチドに関する国際公開第02/09766、国際公開第96/11953、国際公開第97/30148に記載されたポリマーを含む。好ましい実施形態では、ポリマーはP E Gである。

#### 【0041】

結合体に関して以下に使用されるm g / m l の濃度の詳細は、すべてG - C S F 部分のみに関する。定義上、P E G 部分は質量濃度を考慮しない。10

フィルグラスチムは約18 ~ 19 k D の分子量を有しているが、ペグフィルグラスチムはそのモノメトキシ-P E G 部分のためそれよりはるかに大きく、約39 k D の分子量を有する。本発明のポリマーG - C S F 結合体は、20 ~ 60 k D の範囲、好ましくは35 ~ 45 k D の範囲の分子量を有してよい。

#### 【0042】

適切なP E G は、先行技術、例えば国際公開第2005/055946号、国際公開第2006/074467号および国際公開第01/87329号に開示されている。P E G 部分は直線であっても分岐であってもよく、5 ~ 40 k D のサイズを有してよい。好ましくはP E G 部分は15 ~ 25 k D の分子量、最も好ましくは約20 k D の分子量を有する。20

#### 【0043】

ポリマーG - C S F 結合体の生産方法も、先行技術に記載されている。ポリペプチドとポリマー部分との間の結合体の調製に関する上記に言及した文書が援用される。本願ではこれらの文書の開示、すなわち本明細書で説明する結合体およびその製造方法について援用する。

#### 【0044】

本発明において有用な他のポリマーG - C S F 結合体が、国際公開第96/11953号、欧州特許出願公開第822 199 A号、国際公開第01/51510号、国際公開第2006/0128460号、欧州特許出願公開第欧州921 131号 A および欧州特許出願公開第744 409号に記載されている。本願ではこれらの文書の開示、すなわち本明細書で説明する結合体およびその製造方法を明示的に参照する。30

#### 【0045】

当業者は、P E G またはH E S 等のポリマーがタンパク質のアミノ酸残基に直接結合される結合体のみならず、ポリマー部分とG - C S F ポリペプチドがリンカーによって互いに連結された結合体も包含することを容易に理解するだろう。例えば、ポリペプチドとP E G 部分との間に挟まれたグリコシル基は、本発明の結合体内の有用なリンカーである。国際公開第2006/074467号は、G - C S F ポリペプチドとポリマー部分がグリコシルリンカーまたは非グリコシルリンカー(例えば置換または非置換のアルキルまたは置換または非置換のヘテロアルキル)を介して連結されたポリマーG - C S F 結合体について説明している。国際公開第2006/074467の開示は本明細書に援用する。40

#### 【0046】

用語「P E G G - C S F 」(P E G 化G - C S F )は、以下に説明するように1または複数のポリエチレングリコール部分と共有結合で結合されたG - C S F タンパク質を指す。P E G 基とG - C S F タンパク質は、互いに直接結合してもよいし、またはリンカー(例えばグリコシルリンカー)を介して結合されてもよい。

#### 【0047】

本発明の1実施形態では、ポリマーG - C S F ペプチド結合体は、国際公開第2006/074467号に記載された方法によって調製される。好ましい実施形態では、ポリマーG - C S F ペプチドは、P E G 修飾部分とG - C S F ポリペプチドとの間にグリコシル50

連結基を有する P E G - G - C S F 結合体である。そのような結合体は「糖 P E G 化」G - C S F と呼ばれる。

#### 【 0 0 4 8 】

例証的実施形態では、本発明の「糖 P E G 化」G - C S F 分子は、グリコシル化してもグリコシル化しなくてよい G - C S F ペプチドと、その構造内にポリ(エチレングリコール)部分を有する酵素で転位可能なサッカリル部分との間の結合体の酵素媒介性の形成により生産される。P E G 部分は、サッカリル部分に直接取り付けられてもよいし(すなわち 2 つの反応基の反応により一つの基が形成されることにより)、リンカー部分を介して取り付けられても良い(例えば置換または非置換のアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル等)グリコシル連結基は P E G で誘導体化されるシアル酸部分であってよい。

10

#### 【 0 0 4 9 】

本発明の好ましい実施形態では、グリコシルリンカーは、O - グリコシル化を介して、好ましくは G - C S F タンパク質のトレオニン残基の位置での O - グリコシル化を介して、G - C S F タンパク質に結合される。

