

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利说明书

A61K 38/19

A61K 47/00

C07K 14/535

[21] ZL 专利号 87104963.5

[45]授权公告日 1997 年 1 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1033738C

[22]申请日 87.7.18 [24]颁证日 96.10.26

[21]申请号 87104963.5

[30]优先权

[32]86.7.18 [33]JP[31]169486/86

[32]86.7.18 [33]JP[31]169487/86

[32]86.7.18 [33]JP[31]169488/86

[32]86.7.18 [33]JP[31]169489/86

[73]专利权人 中外制药株式会社

地址 日本东京

[72]发明人 町田实

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所

代理人 辛敏忠

审查员 潘爱群

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 含有粒性的细胞集落刺激因子的稳定药
剂及其生产方法

[57]摘要

本发明揭示了含有粒性白细胞集落刺激因子的
稳定药剂,除了粒性白细胞集落刺激因子作为有效
成分外,药剂至少包含一种物质是从可供药用的表
面活性剂,糖类,蛋白质和高分子化合物一类物质
中选择而来的。

权 利 要 求 书

1. 一种生产含有稳定的粒性白细胞集落刺激因子的药剂的方法,该方法包括:在1—30℃的温度条件下将粒性白细胞集落刺激因子(G-CSF)与选自脱水梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚、聚氧乙基化硬化蓖麻油、烷基硫酸盐、卵磷脂、甘油、木糖醇、山梨糖醇、甘露糖醇、葡萄糖醛酸、神经氨酸、葡糖酮酸、透明质酸和其盐、肝素、几丁质及其衍生物、脱乙酰壳多糖及其衍生物、糊精、平均分子量为5,000—150,000的葡聚糖、藻酸及其盐、人血清白蛋白、人血清球蛋白、白明胶、平均分子量为7,000—100,000的酸或碱处理的白明胶、胶原蛋白、羟丙基纤维素、羟甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟乙基纤维素、分子量为300—6,000的聚乙二醇、分子量为20,000—100,000的聚乙烯醇、分子量为20,000—100,000的聚乙烯吡咯烷酮的至少一种物质混合,然后将产生的混合物溶解在一种缓冲液中,并将该溶液装入容器中,其中所说的G-CSF具有下列性质:

(i) 分子量:通过十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝中进行电泳测得分子量为 $19,000 \pm 1000$;

(ii) 等电点:具有下列等电点中的至少一个。

$pI = 5.5 \pm 0.1$, $pI = 5.8 \pm 0.1$, $pI = 6.1 \pm 0.1$ 。

含有粒性白细胞集落刺激因子的稳定药剂及其生产方法

本发明是关于一种含粒性白细胞集落刺激因子的制剂。本发明特别与一种含粒性白细胞集落刺激因子的稳定药剂有关，这种药剂可以防止活性组分（例如粒性白细胞集落刺激因子）由于装制品容器壁吸附，或结合，聚合乃至氧化而失活或丢失。

化疗是治疗多种感染疾病的一种方法，但是近来发现，化疗会引起某些严重的临床问题例如耐药菌的形成，病原菌的变化以及严重的副作用。为了避免与化疗有关的这些问题，包括例如抗生素，杀菌剂等化疗剂的应用，因此想采用一种能够活化感染菌宿主预防能力的物质，从而使前述化疗问题能全部解决。在宿主的多种预防能力中，白细胞的吞噬细菌作用在细菌感染的初期据信影响最强，因此可以设想通过促进中性白细胞的生长，分化进入成熟期可以大大加强宿主的抗感染能力。粒性白细胞集落刺激因子（G-CSF）是具有上述作用的一种十分有用物质，并且本发明的同一受让人过去曾递交过一份有关利用G-CSF作为一种抗感染药的专利（日本专利申请N. 23777/1985）。

如上所述，当前进行的化疗存在着多种不可避免的问题，因此正在尽力采用能够活化宿主或感染病人预防能力的药物。无可置疑，G-CSF本身具有活化宿主预防作用的能力，而且还发现，如果将其与能活化宿主预防能力的一种物质合并应用于临床的话，G-CSF

