



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104689333 B

(45)授权公告日 2018.05.29

(21)申请号 201510065114.9

A61K 38/18(2006.01)

(22)申请日 2008.08.27

A61J 1/06(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 25/00(2006.01)

申请公布号 CN 104689333 A

A61P 7/00(2006.01)

(43)申请公布日 2015.06.10

(30)优先权数据

(56)对比文件

07115047.8 2007.08.27 EP

WO 2006074467 A2,2006.07.13,

(62)分案原申请数据

Armin Schneider et al..《A Role for G-CSF (Granulocyte-colony Stimulating Factor) in the Central Nervous System》.

200880104971.3 2008.08.27

《Cell Cycle》.2005,第4卷(第12期),

(73)专利权人 拉蒂奥法姆有限责任公司

Deirdre Murphy Piedmonte et al..

地址 德国乌尔姆

《Formulation of Neulasta®

(72)发明人 W·因德雷尔 C·谢克曼

(pegfilgrastim)》.《Advanced Drug

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

Delivery Reviews》.2007,

代理人 史文静 黄革生

审查员 吴铁生

(51)Int.Cl.

权利要求书1页 说明书15页

A61K 47/59(2017.01)

序列表1页

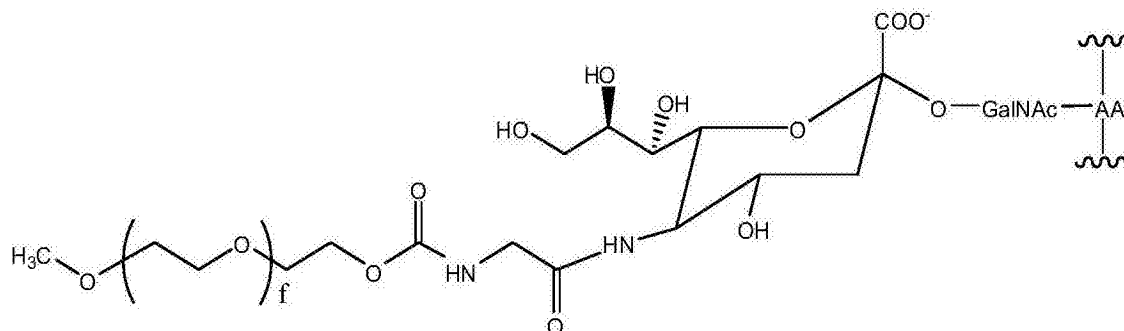
(54)发明名称

G-CSF 缀合物的液体制剂

(57)摘要

本发明涉及包含与聚合物缀合的粒细胞集落刺激因子多肽的液体药物组合物,组合物的pH值在4.5至5.5的范围内。该组合物还包含表面活性剂,以及任选的一种或多种其他可药用的赋形剂。此外,本发明组合物不含作为缓冲剂的酒石酸或其盐和琥珀酸及其盐,并且不含作为稳定剂的氨基酸。该组合物具有良好的储存稳定性,并且特别用于预防和治疗使用粒细胞集落刺激因子制剂治疗有用的疾病和医学适应症。

1. 包含聚合物-G-CSF缀合物作为活性成分、聚山梨酸酯20和/或80作为表面活性剂、山梨糖醇和/或甘露醇作为渗透度调节剂、乙酸盐作为缓冲剂和钠并且没有其他赋形剂的水性制剂,其中所述聚合物-G-CSF缀合物具有下式:



其中AA为G-CSF的苏氨酸133,或者如果N端有甲硫氨酸则为G-CSF的苏氨酸134,并且其中f为选自1至2500的整数,其中所述制剂具有范围在4.5至5.5的pH。

2. 根据权利要求1所述的水性制剂,其中该表面活性剂以0.0001% (w/v) -0.05% (w/v) 的浓度存在。

3. 根据权利要求1或2所述的水性制剂,其中pH在4.7至5.3的范围内。

4. 根据权利要求3中所述的水性制剂,其中pH在4.9至5.1的范围内。

5. 根据权利要求1或2所述的水性制剂,其中该聚合物-G-CSF缀合物以1-20mg/ml的浓度存在。

6. 根据权利要求1或2所述的水性制剂,其中该聚合物-G-CSF缀合物以8-12mg/ml的浓度存在。

7. 包含权利要求1-6中任一项中所述的水性制剂的药物容器。

8. 根据权利要求7所述的药物容器,其中该容器为注射器、小瓶、输液瓶、安瓿或卡普耳。

9. 根据权利要求7所述的药物容器,其中该容器为配备有针头保护系统的注射器或注射笔内的卡普耳。

10. 用于制备根据权利要求1至6中任一项所述的水性制剂的方法,其中聚合物-G-CSF缀合物作为活性成分配制在水性制剂中,所述水性制剂的pH值为4.5至5.5范围内、并且其包含聚山梨酸酯20和/或80作为表面活性剂、山梨糖醇和/或甘露醇作为渗透度调节剂、乙酸盐作为缓冲剂、和钠。

11. 根据权利要求10所述的用于制备水性制剂的方法,其中所述水性制剂以1:2至1:8稀释。

12. 根据权利要求1至6中任一项所述的水性制剂,其用于治疗或预防中性粒细胞减少症,用于治疗或预防神经性疾病,用于骨髓移植法方面或用于干细胞动员。

13. 通过根据权利要求11所述的方法可获得的水性制剂,其用于儿科使用。

G-CSF缀合物的液体制剂

[0001] 本申请为2008年8月27日提交的、发明名称为“G-CSF缀合物的液体制剂”的PCT申请PCT/EP2008/061232的分案申请,所述PCT申请进入中国国家阶段的日期为2010年3月1日,申请号为200880104971.3。

[0002] 本发明涉及一种包含与聚合物缀合的粒细胞集落刺激因子多肽的液体药物组合物,组合物的pH值在4.5至5.5的范围内。该组合物还包含表面活性剂,以及任选地包含一种或多种其他可药用的辅料。此外,本发明组合物不含作为缓冲剂的酒石酸或其盐、和琥珀酸及其盐,并且不含作为稳定剂的氨基酸。该组合物具有良好的储存稳定性,并且特别用于预防和/或治疗认为使用粒细胞集落刺激因子制剂治疗有用的疾病和医学适应症。

[0003] 粒细胞集落刺激因子(G-CSF)是一种造血生长因子,刺激造血前体细胞的增殖和分化,以及嗜中性粒细胞的活化。G-CSF能够在体内或体外支持嗜中性粒细胞的增殖。来自日本和美国的小组于1986年克隆了人形式的G-CSF(见如Nagata等人,Nature 319:415-418,1986)。这种天然人类糖蛋白以两种形式存在,一种具有174个氨基酸,另一种具有177个氨基酸。丰度更高和活性更高的174个氨基酸形式已用于通过重组DNA技术开发药物产品。

[0004] 重组G-CSF已在基因工程大肠杆菌(*Escherichia coli*)中大量生产,并已成功地用于临床应用,以治疗由于化疗导致中性粒细胞减少的癌症患者。大肠杆菌生产的G-CSF是一种在其N端包含额外甲硫氨酸的175个氨基酸的多肽链。该蛋白质通过在*E. coli*中表达G-CSF基因,并纯化蛋白质产品至同质性来生产。该蛋白质为疏水性蛋白质,具有5个半胱氨酸残基,其中有4个形成二硫键。游离的半胱氨酸残基通常与在溶液中存储时形成更高分子量的聚集物有关。蛋白质聚集物也可通过蛋白质氧化形式形成,其中蛋白质氧化形式通过蛋白质一级序列内部甲硫氨酸残基的氧化产生。在四个甲硫氨酸残基中,一个位于N端,另外三个在序列内部。包含122位氧化态甲硫氨酸的蛋白质氧化形式,能够通过常规反相HPLC分离程序从包含127位或138位氧化态甲硫氨酸的形式以及天然蛋白质中分离出来(用由175个氨基酸组成的甲硫氨酰-G-CSF计算位置)。