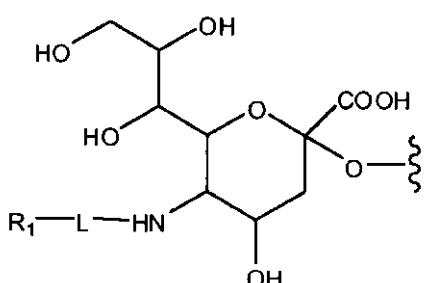
#### 【 0 0 5 0 】

グリコシルリンカーは好ましくは单糖、二糖、またはオリゴ糖を含み、より好ましくはグリコシルリンカーはシアル酸および N - アセチルガラクトサミンを含む。

本発明の 1 実施形態では、ポリマー G - C S F ペプチド結合体は以下の部分を含む：

#### 【 0 0 5 1 】

#### 【 化 1 】



20

式中、R<sub>1</sub>は直鎖または分岐のポリ(エチレングリコール)残基を含む部分であり、Lは結合、置換または非置換のアルキル、および置換または非置換のヘテロアルキルから選択されたメンバーであるリンカーであり、ペプチドはグリコシル基でグリコシル化され、前記部分がグリコシル基に共有結合で結合される。グリコシル基は好ましくは N - アセチルガラクトサミンである。好ましい実施形態では、G - C S F ペプチドは、トレオニン残基で、好ましくは 134 の位置(N末端基メチオニンと合計 175 のアミノ酸を有するメチオニル - G - C S F ポリペプチドについて計算)のトレオニン残基でグリコシル化される。好ましい実施形態では、トレオニン残基では直鎖ポリ(エチレングリコール)基であり、Lはヘテロアルキルである。

30

#### 【 0 0 5 2 】

上述の G - C S F ペプチド結合体は、

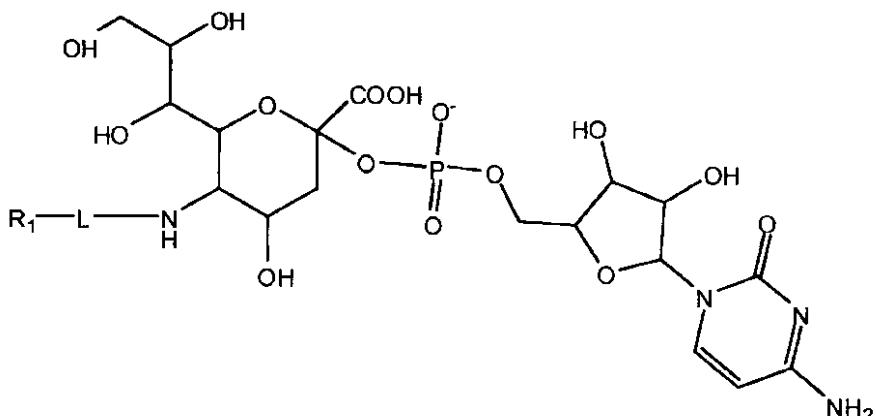
40

(a) 基質 G - C S F ペプチドを、以下の式を有する P E G シアル酸ドナーと接触させること

を含む方法によって生産することが可能である。

#### 【 0 0 5 3 】

## 【化2】



式中、R<sub>1</sub>およびLは上に定義した通りであり、PEGシアル酸部分をドナーから基質G-CSFペプチドのグリコシリル基上に転送できる酵素である。好ましい実施形態では、酵素はシアリルトランスフェラーゼであり、例えば国際公開第2005/055946に記載されるSTGalNAcIである。

## 【0054】

上述のG-CSFペプチド結合体は、

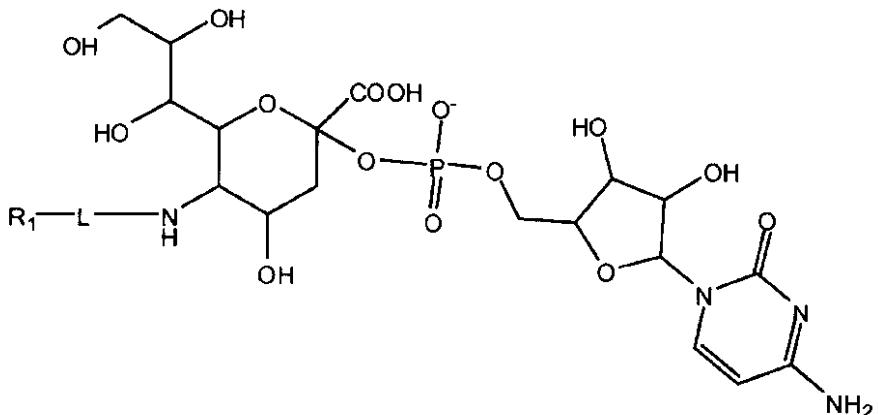
20

(a) 非グリコシリ化基質G-CSFペプチドを、グリコシルドナーおよびグリコシリル基部分をドナーから基質G-CSFペプチド上に転送できる酵素と接触させること、および  
(b) グリコシリ化したG-CSFペプチドを、以下の式を有するPEGシアル酸ドナーと接触させること

を含む方法によって生産することが可能である。

## 【0055】

## 【化3】



式中、R<sub>1</sub>およびLは上に定義した通りであり、PEGシアル酸部分をドナーから基質G-CSFペプチドのグリコシリル基上に転送できる酵素である。工程(a)と(b)は逐次反応でも同時反応でもよい。好ましい実施形態では、グリコシルドナーはUDPN-アセチルガラクトサミンである。好ましい実施形態では、工程(a)の酵素はN-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼであり、工程(b)の酵素はシアリルトランスフェラーゼであり、例えば工程(a)ではGalNAcT2、工程(b)ではSTGalNAcIである。