则会有极大的疗效。

G—C S F 用量极少，G—C S F 含量为 0.1—500 微克（最好为 5—50 微克）的药物服用剂量通常为每个成年人每周 1—7 次。但是 G—C S F 易于被容器例如安瓿或注射器壁所吸附。因此如果药物以这种水溶液形式注射的话，它便会被吸附于其容器例如安瓿或注射器壁上。这样一来由于吸附可能导致的损失结果使得 G—C S F 既不能充分表现药物的活性，也使得必须加入超过需要量的 G—C S F。

此外，G—C S F 不稳定，对环境因素例如温度、湿度、氧和紫外线高度敏感。由于这些因子的作用，G—C S F 可发生物理或化学变化，例如结合，聚合，和氧化并且大大丧失活性。如果以十分精确的方式，极少量地服用 G—C S F 的话，这些现象会导致难以完全起到治疗作用。

因此需要发展一种稳定的 G—C S F 药剂，它能够充分防止其有效组分活性下降。这就是提供一种稳定 G—C S F 药剂的本发明主要目标。

本发明人为了提高含有 G—C S F 药剂的稳定性，进行了深入的研究，并且发现如果加入可药用的表面活性剂、糖类、蛋白质或高分子量化合物则可以有效达到这个目的。

因此，本发明的特征在于含有 G—C S F 和选自可作药用的表面活性剂、糖类、蛋白质和高分子物质中的至少一种物质。

采用例如日本专利申请 NO 153273/1984，
269455/1985，269456/1985，
270833/1985，270839/1985 说明书叙述的

任何方法可以得到含有G-CSF的本发明药剂。例如可以通过培养患口腔癌病人瘤细胞的一种细胞株(CN CM登记号I-315或I-483)或者在一种适当的宿主细胞中(例如大肠杆菌, C-127细胞或中国仓鼠卵巢细胞)通过重组DNA(是采用人G-CSF编码基因作用制备得到的)表达来制备人的G-CSF。

任何高度提纯的人G-CSF都可以作为G-CSF加至本发明的药剂中。最好是从一种产生人G-CSF的培养细胞上清液中分离人的G-CSF,并且还可以从一种含有人G-CSF活性多肽编码基因的重组载体转化过的宿主中得到一种具有人G-CSF活性的多肽或糖蛋白。

两例最好的人G-CSF例子如下:

(1)具有下列物理化学性质的人G-CSF:

i)分子量:采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量大约为 $19,000 \pm 1,000$ 。

ii)等电点:在 $pI=5.5 \pm 0.1$, $pI=5.8 \pm 0.1$ 和 $pI=6.1 \pm 0.1$ 三个等电点中至少有一个是其等电点。

iii)紫外吸收:最大吸收值在 $280nm$,最小吸收值在 $250nm$ 。

iv)N末端21个残基氨基酸顺序为:

H_2N -苏-脯-亮-甘-脯-丙-丝-丝-亮-脯-谷氨酰胺-丝-苯丙-亮-亮-赖-胱-亮-甘-谷氨酰胺-缬-

(2)人G-CSF或是具有人粒性白细胞刺激因子活性的一种多肽,此多肽是部分或全部以下述氨基酸序列表达的。或是一种含有所叙多肽和一个糖链部分的一种糖蛋白。

(Met) _n	Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro
Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Cys	Leu	Glu	Gln	Val
Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln
Glu	Lys	Leu	(Val	Ser	Glu) _m	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys
Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly
His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ser
Ser	Cys	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly
Cys	Leu	Ser	Gln	Leu	His	Ser	Gly	Leu	Phe	Leu
Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile
Ser	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu
Gln	Leu	Asp	Val	Ala	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Ile
Trp	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala	Pro
Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala
Phe	Ala	Ser	Ala	Phe	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly
Val	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser	Phe	Leu
Glu	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala
Gln	Pro									

(规定 m 是 0 或 1; 并且 n 是 0 或 1)。

制备这两类 G—C S F 的详细方法见日本专利申请 N o
 153273/1984, 269455/1985,
 269456/1985, 270838/1985 和
 270839/1985 的说明书, 所有这些已全部由本发明受让人