[0005] 在大肠杆菌表达系统中合成的重组人G-CSF称为非格司亭(国际非专有名称,INN)。非格司亭的结构与天然糖蛋白略有不同。重组人G-CSF的另一种形式称为来格司亭(INN),是在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中合成的。非格司亭和来格司亭在欧洲市场的商品名分别为 **Neupogen[®]** 和Granocyt。

[0006] 然而,市售重组人G-CSF形式具有短期药理学作用,必须在白细胞减少状态期间多于每天一次地经常施用。具有更长循环半衰期的分子可减少减轻白细胞减少和预防后续感染必要的给药次数。目前可用的重组人G-CSF产品的另一问题是剂量依赖性骨痛的发生。由于骨痛作为重组人G-CSF治疗的明显副作用为病人所体验,因此希望提供一种不引起骨痛的重组人G-CSF产品,或借助于本身不具这种作用的产品,或借助于在不引起骨痛或至少减少骨痛的足够小的剂量下有效的产品。因此,明显存在对改进型重组G-CSF分子的需要,以及对包含G-CSF分子的稳定的随时可用药物制剂的需要。

[0007] 已报道了人G-CSF的蛋白质工程变体,例如G-CSF变体在WO 01/87925,EP 0 456

200 A,US 6,166,183,US 6,004,548,US 5,580,755,US 5,582,823,US 5,675,941,US 5,416,195,US 5,399,345,WO 2005/055946和WO 2006/074467中有描述。

[0008] 还报道了与天然多肽相比引入了至少一条附加糖链的人G-CSF和其他多肽的修饰(美国5,218,092)。此外,已报道和研究了天然人G-CSF的聚合物修饰,包括连接聚乙二醇(PEG)基团(美国专利号5,824,778、美国5,824,784、WO 96/11953、WO 95/21629和WO 94/20069)。

[0009] 在改进糖蛋白药物的药代动力学性质的尝试中,将合成聚合物连接至肽主链为本领域公知。PEG是已结合至肽的示例性聚合物。已表明用PEG衍生肽治疗剂可降低肽的免疫原性。例如,美国专利号4,179,337公开了非免疫原性多肽,如偶联至PEG或聚丙二醇(PPG)的酶和肽类激素。除降低免疫原性外,由于所述多肽的PEG缀合物尺寸增加,还延长了循环清除时间。

[0010] 在改进糖蛋白药物的药代动力学性质的尝试中,将合成聚合物连接至肽主链为本领域公知。聚乙二醇(PEG)是已结合至肽的示例性聚合物。已表明用PEG衍生肽治疗剂可降低肽的免疫原性。例如,美国专利号4,179,337公开了非免疫原性多肽,如偶联至聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇(PPG)的酶和肽类激素。除降低免疫原性外,由于所述多肽的PEG缀合物尺寸增加,还延长了循环清除时间。

[0011] 培非司亭(INN)是重组甲硫氨酰基人G-CSF(非格司亭)和单个20kDa单甲氧基-PEG-分子的共价缀合物。单甲氧基-PEG-分子与非格司亭N端甲硫氨酰基共价结合。培非司亭在欧洲市场的商品名为**Neulasta®**。

[0012] 将PEG及其衍生物连接至肽的主要方式是通过肽氨基酸残基的非特异性结合(见如美国专利号4,088,538、美国专利号4,496,689、美国专利号4,414,147、美国专利号4,055,635和WO 87/00056)。将PEG连接至肽的另一方式是通过糖肽上糖基残基的非特异性氧化(见如WO 94/05332)。

[0013] 在这些非特异性方法中,聚乙二醇以随机、非特异的方式加至肽主链的反应性残基。PEG分子的随机加入具有其缺点,包括终产物缺乏同质性和降低肽生物活性或酶活性的可能性。因此,在近几年的努力中,已开发更多将合成聚合物或其他标记物连接至肽的位点特异的方法,并且已发现可通过酶的作用在体外生产特异性缀合的同质肽类治疗剂。这些基于酶的缀合具有区域选择性和立体选择性的优点。用于缀合肽合成的两类主要的酶是糖基转移酶(如唾液酸转移酶、寡糖基转移酶、N-乙酰葡萄糖胺转移酶)和糖苷酶。这些酶可用于糖的特异性连接,随后可对糖进行修饰,使其包含治疗部分。备选地,可用糖基转移酶和经修饰的糖苷酶直接将经修饰的糖转移至肽主链(见如美国专利6,399,336及美国专利申请公开US 2003/0040037、US 2004/0132640、US 2004/0137557、US 2004/0126838和US 2004/0142856)。还已知将化学和酶合成元件相结合的方法(见如US 2004/137557)。

[0014] 将多肽样G-CSF缀合至聚合物部分如PEG的各种方法是公知的并且被广泛地描述在现有技术中。糖聚乙二醇化G-CSF的制备描述在例如WO 2005/055946中。另一个专利申请WO 2006/074467是针对G-CSF和PEG部分之间缀合物的制备的。在这个方法中,缀合物通过完整的糖基连接基团连接,嵌入并共价连接在G-CSF多肽和修饰基团之间。通过糖基转移酶的作用,缀合物可从糖基化的和非糖基化的G-CSF多肽形成。糖基转移酶将修饰的糖部分连接到多肽的氨基酸或糖残基其中之一上。WO 2005/055946和WO 2006/074467所公开的内容

在本发明内容中做明确参考。

[0015] 除了PEG,也有其他聚合物被描述用于带有G-CSF和其他治疗性蛋白质的缀合物。其中,W0 02/09766公开了通过生物学活性蛋白质和生物相容性聚合物衍生物缀合产生的生物相容性蛋白质-聚合物化合物。使用的生物相容性聚合物为高反应活性分支聚合物,并由此产生在聚合物衍生物和蛋白质之间包含长连接物的缀合物。根据W0 02/09766,生物相容性聚合物的例子为PEG、PPG、聚氧乙烯(POE)、聚亚丙基二醇、聚乳酸及其衍生物、聚丙烯酸及其衍生物、聚氨基酸、聚氨酯、聚磷腈、聚(L-赖氨酸)、聚环氧烷(PAO),水溶性聚合物例如多糖、葡聚糖,以及非免疫原性聚合物例如聚乙烯醇和聚丙烯酰胺。

[0016] W0 94/01483公开了生物学惰性聚合物或聚合物衍生物和药学纯的合成亲水性聚合物通过特殊类型化学键的共价结合形成的生物相容性聚合物缀合物。作为自然存在的聚合物及其衍生物,多糖例如透明质酸,蛋白聚糖例如硫酸软骨素A、B和C,甲壳质,肝素,硫酸肝素,葡聚糖例如环糊精、羟乙基纤维素、纤维素醚和淀粉,脂质例如甘油三酯和磷脂都被公开。

[0017] W0 96/11953描述了N-端化学修饰蛋白质化合物及其生产方法。具体的说,所述G-CSF组合物由偶联水溶性聚合物至G-CSF的N端产生。列举在W0 96/11953中的水溶性聚合物的例子为乙二醇和丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、多聚氨基酸(既可以是均聚物也可以是无规共聚物)、聚(n-乙基吡咯烷酮)、聚乙二醇、PPG均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、或聚氧乙烯多元醇。