## 【0056】

G-CSFは、化学合成法で生産してもよいし、任意のヒトまたは別の哺乳動物供給源からのものであってもよいし、精製によりヒト胎盤、ヒト血液またはヒト尿等の天然供給

40

50

源から得てもよい。さらに、多くの上皮癌、急性脊髄性白血病細胞および様々な腫瘍細胞系列がこの因子を発現できる。

#### 【0057】

好ましくは、G-CSFは遺伝子組み換えで生産される。これは、ゲノムもしくはcDNAのクローニングにより、またはDNA合成によって得られた外因性DNA配列の真核生物または原核生物宿主での発現を含む。適切な原核生物宿主は、好ましい宿主である大腸菌を始めとする種々の細菌を包含する。適切な真核生物宿主は、*S. cerevisiae*等の酵母およびチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞ならびにサル細胞等の哺乳動物細胞を含む。

#### 【0058】

G-CSFのようなタンパク質の組換え生産法は当該技術分野で周知である。一般に、これは、宿主細胞の適切な発現ベクターでのトランスフェクション、タンパク質の生産を可能にする条件下での宿主細胞の培養、および宿主細胞からのタンパク質の精製を含む。詳細な情報のためには、例えばSouza, L.M. et al. 1986, Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells, *Science* (1986) 232: 61-65; Nagata, S. et al. 1986, Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor, *Nature* (1986) 319: 415-418; Komatsu, Y. et al. 1987, Cloning of granulocyte colony-stimulating factor cDNA from human macrophages and its expression in *Escherichia coli*, *Jpn. J. Cancer Res.* (1987) 78: 1179-1181. 参照されたい。

10

20

#### 【0059】

好ましい実施形態では、G-CSFは、ヒト成熟G-CSFのアミノ酸配列を有し(Nagata, S. et al. (1986)、前掲を参照)、その網の末端にメチオニンをさらに含んでもよく、その結果、175のアミノ酸からなるタンパク質となる(上述の配列番号1を参照)。さらに、メチオニンの代わりにG-CSFはセリンまたはトレオニン残基を含んでもよい。

#### 【0060】

その後、タンパク質は従来の下流の処理プロトコルに従って精製される。G-CSFに適した精製方法が、例えば、国際公開第87/01132号、欧州特許出願公開第019860A号、欧州特許出願公開第1458757A号、欧州特許出願公開第1527188A号、国際公開第03/051922号、国際公開第01/04154号、および国際公開第2006/097944号の先行技術に記載されている。

30

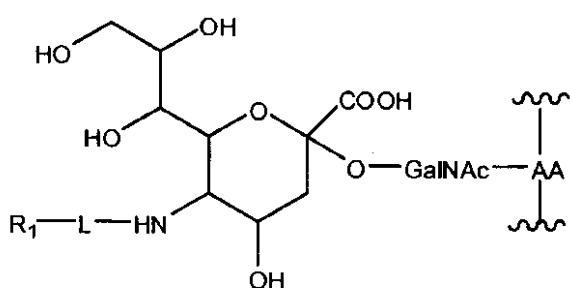
#### 【0061】

本発明の1実施形態では、本明細書で与える実施例1に記載されるようにポリマーG-CSFペプチド結合体が調製される。この結合体は、G-CSFポリペプチドとPEG部分がN-アセチルガラクトサミニル(GalNAc)基とシアル酸(SA)基を介して結合されるよう特徴付けられる。結合体は以下のG-CSF-GalNAc-SA-PEGの構造を有している。

