

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

C07K 14/52

A61K 38/19

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97180277.7

[43]公开日 1999年12月22日

[11]公开号 CN 1239480A

[22]申请日 97.9.12 [21]申请号 97180277.7

[30]优先权

[32]96.10.4 [33]US [31]08/726,123

[86]国际申请 PCT/US97/16196 97.9.12

[87]国际公布 WO98/14476 英 98.4.9

[85]进入国家阶段日期 99.6.3

[71]申请人 安姆根有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 D·N·布雷姆斯

M·J·特雷乌黑特

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 吴玉和 齐曾度

权利要求书 2 页 说明书 32 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 含有 MPL 配体的药物组合物

[57]摘要

本发明涉及 mpl 配体组合物,其成分包括:与至少一种水溶性聚合物任选共价连接的具有相应于人内源 mpl 配体序列中氨基酸片段 7 - 151 至 1 - 332(内含)的全长或截短 mpl 配体;选自谷氨酸盐,磷酸盐,组氨酸,咪唑和乙酸盐的缓冲剂;选自山梨糖醇,蔗糖,甘露糖醇,甘油,聚乙二醇和非极性氨基酸的赋形剂;任选地,去污剂或脂质例如 Tween;任选地,选自谷胱甘肽,甲硫氨酸,柠檬酸盐和 EDTA 的抗氧化剂或螯合剂;具有 pH 优选范围 5.0 - 60(内含)。这样的组合物形态可以是液体(优选含水的),冷冻的(优选含水的)或者冻干的。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



## 权 利 要 求 书

1. 一种组合物, 含有 mpl 配体; 选自谷氨酸盐, 磷酸盐, 组氨酸, 咪唑和乙酸盐的缓冲剂; 选自山梨糖醇, 蔗糖, 甘露糖醇, 甘油, 聚乙二醇和非极性氨基酸的赋形剂; 具有 pH 范围 5.0 - 6.0。
- 5        2. 权利要求 1 的组合物, 其中 mpl 配体包括至少 SEQ ID NO:2 的氨基酸片段 7 - 151。
3. 权利要求 1 的组合物, 其中 mpl 配体由 SEQ ID NO:2 的氨基酸片段 1 - 171 ± 20 组成。
4. 权利要求 1 的组合物, 其中 mpl 配体由 SEQ ID NO:2 的氨基酸  
10 片段 1 - 161 ± 10 组成。
5. 权利要求 1 的组合物, 其中 mpl 配体由 SEQ ID NO:2 的氨基酸片段 1 - 151 组成。
6. 权利要求 1 的组合物, 其中 mpl 配体由 SEQ ID NO:2 的氨基酸片段 1 - 163 组成。
- 15        7. 权利要求 1 的组合物, 其中 mpl 配体与选自聚乙二醇, 一甲氧基聚乙二醇, 葡聚糖, 聚 - ( N - 乙烯吡咯烷酮 ) 聚乙二醇, 丙二醇均聚物, 聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物, 聚氧乙基化多醇的水溶性聚合物连接。
8. 权利要求 7 的组合物, 其中水溶性聚合物是聚乙二醇。
- 20        9. 权利要求 6 的组合物, 其中含有作为缓冲剂的乙酸盐, 作为赋形剂的山梨糖醇, 并且在水介质中, pH 大约为 5.0。
10. 权利要求 1 的组合物, 其中非极性氨基酸选自甘氨酸, 脯氨酸和丙氨酸。
11. 权利要求 1 的组合物, 进一步含有抗氧化剂。
- 25        12. 权利要求 11 的组合物, 其中抗氧化剂选自 DETA, 抗坏血酸, 谷胱甘肽, 甲硫氨酸和柠檬酸盐。
13. 权利要求 1 的组合物, 进一步含有去污剂或脂质。
14. 权利要求 13 的组合物, 其中去污剂选自 Tween; Brij 35; Pluronic; 十二烷基硫酸钠; Triton; 二肉豆蔻酰磷脂酰甘油  
30 ( DMPG ); PEG-40 蓖麻油; 油烯基 ( oleth ) - 3 - 磷酸盐; 二乙醇胺油烯基 ( oleth ) - 10 - 磷酸盐; 含有 C8 ( 辛 ) 和 C14 ( 十四 ) 脂质的短链和长链单层囊泡 ( SLUV ) 的混合物。



15. 权利要求 1 的组合物，其中组合物处于水介质中。

16. 权利要求 1 的组合物，其中组合物是冻干形态。

17. 权利要求 1 的组合物，其含有磷酸盐缓冲剂，5%山梨糖醇，并且水基质中 pH 大约为 6.0。

5 18. 权利要求 1 的组合物，其水基质中含有组氨酸缓冲剂，和大约 5%山梨糖醇。

19. 权利要求 1 的组合物，其水基质中含有咪唑缓冲剂，和大约 5%山梨糖醇。

10 20. 权利要求 1 的组合物，其水基质中含有谷氨酸盐缓冲剂，和大约 5%山梨糖醇。

21. 权利要求 1 的组合物，其水基质中含有谷氨酸盐缓冲剂，5%山梨糖醇，并且具有 pH 大约 5.0。

22. 权利要求 1 的组合物，其冻干形式中含有谷氨酸盐缓冲剂，大约 6%蔗糖，大约 2%甘露糖醇，pH 大约 5.0。

15



## 说明书

### 含有 MPL 配体的药物组合物

5

#### 发明领域

本发明涉及含有 mpl 配体的组合物，其成分适于药用。

#### 发明背景

天然的人 mpl 配体是最近克隆的细胞因子，是循环血小板水平的主要调节剂。参见 Bartley, T.D.等，细胞 ( Cell ) 77:1117-1124(1994); Lok, S.等，自然 ( Nature ) 369:565-568 (1994); de Sauvage, F.J.等，自然 369:533-538 (1994); Miyazake, H.等，Exp.Hematol. 22:838 (1994); 和 Kuter, D.J.等，PNAS USA, 91:11104-11108 (1994)。人内源 mpl 配体也称之为血小板生成素 ( TPO ) 和 megapoiectin，是一共含有 332 个氨基酸的蛋白质。

由中国仓鼠卵巢 ( CHO ) 和大肠杆菌细胞制备的重组 mpl 配体在小鼠、大鼠和猴子体内显示出特异性刺激或增加巨核细胞和/或血小板的生物活性。参见例如，Hunt, P.等，Blood 84 (10): 390A (1994)。从 C - 末端截断多达 181 个氨基酸的人 mpl 配体保留体内生物活性。所得 mpl 配体相应于全长序列中 1 - 151 直到 1 - 331 的氨基酸片段。也可以在人 mpl 配体蛋白质的 N - 末端去除前 6 个氨基酸而保留生物活性。因此，表明生物活性保留在人 mpl 配体的成熟氨基酸序列的氨基酸 7 - 151 ( 内含 ) 中。

体内试验证明 mpl 配体的衍生物具有刺激产生巨核细胞和/或血小板的有利活性。参见公开的 PCT 申请 WO95/26746 。特别地，用水溶性聚合物例如聚乙二醇 ( “ PEG ” ) 部分衍生化的 mpl 配体有临床意义，因为它们在体内寿命长且有活性。

以一般方式公开了含有 mpl 配体和相关的衍生物的组合物。参见公开的 PCT 申请 WO95/26746 ， WO95/21919 ， WO95/18858 ， 和 WO95/21920 。但是，这里描述的对照实验未见报道，该实验可确定何种含有 mpl 配体的组合物具有适于药用的稳定性。这种组合物对将 mpl 配体实用于人类患者有重要意义。因此，当前本领域需要使用这种组合