[0018] W0 97/30148描述了减少变应原性的多肽缀合物,其包含具有两个或多个偶联于其上的多肽分子的聚合物载体分子。这些缀合物通过活化聚合物载体分子,使两个或多个多肽分子与活化聚合物载体分子反应,并阻断缀合物上残留的活化基团来制备。W0 97/30148列举了多种聚合物载体分子,包括自然的或合成的均聚物例如多元醇、多胺、多羧酸,以及包含至少两个不同附着基团的杂聚物。所给的例子包含星型PEG、分支PEG、聚乙烯醇、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯烷酮和聚-D,L-氨基酸。W0 97/30148的缀合物还包括那些含有葡聚糖,例如羧甲基葡聚糖,纤维素例如羟乙基纤维素或羟丙基纤维素,壳聚糖水解物,淀粉例如羟乙基淀粉或羟丙基淀粉,糖原,琼脂糖,瓜尔胶,菊糖,支链淀粉,黄原胶,角叉胶,果胶,海藻酸等的缀合物。

[0019] W0 03/074087涉及将蛋白质偶联至淀粉衍生的变性多糖的方法。蛋白质和多糖、羟烷基淀粉之间的结合反应,为一种在末端醛基、或由所述羟基烷基淀粉分子终端醛基的化学修饰所产生的功能基团,与蛋白质功能基团之间所形成的共价连接。作为蛋白质的反应基团,氨基、硫代基和羧基都被公开。

[0020] W0 2005/014050描述了羟烷基淀粉(HAS)和G-CSF蛋白的缀合物的制备,其中聚合物或其衍生物的至少一个功能基团与蛋白质的至少一个功能基团反应,从而形成共价连接。其他涉及多肽的羟烷基淀粉化,优选羟乙基淀粉化的现有技术文件为W0 2005/014655, W0 2005/092390, W0 2007/031266, W0 2005/092928和W0 2005/092391。

[0021] 虽然通过聚合物部分修饰治疗性多肽例如G-CSF以延长其清除时间和降低免疫原性的若干方法已经在现有技术中描述,为这样的聚合物-G-CSF缀合物研发有利制剂的工作似乎还鲜有所成。

[0022] 上述 **Neulasta**[®] 产品为用于皮下注射的液体组合物。该制剂包括培非司亭、乙酸钠、山梨糖醇、聚山梨酸酯20和注射用水,并有4.0的pH值(见<http://www.neulasta.com>和ROTE LISTE 2007)。**Neulasta**[®]和**Neupogen**[®]产品都通过Amgen进入市场,其溶液的缓冲剂、赋形剂和pH值几乎是相同的:**Neupogen**[®]包含非格司亭(而不是培非司亭)、乙酸钠、山梨糖醇、聚山梨酸酯20和注射用水,也具有4.0的pH值(见<http://www.neupogen.com>和ROTE LISTE 2007)。

[0023] 本发明是针对包含聚合物-G-CSF缀合物的液体药物组合物,其中,专门开发该组合物以考虑到聚合物-G-CSF缀合物的特点。虽然现有技术中已经报道了几种关于包含非缀合G-CSF的制剂的方法,但是很少有已知的关于聚合物-G-CSF缀合物的有用的制剂。

[0024] 虽然一些为了非缀合G-CSF开发的药物组合物出现在专利文献中,以这样的方式,其包含将非缀合G-CSF取代为PEG-G-CSF缀合物的制剂,很显然该组合物是只为非缀合G-CSF定制或测试的。

[0025] 例如,WO 2005/042024描述了包含G-CSF的稳定的药物组合物,其中组合物具有高于4.0的pH值,并且还包含一种酸,但是没有表面活性剂。尽管描述于WO 2005/042024的药物组合物显然是为非缀合G-CSF开发的,在其说明书中也提到了其也包含用PEG或其相似物化学修饰过的G-CSF,表现出同样的或改进的生物学活性。

[0026] 另一个例子是WO 2005/039620,其也是针对稳定的水性的包含G-CSF的组合物。该组合物包含作为缓冲剂的琥珀酸或酒石酸或其盐,并且具有优选范围在4.0和5.8的pH值。根据说明书,G-CSF蛋白质也可以经合成修饰,例如,通过酶促糖基化或化学聚乙二醇化。

[0027] EP 1 260 230 A1公开了包含色氨酸作为稳定剂的稳定的蛋白质制剂。蛋白质列表包括G-CSF,以及用PEG或其相似物化学修饰的G-CSF。所述G-CSF制剂优选具有5-7的pH值,更优选为6.0-6.7。

[0028] 另一个例子是EP 1 336 410 A1,其描述了包含生理活性蛋白质作为活性成分,以及至少一种糖作为安抚剂的可注射的药物制剂,并且具有6.5-7.4的pH值。同样是在这种情况下,其提及到了包含用PEG或其相似物化学修饰的G-CSF。

[0029] EP 1 329 224 A1描述了一种G-CSF溶液制剂,其包含至少一种作为稳定剂的氨基酸或其盐,优选甲硫氨酸。G-CSF溶液制剂优选具有5-7的pH值,更优选为5.5-6.8。同样,用PEG或其相似物化学修饰的G-CSF也包括在内。

[0030] 但是,在现有技术中公开的制剂没有一个是特定的聚合物-G-CSF-缀合物制剂。相反,在专利文献中描述的溶液仅仅是为了非缀合G-CSF开发和测试的。

[0031] 本发明的基本问题是提供聚合物-G-CSF-缀合物组合物,其适合这种缀合物,并且在高温下稳定,即,高于通常在2至8℃之间的冰箱温度。此外,发明的目标是提供一种药物组合物,其在制备的任何阶段不需要重构,并在对患者给药时引起尽可能小的刺激。

[0032] 根据本发明,这些问题通过提供包含聚合物-G-CSF缀合物的水性药物组合物解决,该组合物具有4.5至5.5范围内的pH值。根据本发明的水溶液制剂包含表面活性剂和任选的一种或多种其他的可药用的赋形剂。在优选的实施方案中,该组合物没有作为稳定剂的氨基酸或其衍生物或其盐,没有作为缓冲剂的酒石酸或其盐、和琥珀酸或其盐。

[0033] 令人惊讶的发现,在具有4.5至5.5范围内,优选5.0的pH值的组合物中配制聚合

物-G-CSF缀合物,能防止缀合键的酸水解。这个pH范围改进了溶液在温度高于冰箱温度(2-8℃),特别是在室温(即低于25℃),甚至在较高温度(例如40℃)时的稳定性。这意味着该缀合物能够不经冷却地储存很长一段时间,而活性没有明显损失,且没有明显的降解。

[0034] 此外,不论储存稳定性,根据本发明的组合物与pH为4.0的可比较组合物相比是有利的,因为在对患者给药时,组合物中更少的酸性能引起更少的刺激。

[0035] 除非另有指明,以下定义是用以说明和定义用于本发明描述的不同术语的意思和范围。

[0036] 术语“聚合物-G-CSF缀合物”指G-CSF多肽和聚合物之间的缀合物,其中缀合物通过聚合物功能基团和多肽功能基团之间的共价连接形成。该缀合物可以包含一个或多个聚合物部分。

[0037] 术语“G-CSF”(或G-CSF多肽或G-CSF蛋白质或G-CSF肽)指具有自然存在的人G-CSF的体内生物学活性的蛋白质,即能刺激造血祖细胞分化和增殖的蛋白质。根据描述于Stute,N.等人,“Pharmacokinetics of subcutaneous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children”(1992)Blood 79(11),第2849-2854页的分析方法,该G-CSF能够被准确的鉴定为G-CSF。