#### 【0062】

#### 【化4】

40



式中、R<sub>1</sub>およびLは上に定義した通りであり、AAはG-CSFのアミノ酸残基である

50

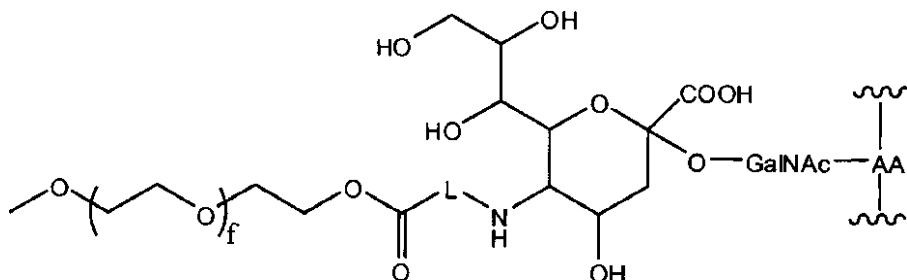
。

## 【0063】

例証的実施形態では、R<sub>1</sub>は、シアル酸基とGalNAc基を介してG-CSFポリペプチドに結合される、以下に示すような線形のPEG部分である。

## 【0064】

## 【化5】



10

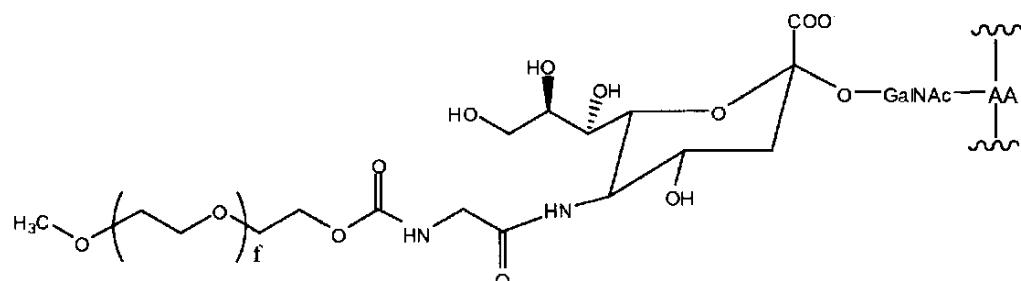
式中、Lは上に定義した通りであり、AAはG-CSFのアミノ酸残基であり、fは1～2500から選択された整数である。

## 【0065】

ある実施形態では、ポリマーG-CSF結合体は以下の式を有する：

## 【0066】

## 【化6】



20

式中、AAはG-CSFのトレオニン133（N末端メチオニンが存在する場合トレオニン134）であり、fは1～2500から選択された整数である。

30

## 【0067】

本発明の調製物は液体組成物（例えば水溶液）である。注入目的では、溶媒として純水の使用が好ましい。しかしながら、医薬製剤に適した従来の他の溶媒も使用することができる。本発明の好ましい実施形態では、医薬組成物は等張溶液である。

## 【0068】

さらに、本発明の液体溶液製剤の調製のいかなる段階でも、再構成の必要はない。溶液は使用の準備ができている製剤である。

本発明の医薬組成物は4.5～5.5の範囲のpHを有している。好ましい実施形態では、pH値が4.7～5.3の間、より好ましくは4.8～5.2の間、最も好ましくは4.9と5.1の間にある。

40

## 【0069】

所望のpH範囲を達成するために調整が必要な場合、pH値は適切な溶液により調整される；pH値の減少が示された場合は酸性溶液、pH値の増加が示された場合はアルカリ性溶液で。適切な酸性溶液は、例えば塩酸、リン酸、クエン酸および、リン酸水素ナトリウムおよびリン酸水素カリウム。適切なアルカリ性溶液は、アルカリおよびアルカリ土類金属の水酸化物、アルカリ炭酸塩、アルカリ酢酸塩、アルカリクエン酸塩、およびジアルカリ水素リン酸塩（例えば水酸化ナトリウム、酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、二ナトリウム、リン酸カリウム、アンモニア）である。

## 【0070】

50

好ましくは、溶液の pH は水酸化ナトリウムを使用して調整される。結果として、本発明の製剤はナトリウムイオンを含んでよい。ナトリウムは、10 mmol / 1 未満、通常は 6 mmol / 1 未満の濃度で存在する。

#### 【0071】

本発明の製剤は、1または複数の界面活性剤を含む。界面活性剤の典型的な例には以下のものが含まれる：非イオン性界面活性剤、例えばモノカプリル酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、およびモノパルミチン酸ソルビタン等のソルビタン脂肪酸エステル；モノカプリル酸グリセリン、モノミリスチル酸グリセリン、およびモノステアリン酸グリセリン等のグリセリン脂肪酸エステル；モノステアリン酸デカグリセリル、ジステアリン酸デカグリセリル、およびモノリノール酸デカグリセリル等のポリグリセリン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンモノラウリン酸ソルビタン、ポリオキシエチレンモノオレイン酸ソルビタン、ポリオキシエチレンモノステアリン酸ソルビタン、ポリオキシエチレンモノパルミチン酸ソルビタン、ポリオキシエチレントリオレイン酸ソルビタン、およびポリオキシエチレントリステアリン酸ソルビタン等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンテトラステアリン酸ソルビトールおよびポリオキシエチレンテトラオレイン酸ソルビトール等ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンモノステアリン酸グリセリン等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレンジステアリン酸グリコール等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル；ポリオキシエチレンひまし油、ポリオキシエチレン硬化ひまし油（ポリオキシエチレン水素化ヒマシ油）等のポリオキシエチレン硬化ひまし油；ポリオキシエチレンソルビトールワックス等のポリオキシエチレンワックス誘導体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；6 - 18 のHLB 値を有するポリオキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド；陰イオン界面活性剤、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、およびオレイル硫酸ナトリウム等の C10 ~ 18 アルキルを有する硫酸アルキル；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、2 - 4 の平均 EO モル数と C10 ~ 18 アルキルを有するポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスルホスクシン酸ナトリウム等の C8 ~ 18 アルキルを有するアルキルスルホスクシン酸エステル塩；および天然界面活性剤、例えばレシチン；グリセロリン脂質；スフィンゴミエリン等のスフィンゴリン脂質；C12 ~ 18 脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル。これらの界面活性剤の1つまたは複数を、本発明の製剤と組み合わせて加えることが可能である。