物，将 mpl 配体给予患者，使血小板水平升高。

### 发明概述

因此，本发明的目的是提供含有 mpl 配体的药用稳定组合物。

5 本发明另一个目的是提供对患者给药的含有 mpl 配体的组合物。

在实施方案中，本发明涉及的组合物包括：与至少一种水溶性聚合物任选共价连接的具有相应于天然人 mpl 配体的氨基酸 7 - 151 至 1 - 332（内含）的氨基酸序列的全长或截短的 mpl 配体；选自谷氨酸盐，磷酸盐，组氨酸，咪唑和乙酸盐的缓冲剂；选自山梨糖醇，蔗糖，甘露糖醇，甘油，聚乙二醇和非极性氨基酸的赋形剂；任选地，去污剂例如 Tween；任选地，选自谷胱甘肽，甲硫氨酸，柠檬酸盐和 EDTA 的抗氧化剂或螯合剂；具有 pH 优选范围 5.0 - 6.0（内含）。这样的组合物可以是液体（优选含水的），冷冻的（优选含水的）或者冻干的。

本发明的其他方面在下面提供的详细说明书中提出。

15

### 附图的简要说明

图 1 给出人内源 mpl 配体的 cDNA 序列和相应的蛋白质序列（SEQ ID NOS:1 和 2）。它们含有一个前导序列（氨基酸-21 至-1,），该序列在体内自 cDNA 编码蛋白中切除以产生成熟蛋白。

20

### 发明的详细说明

本发明提供含有 mpl 配体和其他试剂的组合物，其稳定、有生物活性，适于人用。

在第一个实施方案中，本发明涉及 mpl 配体的组合物。“mpl 配体”  
25 广义上指能够特异性结合和激活 mpl 受体，从而刺激体内巨核细胞和/或血小板产生的所有蛋白分子。在优选的实施方案中，mpl 配体具有和来自人的配体相同的氨基酸序列，例如天然人序列的氨基酸 1 - 332（SEQ ID NO:2）。在另一个优选实施方案中，mpl 配体至少与 SEQ ID NO:2 的氨基酸片段 7 - 151 有相同序列。优选 1 - 171 ± 20 氨基酸（即  
30 氨基酸 1 - 151 至 1 - 191）特别优选相应于 SEQ ID NO:2 的 1 - 161 ± 10 氨基酸相同的氨基酸序列。一些特别优选的 mpl 配体种类如下：SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 - 151，1 - 152，1 - 153，1 - 154，1 - 163，



1 - 174, 1 - 191, 1 - 232, 1 - 244。最优选的种类具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基片段 1 - 163。

mpl 配体也可以用一种或多种水溶性聚合物例如一种或多种聚乙二醇 ( PEG ) 基团衍生物化。选择的聚合物应该是水溶性的, 使得其所连接的 mpl 配体不在有水环境下 ( 例如生理环境 ) 沉淀。水溶性聚合物的例子在公开的 PCT 申请 WO95/26746 中给出, 其在这里引作参考。

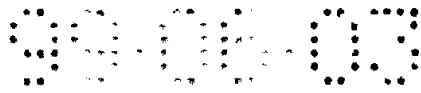
水溶性聚合物可以使用化学反应连接, 例如使用那些在公开的 PCT 申请 WO95/26746 中描述的化学反应。优选的连接化学作用是酰化和烷基化。本发明 mpl 配体衍生物可以连接多个聚合物分子, 例如可有 2 - 6 个, 优选 2 - 5 个。聚合物基团通常在氨基酸的  $\alpha$  或  $\epsilon$  氨基处与蛋白质连接, 但是也可考虑只要反应条件合适、反应活性足够, 聚合物基团可与蛋白质上的任何氨基连接。

在优选的实施方案中, 单个聚合物分子连接 mpl 配体。在这样的情况下, 与 mpl 配体反应的聚合物应用单一反应基团加以修饰, 例如用于酰化的活性酯或者用于烷基化的醛, 从而可控制聚合程度。

聚合物可以是分支或未分支的。优先考虑终产物制剂的治疗用途, 聚合物应是药学可接受的。水溶性聚合物可以选自基团, 例如聚乙二醇, 一甲氧基聚乙二醇, 葡聚糖, 聚 - ( N - 乙烯吡咯烷酮 ) 聚乙二醇, 丙二醇均聚物, 聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物, 聚氧乙基化多醇 ( 例如甘油 ) 和聚乙烯醇。对于 mpl 配体通过酰化反应进行衍生化, 选择的聚合物应该具有单一的反应性酯基。对于 mpl 配体通过还原烷基化反应进行衍生化, 选择的聚合物应该具有单一的反应性醛基。一般情况下, 不应该选择天然存在糖基残基的水溶性聚合物, 因其通常经哺乳动物重组表达系统更容易制备。聚合物可以是任何分子量, 只要其基本不干扰或消除得到的 mpl 配体衍生物的生物活性。

这里所使用的特别优选的水溶性聚合物是聚乙二醇, 缩写 PEG。是包括用来衍生其他蛋白质的 PEG 的任何形式, 例如 - ( C1 - C10 ) 烷氧基 - 或芳基氧基 - 聚乙二醇 ( 参见美国专利 5252714 )。

mpl 配体的 peg 基化作用 ( pegylation ) 可以通过本领域已知的 peg 基化作用的任何反应进行。参见, 例如: Focus on Growth Factor 3(2): 4-10 (1992); EP 0154316; EP 0401384; 和这里所引用的与 peg 基化作用相关的其他公开物。优选地, peg 基化作用通过与反应性聚乙二醇分子



的酰化或烷基化进行。

因此，从优选角度讲，本发明涉及 peg 基化的 mpl 配体，其中 PEG 基通过酰基或烷基连接。如上所讨论的，这样的产物可以是一 -peg 基化的或多-peg 基化的（例如含有 2 - 6 个，优选 2 - 5 个 PEG 基团）。

5 聚合物基团通常在氨基酸的 $\alpha$  或 $\epsilon$  氨基处与蛋白质连接，但是也包括 PEG 基团可以在合适的反应条件下，与具有足够反应活性的蛋白质上任何氨基连接。

10 优选分子量 5 - 50 kd 的 PEG 基团通过还原烷基化作用方法连接。在最优选的实施方案中，PEG-mpl 配体中的 PEG 基团平均分子量约为 20kd（即  $20 \text{ kd} \pm 2 \text{ kd}$ ）。

特别优选的 mpl 配体衍生物是指 SEQ ID NO:2 中氨基酸 1 - 163 片段上第一个残基的 $\alpha$  位氨基与 PEG 基团的连接产物，其中 PEG 通过与 PEG 醛反应物的还原性烷基化反应而连接。这里该类型 mpl 配体指定为缩写“PEG-rHuMGDF”。

15 在优选的实施方案中，mpl 配体是已经转染到宿主细胞中的外源 DNA 序列的表达产物；也就是说，在优选的实施方案中，mpl 配体是“重组 mpl 配体”。重组 mpl 配体可以在已知为此目的的任何细胞例如 CHO 细胞中制备。优选的宿主是细菌，特别优选大肠杆菌细胞。根据这里所引述的关于 mpl 配体克隆和表达的公开出版物中所描述的方法，重组 mpl 配体易于制备。

20 尽管先前技术人员曾报道过涉及天然人 mpl 配体（SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 - 332）的组合物，但是没有一个人先前报道过这里所提出的作为组合物成分函数的大量稳定性数据。因此，尽管先前预测了 mpl 配体组合物的稳定性，但是直到本发明时还没有明确公开过具有期望稳定性的组合物，尤其是对于截短的衍生化的 mpl 配体。

