



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101193658 B

(45) 授权公告日 2011.08.31

(21) 申请号 200680019558.8

(22) 申请日 2006.05.26

(30) 优先权数据

60/686,726 2005.06.01 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.12.03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DK2006/000292 2006.05.26

(87) PCT申请的公布数据

WO2006/128460 EN 2006.12.07

(73) 专利权人 马克西根控股公司

地址 英属开曼群岛

(72) 发明人 卡斯滕·杰曼森 博比·索尼

格雷思·拉斯马森

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

(56) 对比文件

EP 0401384 A1, 1990.12.12, 说明书第1页
倒数第2段到第2页第2段, 第7页第2段.

CN 1401101 A, 2003.03.19, 说明书第11页
第3段到第4页第1段, 第10页第4段到第44
页第1段, 说明书第48页第2段到第49页第4
段, 实施例8-14.

US 20030204057 A1, 2003.10.30, 第1页左
栏第8段到第2页右栏第43段.

WO 0236626 A1, 2002.05.10, 说明书31页第
2段, 32页第4段, 第57页第3段, 第66页第3
段, 第79-81页实施例8.

审查员 张宇腾

权利要求书 1 页 说明书 20 页

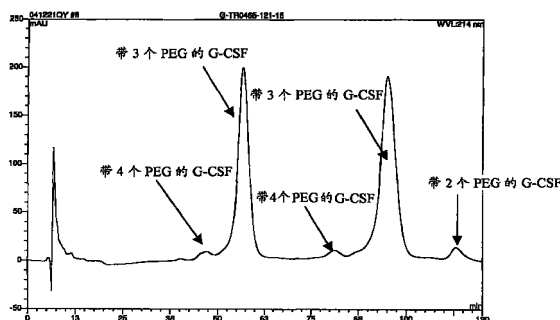
序列表 1 页 附图 4 页

(54) 发明名称

聚乙二醇化 G-CSF 多肽及其产生方法

(57) 摘要

本发明涉及用于增加聚乙二醇化 G-CSF 多肽稳定性和均匀性的方法, 所述多肽具有至少一个连接于赖氨酸残基 ϵ -氨基或 N 末端氨基的 PEG 部分和至少一个连接于羟基的 PEG 部分, 所述方法包括以一段适合于去除连接于羟基的 PEG 部分的时间对所述多肽施加 8.0 以上的高 pH, 再将 pH 降低至大约 8.0 或更低; 本发明还涉及根据所述方法产生的聚乙二醇化 G-CSF 多肽和组合物, 以及使用所述聚乙二醇化 G-CSF 多肽和组合物增加患者中嗜中性粒细胞水平的方法。



1. 一种组合物,其包含聚乙二醇化 G-CSF 多肽的 PEG 位置异构体的混合物,其中所述多肽相对于野生型人 G-CSF 包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K,并且其中所述多肽的至少 80% 的 PEG 位置异构体是连接有三个 PEG 部分的赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体,且其中所述连接有三个 PEG 部分的 PEG 位置异构体中的至少 80% 由两种 PEG 位置异构体组成,其中一种异构体在 N 末端、Lys23 和 Lys159 连接有 PEG 部分,另一种异构体在 N 末端、Lys105 和 Lys159 连接有 PEG 部分。

2. 权利要求 1 的组合物,其中所述多肽的至少 85% 的 PEG 位置异构体是连接有三个 PEG 部分的赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体,且其中所述连接有三个 PEG 部分的 PEG 位置异构体中的至少 85% 由两种 PEG 位置异构体组成,其中一种异构体在 N 末端、Lys23 和 Lys159 连接有 PEG 部分,另一种异构体在 N 末端、Lys105 和 Lys159 连接有 PEG 部分。

3. 权利要求 1 的组合物,其中所述多肽的至少 90% 的 PEG 位置异构体是连接有三个 PEG 部分的赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体,且其中所述连接有三个 PEG 部分的 PEG 位置异构体中的至少 90% 由两种 PEG 位置异构体组成,其中一种异构体在 N 末端、Lys23 和 Lys159 连接有 PEG 部分,另一种异构体在 N 末端、Lys105 和 Lys159 连接有 PEG 部分。