#### 【0072】

好ましい界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタンのアルキルエステルであり、好ましくは、ポリソルベート 20、21、40、60、65、80、81、85、最も好ましくはポリソルベート 20 および 80 である。

#### 【0073】

製剤中の界面活性剤の濃度は、溶液製剤の全量に対し、通常 0.0005% (w/v) から 0.05% (w/v) までの範囲、より好ましくは 0.001% (w/v) から 0.01% (w/v) までの範囲、さらに好ましくは 0.002% (w/v) から 0.006% (w/v) までの範囲、最も好ましくは 0.003% (w/v) から 0.004% (w/v) までの範囲である。

#### 【0074】

通常、本発明の製剤は、0.003% (w/v)、0.0033% (w/v) または 0.004% (w/v) の濃度の界面活性剤ポリソルベート 20 または 80 を含み、ポリソルベート 20 が好ましい。

10

20

30

40

50

## 【0075】

本発明の製剤は生理学的に許容される緩衝液を含む。適切な緩衝液が溶液製剤の分野では周知であり、例えば(好ましくはリン酸一水素ナトリウム-リン酸二水素ナトリウム系)リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、乳酸緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液、BisTris、MES、およびグリシン-HCl)が挙げられる。酢酸緩衝液の使用、すなわち酸性の酸とその塩(例えばアルカリまたはアンモニウム塩)の使用が好ましい。

## 【0076】

緩衝液は、通常、1~100mmol/l、好ましくは2~50mmol/l、最も好ましくは5~20mmol/lの濃度で製剤中に存在する。好ましい実施形態では、緩衝液は、10mmol/lで存在し、最も好ましくは10mmol/lで存在する酢酸塩である。

10

## 【0077】

緩衝液(例えば酢酸塩)の濃度は、十分な緩衝能のみならずpH安定化作用が提供されるように選択される。しかしながら、同時に、イオン濃度、従って溶液の導電率は凝集体の形成を回避するためにできるだけ低くする。

## 【0078】

本発明の実施形態では、最終的な溶液製剤の導電率は1.0mS/cm未満で、好ましくは0.8mS/cm未満、より好ましくは0.5未満mS/cmである。

さらに、製剤は酒石酸およびコハク酸ならびにその塩を含まないことが好ましい。溶液がHEPES、TESおよびトリシンを含まないこともまた好ましい。

20

## 【0079】

本発明の製剤が硫酸イオンを含まないことも好ましい。

さらに、好ましい実施形態では、製剤は防腐剤を含まない。ここで防腐剤とは、貯蔵安定性を増大させるための防腐剤として慣例的に使用され、標準濃度では殺菌作用を有する物質のことを意味する。特に、製剤は、塩化エチル、ベンジルアルコール、p-クロロ-m-クレゾールおよびピロカルボン酸ジアルキルエステルおよび塩化ベンザルコニウム等の防腐剤を含まない。

## 【0080】

本発明の実施形態では、製剤はさらに好ましくはポリオール、好ましくは糖アルコール、最も好ましくはマンニトールまたはソルビトールを、張性改变剤として含む。ソルビトールは特に好ましい。ソルビトールまたはマンニトール等の糖の量は、溶液の総量に対して通常10.0%(w/v)以下である。好ましくは、糖の濃度は8.0%(w/v)以下、より好ましくは6.0%(w/v)以下、最も好ましくは5.0%(w/v)以下である。好ましい実施形態では、ソルビトールは5.0%(w/v)の量で存在する。

30

## 【0081】

さらに、本発明の溶液製剤は、アミノ酸、その誘導体および塩、ポリマー安定化剤およびタンパク質安定化剤から選択された安定化剤を含まないことが好ましい。

ポリマーG-CSF結合体を含む本発明の製剤は、注射(皮下、静脈内または筋肉注射)または経皮、粘膜、鼻、または肺投与等の非経口経路で通常投与されるが、経口投与であってもよい。

40

## 【0082】

ポリマーG-CSF結合体は、通常、1.0~30.0mg/mlの濃度、好ましくは5.0~20.0mg/mlの濃度、最も好ましくは8.0~12.0mg/mlの濃度で製剤中に存在する。好ましい実施形態では、ポリマーG-CSF結合体は、10.0mg/mlの量で存在するPEG-SA-GalNac-G-CSFである。

## 【0083】

好ましい実施形態では、製剤は、活性成分としてのポリマーG-CSFと、界面活性剤と、緩衝液と、張性改变剤と、ナトリウムイオンと、水とを含み、他の成分は含まない。最も好ましくは、本発明の水性製剤は、活性薬剤としての糖PEG化G-CSFと、界面活性剤としてのポリソルベート20およびポリソルベート80のうちの少なくとも一方と