杂交。

另外一种可以采用的方法是使产生G—CSF的细胞和一种自我增生的恶性肿瘤细胞融合，然后在加有或不加有促细胞分裂素的条件下培养得到的杂交瘤。

按照要求，采用任何已知的方法进一步提纯和浓缩后得到的含人G—CSF溶液可以冷冻保存，或者冷冻干燥脱水后，可以保存这种溶液。

为了得到含G—CSF的稳定药剂，可以采用本发明专门提到的过程来制备所有这些人G—CSF。

用于本发明含有G—CSF稳定药剂的表面活性剂典型例子叙述如下：

具有6—18HLB的非离子表面活性剂，例如脱水山梨糖醇脂肪酸酯（如脱水山梨糖醇辛酸单酯，脱水山梨糖醇月桂酸单酯，和脱水山梨糖醇棕榈酸单酯），甘油脂肪酸酯（例如甘油辛酸单酯，甘油肉豆蔻酸单酯和甘油硬脂酸单酯），聚甘油脂肪酸酯（例如十甘油硬脂酸单酯，十甘油硬脂酸双酯，和十甘油亚油酸单酯），聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯（如聚氧乙烯脱水山梨糖醇月桂酸单酯，聚氧乙烯脱水山梨糖醇油酸单酯，聚氧乙烯脱水山梨糖醇硬脂酸单酯，聚氧乙烯脱水山梨糖醇棕榈酸酯，聚氧乙烯脱水山梨糖醇油酸三酯和聚氧乙烯脱水山梨糖醇，硬脂酸三酯），聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯（如聚氧乙烯山梨醇硬脂酸四酯，和聚氧乙烯山梨醇油酸四酯），聚乙烷甘油脂肪酸酯（如聚氧乙烷甘油硬脂酸单酯），聚乙烷甘醇脂肪酸酯（如聚乙烷甘醇硬脂酸二酯），聚氧乙烷烷基醚（如聚氧乙烷月桂醚），聚氧乙烷聚氧丙烯烷基醚（如聚氧乙烷聚氧丙烯甘醇

醚，聚氧乙烯聚氧丙烯丙醚和聚氧乙烯聚氧丙烯十六烷基醚），聚氧乙烯烷代苯基醚（如聚氧乙烯壬基醚），聚氧乙烯蓖麻油，聚氧乙基硬蓖麻油（聚氧乙基氢化蓖麻油），聚氧乙醇蜂蜡衍生物（如聚氧乙基山梨醇蜂蜡），聚氧乙烯羊毛脂衍生物（如聚氧乙烯羊毛脂），和聚氧乙烯脂肪酸酰胺（如聚氧乙烯硬脂肪酸酰胺）；非离子表面活性剂，例如有一个 $C_{10}-C_{18}$ 烷基的烷基硫酸盐，（如十六烷基硫酸钠，十二烷基硫酸钠和油硫酸钠）聚氧乙烯烷基醚硫酸盐，其中氧乙烯平均克分子数为2—4，并且烷基有10—18个碳原子（如聚氧乙烯十二烷基硫酸钠），烷基硫代琥珀酸酯，其中烷基有8—18个碳原子（如十二烷基硫代琥珀酸酯钠）；中性表面活性剂，例如卵磷脂，甘油磷酸酯，脑磷脂（如神经鞘磷脂），和蔗糖脂肪酸酯，其中脂肪酸有12—18个碳原子。当然这些表面活性剂既可以单独使用也可以混合使用。

上面列出的表面活性剂用量最好是按重量每1份G—CSF用1—10000份活性剂。

用于本发明制备含稳定G—CSF药剂用的糖类可选择作药用的有单糖，寡糖和多糖及磷脂和核苷酸衍生物。典型例子如下；三价和更高的蔗糖醇，例如甘油，赤藓醇，阿糖醇，木糖醇，山梨醇和甘露糖醇；酸性糖例如葡萄糖醛酸，艾杜糖醛酸，神经氨糖酸，半乳糖醛酸，葡萄糖酸，甘露糖醛酸，葡萄糖酮酸，半乳糖酮酸和古洛糖酮酸，透明质酸及其盐，硫酸软骨素及其盐，还有肝素，菊粉，几丁质及其衍生物，糊精，平均分子量为5000—150000的葡聚糖和藻酸及其盐。无论是单用还是合用，所有这些糖类都是有益的。