25 以下文给出的数据为基础，本发明人发现一些稳定组合物包括：与至少一种水溶性聚合物共价选择性连接的具有相应于天然人 mpl 配体氨基酸片段 7 - 151 至 1 - 332（内含）的全长或截短的 mpl 配体；选自谷氨酸盐，磷酸盐，组氨酸，咪唑和乙酸盐的缓冲剂；选自山梨糖醇，蔗糖，甘露糖醇，甘油，聚乙二醇和非极性氨基酸的赋形剂；任选去污剂例如 Tween；任选地，选自谷胱甘肽，甲硫氨酸，柠檬酸盐和 EDTA 的抗氧化剂或螯合剂；具有 pH 优选范围 5.0 - 6.0（内含）。



这样的组合物形态可以是液体（优选含水的），冷冻的（优选含水的）或者冻干的。

该蛋白质（mpl 配体）在最终组合物中的浓度一般应该是大约 0.1mg/ml 至 5 mg/ml 范围，优选 0.2mg/ml 至 3 mg/ml，特别优选 0.3 - 1 mg/ml。

优选地，缓冲液是 5 - 20mM 浓度的乙酸盐，特别优选地大约  $10 \pm 2$  mM。下面的表 1 中提供了具体缓冲液和浓度的总结：

表 1

缓冲液	优选的浓度范围 ( mM )	操作浓度范围 ( mM )	试验浓度 ( mM )
乙酸盐	5 - 20	8 - 12	10
磷酸盐	5 - 20	8 - 12	10
组氨酸	5 - 20	8 - 12	10

10

组合物的 pH 随着特定缓冲液和其他因素而变化。对于用适当的酸性缓冲液（例如乙酸盐）提高稳定性的优选的 pH 范围是 4.0 - 6.0。最优选的范围是 4.5 - 5.5，大约 5.0 是最优选的实施方案。

组合物应该还含有赋形剂。表 2 中列出了一些举例的赋形剂和代表性浓度：

15

表 2

赋形剂	优选的浓度范围 ( W/V )	操作浓度范围 ( W/V )	试验浓度 ( W/V )
山梨糖醇	3 - 10%	4 - 6%	5%
蔗糖	5 - 10%	8 - 10%	9%
甘露糖醇	3 - 10%	4 - 6%	5%

一般以一定量加入赋形剂，使得产生等渗溶液。

组合物可以进一步含有在某些情况下将增强稳定性的一些氨基酸。氨基酸可以是极性或非极性的，非极性氨基酸是优选的。举例的极

20



性氨基酸是精氨酸和赖氨酸，举例的非极性氨基酸是甘氨酸，脯氨酸和丙氨酸。

本发明组合物中还可以含有抗氧化剂或螯合剂。优选的抗氧化剂是：EDTA，抗坏血酸，谷胱甘肽，甲硫氨酸和柠檬酸盐。也包括这些试剂的组合，例如柠檬酸盐加 EDTA。以适合减少或消除 mpl 配体的氧化作用的量含有这样的试剂。举例的浓度是：0.1 - 10mM，优选 0.5 - 5mM，一般 1 - 3mM。

本发明组合物中还可以含有去污剂或脂质。一些代表性去污剂是：聚山梨酯的 Tween 商标（例如 Tween20 和 Tween80）； Brij 35； Pluronics（例如 F-127 和 F-68）； 十二烷基硫酸钠； Triton（例如 X-100）； 二肉豆蔻酰磷脂酰甘油（ DMPG ）； PEG 蓖麻油（例如 PEG-40）； 油烯基（oleth）- 3 - 磷酸盐； 二乙醇胺油烯基（oleth）- 10 - 磷酸盐； 含有例如 C8（辛）和 C14（十四）脂质的短链，长链单层脂小泡（SLUV）的混合物（例如 1:1）。这些去污剂/脂质的量一般应足以防止由于表面粘连或聚集引起的 mpl 配体损失。一些举例的去污剂浓度是 0.004mg/ml - 50mg/ml； 优选 0.004mg/ml - 10mg/ml； 最优选 0.006mg/ml - 0.060mg/ml。当 mpl 配体的浓度较低，例如尤其是小于等于 0.2mg/ml mpl 配体时，含有这些去污剂/脂质的需要会更大。

这样的组合物可以是液体（优选含水的），冷冻的（优选含水的）或冻干的。

关于冻干的组合物，与液体组合物相比，有增加的蛋白质凝聚的可能性。特别优选的冻干的组合物含有 pH 在 4.0 - 6.0 范围内的谷氨酸盐，蔗糖和甘露糖醇的混合物。下面的表 3 中提供了特别优选的组合物说明：

表 3

材料	范围	实施例
谷氨酸盐	5-20mM	10mM
蔗糖	2-10%(w/v)	6%(w/v)
甘露糖醇	1-5%(w/v)	2%(w/v)
pH	4.0-6.0	5.0



本发明组合物是“稳定的”，这意味着根据单纯的 SEC 色谱分析，在 37 °C 温度下贮存 12 星期后保留至少大约 87%，优选大约 90%，最优选大约 93% 完整的 mpl 配体衍生物（参见表 4）。这种稳定程度有重要的实践意义，因为较小的稳定性会产生对患者不可接受的安全性。

这里所使用的“治疗有效量”可在患者体内产生合适的生物活性，即对给定症状和处方的患者产生疗效。

本发明组合物可以系统地在肠胃外，静脉内或皮下给药。此时，本发明中使用的治疗组合物可以是无热源、生理可接受水溶液。选择具体的途径取决于要治疗的症状。要求的剂量是足以提高患者血小板和/或巨核细胞水平的量，并且根据要治疗的症状的严重程度，使用的给药方法等而不同。

通过本发明方法和组合物要治疗的症状一般是涉及存在巨核细胞/血小板缺乏或者预期巨核细胞/血小板缺乏（例如由于安排好的手术）的那些症状。这样的症状通常是体内缺乏（暂时的或永久的）活性 mpl 配体的结果。血小板缺乏的通用术语是血小板减少，因此本发明方法和组合物一般用于治疗血小板减少。

血小板减少（血小板缺乏）由于各自原因而存在，包括用各种药物化疗和其它治疗，放疗，手术，偶然性失血，和其它具体的病症。涉及血小板减少并且可以根据本发明治疗的举例的具体病症是：再生障碍性贫血，自发的血小板减少，导致血小板减少的转移瘤，系统性红斑狼疮，脾肿大，范可尼综合症，维生素 B12 缺乏，叶酸缺乏，May-Hegglin 异常，Wiskott-Aldrich 综合症，和阵发性夜发血红蛋白尿。而且对于 AIDS 的某些治疗导致血小板减少（例如 AZT）。一些伤口愈合失调也可以从血小板数增加获得好处。

关于预期的血小板缺乏，例如，由于未来的手术，本发明 mpl 配体类似物可以在需要血小板之前几天至几小时给药。对于急性情况，例如偶然性和大量失血，mpl 配体类似物可以和血液或纯化的血小板一起给与。

mpl 配体组合物也可以给计划提供血小板或其它相关细胞的正常人服用。给与本发明组合物会增加患者一次供出的血小板和/或相关的细胞的量。



用于治疗上述病症的方法中涉及的剂量计划将取决于根据主治医师，考虑调整药物作用的各种因素，例如年龄，症状，体重，性别和患者的饮食，感染的严重程度，给药时间和其他临床因素来确定。一般情况下，对于每千克体重的日剂量应该是 0.01 - 1000 微克 mpl 配体类似物范围。