50

、張性改変剤としてのソルビトールおよびマンニトールのうちの少なくとも一方と、緩衝液としての酢酸塩と、ナトリウムとを含み、他の賦形剤を含まない。

【0084】

本発明の別の態様では、上述した本発明の水性製剤は、小児への使用に適した稀釀水性製剤を得るために希釀される。子供の治療に適した稀釀液は、上記の本発明の溶液を1：2～1：8に希釀することにより得られる。

【0085】

本発明はさらに、本発明の水性製剤または該水性製剤から希釀によって得られる希釀溶液を備えた医薬容器に関する。適切な医薬容器は先行技術から理解される。容器は、例えば、注射器、ガラス瓶、輸液ボトル、アンプルまたはカルブルであってよい。好ましい実施形態では、容器が注射器である場合、注射器は針保護システムを備えている。先行技術から周知のそのような針保護システムは、損傷の危険性を減らすよう支援する。別の実施形態では、容器は注入ペン内のカルブルである。

10

【0086】

本発明はさらに、本発明の水性製剤を製造する方法であって、活性薬剤としてのポリマーG-CSF結合体を、4.5～5.5の範囲のpHを有し界面活性剤とさらには医薬賦形剤とを含む水性製剤へと調合することを含む方法に関する。

【0087】

別の態様では、本発明は、好中球減少症の治療または予防における本発明の水性製剤の使用に関する。さらに、本発明の水性製剤は、有利には、神経障害の治療または予防に、または骨髄移植に関して使用することが可能である。一般に、本発明の医薬溶液は幹細胞の動員に有用である。

20

【0088】

本発明の医薬液体の製剤は、非常に良好な貯蔵安定性を示すことが判明した。本発明の範囲内では、用語「貯蔵安定性」とは、活性なポリマーG-CSFの含量が25%で製剤を3ヶ月貯蔵した後でも最初の濃度の80%以上にいまだ達することを意味する。好ましくは、25%で3ヶ月貯蔵した後に、G-CSF活性の残りの含量は最初の活性の少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%に達する。

30

【0089】

ポリマーG-CSF結合体の活性は、G-CSFに関する先行技術に記載されているため、従来の活性試験によって決定することが可能である。例えば、Draft Monographie "Filgrastim Concentrated Solution" PharmEur. Vol.19, No.1, Jan. 2007, or Stute, N., et al. "Pharmacokinetics of subcutaneous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children 1" (1992) Blood 79 (11), pages 2849-2854参照されたい。

【0090】

インビトロにおけるG-CSF活性の測定は、Shirafuji, N. et al. 1989, A new bioassay for human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) using murine myeloblasts NFS-60 cells as targets and estimation of its levels in sera from normal healthy persons and patients with infectious and hematological disorders, Exp. Hematol. (1989) 17, 116-119に記載されている。インビトロにおけるG-CSF活性の測定については、例えばTanaka, H. et al. 1991, Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor conjugated to polyethylene glycol in rats, Cancer Research (1991) 51, 3710-3714に記載されている。G-CSF活性の測定に関する試験が記載されたさらなる刊行物には米国特許第6,555,660号およびNohynek, G.J. et al. 1997, Comparison of the potency of glycosylated and nonglycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factors in neutropenic and non-neutropenic CD rats, Cancer Chemother. Pharmacol. (1997) 39, 259-266がある。

40

50

## 【0091】

製剤に使用されるポリマーG-CSF結合体の純度は、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも99%、最も99%よりも高い。純度の程度はHPLC分析により決定できる。そのような分析を行なうのに適した材料およびプロトコルは、VydacまたはTOSOH Bioscience (<http://www.tosohbioscience.de>)等の商用供給業者から得ることができる。

## 【0092】

本発明の溶液を調合するための成分は、従来の供給業者から、例えばSigmaまたはMerck等の会社から得ることができる。

本発明の製剤の生産は従来の方法により行なうことができる。製剤の成分は、水性緩衝液に溶解させることができる。代わりに、結合体を、精製プロセスの結果としての水性緩衝液の形で得てもよい。

## 【0093】

最後に、完成した液体製剤は適切な医薬容器へ充填され、投与されるまで保存される。

以下の実施例は、本発明の範囲を限定せずに本発明を例証するものである。 実施例

## 実施例1. G-CSF-GalNAc-SA-PEGの調製

以下の実施例では、酵素の同時の相加を使用して、(a)次の工程で使用される前に各中間生成物が精製される2つの連続工程からなる方法、および(b)1つの工程からなる方法、におけるG-CSF-GalNAc-SA-PEGの調製を説明する。