上面列出的糖类用量，按重量最好是1份G—CSF

1—10000份糖。

用于本发明含G—CSF稳定药剂的蛋白质典型例子包括人血清蛋白，人血清球蛋白，白明胶，酸处理过的白明胶（平均分子量=7000—100,000），碱处理过的白明胶（平均分子量=7000—100,000）和胶原蛋白。无可置疑，这些蛋白既可以单用也可以混合用。

上面所列蛋白质用量按重量每份G—CSF可以加1—20,000份。

可用于本发明含G—CSF稳定药剂的高分子化合物典型例子包括天然多聚物例如羟丙基纤维素，羟甲基纤维素，羧甲基纤维素钠和羟乙基纤维素；合成的多聚物例如聚乙烯乙二酸（分子量=300—6,000），聚乙烯醇（分子量=20,000—100,000）和聚乙烯吡咯烷酮（分子量=20,000—100,000）。无可置疑这些高分子化合物既可单用也可合并使用。

列于上面的高分子量化合物的最适用量按重量每份G—CSF加入1—20,000份。

除了上述表面活性剂、糖类、蛋白质或高分子化合物外，还可以从氨基酸，含硫还原剂和抗氧化剂类中选择至少一种加至本发明含有G—CSF的药剂中。阐明的氨基酸包括甘氨酸，苏氨酸，色氨酸，赖氨酸，羟赖氨酸，组氨酸，精氨酸，半胱氨酸，胱氨酸和甲硫氨酸。所提到的含硫还原剂包括N—乙酰半胱氨酸，N—乙酰高半胱氨酸，硫辛酸，硫二甘醇，硫乙醇胺，硫甘油，硫山梨醇，硫乙二醇酸及其盐，硫代硫酸盐，硫氢酸钠，焦亚硫酸钠，亚硫酸钠，硫羟乳酸，二硫苏糖醇，谷胱甘肽，和一种温和的带有巯基的硫还原剂，例

如一种 $C_1 - C_7$ 硫链烷酸。所提到的抗氧化剂包括，异抗坏血酸，二丁羟甲苯，丁羟茴香醚， α -生育酸，生育酚醋酸盐，L-抗坏血酸及其盐，L-抗坏血酸棕榈盐，L-抗坏血酸硬脂酸盐，三戊基脒酸盐，丙基脒酸盐和螯合剂例如乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)，焦磷酸钠和偏磷酸钠。

上述氨基酸，含硫还原剂和抗氧化剂或其混合物按重量每份 G-CSE 加量 1-10,000 份。

为了以合适剂量形式配制本发明含 G-CSE 的稳定制剂，可以加入下列一种或多种试剂：稀释剂，助溶剂，等渗剂，赋形剂，PH 调节剂，润肤剂和缓冲液。

本发明的稳定 G-CSE 药剂既可以配制口服用，也可以非肠道用，例如以多种方式进行注射。服用的特定方式决定了不同的剂量。典型的剂型包括：适用于口服的例如片剂，丸剂，胶囊，小粒和悬液，溶液，悬液和冻干制剂主要用于静脉注射，肌肉注射等下注射和等内注射，适于透过粘膜服用的如直肠栓剂，滴鼻剂和阴道栓剂。

根据本发明，从表面活性剂，糖类，蛋白质或高分子化合物类物质中至少可选择一种加至含 G-CSE 的药剂中，这样一来，同时可以防止吸附于容器壁或注射器上，而且可以在相当长时间内保持稳定。关于利用上述物质稳定 G-CSE 和防止吸附的详细机制已经弄清。在表面活性剂存在时，作为疏水蛋白的 G-CSE 表面被表面活性剂所复盖，形成可溶物，这样一来，少量的 G-CSE 也可以防止被吸附于容器壁和注射器上。糖类或亲水的高分子化合物在 G-CSE 和容器及注射器壁之间形成水合层，因此可以有效防止吸附 G-CSE。蛋白则和 G-CSE 竞争吸附于容器和注射器壁上，因