在治疗特征在于其他综合症以及血小板缺乏的疾病状态中，本发明组合物还可以单独使用或者和其他细胞因子，可溶性 Mpl 受体（即 mpl 受体），造血因子，白细胞介素，生长因子或抗体结合使用。预期这样的组合物证明在治疗与血细胞生成的一般刺激剂例如 IL-3 或 GM-CSF 结合的血小板减少的一些情况中是有用的。其他巨核细胞刺激因子，即 meg-CSF，干细胞生长因子（SCF），白血病抑制因子（LIF），制癌蛋白 M（OSM），或者其他具有巨核细胞刺激活性的分子也可以与 mpl 配体使用。另外举例的用于这样的共同给药的细胞因子或血细胞生成因子包括 IL-1 $\alpha$ ，IL-1 $\beta$ ，IL-2，IL-3，IL-4，IL-5，IL-6，IL-11，集落刺激因子 - 1（CSF-1），GM-CSF，粒细胞集落刺激因子（G-CSF），EPO，干扰素 -  $\alpha$ （IFN- $\alpha$ ），IFN- $\beta$  或 IFN- $\gamma$ 。更为有用的是同时或者连续服用有效量的可溶性哺乳动物 Mpl 受体，表明具有一旦巨核细胞达到成熟形式就引起巨核细胞裂解成片段成为血小板的效果。因此，服用 PEG-mpl 配体（以增加成熟巨核细胞数）后再服用可溶性 Mpl 受体（以灭活类似物并且使成熟巨核细胞产生血小板）可望是刺激血小板产生的特别有效的方法。调节上述剂量可补偿治疗组合物中这样的附加成分。患者的疗程可以通过常规方法监测。

下面的实施例更全面描述本发明，但是不认为限制其范围。

25

### 实施例 1

下面的表 4 和 5 总结了下面一些实施例提供的的数据。在这些实施例的每一个中，试验的 mpl 配体是 PEG-rHuMGDF，其含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 - 163，用平均分子量大约 20 kDa 的聚乙二醇基团在 N - 末端氨基酸的  $\alpha$  氨基处单-peg 基化。



表 4

配方	37 °C 12 星期后 通过 SEC <sup>1</sup> 测定 的主峰百分数
组氨酸, pH8.0, 5%山梨糖醇	70
Tris, pH8.0, 5%山梨糖醇	47
磷酸盐, pH7.0, 5%山梨糖醇	71
组氨酸, pH7.0, 5%山梨糖醇	84
磷酸盐, pH6.0, 5%山梨糖醇	89
谷氨酸盐/组氨酸, pH6.0, 5%山梨糖醇	92
组氨酸, pH6.0, 5%山梨糖醇	92
咪唑, pH6.0, 5%山梨糖醇	92
谷氨酸盐, pH5.5, 5%山梨糖醇	91
谷氨酸盐/组氨酸, pH5.5, 5%山梨糖醇	93
乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇	92
谷氨酸盐/组氨酸, pH5.0, 5%山梨糖醇	93
谷氨酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇	91
组氨酸, pH5.0, 5%山梨糖醇	89
琥珀酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇	76
谷氨酸盐, pH4.0, 5%山梨糖醇	87
琥珀酸盐, pH4.0, 5%山梨糖醇	81
乙酸盐, pH4.0, 5%山梨糖醇	77
酒石酸盐, pH4.0, 5%山梨糖醇	18
琥珀酸盐, pH3.5, 5%山梨糖醇	74

<sup>1</sup> 附加的稳定性指数测定, 具体地说, 是反相和阳离子交换色谱, 对 SEC 给出相似结果。

- 5 主峰百分数的减少指示优选的 pH 范围 4.0 - 6.0, 优选 5.0 - 6.0。另外, pH 范围 4.0 - 6.0 内的缓冲效果表明该范围内一些缓冲液不是优选的。

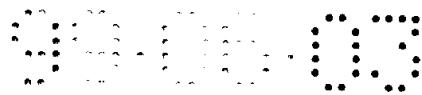


表 5

配方	37 °C 12 星期后 SEC <sup>1</sup> 测定的 主峰百分数
乙酸盐,pH5.0,5%等渗 多醇(山梨糖醇)	92
乙酸盐,pH5.0, 等渗盐水,一价和 二价两者(NaCl)	10
乙酸盐,pH5.0, 等渗极性氨 基酸(赖氨酸)	10
乙酸盐,pH5.0, 等渗非极性 氨基酸(甘氨酸)	84

所有试验的多醇, 包括:山梨糖醇, 蔗糖, 甘油, 甘露糖醇和聚乙二醇, 都给出相似结果。

- 5 所有的盐(一价和二价两者), 包括:氯化钠, 氯化钙, 氯化铜, 氯化镁, 氯化锰, 氯化镍, 氯化锌和二氯化铁, 都给出相似结果。

所有试验的极性氨基酸, 包括:精氨酸和赖氨酸, 都给出相似结果。

所有试验的非极性氨基酸, 包括:甘氨酸, 脯氨酸和丙氨酸, 都给出相似结果。

- 10 所有试验的抗氧化剂, 包括:EDTA, 抗坏血酸, 谷胱甘肽, 甲硫氨酸, 甲硫氨酸+EDTA 和柠檬酸盐, 没有表现出超过 A50S 的 PEG-rHuMGDF 的稳定性的大大提高(参见定义的实施例)。



## 实施例 2

### pH 评定

A. 起始材料: PEG-rHuMGDF

B. 配方:

5	10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇	(A50S)
	10mM 乙酸盐, pH4.0, 5%山梨糖醇	(A40S)
	10mM 琥珀酸盐, pH3.5, 5%山梨糖醇	(S35S)
	10mM 琥珀酸盐, pH4.0, 5%山梨糖醇	(S40S)
	10mM 琥珀酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇	(S50S)
10	10mM 组氨酸, pH6.0, 5%山梨糖醇	(H60S)
	10mM 咪唑, pH6.0, 5%山梨糖醇	(I60S)
	10mM 酒石酸盐, pH4.0, 5%山梨糖醇	(T40S)
	10mM 谷氨酸盐, pH4.0, 5%山梨糖醇	(E40S)
	10mM 磷酸盐, pH6.0, 5%山梨糖醇	(P60S)
15	10mM 磷酸盐, pH7.0, 5%山梨糖醇	(P70S)
	10mM Tris, pH8.0, 5%山梨糖醇	(T80S)
	10mM 组氨酸, pH5.0, 5%山梨糖醇	(H50S)
	10mM 组氨酸, pH6.0, 5%山梨糖醇	(H60S)
	10mM 组氨酸, pH7.0, 5%山梨糖醇	(H70S)
20	10mM 组氨酸, pH8.0, 5%山梨糖醇	(H80S)

C. 管瓶:以 0.5mg/ml 蛋白质浓度装入 3cc 管瓶 1mL。

D. 温度和时间点:37 °C; 时间点表中给出。

E. 分析:HPLC:大小排阻层析 ( SEC ), 反相色谱 ( RP ), 离子交换  
25 色谱 ( IEX )。

F. 数据

表 6-11 给出在 37 °C 孵育指定时间后通过大小排阻, 反相和阳离子交换色谱测定的主峰百分数。



pH 评定 - 在 37 °C 孵育指定时间后通过  
大小排阻层析测定的主峰百分数

表 6

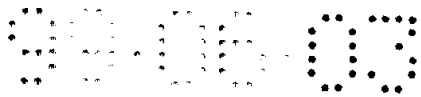
Form. *	孵育时间					
	T=0	T=2 星期	T=4 星期	T=8 星期	T=12 星期	T=17 星期
A40S	94.39	90.86	88.20	82.91	77.21	70.19
S35S	94.90	93.65	90.29	80.95	74.28	62.43
S40S	94.63	92.59	90.20	86.16	80.51	72.34
S50S	94.27	87.53	85.29	80.77	76.45	71.12
H60S	94.99	94.31	93.77	91.74	89.13	85.96
I60S	94.93	94.56	94.20	92.77	91.49	94.83
T40S	89.71	43.46	34.44	24.48	18.10	-
E40S	94.90	94.29	93.65	91.30	86.84	77.94