4. 一种组合物,其包含药用载体和根据权利要求 1-3 任一项的组合物。

5. 一种产生重组 G-CSF 多肽的赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体的混合物的方法,所述多肽相对于野生型人 G-CSF 包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K,所述方法包括:

a) 在宿主细胞中表达重组 G-CSF 多肽;

b) 分离所述重组 G-CSF 多肽;

c) 使分离的重组 G-CSF 多肽与胺特异性活化 PEG 反应以产生所述重组 G-CSF 多肽的多种 PEG 位置异构体,其中所述胺特异性活化 PEG 是 mPEG-琥珀酰亚胺丙酸酯 (mPEG-SPA); 和

d) 将所述多种 PEG 位置异构体在 9.0 至 10.0 的 pH 范围内反应 12 小时至 30 小时的时间以产生所述重组 G-CSF 多肽的多种部分脱聚乙二醇化赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体,其中混合物中的部分脱聚乙二醇化赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体的至少 80% 是连接有三个 PEG 部分的赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体,且其中所述连接有三个 PEG 部分的 PEG 位置异构体中的至少 80% 由两种 PEG 位置异构体组成,其中一种异构体在 N 末端、Lys23 和 Lys159 连接有 PEG 部分,另一种异构体在 N 末端、Lys105 和 Lys159 连接有 PEG 部分。

6. 权利要求 5 的方法,其中在所述步骤 d) 中多个 PEG 位置异构体在 9.2 至 9.8 范围的 pH 反应 12 小时至 30 小时的时间。

7. 权利要求 5-6 中任一项的方法,进一步包括对所述重组 G-CSF 多肽的多种赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体施以一个或多个层析纯化步骤,以产生该重组 G-CSF 多肽的赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体的基本上纯化的混合物。

8. 权利要求 7 的方法,进一步包括将所述重组 G-CSF 多肽的赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体的基本上纯化的混合物以有效剂量与至少一种药用赋形剂组合,以产生药用组合物。

9. 根据权利要求 1-3 中任一项的组合物在制备用于在患有或有风险患上嗜中性粒细胞水平不足的患者中提高嗜中性粒细胞水平的药物中的用途。

10. 根据权利要求 9 的用途,其中所述嗜中性粒细胞水平不足是化疗或放射治疗的结果。

聚乙二醇化 G-CSF 多肽及其产生方法

发明领域

[0001] 本发明涉及从聚乙二醇化 (PEGylated) G-CSF 蛋白中去除不稳定的聚乙二醇部分 (PEG moieties) 以增加稳定性和均匀性的方法, 并且涉及所得的聚乙二醇化 G-CSF 蛋白。本发明还涉及包含所述聚乙二醇化蛋白的药用组合物和通过施用该药用组合物进行治疗的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 将聚乙二醇 (PEG) 部分共价连接于蛋白质或多肽 (“聚乙二醇化”) 是用于改进这些蛋白质或多肽尤其是药用蛋白的性质的公知方法, 例如为了改善循环半衰期和 / 或为了屏蔽潜在表位从而减少发生不期望的免疫应答的潜在可能。有许多基于活化 PEG 的技术可用来提供 PEG 部分对蛋白质上一种或多种基团的连接。例如, 通常认为 mPEG-琥珀酰亚胺丙酸酯 (mPEG-succinimidylpropionate; mPEG-SPA, 可从 Nektar Therapeutics 获得) 通过酰胺键选择性连接于 N 末端和赖氨酸残基的 ϵ -氨基。然而, 在实践中 mPEG-SPA 并不总是专一地连接于这些基团, 而是还有可能通过酯键连接于丝氨酸、酪氨酸或苏氨酸残基的羟基。结果是, 使用这种技术制备的聚乙二醇化蛋白可能不具有足够的均匀度, 并且可能除了需要的 PEG 之外还包含许多不同的 PEG 异构体。这是人们所不期望的, 原因有很多, 其中之一是这使得表征这些蛋白质更加复杂。另外, 结合于目的基团之外的基团的 PEG 部分可能是相对不稳定的。例如, 在胺特异性 PEG 例如 mPEG-SPA 的情况下, 通过酯键结合于羟基的 PEG 部分与那些通过酰胺键结合于 N 末端或赖氨酸残基的部分相比倾向于相对不稳定。取决于配制和贮存条件, 这可能导致这些不稳定 PEG 基团发生不期望的损失, 并从而潜在可能导致所述聚乙二醇化蛋白的性质随着时间推移发生改变。此外, 对于聚乙二醇化蛋白药物而言可能有潜在的监管或安全性上的问题: 所述药物施用于患者之后, 存在一个或多个 PEG 部分在体内从蛋白质上脱离的风险。