[0038] 在一个示例性实施方案中,G-CSF具有根据下列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:1描述了在大肠杆菌中生产的人甲硫氨酰-G-CSF的野生型氨基酸序列,SEQ ID NO:2描述了在哺乳动物细胞,例如在CHO细胞中生产的人-G-CSF的氨基酸序列。SEQ ID NO:1为175个氨基酸的变体,其中第一个氨基酸为甲硫氨酸,并且在Thr 134位为苏氨酸。SEQ ID NO:2为174个氨基酸的变体,其与175个氨基酸的变体具有同样的序列,除了没有为首的甲硫氨酸,因此该序列从T开始,并且其133位为苏氨酸残基。

[0039] SEQ ID NO:1:

[0040]

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPHEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS
QLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLV
ASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP (175个氨基酸)

[0041] SEQ ID NO:2

[0042]

TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPHEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS
LHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGV
LVA SHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP (174个氨基酸)

[0043] 熟练技术人员将很容易领会,本发明并不局限于描述于此的序列,并且还包括G-CSF变体。这种变体是本领域所熟知的。它们可以包含在上述氨基酸序列中缺失、替换或添加一个或多个氨基酸,而保持自然存在的G-CSF的生物学活性。作为例子,但绝不意味着限制本发明,G-CSF变体在WO 01/87925,EP 0 456 200 A,US 6,166,183,US 6,004,548,US 5,580,755,US 5,582,823,US 5,675,941,US 5,416,195,US 5,399,345,WO 2005/055946和WO 2006/074467中有描述。

[0044] G-CSF多肽可以是糖基化或未糖基化的。在优选的实施方案中,该G-CSF多肽为在大肠杆菌中生产的重组人G-CSF,即具有描述于上述SEQ ID NO:1或其变体的氨基酸序列。

[0045] 聚合物可为能够共价结合G-CSF多肽、并且当共价结合G-CSF多肽时产生有治疗作用聚合物-G-CSF缀合物的任何聚合物。若干适合的聚合物已经在前面的导言部分提及过, 这些包括聚(烷基二醇类)例如PEG和PPG, 羟烷基淀粉类例如羟乙基淀粉(HES), 以及在WO 02/09766, WO 96/11953和WO 97/30148中有关连接聚合物多肽缀合物的聚合物。在优选的实施方案中, 聚合物为PEG。

[0046] 在下列关于缀合物使用的所有mg/ml浓度规格只与G-CSF部分相关。依定义PEG部分不考虑在质量浓度中。

[0047] 虽然非格司亭具有大约18-19kD的分子量, 由于单甲氧基-PEG部分, 聚乙二醇非格司亭的分子量要大很多, 具有大约39kD的分子量。本发明的聚合物-G-CSF缀合物可以具有20至60kD范围内的分子量, 优选35至45kD范围内。

[0048] 现有技术中已公开有合适的PEG, 例如在WO 2005/055946, WO 2006/074467和WO 01/87329中。PEG部分可以是线性的或分支的, 并且具有5至40kD的大小。优选的, PEG部分具有15至25kD的分子量, 更优选大约20kD。

[0049] 生产聚合物-G-CSF缀合物的方法也已经描述于现有技术中。上述与在多肽和聚合物部分之间制备缀合物有关的文件也包含于此作为参考。

[0050] 在本发明中有用的其他聚合物-G-CSF缀合物详细描述于WO 96/11953, EP 822 199 A, WO 01/51510, WO 2006/0128460, EP 921 131 A和EP 744 409中。这些文件所描述的公开内容, 即缀合物和生产它们的方法, 一并明确参考。

[0051] 熟练技术人员将很容易领会, 本发明并不局限于其中的聚合物例如PEG或HES直接连接到蛋白质的氨基酸残基上的缀合物, 而且还包括其中的聚合物部分和G-CSF多肽通过连接物相互连接的缀合物。例如, 介于多肽和PEG部分之间的糖基连接基团就是本发明缀合物中有用的连接物。

[0052] WO 2006/074467描述了这种聚合物-G-CSF缀合物, 其G-CSF多肽和聚合物部分通过糖基连接物或非糖基连接物(例如取代或未取代的烷基、取代或未取代的杂烷基)连接。WO 2006/074467的公开内容在此明确包含作为参考。

[0053] 术语“PEG-G-CSF”(聚乙二醇化-G-CSF)指如下述与一个或多个聚乙二醇部分共价连接的G-CSF蛋白质。PEG基团和G-CSF蛋白质既可以相互直接连接, 也可以通过连接物, 例如糖基连接物连接。

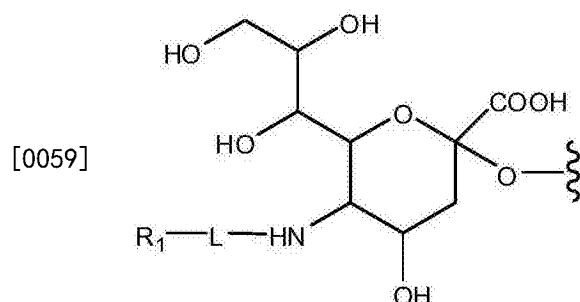
[0054] 在本发明的一个实施方案中, 聚合物-G-CSF肽缀合物根据描述于WO 2006/074467的方法制备。在优选的实施方案中, 聚合物-G-CSF肽是具有糖基连接基团的PEG-G-CSF缀合物, 其中糖基连接基团介于PEG修饰部分和G-CSF多肽之间。这样的缀合物被称为“糖聚乙二醇化(glycopeglyated)”G-CSF。

[0055] 在一个示例性实施方案中, 本发明“糖聚乙二醇化”的G-CSF分子通过酶介导在糖基化或非糖基化G-CSF肽和可酶促转移的糖基部分之间形成缀合物, 可酶促转移的糖基部分结构中包括聚乙二醇部分。PEG部分直接连接至糖基部分(即通过两个反应基团的反应形成的单个基团), 或通过连接物部分, 例如取代或未取代的烷基、取代或未取代杂烷基等连接。糖基连接基团可为具有PEG的衍生的唾液酸部分。

[0056] 在本发明的优选的实施方案中, 糖基连接物通过O-糖基化与G-CSF蛋白质结合, 优选通过G-CSF蛋白质苏氨酸残基的O-糖基化。

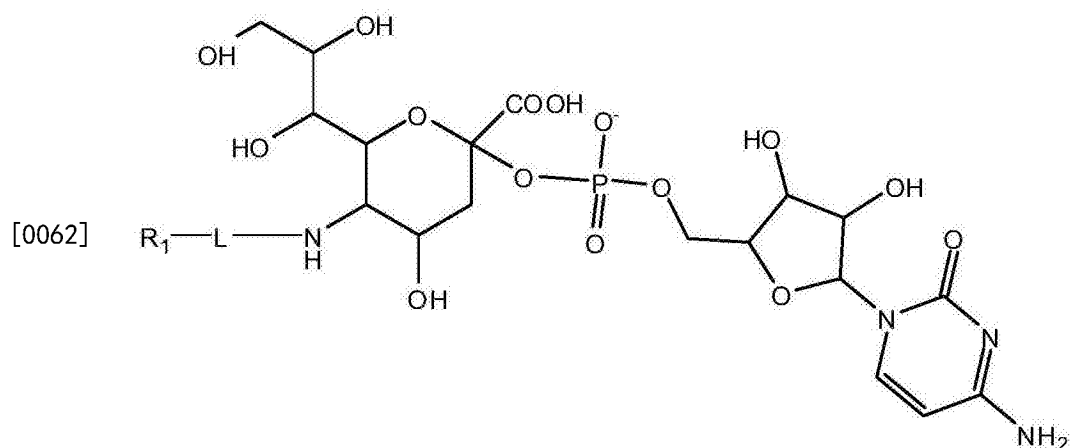
[0057] 糖基连接物优选包含单糖、双糖或寡糖,更优选糖基连接物包含唾液酸和N-乙酰半乳糖胺。