\* Form.=配方。

5

表 7

Form. *	孵育时间							
	T=0	T=3 天	T=7 天	T=10 天	T=2 星期	T=3 星期	T=6 星期	T=12 星期
T80S	97.70	93.56	91.28	88.12	86.63	80.25	66.18	46.58
H50S	97.53	94.20	94.22	94.37	94.54	92.94	91.76	89.18
H60S	97.62	97.02	97.24	97.09	94.50	96.19	95.12	91.68
H70S	97.62	96.64	96.75	95.86	95.37	94.33	90.95	84.34
H80S	97.70	-	94.68	93.27	92.03	89.36	81.52	69.65
P60S	97.65	95.55	96.84	96.35	96.38	95.77	93.76	89.16
P70S	97.81	96.45	95.84	94.83	94.12	91.77	84.81	71.14
A50S	97.72	96.28	95.43	95.45	95.63	94.71	93.97	91.65



pH 评定 - 在 37 °C 孵育指定时间后通过  
反相色谱测定的主峰百分数

5

表 8

配方	孵育时间					
	T=0	T=2 星期	T=4 星期	T=8 星期	T=12 星期	T=17 星期
A40S	93.49	91.69	84.34	78.87	70.55	64.23
S35S	93.78	90.10	80.86	70.36	59.35	50.98
S40S	93.91	91.61	83.89	77.16	-	59.22
S50S	93.49	92.59	88.93	85.96	79.35	73.71
H60S	93.65	90.54	86.69	86.49	80.88	76.11
I60S	93.68	92.61	87.64	87.34	84.11	79.49
T40S	93.65	88.04	74.51	66.08	53.87	-
E40S	93.67	92.39	86.03	80.64	71.50	65.23

表 9

配方	孵育时间						
	Time 0	T=3 天	T=7 天	T=10 天	T=2 星期	T=6 星期	T=12 星期
T80S	95.96	93.75	92.68	88.57	87.98	68.58	48.84
H50S	96.14	95.38	95.52	94.70	97.08	92.18	88.45
H60S	95.88	94.32	94.77	94.65	94.08	90.20	84.80
H70S	95.78	92.66	93.84	90.72	90.95	-	70.83
H80S	95.88	94.11	93.23	90.94	89.66	77.82	67.64
P60S	96.49	94.62	94.82	94.18	93.44	86.25	81.09
P70S	96.04	94.98	94.14	92.41	94.37	82.67	71.11
A50S	96.02	95.13	95.57	94.68	96.35	92.78	89.30



pH 评定 - 在 37 °C 孵育指定时间后通过  
阳离子交换色谱测定的主峰百分数

5

表 10

配方	孵育时间					
	T=0	T=2 星期	T=4 星期	T=8 星期	T=12 星期	T=17 星期
A40S	81.17	73.84	69.66	53.96	43.09	41.14
S35S	82.64	72.97	67.10	52.36	45.84	37.70
S40S	82.16	74.54	70.95	53.81	44.63	34.96
S50S	82.86	75.30	67.91	58.14	49.48	41.49
H60S	82.32	79.60	75.57	70.77	65.47	-
I60S	83.72	80.20	77.95	72.15	64.05	66.01
T40S	79.23	30.25	27.58	19.37	11.92	-
E40S	82.37	75.53	69.71	59.80	50.91	47.72

表 11

配方	孵育时间							
	Time 0	T=3 天	T=7 天	T=10 天	T=2 星期	T=3 星期	T=6 星期	T=12 星期
T80S	87.44	80.38	78.04	76.41	72.76	71.28	54.49	-
H50S	84.42	83.70	83.86	83.23	82.16	78.52	76.07	70.85
H60S	87.86	86.81	85.40	84.56	82.00	78.90	80.64	73.71
H70S	82.99	83.33	81.35	81.01	79.55	72.70	67.95	56.91
H80S	84.08	84.72	81.49	82.17	77.28	64.21	68.21	54.79
P60S	85.68	84.58	83.73	83.22	79.15	75.87	73.38	60.93
P70S	87.60	78.70	82.50	84.04	78.99	77.85	78.90	69.18
A50S	83.00	84.54	81.65	83.81	81.54	77.68	79.50	72.22



### 实施例 3

#### mpl 配体浓度的评定

- 5 A. 起始材料: PEG-rHuMGDF
- B. 配方:
- |                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇, 2.0mg/ml | (20A5S) |
| 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇, 1.0mg/ml | (10A5S) |
| 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇, 0.5mg/ml | (05A5S) |
| 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇, 0.2mg/ml | (02A5S) |
- 10
- C. 管瓶:以指定的蛋白质浓度装入 3cc 管瓶 1mL。
- D. 温度和时间点:37 °C; 时间点表中给出。
- E. 分析:HPLC: SEC, RP, IEX。
- 15 F. 数据

表 12 - 14 给出在 37 °C 孵育指定时间后通过大小排阻, 反相和阳离子交换色谱测定的主峰百分数。

#### 20 mpl 配体浓度评定 - 在 37 °C 孵育指定时间后的主峰百分数

表 12  
大小排阻色谱

配方	孵育时间						
	T=0	T=1 星期	T=2 星期	T=3 星期	T=4 星期	T=8 星期	T=12 星期
02A5S	94.44	94.86	93.84	94.53	94.51	93.90	92.74
05A5S	94.11	93.78	92.86	93.25	93.40	91.55	90.11
10A5S	93.96	92.60	91.69	91.74	91.32	89.20	86.89
20A5S	93.81	91.50	90.25	90.20	89.55	86.89	83.59

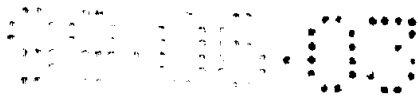


表 13  
反相色谱

配方	解育时间						
	T=0	T=1 星期	T=2 星期	T=3 星期	T=4 星期	T=8 星期	T=12 星期
02A5S	94.53	93.41	93.28	92.16	91.05	88.89	87.90
05A5S	94.73	94.44	93.30	92.41	91.97	89.18	85.97
10A5S	94.86	94.56	93.25	92.39	91.98	88.06	87.62
20A5S	94.67	94.12	93.07	92.47	91.79	88.37	87.07

表 14  
阳离子交换色谱

5

配方	解育时间					
	T=0	T=1 星期	T=2 星期	T=4 星期	T=8 星期	T=12 星期
02A5S	79.40	65.75	78.56	79.80	74.42	59.74
05A5S	78.22	67.44	80.26	81.10	76.27	61.39
10A5S	-	66.18	80.80	82.02	75.81	60.72
20A5S	79.52	76.71	82.09	81.38	74.26	60.89



实施例 4  
赋形剂评定

- 5 A. 起始材料: PEG-rHuMGDF  
B. 配方:
- |    |                          |         |
|----|--------------------------|---------|
|    | 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇  |         |
|    | 5mM EDTA                 | (A5SE)  |
|    | 10mM 乙酸盐, pH5.0, 2%丙氨酸   | (A5A)   |
| 10 | 10mM 乙酸盐, pH5.0, 1.6%甘氨酸 | (A5G)   |
|    | 10mM 乙酸盐, pH5.0, 2.7%脯氨酸 | (A5P)   |
|    | 10mM 乙酸盐, pH5.0, 3.5%赖氨酸 | (A5K)   |
|    | 10mM 乙酸盐, pH5.0, 4.3%精氨酸 | (A5R)   |
|    | 10mM 谷氨酸盐, pH5.0, 9.3%蔗糖 | (E5S u) |
| 15 | 10mM 谷氨酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇 | (E5S)   |
- C. 管瓶:以 0.5mg/ml 蛋白质浓度装入 3cc 管瓶 1mL。  
D. 温度和时间点:37 °C; 时间点表中给出。  
E. 分析:HPLC: SEC, RP, IEX。  
20 F. 数据