[0004] 本发明通过提供将这些不稳定 PEG 基团简单去除的方法来应对这些问题, 由此产生更均匀和稳定的聚乙二醇化蛋白产品。

[0005] 发明简述

[0006] 本发明一般性地涉及用于增加聚乙二醇化多肽的稳定性和均匀性的方法, 所述多肽具有至少一个连接于赖氨酸残基或 N 末端的 PEG 部分和至少一个连接于羟基的 PEG 部分, 所述方法包括以一段适合于去除连接于羟基的 PEG 部分的时间对所述多肽施加改变的 pH, 之后将该 pH 调节至适合于长期贮存所述多肽的 pH。

[0007] 在一个具体的方面, 本发明涉及一种增加聚乙二醇化粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 多肽的稳定性和均匀性的方法, 所述多肽具有至少一个连接于赖氨酸残基的 ϵ -氨基或 N 末端氨基的 PEG 部分, 和至少一个连接于羟基的 PEG 部分, 所述方法包括以一段适合于去除连接于羟基的 PEG 部分的时间对所述多肽施加 8.0 以上的高 pH, 然后将 pH 降低至大约 8.0 或更低。

[0008] 本发明的另一方面涉及一种产生聚乙二醇化 G-CSF 多肽的方法, 包括使 G-CSF 多肽与胺特异性活化聚乙二醇 (amine-specific activated PEG) 进行聚乙二醇化反应, 以产

生聚乙二醇化多肽中间体,随后以一段适合于去除连接于羟基的 PEG 部分的时间对所述聚乙二醇化多肽中间体施加至少大约 9.0 的高 pH,以产生聚乙二醇化 G-CSF 多肽。

[0009] 本发明的另一方面涉及一种组合物,它包含聚乙二醇化 G-CSF 多肽变体的 PEG 位置异构体 (positional PEG isomer) 的均质混合物 (homogeneous mixture),其中所述混合物中至少大约 80% 的 PEG 位置异构体由两种 PEG 位置异构体组成,每一种都具有由两个结合于赖氨酸的 ϵ -氨基的 PEG 部分和一个结合于 N 末端氨基的 PEG 部分组成的 PEG 部分。

[0010] 本发明的另一方面涉及一种组合物,它包含聚乙二醇化 G-CSF 多肽的 PEG 位置异构体的混合物,其中所述多肽相对于野生型人 G-CSF (SEQ ID NO :1) 包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K,且其中所述多肽的至少大约 80% 的 PEG 位置异构体是连接有三个 PEG 部分的赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体。

[0011] 在本发明的另一方面涉及一种产生重组 G-CSF 多肽的赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体的混合物的方法,所述重组 G-CSF 多肽相对于野生型人 G-CSF 包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K,所述方法包括 :a) 在宿主细胞中表达重组 G-CSF 多肽 ;b) 分离所述重组 G-CSF 多肽 ;c) 将所述分离的重组 G-CSF 多肽与胺特异性活化 PEG 反应以产生该重组 G-CSF 多肽的多种 PEG 位置异构体 ;d) 将所述多种 PEG 位置异构体在 8.5 至 10.5 的 pH 进行反应以产生所述重组 G-CSF 多肽的多种部分脱聚乙二醇化的 (partially dePEGylated) 赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体。

[0012] 本发明的其它方面涉及使用本文所述方法产生的聚乙二醇化 G-CSF 多肽和以它们的 PEG 位置异构体分布为特征的聚乙二醇化 G-CSF 多肽及包含这些聚乙二醇化 G-CSF 多肽的组合物,以及在患有或有风险患上嗜中性粒细胞水平不足 (insufficient neutrophil level) 的患者中通过施用本发明的聚乙二醇化 G-CSF 多肽或组合物来提高嗜中性粒细胞水平的方法。本发明另外的方面和优选的实施方式根据以下说明书以及所附权利要求将是易于想到的。