## 【0094】

## a. 二つの工程からなる方法

GalNAc-T2を用いたG-CSFおよびUDP-GalNAcからのG-CSF-GalNAc(pH6.2)の調製

G-CSF(960μg)のパッケージされた3.2mLの緩衝液を限外濾過フィルタ(MWCO5K)を使用して濃縮し、次に、1mLの25mM MES緩衝液(pH6.2、0.005%NaN<sub>3</sub>)で再構成した。その後、UDP-GalNAc(6mg、9.24mM)、GalNAc-T2(40μL、0.04U)、および100mM MnCl<sub>2</sub>(40μL、4mM)を加え、生じた溶液を室温でインキュベートした。

## 【0095】

24時間後、MALDIにより反応が完了したことが示された。反応混合物を、SEC(Superdex75およびSuperdex200)とPBS(リン酸緩衝液、pH4.9および0.005%Tween80)を含む溶出緩衝液を使用してHPLC精製に直接かけた。G-CSF-GalNAcの採集ピークを、Centricon5KDAMWCOフィルタを使用して約150μLに濃縮し、PBS(リン酸緩衝液(pH4.9および0.005%Tween80))を用いて1mLに体積を調節した。最終タンパク質濃度は1mg/mL(A<sub>280</sub>)、収率は100%であった。サンプルを4℃で保存した。

## 【0096】

精製したG-CSF-GalNAc、CMP-SA-PEG(20kDa)およびマウスSTOGalNAc-TI(pH6.2)を用いたG-CSF-GalNAc-SA-PEGの精製

1mgのタンパク質を含むG-CSF-GalNAc溶液を、25mM MES緩衝液(pH6.2、0.005%NaN<sub>3</sub>)へ緩衝液を交換し、CMP-SA-PEG(20kDa)(5mg、0.25μmol)を加えた。溶解後、MnCl<sub>2</sub>(100μL、100mM溶液)およびST6GalNAc-I(100μL(マウス酵素))を加え、反応混合物を32℃で3日間ゆっくり振動させた。反応混合物を、限外濾過(MWCO5K)で濃縮し、25のmM NaOAc(pH4.9)で1回緩衝液を交換し、次に、全量1mLに濃縮した。その後、生成物を、保持時間13~18分のSP-Sepharose(A:25mM NaOAc+0.005%トウイーン-80 pH4.5、B:25mM NaOAc+0.005%トウイーン-80 pH4.5+2M NaCl)と、保

10

20

30

40

50

持時間 8 . 6 分 ( Superdex 75、流量 1 m l / 分 ) の S E C ( Superdex 75 ; PBS - pH 7 . 2 、 0 . 0 0 5 % Tween 80 ) を使用して精製した。所望の分画を採集し、 0 . 5 m L に濃縮し、 4 °で保存した。

#### 【 0 0 9 7 】

b . 一つの工程からなる方法

マウス STO GalNAc - I ( pH 6 . 0 ) を用いたワンポットプロセス G - CSF ( 960 μg のタンパク質、 3 . 2 m L の生成物調合緩衝液に溶解 ) を、 外漏過 ( MWCO 5 K ) で 0 . 5 m l まで濃縮し、 25 mM MES 緩衝液 ( pH 6 . 0 、 0 . 0 0 5 % NaN<sub>3</sub> ) で全量約 1 m L またはタンパク質濃度 1 m g / m L に再構築した。その後、 UDP - GalNAc ( 6 m g 、 9 . 21 μmol ) 、 GalNAc - T 2 ( 80 μL 、 80 mU ) 、 CMP - SA - PEG ( 20 KDa ) ( 6 m g 、 0 . 3 μmol ) およびマウス酵素 ST6GalNAc - I ( 120 μL ) および 100 mM MnCl<sub>2</sub> ( 50 μL ) を加えた。溶液を 32 °で 48 時間振動させ、 SP - Sepharose で標準クロマトグラフィ条件を使用して精製した。全量で 0 . 5 m l のタンパク質 ( A<sub>280</sub> ) または約 50 % の全収率が得られた。生成物の構造を MALDI および SDS - PAGE の両方を用いた分析により確認した。

#### 【 0 0 9 8 】

ニワトリ STO GalNAc - I ( pH 6 . 0 ) を用いたワンポットプロセス

14 . 4 m g の G - CSF を最終量 3 m L に濃縮し、 25 mM MES 緩衝液 ( pH 6 . 0 、 0 . 0 5 % NaN<sub>3</sub> 、 0 . 0 0 4 % Tween 80 ) で緩衝液を交換し、 体積を 13 m L に調節した。その後、 UDP - GalNAc ( 90 m g 、 150 μモル ) 、 GalNAc - T 2 ( 0 . 59 U ) 、 CMP - SA - PEG - 20 KDa ( 90 m g ) 、 ニワトリ ST6GalNAc - I ( 0 . 44 U ) および 100 mM MnCl<sub>2</sub> ( 600 μL ) を加えた。得られた混合物を室温で 60 時間静置した。その後、反応混合物を限外漏過 ( MWCO 5 K ) と遠心分離を使用して濃縮した。残留物 ( 約 2 m L ) を 25 mM NaOAc 緩衝液 ( pH 4 . 5 ) に溶解し、 再び 5 m L の最終体積に濃縮した。このサンプルを、 保持時間約 10 ~ 23 分の SP セファロース、 SEC ( Superdex 75 、 17 分、 流量 0 . 5 m l / 分 ) および追加の SEC ( Superdex 200 、 23 分、 流量 0 . 5 m l / 分 ) を使用して精製し、 3 . 6 m g ( 25 % の全収率 ) の G - CSF - GalNAc - SA - PEG - 20 KDa ( A<sub>280</sub> および BCA 法 ) を得た。