此可以有效抑制 G—C S F 的吸附。

除了防止 G—C S F 吸附外，上述物质也可以防止 G—C S F 分子的结合或聚合。在存在表面活性剂，糖类、蛋白质或高分子化合物时，单个 G—C S F 分子分散在这些物质中，G—C S F 分子间的相互作用大大降低，以至引起其结合或聚合能力的显著减少。此外，这些物质会阻止在高温和潮湿下加速的自动氧化过程，或防止氧化引起的结合或聚合。加入一种氨基酸，含硫还原剂或一种抗氧化剂可以进一步增强防止 G—C S F 自动氧化、结合或聚合的效应。

上述问题对注射溶液和悬液值得特别注意，但是在以其它剂型例如片剂配制 G—C S F 的过程中也有这些问题。对于后一种情况加入表面活性剂，糖类、蛋白质或高分子化合物也有效。

通过加入选自表面活性剂，糖类，蛋白质和高分子化合物类的一种物质，G—C S F 高度稳定，可以长时间保持活性，这将在下例中得以证实。为了达到这一目的，这些物质中每一种的数量特别是其下限是关键，如下范围是理想的：按重量每一份 G—C S F 加入 1—10,000 份糖，1—20,000 份蛋白质和 1—20,000 份高分子化合物。

根据本发明，表面活性剂，糖类，蛋白质和/或高分子化合物按特定浓度使用，其作用不仅在于防止 G—C S F 被吸附于容器和注射器壁上，而且也在于加强含 G—C S F 药剂的稳定性。从而就可能保障病人服用少量而且是高度精确剂量的 G—C S F。由于 G—C S F 很贵，这样使用将会导致生产含 G—C S F 药剂价格降低。

为了进一步阐明本发明，提供了下列例子，但这并不意味着作为一种限制。在这些例子中，采用下述任何一种方法都可以确定 G—C S F

的剩余活性。

a) 小鼠骨髓细胞软琼脂法

混合马血清(0.4 ml), 0.1毫升样品, 0.1 ml C3H/H₂ (雌性)鼠骨髓细胞悬液(0.5—1×10⁵核细胞)和0.4 ml含有0.75%琼脂的修改MeCoY的5A培养液, 侧至组织培养的塑料平皿中(35 mm[∅])凝固于37℃在5% CO₂ / 95%空气和100%湿度下培养5天。计算形成的集落数(一个集落含有至少50个细胞)并测定活性, 形成一个集落定为一个活性单位。

按照下列步骤配制方法(a)用的修改的MeCoY 5A培养液。

修改的MeCoY的5A培养溶液(双倍浓度)

12克MeCoY的5A培养液(Gibco), 2.55克MEM氨基酸—维生素培养基(Nissui Seiyaku 公司)

2.18克碳酸氢钠和50,000单位青霉素G钾盐两次溶解在500毫升蒸馏水中, 然后, 通过微孔滤膜(0.22 μm)无菌过滤溶液。

(b) 反相高效液相层析:

使用反相C₈柱(4.6 mm×300 mm, 5 μm)和正丙醇/三氟醋酸混合液作为流动相, 在下述梯度洗脱的条件下确定G-CSF(注射相当于1微克的量)的剩余活性:

时间(秒)	溶剂(A)	溶剂(B)	梯度
0	100%	0%	线性
15	0%	100%	
25	100%	0%	线性

溶剂(A): 30%正丙醇和0.1%三氟醋酸

溶剂(B): 60%正丙醇和0.1%三氟醋酸

检测波长为210nm, 剩余G-CSF活性的百分率按下述公式计算:

$$\text{剩余G-CSF活性(\%)} = \frac{\text{给定时间后剩余的G-CSF量}}{\text{最初的G-CSF量}} \times 100$$

用这种方法测定的G-CSF剩余量同用小鼠骨髓细胞琼脂方法(a)测得的结果有很好的相关性。

例1

表1列出的一种稳定剂加至5微克G-CSF中, 混合物无菌溶于20mM缓冲液中(含100mM氯化钠, PH7.4), 制成每毫升含5微克G-CSF的药剂, 然后冷干。根据时间所呈现的G-CSF活性变化, 用方法(a)测定, 结果见表1。术语“活性(%)”代表与起始单位相关的G-CSF的剩余活性, 以下列公式