表 15 - 17 给出在 37 °C 孵育指定时间后通过大小排阻, 反相和阳离子交换色谱测定的主峰百分数。



赋形剂评定 - 在 37 °C 孵育指定时间后的主峰百分数

5

表 15  
大小排阻色谱

配方	孵育时间				
	T=0	T=2 星期	T=4 星期	T=8 星期	T=12 星期
A5R	84.71	21.83	19.01	12.30	-
E5Su	94.30	91.40	91.95	88.36	86.52
A5G	94.57	91.22	91.43	92.26	84.50
A5K	86.75	17.24	15.02	9.76	-
A5SE	93.08	60.01	54.53	43.22	37.75
A5P	94.66	91.97	92.16	87.63	85.05
E5S	94.78	93.07	93.55	90.68	92.28
A5A	94.55	91.57	92.18	88.13	85.89

表 16  
阳离子交换色谱

配方	孵育时间				
	T=0	T=2 星期	T=4 星期	T=8 星期	T=12 星期
A5R	82.26	28.41	21.32	11.71	-
E5Su	84.93	86.22	88.62	72.16	65.04
A5G	86.17	81.90	66.81	18.95	26.45
A5K	80.88	20.18	14.23	8.75	-
A5SE	84.56	62.75	56.40	36.31	30.38
A5P	86.73	87.58	86.22	69.34	65.76
E5S	87.49	90.23	88.83	75.55	70.01
A5A	86.28	81.31	86.10	70.29	63.69



表 17  
反相色谱

配方	孵育时间			
	T=0	T=2 星期	T=4 星期	T=12 星期
A5R	95.96	92.35	85.68	-
E5Su	96.10	94.57	91.59	77.92
A5G	95.71	69.61	39.86	-
A5K	95.81	88.93	81.30	-
A5SE	95.98	93.60	90.01	-
A5P	95.67	92.98	89.96	78.85
E5S	95.64	93.98	90.61	83.90
A5A	95.78	90.38	86.52	70.00

实施例 5  
等渗性评定

5

A. 起始材料: PEG-rHuMGDF

B. 配方:

- 10mM 乙酸盐, pH5.0, 9.3%蔗糖 (A5SU)
- 10 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%甘露糖醇 (A5MA)
- 10mM 乙酸盐, pH5.0, 140mM 氯化钠 (A5N)
- 10mM 乙酸盐, pH5.0, 2%PEG8000 (A5P8)
- 10mM 乙酸盐, pH5.0, 2.5%甘油 (A5G)
- 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇,
- 15 0.01%Tween 20 (A5ST)
- 10mM 组氨酸, pH6.0, 5%山梨糖醇 (H6S)
- 10mM 组氨酸, pH6.0, 5%山梨糖醇,
- 0.001%抗坏血酸 (H6AA)

20 C. 管瓶:以 0.5mg/ml 蛋白质浓度装入 3cc 管瓶 1mL。



- D. 温度和时间点:37 °C; 时间点在表中给出。
- E. 分析:HPLC: SEC, RP, IEX。
- F. 数据

5 表 18 - 20 给出在 37 °C 孵育指定时间后通过大小排阻, 反相和阳离子交换色谱测定的主峰百分数。

等渗性评定 - 在 37 °C 孵育指定时间后的主峰百分数

10

表 18  
大小排阻色谱

配方	孵育时间						
	T=0	T=3.5 天	T=1 星期	T=2 星期	T=3 星期	T=7 星期	T=12 星期
H6S	96.70	96.23	96.30	95.95	95.77	93.37	91.03
H6Aa	96.75	95.66	96.03	95.72	95.29	93.32	90.61
A5N	83.54	30.42	28.04	24.64	20.19	17.62	-
A5Ma	96.55	95.14	95.22	95.02	95.13	93.08	91.42
A5Su	96.36	95.18	95.37	95.16	95.60	93.49	91.89
A5G	96.46	95.29	95.49	95.20	95.59	93.23	91.68
A5P8	94.88	92.89	92.89	92.61	91.62	92.78	82.05
A5ST	96.25	94.83	94.50	94.58	94.37	91.16	87.68

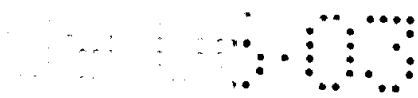


表 19  
反相色谱

配方	孵育时间					
	T=0	T=3.5 天	T=1 星期	T=2 星期	T=7 星期	T=12 星期
H6S	95.49	94.39	94.69	85.55	87.60	85.62
H6Aa	95.64	92.00	90.67	93.02	74.22	66.22
A5N	94.94	93.99	92.19	89.52	68.67	-
A5Ma	95.90	95.05	95.29	94.34	90.13	87.22
A5Su	95.55	95.39	94.78	93.47	88.19	82.88
A5G	95.57	94.78	95.51	94.88	90.04	88.64
A5P8	94.75	91.31	87.07	76.93	13.41	-
A5ST	94.57	93.24	93.90	82.75	87.61	85.45

5

表 20  
阳离子交换色谱

配方	孵育时间						
	T=0	T=3.5 天	T=1 星期	T=2 星期	T=3 星期	T=7 星期	T=12 星期
H6S	87.13	85.79	84.67	82.66	82.77	79.32	59.35
H6Aa	85.12	80.75	79.31	75.99	75.23	64.62	45.93
A5N	79.98	39.01	29.14	25.03	20.77	14.67	-
A5Ma	84.73	84.37	84.43	81.92	83.07	78.17	58.52
A5Su	82.98	84.83	83.46	80.76	81.09	76.61	56.85
A5G	82.79	84.69	85.09	81.73	81.61	76.98	59.03
A5P8	85.65	82.26	81.74	77.41	74.77	53.74	4.80
A5ST	85.02	83.83	83.95	80.02	79.79	74.56	55.85



实施例 6  
抗氧化剂/螯合剂评定

- A. 起始材料: PEG-rHuMGDF
- 5 B. 配方:
- |                            |            |           |
|----------------------------|------------|-----------|
| 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇    | 3mM 谷胱甘肽   | (A5S GT)  |
| 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇    | 5mM 甲硫氨酸   | (A5S M)   |
| 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇    | 5mM 甲硫氨酸   |           |
| 1mM EDTA                   |            | (A5S ME)  |
| 10 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇 | 1mM 柠檬酸盐   | (A5S C)   |
| 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇    | 0.5mM 柠檬酸盐 | (A5S 05C) |
| 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇    | 1mM EDTA   | (A5S 1E)  |
| 10mM 乙酸盐, pH5.0, 5%山梨糖醇    | 0.5mM EDTA | (A5S E)   |
- 15 C. 管瓶:以 0.5mg/ml 蛋白质浓度装入 3cc 管瓶 1mL。  
D. 温度和时间点:37 °C; 时间点表中给出。  
E. 分析:HPLC: SEC, RP, IEX。  
F. 数据
- 20 表 21 - 23 给出在 37 °C 保温指定时间后通过大小排阻, 反相和阳离子交换色谱测定的主峰百分数。



抗氧化剂/螯合剂评定 - 在 37 °C 保温指定时间后的主峰百分数

5

表 21  
大小排阻色谱

配方	孵育时间			
	T=0	T=2 星期	T=4 星期	T=9 星期
A5SGT	16.69	12.32	8.03	5.91
A5SM	94.53	91.03	89.72	89.00
A5SME	94.88	92.15	90.73	85.74
A5SC	94.30	90.83	88.14	79.61
A5S05C	93.96	90.95	88.98	-
A5S1E	94.88	90.75	89.15	80.63
A5SE	94.80	91.72	89.89	82.06