[0058] 在本发明的一个实施方案中,聚合物-G-CSF肽缀合物包含以下部分:



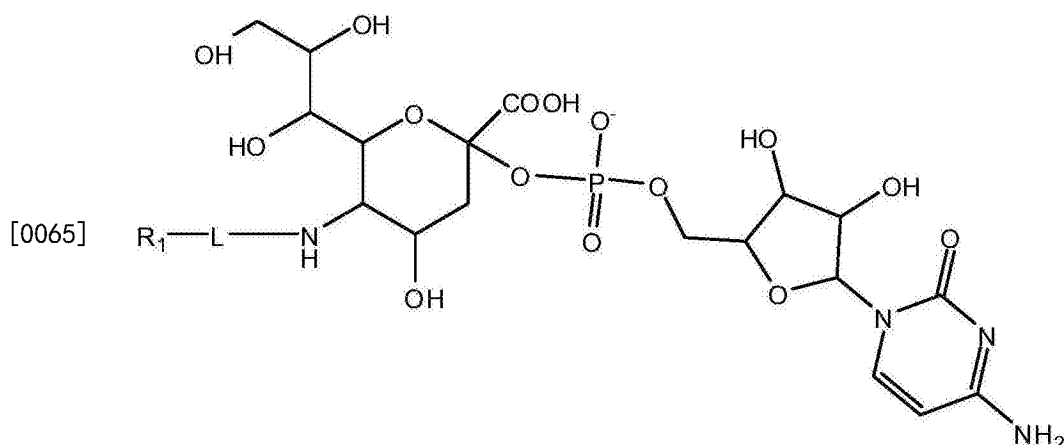
[0060] 其中R₁为包含直链或分支的聚乙二醇残基的部分;并且L为连接物,其选自键、取代或未取代烷基、取代或未取代杂烷基的成员;并且其中肽是以糖残基糖基化的,并且该部分与糖残基共价结合。糖残基优选N-乙酰半乳糖胺。在优选的实施方案中,G-CSF肽在苏氨酸残基处糖基化,优选在134位的苏氨酸残基处(以甲硫氨酰-G-CSF计算,即具有N端甲硫氨酸,总计175个氨基酸)。在优选的实施方案中,R₁为直链聚乙二醇残基,并且L为杂烷基。

[0061] 上述G-CSF肽缀合物可以根据这样的方法制备,包括(a)将底物G-CSF肽与具有下式的PEG-唾液酸的供体、和具有将PEG-唾液酸部分从供体转移至底物G-CSF肽糖残基上的能力的酶相接触:



[0063] 其中R₁和L如上定义。在优选的实施方案中,酶为唾液酸转移酶,例如描述于WO 2005/055946的ST6GalNAcI。

[0064] 上述G-CSF肽缀合物可以根据这样的方法制备,包括(a)将非糖基化的底物G-CSF肽与糖基供体、和具有将糖基部分从供体转移至底物G-CSF肽上的能力的酶相接触,(b)将糖基化的G-CSF肽与具有下式的PEG-唾液酸的供体、和具有将PEG-唾液酸部分从供体转移至底物G-CSF肽的糖残基上的能力的酶相接触:



[0066] 其中 R_1 和 L 如上定义, (a) 和 (b) 为相继或同时的反应。在优选的实施方案中, 糖基供体为UDP-N-乙酰半乳糖胺。在优选的实施方案中, (a) 中的酶为N-乙酰半乳糖胺基转移酶, (b) 中的酶为唾液酸转移酶, 例如 (a) 中为GalNAcT2、(b) 中为ST6GalNAcI。

[0067] G-CSF可通过化学合成程序生产, 或可为任何人或其他哺乳动物来源并可通过从自然存在的来源例如人胎盘、人血或人尿中纯化获得。此外, 许多上皮癌、急性髓样细胞白血病细胞和各种肿瘤细胞系有能力表达这个因子。

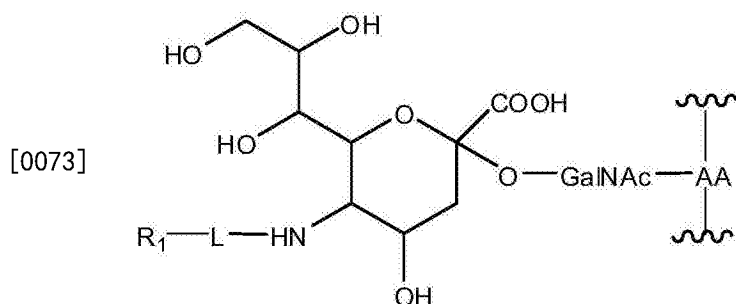
[0068] 优选地, G-CSF为重组生产。这包括通过基因组或cDNA克隆或DNA合成获得的外源DNA序列的原核或真核宿主表达。适合的原核宿主包括各种细菌, 例如优选的宿主大肠杆菌。适合的真核宿主包括酵母例如酿酒酵母 (*S. cerevisiae*), 以及哺乳动物细胞例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞和猴子细胞。

[0069] 蛋白质例如G-CSF的重组生产在本领域是众所周知的。通常来说, 这包括用适当表达载体转染宿主细胞, 在能够产生蛋白质的条件下对宿主细胞进行培养, 并将蛋白质从宿主细胞中纯化。有关详细信息, 请见例如Souza, L.M. 等人, 1986, Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells, *Science* (1986) 232:61-65; Nagata, S. 等人, 1986, Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor, *Nature* (1986) 319:415-418; Komatsu, Y. 等人, 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。

[0070] 在一个优选的实施方案中, G-CSF具有人成熟G-CSF的氨基酸序列 (见例如Nagata, S. 等人 (1986), 见上), 并且可以在其氨基端还包含甲硫氨酸, 而产生175个氨基酸的蛋白质 (见上面SEQ ID NO:1)。此外, G-CSF可以包含丝氨酸或苏氨酸残基, 而不是甲硫氨酸。

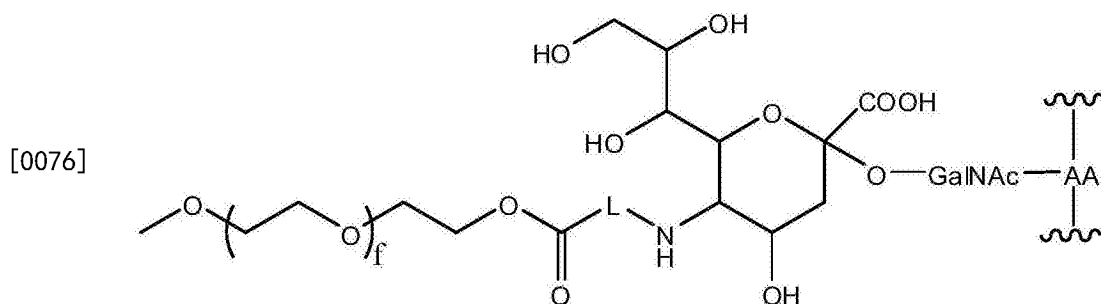
[0071] 该蛋白质然后根据传统下游加工程序纯化。适合的G-CSF纯化方法描述于现有技术中, 例如在WO 87/01132, EP 0 719 860A, EP 1 458 757 A, EP 1 527 188 A, WO 03/051922, WO 01/04154和WO 2006/097944中。

[0072] 在本发明的一个实施方案中, 聚合物-G-CSF肽缀合物按在此提供的实施例1所描述的制备。这种缀合物特征在于G-CSF多肽和PEG部分通过N-乙酰半乳糖胺基 (GalNAc) 基团和唾液酸 (SA) 基团连接。该缀合物具有如下G-CSF-GalNAc-SA-PEG的结构:



[0074] 其中R₁和L如上定义,并且AA为G-CSF的氨基酸残基。

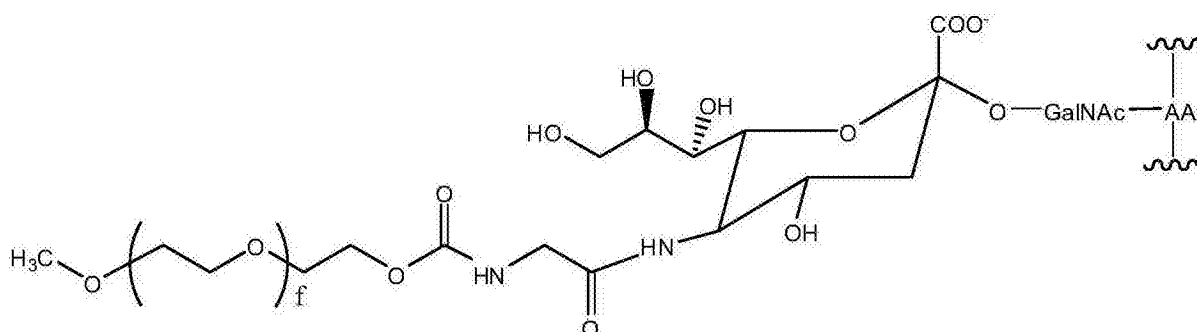
[0075] 在示例性实施方案中,R₁为通过唾液酸基团和GalNAc基团连接至的G-CSF多肽上的线性PEG部分,如下所示:



[0077] 其中L如上定义,并且AA为G-CSF的氨基酸残基;并且f为选自1至2500的整数。

[0078] 在某些实施方案中,聚合物G-CSF缀合物具有下式:

[0079]



[0080] 其中AA为G-CSF的苏氨酸133(如N端有甲硫氨酸则为苏氨酸134);f为选自1至2500的整数。

[0081] 本发明的药物制剂是液体组合物,例如水溶液。为了注射目的,优选使用纯净水为溶剂。但是其他适合的且传统的用于药物制剂的溶剂也可使用。在本发明的优选的实施方案中,药物组合物为等渗溶液。

[0082] 此外,本发明液体溶液制剂的制备在任何阶段都不需要重构。该溶液为随时可用的制剂。

[0083] 本发明药物组合物具有范围在4.5至5.5之间的pH值。在优选的实施方案中,该pH值在4.7至5.3之间,更优选在4.8至5.2之间,最优选在4.9至5.1之间。

[0084] 如果需要调整以达到预期的pH值范围,pH值可通过适合的溶液进行调整;如果指示pH值减小则用酸溶液,如果指示pH值增加则用碱溶液。适合的酸溶液例如盐酸、磷酸、柠檬酸、磷酸氢钠或磷酸氢钾。适合的碱溶液例如碱和碱土的氢氧化物、碳酸碱、乙酸盐、

柠檬酸碱和磷酸氢二碱,例如氢氧化钠、乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸钠、磷酸氢二钠或磷酸氢二钾、或氨。

[0085] 优选的,用氢氧化钠调节溶液的pH值。因此,本发明的制剂中可能包含钠离子。存在的钠的浓度一般小于10mmol/l,通常是小于6mmol/l。

[0086] 本发明药物制剂包含一种或多种表面活性剂。典型的表面活性剂的例子包括:非离子表面活性剂,例如,失水山梨醇脂肪酸酯如失水山梨醇单辛酸酯、失水山梨醇单月桂酸酯、失水山梨醇单棕榈酸,甘油脂肪酸酯如单辛酸甘油酯,单肉蔻酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯,聚甘油脂肪酸酯如单硬脂酸十甘油酯、双硬脂酸十甘油酯、单亚油酸十甘油酯,聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯如聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯、聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯、聚氧乙烯山梨糖醇酐单硬脂酸、聚氧乙烯山梨糖醇酐单棕榈酸、聚氧乙烯山梨糖醇酐三油酸酯、聚氧乙烯山梨糖醇酐三硬脂酸酯;聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯如聚氧乙烯山梨醇四硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨醇四油酸酯,聚氧乙烯甘油脂肪酸酯例如聚氧乙烯单硬脂酸甘油酯,聚乙二醇脂肪酸酯例如聚乙二醇双硬脂酸酯,聚氧乙烯烷基醚例如月桂醇聚氧乙烯烷基醚,聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚例如聚氧乙烯聚氧丙烯乙二醇醚、聚氧乙烯聚氧丙烯丙醚、聚氧乙烯聚氧丙烯十六烷基醚,聚氧乙烯烷基苯基醚例如聚氧乙烯壬基苯基醚,聚氧乙烯硬化蓖麻油例如聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯硬化蓖麻油(聚氧乙烯氢化蓖麻油),聚氧乙烯蜂蜡衍生物例如聚氧乙烯山梨醇蜂蜡,聚氧乙烯羊毛脂衍生物例如聚氧乙烯羊毛脂,聚氧乙烯脂肪酰胺例如HLB值为6至18的聚氧乙烯硬脂酸酰胺;阴离子表面活性剂,例如,具有C10-18烷基的烷基硫酸盐如十六烷基硫酸钠、十二烷基硫酸钠、十八烷基硫酸钠,具有2-4的平均EO摩尔数和C10-18烷基的聚氧乙烯烷基醚硫酸盐如聚氧乙烯十二烷基硫酸钠,具有C10-18烷基的烷基磺基琥珀酸酯盐如月桂基磺基琥珀酸钠,以及天然表面活性剂,例如,卵磷脂、甘油磷脂,鞘磷脂例如神经鞘磷脂,蔗糖的C12-18脂肪酸酯。这些表面活性剂中的一个或多个可组合加入到本发明制剂中。

[0087] 优选的表面活性剂为聚氧乙烯山梨糖醇酐烷基酯,更优选为聚山梨酸酯20,21,40,60,65,80,81,85,最优选为聚山梨酸酯20和80。

[0088] 基于溶液制剂的总体积,制剂中去污剂的浓度通常在0.0005% (w/v) 至0.05% (w/v) 的范围内,优选从0.001% (w/v) 至0.01% (w/v),更优选从0.002% (w/v) 至0.006% (w/v),最优选从0.003% (w/v) 至0.004% (w/v)。

[0089] 本发明制剂中一般含有浓度为0.003% (w/v)、0.0033% (w/v) 或0.004% (w/v) 的表面活性剂聚山梨酸酯20或80。优选聚山梨酸酯20。

[0090] 根据本发明的制剂包含生理学可接受的缓冲剂。适合的缓冲剂为溶液制剂领域所知,例如,磷酸缓冲液(优选磷酸一氢钠-磷酸二氢钠系统)、柠檬酸缓冲液、乳酸缓冲液、乙酸缓冲液、碳酸缓冲液、BisTris、MES、以及甘氨酸-盐酸。优选使用乙酸缓冲液,即酸性酸或其盐,例如碱或铵盐。

[0091] 缓冲剂一般以1至100mmol/l的浓度存在于制剂中,优选2至50mmol/l,更优选5至20mmol/l。在优选的实施方案中,缓冲剂以10mmol/l的浓度存在,最优选为乙酸以10mmol/l的浓度存在。

[0092] 缓冲剂例如乙酸的浓度以这种方式选择:要提供稳定pH值的租用以及足够的缓冲能力。但是,同时离子浓度以及由此而致的溶液导电性保持尽可能低,以避免聚集体形成。