表示:

$$\text{活性}(\%) = \frac{\text{给定时间后的活性单位}}{\text{起始活性单位}} \times 100$$

冷干是以下列步骤进行的:

把含有稳定性的 G—CSE 溶液放入磺胺处理过消毒的玻璃小瓶中, 在 -40°C 或低于 -40°C 冷冻 4 小时, 接着进行第一次干燥 48 小时, 从 -40°C 加热至 0°C , 压力从 0.03 托增加至 0.1 托, 然后进行第二次干燥 12 小时, 温度从 0°C 加热至 20°C , 压力从 0.03 托增加至 0.08 托, 然后将消毒的干燥氮气充入小瓶内部, 使其达到一个大气压, 小瓶用冷干的橡皮塞塞上, 最后用铝盖密封。

表 1

稳 定 剂	数 量 (按重量份数)	活 性 (%)	
		4 °C 保存 6 个月 后	37 °C 保存 1 个月 后
木糖醇	10,000	92	86
甘露糖醇	10,000	91	85
葡萄糖醛酸	10,000	86	82
透明质酸	2,000	92	89
葡聚糖 (m.w. 40,000)	2,000	95	90
肝 素	5,000	85	80
脱乙酰壳多糖	2,000	93	91
藻 酸	2,000	90	90
人血清清旦白	1,000	98	99
人血清球旦白	1,000	98	95
酸处理的白明胶	2,000	97	95
碱处理的白明胶	1,000	99	96
胶原旦白	2,000	95	90
聚乙烯乙二醇 (m.w. 4,000)	10,000	94	90
羟丙基纤维素	1,000	98	94
羧甲基纤维素钠	1,000	88	80
羟甲基纤维素	5,000	92	90
聚乙烯醇 (m.w. 50,000)	2,000	96	95
聚乙烯吡咯烷酮 (m.w. 50,000)	2,000	95	94
人血清清旦白	2,000		
甘露糖醇	2,000	100	97
半胱氨酸	100		

表 1 (续)

稳 定 剂	数 量 (按重量份数)	活 性 (%)	
		4 °C 保存 6 个月后	37 °C 保存 1 个月后
人血清清旦白	2,000		
聚氧乙烯	100	99	96
脱水山梨糖醇单月桂酸酯			
甘露糖醇	2,000		
人血清清旦白	2,000		
羟丙基纤维素	500	98	92
葡聚糖 (m.w. 40,000)	2,000		
聚氧乙烯	100		
脱水山梨糖醇月桂酸		98	96
山梨糖醇	2,000		
聚氧乙烯硬蓖麻油	100		
葡聚糖 (m.w. 40,000)	2,000	94	92
不 加	-	74	58

例 2

向 10 微克 G—CSF 加入列于表 2 的一种稳定剂，将混合物无菌溶于 20 m M 磷酸缓冲液中（含 100 m M 氯化钠，P H 7. 4 ）制备成为每毫升含 10 微克 G—CSF 的药剂，将制剂无菌装入磺胺处理过的玻璃小瓶中，封口，制备成 G—CSF 溶液。采用例 1 的同样方法来测定溶液中随着时间 G—CSF 的活性变化，结果列于表 2。

表 2

稳 定 剂	数 量 (按重量份数)	活性(%)		
		4℃保存 7天后	4℃保存 2月后	室温保存 一月后
甘露糖醇	5,000	91	87	82
透明质酸	2,000	93	87	70
葡聚糖(m.w. 40,000)	2,000	96	95	85
甘 油	10,000	90	90	88
神经氨酸	5,000	93	91	84
几丁质	2,000	95	92	86
糊精	2,000	90	92	87
人血清清旦白	1,000	99	95	92
人血清球旦白	1,000	98	94	90
酸处理白明胶	2,000	97	96	87
碱处理白明胶	500	99	95	92
胶原旦白	2,000	99	94	88
聚乙烯乙二醇 (m.w. 4,000)	10,000	94	89	90
羟丙基纤维素	2,000	98	95	92
羧甲基纤维素钠	2,000	92	91	80
羟乙基纤维素	4,000	92	94	90
聚乙烯醇 (m.w. 50,000)	4,000	97	93	90
聚乙烯吡咯烷酮(m.w. 50,000)	4,000	95	95	92
脱水山梨糖醇单月桂酸酯	400	97	96	95
聚氧乙烯 脱水山梨糖醇单月桂酸酯	400	100	96	94