#### 【 0 0 9 9 】

実施例 2 . 液体ポリマー - G - CSF 結合体 ( PEG - SA - GalNAc - G - CSF ) 製剤

糖 PEG 化 G - CSF ( PEG - SA - GalNAc - G - CSF の構造を有する結合体 ) を含む液体製剤を、 以下の成分を酢酸緩衝液中で調合することにより調製した。

#### 【 0 1 0 0 】

#### 【表 1】

成分	
糖PEG化G-CSF	10 mg/ml
酢酸緩衝液	10 mM
ソルビトール	5.0 % (w/v)
ポリソルベート 20	0.0033% (w/v)
ナトリウム	4.38 mM
pH	5.0

組成物の pH 値は NaOH の添加により調整した。成分はすべて欧洲薬局方 ( Ph . E )

u r . ) に従った品質である。

**【0101】**

さらに、pH 4.5 または pH 5.5 のいずれかを有し、それに比例してより少ないまたは多いナトリウムをそれぞれ有する同じ組成物を調製した。pH 4.0 (Neulasta (登録商標) 製剤のように) を有する比較製剤も調合した。

**【0102】**

実施例3. 本発明による製剤の安定性試験

pH 4.5、5.0 および 5.5 の組成物を、500 μl / ガラス瓶に等分割し、2 ~ 8 および 25 で保存した。1、2、3、4.5、6、8、12 および 15 か月後に、サンプルを以下の表に与える試験パラメータに関して試験した。

10

**【0103】**

pH 5.0 を有する組成物に対する予測の仕様は以下の通りであった：

**【0104】**

**【表2】**

試験パラメータ	方法	仕様
外観	目視による観察	透明無色
含量	UV-VIS	10.0 mg/ml ± 5%
含量	RP-HPLC (30°C)	10.0 mg/ml ± 5%
効能	バイオアッセイ	54-156%
同一性	SDS-PAGE	参照標準に適合
純度	ウェスタンプロット	参照標準に適合
純度	RP-HPLC (60°C)	酸化 < 2.0%
純度	RP-HPLC (30°C)	非ペグ化G-CSF 2.0%
純度	SEC	ダイマーおよび凝集体 < 2.0%
脱アミド化	IEF	追加のバンドは検出せず
pH	欧洲薬局方5および米国薬局方28に従う	5.0 ± 0.2
エンドトキシン	欧洲薬局方5に従う細菌エンドトキシン試験	< 5 EU/mg
滅菌性	欧洲薬局方5に従う	滅菌
目に見えるよりも小さい粒子	粒子汚染： 欧洲薬局方5に従う 目視よりも小さい粒子	< 6000 粒子 ≥ 10 μm 1つのガラス瓶 < 600 粒子 ≥ 25 μm 1つのガラス瓶

20

30

40

び15か月に試験したサンプルはすべて、予測された仕様を満たしていた。このことは、糖PEG化G-CSFを含み、かつ4.5、5.0または5.5のpHを有するすべての組成物で判明した。

【0105】

本発明の組成物を、2つの比較製剤：Neulasta（登録商標）（pH4.0）および4.0のpHを有する糖PEG化G-CSF（PEG-SA-GalNAc-G-CSF）の組成物：と比較した。その結果、糖PEG化G-CSFを含み4.0pHを有する比較溶液と比較して、4.5、5.0のおよび5.5のより高いpH値を有する製剤はより良好な貯蔵安定性を示すことが判明している。これらの収集データによって、pH値がより高いと糖PEG結合の酸加水分解が予防されると結論することが可能である。

10

【0106】

さらに、本発明の製剤が、Neulasta（登録商標）として知られるPEG-G-CSF結合体の安定性に匹敵する安定性を有することが観察された。

【配列表】

0005570988000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 105 A 6 1 P 43/00 107

(72)発明者 シェッケルマン、クリスティアン  
ドイツ連邦共和国 7 9 2 3 8 エーレンキルヒエン ゼーゲガーセ 1ツェー

審査官 小森 潔

(56)参考文献 国際公開第06/074467 (WO, A1)  
Glycobiology, 2006年, Vol. 16, No. 9, p 833 - 843  
Angiology Frontier, 2006年, Vol. 5, No. 3, p 241 - 247  
Stroke, 2006年, Vol. 37, No. 4, p 1123 - 1128  
Haematologica, 2006年, Vol. 91, No. 7, p 1004 - 1005

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 38 / 22  
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)  
JSTplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)