[0093] 在本发明的实施方案中,最终溶液制剂的导电性小于1.0mS/cm,优选小于0.8mS/cm,更优选小于0.5mS/cm。

[0094] 此外,优选制剂中没有酒石酸和琥珀酸及其盐。还优选溶液中没有HEPES, TES和三(羟甲基)甲基甘氨酸(tricine)。

[0095] 还优选本发明制剂没有硫酸离子。

[0096] 此外,在优选的实施方案中,制剂中无防腐剂,其中防腐剂是指传统上被用作防腐剂以增加存储稳定性并且在标准浓度时具有杀菌效果的物质。特别的,制剂中不含有如氯乙烷、苯甲醇、对氯间甲酚、焦碳酸二烷基酯和苯扎氯铵的防腐剂。

[0097] 在本发明的实施方案中,制剂还包含多元醇,优选糖醇,最优选甘露醇或山梨糖醇,作为渗透度调节剂。山梨糖醇为特别优选的。基于溶液的总体积,糖例如山梨糖醇或甘露醇的数量一般达10.0% (w/v)。优选的浓度达8.0% (w/v),更优选的浓度达6.0% (w/v),最优选的浓度达5.0% (w/v)。在优选的实施方案中,山梨糖醇存在的量为5.0% (w/v)。

[0098] 此外,优选本发明溶液制剂不包含选自氨基酸及其衍生物和盐的稳定剂,聚合物稳定剂以及蛋白质稳定剂。

[0099] 包含聚合物-G-CSF缀合物的本发明制剂一般通过肠胃外途径给药,例如注射(皮下、静脉或肌肉注射)或经皮、黏膜、鼻腔或肺给药,但是也可以口服给药。

[0100] 聚合物-G-CSF缀合物在制剂中一般以1.0至30.0mg/ml的浓度存在,优选5.0至20.0mg/ml,更优选8.0至12.0mg/ml。在优选的实施方案中,聚合物-G-CSF缀合物为以10.0mg/ml数量存在的PEG-SA-GalNAc-G-CSF。

[0101] 在优选的实施方案中,制剂中包含作为活性成分的聚合物-G-CSF缀合物、表面活性剂、缓冲剂、渗透度调节剂、钠离子和水,并且没有其他组分。最优选的根据本发明的水性制剂包含糖聚乙二醇化G-CSF作为活性成分、聚山梨酸酯20或80作为表面活性剂、山梨糖醇和/或甘露醇作为渗透度调节剂、乙酸作为缓冲剂、和钠,并且没有其他赋形剂。

[0102] 本发明另一方面,将如上所述本发明水性制剂稀释以获得合适儿科使用的水性稀释制剂。用于儿童治疗的适当的稀释通过稀释本发明上述溶液1:2至1:8获得。

[0103] 本发明还涉及到药物容器,其中包含本发明水性制剂或通过稀释获得的稀释溶液。适合的药物容器可从现有技术中获知。该容器可以,例如,为注射器、小瓶、输液瓶、安瓿或卡普耳(carpoule)。在优选的实施方案中,当容器为注射器时,该注射器配备有针头保护系统。在现有技术中众所周知的这种针头保护系统有助于减少受伤的风险。在另一个实施方案中,该容器为注射笔(injection pen)内的卡普耳(carpoule)。

[0104] 本发明还涉及制备本发明水性制剂的方法,其中聚合物-G-CSF缀合物作为活性成分,配制在pH值为4.5至5.5范围内、并且包含表面活性剂和其他药物赋形剂的水性制剂中。

[0105] 在本发明的另一个方面,涉及本发明水性制剂在治疗或预防中性白细胞减少症中的用途。此外,本发明水性制剂能有利的用于治疗或预防神经性疾病或用于骨髓移植方面。一般来说,本发明药物溶剂对于干细胞动员是有用的。

[0106] 本发明药物液体制剂被发现显示出非常好的储存稳定性。在本发明的范围中,术语“储存稳定”的意思理解为,制剂在25℃储存三个月以后,活性聚合物-G-CSF缀合物的含量仍总计为原始浓度的80%或更多。优选的,在25℃储存三个月以后,G-CSF活性的剩余量仍总计为原始活性的至少85%,更优选至少90%,最优选至少95%。

[0107] 聚合物-G-CSF缀合物的活性能通过用于G-CSF的现有技术中的传统活性测试方法确定。见例如Draft Monographie, "Filgrastim Concentrated Solution", PharmEur. Vol. 19, No. 1, 2007年1月, 或Stute, N. 等人, "Pharmacokinetics of subcutaneous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children 1", (1992), Blood, 79 (11), 第2849-2854页。

[0108] G-CSF活性的体外测量描述于例如Shirafuji, N. 等人, 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中。G-CSF活性的体内测量见例如Tanaka, H. 等人, 1991, Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor conjugated to polyethylene glycol in rats, Cancer Research, Cancer Research (1991) 51, 3710-3714中。描述用于测量G-CSF活性的实验的其他出版物为US 6,555,660、Nohynek, G. J. 等人, 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。

[0109] 根据本发明制剂中使用的聚合物-G-CSF缀合物的纯度应该至少为95%, 优选为至少97%, 更优选为至少99%, 最优选为大于99%。纯度可以通过HPLC分析的方法确定。用于进行这样的分析的适合的材料和方案能通过商业来源例如Vydac或TOSOH Bioscience (<http://www.tosohbiosep.de>) 获得。

[0110] 用于配制根据本发明溶液的组分能够从传统来源, 例如从如Sigma或Merck公司获得。

[0111] 本发明制剂的生产可根据传统方法执行。制剂的组分能溶解在水性缓冲剂中。可选地, 缀合物也能作为纯化过程的结果已经处于水性缓冲剂中获得。

[0112] 最后, 成品液体制剂填充到适合的药物容器中, 储存直至给药。

[0113] 以下实施例用来说明本发明, 但不限制其范围。

实施例

[0114] 实施例1. G-CSF-GalNAc-SA-PEG的制备

[0115] 以下实施例说明G-CSF-GalNAc-SA-PEG的制备方法为: (a) 两个连续步骤的方法, 其中每一个中间产物在下一步使用前被纯化, 以及 (b) 使用同时加入酶的一步法。

[0116] a. 两步法

[0117] 使用GalNAc-T2从G-CSF和UDP-GalNAc制备G-CSF-GalNAc (pH 6.2)。

[0118] 在3.2mL缓冲剂包装中的G-CSF (960µg) 通过使用UF过滤器 (MWCO 5K) 超滤进行浓缩, 然后使用1mL的25mM MES缓冲液 (pH 6.2, 0.005% NaN₃) 进行重构。然后加入UDP-GalNAc (6mg, 9.24mM)、GalNAc-T2 (40µL, 0.04U) 和100mM MnCl₂ (40µL, 4mM), 将所得溶液在室温下孵育。

[0119] 24小时以后, MALDI表明反应完成。反应混合物直接使用SEC (Superdex 75和

Superdex 200) 和PBS (磷酸盐缓冲液, pH 4.9和0.005% Tween 80) 组成的洗脱缓冲液进行HPLC纯化。收集的G-CSF-GalNAc峰用Centricon 5KDa MWC0过滤器浓缩至150 μ L, 并且使用PBS (磷酸盐缓冲液, pH 4.9和0.005% Tween 80) 将体积调整至1ml。最终的蛋白质浓度为1mg/mL (A_{280}), 产量100%。样品在4℃保存。

[0120] 使用纯化的G-CSF-GalNAc, CMP-SA-PEG (20KDa) 和小鼠ST6GalNAc-TI (pH 6.2) 制备G-CSF-GalNAc-SA-PEG。