表 22  
反相色谱

配方	孵育时间				
	T=0	T=2 星期	T=4 星期	T=9 星期	T=12 星期
A5SGT	5.69	2.37	2.80	2.60	2.50
A5SM	94.70	91.59	88.67	88.55	86.83
A5SME	94.54	87.66	91.36	81.97	80.39
A5SC	93.98	81.13	90.33	68.01	62.91
A5S05C	94.43	87.01	84.30	79.83	76.35
A5S1E	94.36	86.84	76.43	89.93	84.56
A5SE	94.75	90.27	85.64	81.20	78.96

10

表 23  
阳离子交换色谱

配方	孵育时间			
	T=0	T=2 星期	T=4 星期	T=9 星期
A5SGT	4.66	5.15	0.0	-
A5SM	84.69	81.18	80.96	72.95
A5SME	84.93	78.36	78.26	69.48
A5SC	85.23	72.11	66.46	54.68
A5S05C	86.06	78.00	72.53	66.06
A5S1E	85.38	77.00	76.42	66.21
A5SE	86.51	80.07	77.93	69.79

实施例 7

去污剂评定

5

A. 起始材料: PEG-rHuMGDF

B. 配方:

所有的形式含有 10mM 乙酸盐, pH5.0, 和 5%山梨糖醇和  
10 0.050mg/ml PEG-rHuMGDF。

004T20: 0.004mg/ml Tween-20

006T20: 0.006mg/ml Tween-20

010T20: 0.010mg/ml Tween-20

15 040T20: 0.040mg/ml Tween-20

060T20: 0.060mg/ml Tween-20

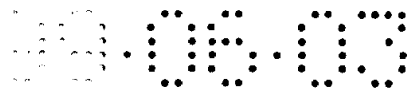
004T80: 0.004mg/ml Tween-80

006T80: 0.006mg/ml Tween-80

010T80: 0.010mg/ml Tween-80

20 040T80: 0.040mg/ml Tween-80

060T80: 0.060mg/ml Tween-80



C. 数据

表 24 给出以主峰百分数为基础的反相 HPLC 纯度的结果。

表 24  
反相色谱

5

配方	在 37 摄氏度的孵育时间				
	T=0	T=2 星期	T=4 星期	T=6 星期	T=12 星期
A5S	94.66	94.05	90.67	90.90	89.07
004T20	94.68	94.79	91.25	91.02	88.49
006T20	94.69	93.99	91.48	90.46	88.43
010T20	94.89	94.30	91.33	90.76	88.47
040T20	94.59	92.95	90.63	89.88	87.58
060T20	94.61	92.62	90.57	89.49	86.72
004T80	94.44	94.35	90.91	90.80	88.48
006T80	94.43	94.05	91.01	90.18	88.08
010T80	94.89	94.22	90.69	90.22	88.04
040T80	94.45	92.64	89.74	89.26	86.56
060T80	94.19	88.38	88.67	87.64	84.53

D. 结果:

去污剂例如 Tween 可以包含在 PEG-rHuMGDF 配方中以提高物理稳定性, 并且在化学稳定性没有不利影响下回收。 Tween-20 和 Tween-80 可以以最多大约 0.060mg/ml 的终浓度加入到 PEG-rHuMGDF 配方中而没有引起过量的甲硫氨酸的氧化。 Tween-20 和 Tween-80 在 0.006mg/ml 至 0.060mg/ml 的浓度范围中最有效。

实施例 8

冻干的组合物

5 下面的表 25 总结了对于含有 mpl 配体的冻干的组合物获得的数据。在这些实施例的每一个中，试验的 mpl 配体是 PEG-rHuMGDF，其包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 - 163，用平均分子量大约 20 kDa 的聚乙二醇基团在 N - 末端氨基酸的  $\alpha$  氨基处 -PEG 基化。对于表 25 - 27，在分析前用大约 1ml 注射用水再次配制冻干的 PEG-rHuMGDF，并且主峰百分数代表作为冻干结果的 PEG-rHuMGDF 的回收率。

10

表 25

配方	SEC 测定的主峰百分数%
10mM 组氨酸, 5%甘露糖醇	88
10mM 组氨酸, 4%甘露糖醇, 1%蔗糖	93

注:mpl 配体浓度是 0.5mg/ml。

15 对于冻干的样品，根据大小排阻所测定的 pH6，7 和 8 时，物理稳定性没有增加。

研究的蔗糖浓度范围：

表 26

蔗糖浓度	SEC 测定的主峰百分数%
2%	91
4%	94
5%	97
6%	95

20 研究的缓冲液的范围（10mM 浓度）：



表 27

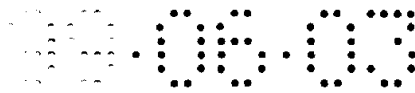
配方	SEC,HPLC 测定的主峰百分数%
组氨酸, 3.8%甘露糖醇, 2%蔗糖, pH5	87
柠檬酸盐, 3.8%甘露糖醇, 2%蔗糖, pH5	87
乙酸盐, 3.8%甘露糖醇, 2%蔗糖, pH5	79
琥珀酸盐, 3.8%甘露糖醇, 2%蔗糖, pH5	88
MES, 3.8%甘露糖醇, 2%蔗糖, pH5	88
磷酸盐, 3.8%甘露糖醇, 2%蔗糖, pH7	87
磷酸盐, 3.8%甘露糖醇, 0.5%甘氨酸, pH7	80

所有的稳定剂例如氨基酸（例如等渗精氨酸，赖氨酸，脯氨酸和组氨酸）和非晶形试剂（例如海藻糖和 PEG）在冻干期间没有表现出提高的稳定性。

具有最好主峰回收率和最低凝聚水平的配方：

10mM 谷氨酸盐， 6%蔗糖， 2%甘露糖醇， pH5.0

虽然用优选的实施方案描述了本发明，但是不限于公开的实施方案，相反，意要覆盖各种各样的附加权利要求书精神和范围内的修饰和等价物，其范围记录最宽的解释可包括所有这样的修饰和等价物。



## 序列表

### (1)一般信息:

(i)申请人: AMGEN INC.

(ii)发明题目: 含有 mpl 配体的药物组合物

5 (iii)序列数: 2

(iv)联系地址:

(A)住址: AMGEN INC.

(B)街道: 1849 DeHavilland Drive

(C)城市: Thousand Oaks

10 (D)州: California

(E)国家: 美国

(F)邮编(ZIP): 91320-1789

(v)计算机可读形式:

(A)Floppy 盘

15 (B)计算机: IBM PC 兼容

(C)操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D)软盘:Patent In Release #1.0 , Version #1.30

(vi)当前申请数据:

(A)申请号: US(还没有登记)

20 (B)申请日: 04-10-1996

(C)分类:

(viii)代理人/事务所信息:

(A)名称: COOK Ph.D., Robert R.