表 2 (续)

稳 定 剂	数 量 (按重量份数)	活性 (%)		
		4℃保存 7天后	4℃保存 2月后	室温保存 1月后
聚氧乙烯 脱水山梨糖醇单硬脂酸盐	400	98	97	94
聚氧乙烯, 聚氧丙烯 乙二醇醚	400	100	94	93
聚氧乙烯硬蓖麻油	400	99	98	90
十二烷基磺酸钠	2,000	97	93	87
卵磷脂	2,000	97	94	90
人血清清旦白	2,000			
甘露糖醇	2,000	100	99	97
半胱氨酸	100			
人血清清旦白	2,000			
聚氧乙烯 脱水山梨糖醇单月桂酸酯	100	99	97	95
甘露糖醇	2,000			
人血清清旦白	1,000			
羟丙基纤维素	500	99	97	95
葡聚糖 (m.w. 40,000)	2,000			
聚氧乙烯 脱水山梨糖醇单棕榈酸酯	100	96	96	93
山梨糖醇	2,000			
聚氧乙烯硬蓖麻油	100			
葡聚糖 (m.w. 40,000)	2,000	95	92	92
不加	-	72	61	47

例 3

向 10 微克 G—CSF 加入列于表 3 的一种稳定剂，将混合物无菌溶于 20 mM 磷酸缓冲液中（含 100 mM 氯化钠，PH 7.4）制备成每毫升含 10 微克 G—CSF 的药剂。将 1 毫升制剂加至磺胺处理过的硅化玻璃小瓶中，置于 4℃。每种稳定剂防止 G—CSF 吸收的作用可以通过在半小时，2 小时和 4 小时后测定溶液中 G—CSF 保留活性来评价。测量采用（b）所用反相高压液相层析的方法来进行，结果列于表 3。

表 3

稳 定 剂	数 量 (按重量份数)	保留活性 (%)			
		开始	半小时	2 小时	24 小时
甘露糖醇	5,000	100	93	90	91
透明质酸	2,000	100	97	92	92
葡聚糖 (m. w. 40, 000)	2,000	100	98	95	96
甘油	10,000	100	94	91	90
肝素	2,000	100	92	90	90
葡萄糖醛酸	5,000	100	96	90	91
葡萄糖酮酸	5,000	100	92	88	90
人血清清旦白	1,000	100	100	101	99
人血清球旦白	1,000	100	98	100	98
碱处理白明胶	500	100	99	98	99
酸处理白明胶	2,000	100	99	97	97
胶原旦白	2,000	100	100	98	99
聚乙二醇 (m. w. 4, 000)	10,000	100	100	100	99
羟丙基纤维素素	2,000	100	100	100	99
羧甲基纤维素钠	2,000	100	98	96	95
羟乙基纤维素	4,000	100	96	93	92
聚乙烯醇 (m. w. 50, 000)	4,000	100	99	100	98
聚乙烯吡咯烷酮 (m. w. 50, 000)	4,000	100	98	98	96
吸水山梨糖醇单辛酸酯	400	100	100	100	98
聚氧乙烯脱水山梨糖醇单硬脂 酸酯	400	100	100	98	100
聚氧乙烯硬蓖麻油	400	100	99	101	99

表 3 (续)

稳 定 剂	数 量 (按重量份数)	保留活性 (%)			
		开始	半小时	2 小时	24 小时
十二烷基磺酸钠	2,000	100	100	99	97
卵磷脂	2,000	100	99	100	98
人血清清旦白	2,000				
甘露糖醇	2,000	100	100	100	101
半胱氨酸	100				
人血清清旦白	2,000				
聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯	100	100	100	98	99
甘露糖醇	2,000				
人血清清旦白	1,000				
羟丙基纤维素	500	100	101	99	100
葡聚糖 (m. w. 40, 000)	2,000				
聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯	100	100	100	99	99
山梨糖醇	2,000				
聚氧乙烯硬蓖麻油	100				
葡聚糖 (m. w. 40, 000)	2,000	100	100	98	97
不 加	-	100	91	72	73