[0121] 包含1mg蛋白质的G-CSF-GalNAc溶液用缓冲剂交换成25mM MES缓冲剂 (pH 6.2, 0.005% NaN_3), 并加入CMP-SA-PEG (20KDa) (5mg, 0.25 μ mol)。溶解后, 加入 MnCl_2 (100 μ L, 100mM溶液) 和ST6GalNAc-I (100 μ L, 小鼠酶), 并将反应混合物在32℃缓慢摇动三天。将反应混合物通过超滤法 (MWC0 5K) 浓缩, 并用25mM NaOAc (pH 4.9) 缓冲剂交换一次, 然后浓缩至1mL总体积。然后用SP-Sepharose (A: 25mM NaOAc+0.005% tween-80 pH 4.5; B: 25mM NaOAc+0.005% Tween-80 pH 4.5+2M NaCl) 纯化, 保留时间13-18分钟, 以及用SEC (Superdex 75; PBS-pH 7.2, 0.005% Tween 80), 保留时间8.6分钟 (Superdex 75, 流速1ml/min) 将产品纯化。收集所需组分, 浓缩至0.5mL并在4℃保存。

[0122] b. 一步法

[0123] 使用小鼠ST6GalNAc-I (pH 6.0) 的一锅法

[0124] G-CSF (960 μ g蛋白质溶解在3.2mL产品制剂缓冲剂中) 用超滤法 (MWC0 5K) 浓缩至0.5ml, 并使用25mM MES缓冲剂 (pH 6.0, 0.005% NaN_3) 重构至总体积约1mL或蛋白质浓度为1mg/mL。然后加入UDP-GalNAc (6mg, 9.21 μ mol)、GalNAc-T2 (80 μ L, 80mU)、CMP-SA-PEG (20KDa) (6mg, 0.3 μ mol)、小鼠酶ST6GalNAc-I (120 μ L) 和100mM MnCl_2 (50 μ L)。溶液在32℃摇动48小时, 并使用标准色谱条件在SP-Sepharose上纯化。获得总共0.5mg蛋白质 (A_{280}) 或约50%总收率。产品结构通过经MALDI和SDS-PAGE两者的分析确定。

[0125] 使用鸡ST6GalNAc-I (pH 6.0) 的一锅法

[0126] 14.4mg G-CSF浓缩至3mL终体积, 用25mM MES缓冲剂 (pH 6.0, 0.05% NaN_3 , 0.004% Tween 80) 进行缓冲剂交换, 将体积调整至13mL。然后加入UDP-GalNAc (90mg, 150 μ mole)、GalNAc-T2 (0.59U)、CMP-SA-PEG-20KDa (90mg)、鸡ST6GalNAc-I (0.44U) 和100mM MnCl_2 (600 μ L)。所得混合物室温放置60小时。然后用UF (MWC0 5K) 将反应混合物浓缩, 并离心。残渣 (约2mL) 溶解在25mM NaOAc缓冲剂 (pH 4.5) 中并再次浓缩至5mL终体积。该样品使用SP-Sepharose纯化大约10-23分钟、SEC (Superdex 75, 17min, 流速0.5ml/min) 和额外的SEC (Superdex 200, 23min, 流速0.5ml/min) 纯化至产生3.6mg (25%总收率) G-CSF-GalNAc-SA-PEG-20KDa (A_{280} 和BCA方法)。

[0127] 实施例2. 液体聚合物-G-CSF缀合物 (PEG-SA-GalNAc-G-CSF) 制剂

[0128] 含糖聚乙二醇化G-CSF (缀合物的结构为: PEG-SA-GalNAc-G-CSF) 的液体制剂通过配制以下组分于水性乙酸缓冲液中制备。

[0129]

成分	
糖聚乙二醇化G-CSF	10mg/ml
乙酸	10mM
山梨糖醇	5.0% (w/v)

聚山梨酸酯20	0.0033% (w/v)
钠	4.38mM
pH	5.0

[0130] 组合物的pH值通过加入NaOH调整。所有成分的质量符合欧洲药典 (Ph.Eur.)。

[0131] 此外,还制备pH 4.5或pH 5.5,以及分别成比例的减少或增加钠的同样的组合物。

还制备具有pH 4.0的对比制剂(如**Neulasta**[®]制剂)。

[0132] 实施例3.本发明制剂的稳定性测试

[0133] pH 4.5,5.0和5.5的组合物分装为500 μ l/瓶,并在2-8℃和25℃下保存。在1,2,3,4.5,6,8,12和15个月后,将样品按下表给定的测试参数测试。

[0134] 具有pH5.0的组合物的预期规格如下:

[0135]

测试参数	方法	规格
外观	目测	无色透明
含量	UV-VIS	10.0 mg/ml $\pm$ 5%
含量	RP-HPLC (30℃)	10.0 mg/ml $\pm$ 5%
效价	生物分析	54-156%
鉴定	SDS-PAGE	符合参考标准
纯度	Western 印迹	符合参考标准
纯度	RP-HPLC (60℃)	氧化< 2.0%
纯度	RP-HPLC (30℃)	无聚乙二醇化 G-CSF 2.0%
纯度	SEC	二聚体和聚集体< 2.0%
脱酰胺	IEF	无可检测到的其他条带
pH	根据 Ph. Eur. 5 和 USP 28	5.0 $\pm$ 0.2
内毒素	根据 Ph. Eur. 5 检查细菌内毒素	< 5 EU/mg
无菌	根据 Ph. Eur. 5	无菌

[0136]

显微镜下可见 (sub-visible) 颗粒	微粒污染: 根据 Ph. Eur. 5 的显微镜下 可见颗粒	< 6000 颗粒 $\geq 10 \mu\text{m}$ 每瓶; < 600 颗粒 $\geq 25 \mu\text{m}$ 每瓶
-------------------------------	--------------------------------------	--

[0137] 在T=0,1个月,2个月,3个月,4.5个月,6个月,8个月,12个月和15个月时测试的所有样品都符合预期规格。这个对所有测试的包含糖聚乙二醇化G-CSF,并且pH值为4.5、5.0或5.5的组合物均如此。

[0138] 本发明组合物与两个对比制剂进行比较:**Neulasta**[®] (pH 4.0) 和pH4.0的糖聚乙二醇化G-CSF (PEG-SA-GalNAc-G-CSF) 组合物。结果显示,与包含糖聚乙二醇化G-CSF且pH值为4.0的对比溶液相比,具有更高pH值4.5,5.0和5.5的该制剂显示出更好的储存稳定性。所收集的数据可以得出结论,更高的pH值能防止糖PEG键的酸水解。此外,还发现本发明制剂具有比得上与作为**Neulasta**[®] 所公知的PEG-G-CSF缀合物的稳定性的稳定性。

序列表

<110> 拜奥吉耐里克斯股份公司

<120> G-CSF聚合物的液体制剂

<130> B 8369/BN

<150> EP 07 115 047.8

<151> 2007-08-27

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 175

<212> PR

<213> 智人

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (1)...(175)

<223> 在大肠杆菌中生产的人甲硫氨酸-G-CSF的野生型氨基酸序列；苏氨酸残基在134位

<400> 1

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1 5 10 15
Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
20 25 30
Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
35 40 45
Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
50 55 60
Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
65 70 75 80
Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
85 90 95
Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
100 105 110
Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
115 120 125
Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
130 135 140
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
145 150 155 160
Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
165 170 175

<210> 2

<211> 174

<212> PR

<213> 智人

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (1)...(174)

<223> 在哺乳动物细胞中生产的人G-CSF的氨基酸序列；苏氨酸残基在133位

<400> 2

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
1 5 10 15
Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
20 25 30
Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
35 40 45
Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
50 55 60
Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
65 70 75 80
Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
85 90 95
Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
100 105 110
Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro
115 120 125
Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe
130 135 140
Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe
145 150 155 160
Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
165 170

[0001]