(B)登记号: 31602

25 (C)参考/记录号: A-412

### (2)SEQ ID NO: 1 的信息:

(i)序列特征:

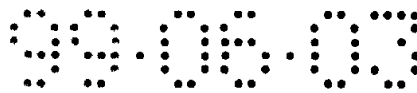
(A)长度: 1342 个碱基对

(B)类型: 核酸

30 (C)链数: 未知

(D)拓扑学: 未知

(ii)分子类型: cDNA



(ix)特征:

(A)名词/关键词: CDS

(B)位置: 36..1097

(ix)特征:

5 (A)名词/关键词: mat - 肽

(B)位置: 99..1097

(ix)特征:

(A)名词/关键词: sig - 肽

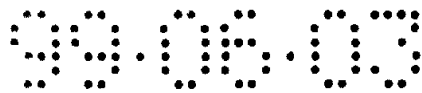
(B)位置: 36..98

10 (xi)序列描述:SEQ ID NO: 1:

CAGGGAGCCA CGCCAGCCAA GACACCCCGG CCAGA ATG GAG CTG ACT GAA TTG	53
Met Glu Leu Thr Glu Leu	
-21 -20	
CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA AGG CTA ACG CTG TCC AGC	101
Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser	
-15 -10 -5 1	
CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT	149
Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg	
5 10 15	
GAC TCC CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC	197
Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His	
20 25 30	
CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA	245
Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly	
35 40 45	
GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA	293
Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly	
50 55 60 65	
GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG	341
Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu	
70 75 80	
GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC	389
Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val	
85 90 95	
CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT	437
Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro	
100 105 110	
CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG	485
Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu	
115 120 125	



AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG CTT GTA	533
Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val	
130 135 140 145	
GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA GCT GTC	581
Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val	
150 155 160	
CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC CTC ACA CTG AAC GAG CTC CCA AAC AGG	629
Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro Asn Arg	
165 170 175	
ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACA AAC TTC ACT GCC TCA GCC AGA ACT ACT	677
Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg Thr Thr	
180 185 190	
GGC TCT GGG CTT CTG AAG TGG CAG CAG GGA TTC AGA GCC AAG ATT CCT	725
Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys Ile Pro	
195 200 205	
GGT CTG CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTG GAC CAA ATC CCC GGA TAC	773
Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly Tyr	
210 215 220 225	
CTG AAC AGG ATA CAC GAA CTC TTG AAT GGA ACT CGT GGA CTC TTT CCT	821
Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe Pro	
230 235 240	
GGA CCC TCA CGC AGG ACC CTA GGA GCC CCG GAC ATT TCC TCA GGA ACA	869
Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly Thr	
245 250 255	
TCA GAC ACA GGC TCC CTG CCA CCC AAC CTC CAG CCT GGA TAT TCT CCT	917
Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser Pro	
260 265 270	
TCC CCA ACC CAT CCT CCT ACT GGA CAG TAT ACG CTC TTC CCT CTT CCA	965
Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu Pro	
275 280 285	
CCC ACC TTG CCC ACC CCT GTG GTC CAG CTC CAC CCC CTG CTT CCT GAC	1013
Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro Asp	
290 295 300 305	
CCT TCT GCT CCA ACG CCC ACC CCT ACC AGC CCT CTT CTA AAC ACA TCC	1061
Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr Ser	
310 315 320	
TAC ACC CAC TCC CAG AAT CTG TCT CAG GAA GGG TAA GGTTCTCAGA	1107
Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly *	
325 330	
CACTGCCGAC ATCAGCATTG TCTCGTGTAC AGCTCCCTTC CCTGCAGGGC GCCCCTGGGA	1167



GACAACTGGA CAAGATTTCC TACTTTTCTCC TGAAACCCAA AGCCCTGGTA AAAGGGATAC 1227  
 ACAGGACTGA AAAGGGAATC ATTTTTTCACT GTACATTATA AACCTTCAGA AGCTATTTTTT 1287  
 TTAAGCTATC AGCAATACTC ATCAGAGCAG CTAGCTCTTT GGTCTATTTTT CTGCA 1342

5

(2)SEQ ID NO: 2 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 354 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑学: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 2:

10

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala  
 -21 -20 -25 -10

15

Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val  
 -5 1 5 10

Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser  
 15 20 25

Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala  
 30 35 40

Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys  
 45 50 55

Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met  
 60 65 70 75

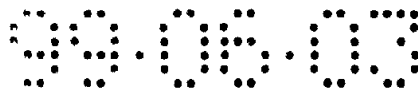
Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly  
 80 85 90

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu  
 95 100 105

Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp  
 110 115 120

Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val  
 125 130 135

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala  
 140 145 150 155



5

Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu  
160 165 170

Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr  
175 180 185

Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly  
190 195 200

Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu  
205 210 215

Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly  
220 225 230 235

Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro  
240 245 250

Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu  
255 260 265

Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr  
270 275 280

Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu  
285 290 295

His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser  
300 305 310 315

Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu  
320 325 330

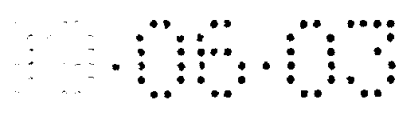
Gly \*

# 说 明 书 附 图

1 -21	CAGGGAGCCACGCCAGCCAAGACACCCCGCCAGAAATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTC MetGluLeuThrGluLeuLeuLeu	59 -14
60 -13	GTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCCGGCTCCTCGCTTGT ValValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProProAlaCys	119 7
120 8	GACCTCCGAGTCCAGTAAACTGCTTTCGTGACTCCCATGTCTCCTTCACAGCAGACTGAGC AspLeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSer	179 27
180 28	CAGTGCCCCAGAGGTTTACCCCTTTGCCCTACACCTGTCTCCTGCTGCCTGTGTGGACTTTAGC GlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSer	239 47
240 48	TTGGGAGAAATGGAAACCAGATGGAGGAGACCAAGGCACAGGACATTTCTGGGAGCAGTG LeuGlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaVal	299 67
300 68	ACCCTTCTGCTGGAGGGAGTGATGGCAGCACGGGGACAACCTGGGACCCACTTGCCCTCTCA ThrLeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSer	359 87
360 88	TCCCTCCTGGGCAGCTTTCTGGACAGGTCCCGTCTCCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTC SerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeu	419 107

图 1A

420	CTTGGAAACCCAGCTTCCCTCACAGGGCAGGACCACAGCTCACAAAGGATCCCAATGCCATCC	479
108	LeuGlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIle	127
480	TTCCCTGAGCTTCCAACACCTGCTCCGAGGAAAGGTGCGTTTCCCTGATGCTTGTAGGAGGG	539
128	PheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysValArgPheLeuMetLeuValGlyGly	147
540	TCCACCCTCTGCGTCAGGGGGCCCCACCACACAGCTGTCCCCAGCAGAACCTCTCTA	599
148	SerThrLeuCysValArgArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeu	167
600	GTCCTCACACTGAACGAGCTCCCAAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAAACTTCACT	659
168	ValLeuThrLeuAsnGluLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThr	187
660	GCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGGGATTTCAGAGCCCAAG	719
188	AlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGlyPheArgAlaLys	207
720	ATTCCCTGGTCTGCTGAACCAACCTCCAGGTCCCTGGACCCAAATCCCCGGATACCTGAAC	779
208	IleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsn	227
780	AGGATACACGAACTTGAATGGAACTCGTGGACTTTCCTGGACCCCTCACGCAGGACC	839
228	ArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThrArgGlyLeuPheProGlyProSerArgArgThr	247



840 CTAGAGCCCCGGACATTTCCCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCCCAACCTC 899  
 248 LeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeu 267  
 900 CAGCCTGGATATTCCTTCCCTCCCAACCCATCCCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCT 959  
 268 GlnProGlyTyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPhePro 287  
 960 CTTCCACCCACCTTGCCCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCTGCTTCCCTGACCCCTTCT 1019  
 288 LeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeuProAspProSer 307  
 1020 GCTCCAACGCCCCACCCCTACCAGCCCTCTCTAAACACATCCTACACCCACTCCCAGAAT 1079  
 308 AlaProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsn 327  
 1080 CTGTCTCAGGAAGGGTAAGGTTCTCAGACACTGCCCGACATCAGCATTGTCTCGTGTACAG 1139  
 328 LeuSerGlnGlyEnd 332  
 1140 CTCCTTCCCTGCAGGGCCCCCTGGGAGACAACCTGGACAAGATTTCCTACTTCTCCTG 1199  
 1200 AAACCCAAAGCCCTGGTAAAGGGATACACAGGACTGAAAAGGGAATCATTTCACCTGT 1259  
 1260 ACATTATAAACCTTCAGAGCTATTTTTTTAAGCTATCAGCAATACTCATCAGAGCAGCT 1319  
 1320 AGCTCTTTGGTCFATTTCTGCA 1342

ω