[0013] 附图简述

[0014] 图 1 显示如本文所述聚乙二醇化、部分脱聚乙二醇化和纯化的 G-CSF 变体的 SDS-PAGE 分析的扫描图。

[0015] 图 2 显示如本文所述聚乙二醇化和部分脱聚乙二醇化 G-CSF 的 SDS-PAGE 分析的扫描图。

[0016] 图 3 显示根据本发明制备的部分脱聚乙二醇化产物集合 (product pool) 的阳离子交换层析图。

[0017] 图 4 显示未经本发明的脱聚乙二醇化的纯化聚乙二醇化 G-CSF 的阳离子交换层析图。

[0018] 描述

[0019] 定义

[0020] 在本说明书的上下文和权利要求中应用以下定义 :

[0021] 术语“多肽”或“蛋白质”可以在本文中互换使用,用来指氨基酸的聚合物,而限于任何具体长度的氨基酸序列。这些术语意图不仅包括全长蛋白质,还包括例如任何给定蛋白质或多肽的片段或截短形式 (truncated version)、变体、域等。

[0022] “G-CSF”多肽是具有如 SEQ ID NO :1 所示的人粒细胞集落刺激因子 (hG-CSF) 序

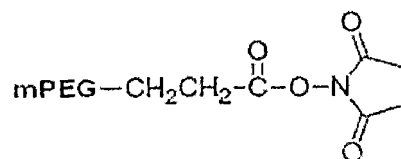
列的多肽,或呈现 G-CSF 活性的 hG-CSF 变体。所述“G-CSF 活性”可以是结合 G-CSF 受体的能力 (Fukunaga et al., J. Bio. Chem., 265 :14008, 1990), 但优选是 G-CSF 细胞增殖活性, 具体而言是在使用鼠细胞系 NFS-60 (ATCC 编号 :CRL-1838) 的体外活性测定中测得的活性。使用 NFS-60 细胞系的适合于 G-CSF 活性的体外测定由 Hammerling 等人在 J. Pharm. Biomed. Anal. 13(1) :9-20, 1995 中描述。“呈现”G-CSF 活性的多肽在它展现可测量的功能时被认为具有这种活性, 所述可测量的活性例如在体外测定中可测量的增殖活性。

[0023] “变体”是在一个或多个氨基酸残基上不同于亲本多肽的多肽, 其中所述亲本多肽通常是具有天然的、野生型氨基酸序列的多肽, 典型地是天然哺乳动物多肽, 更典型地是天然人多肽。因此所述变体与天然多肽相比包含一个或多个取代、插入或缺失。这些可能包括例如 N 末端和 / 或 C 末端截短一个或多个氨基酸残基, 或在 N 末端和 / 或 C 末端添加一个或多个额外的残基, 例如在 N 末端添加甲硫氨酸残基。最通常地, 变体将与亲本多肽有至多 15 个氨基酸残基的不同, 例如至多 12、10、8 或 6 个氨基酸残基的不同。

[0024] “胺特异性活化 PEG”是通过酰胺键优先连接于 N 末端氨基或赖氨酸残基 ϵ -氨基的任何活化 PEG 衍生物。胺特异性活化 PEG 衍生物的实例包括 :

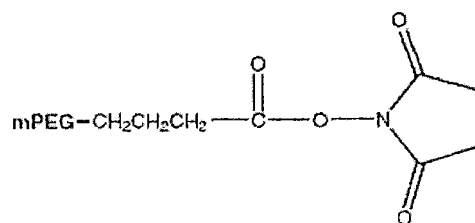
[0025] mPEG-琥珀酰亚胺丙酸酯 (mPEG-SPA) :

[0026]



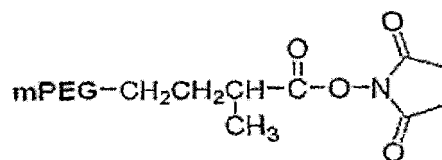
[0027] mPEG-琥珀酰亚胺丁酸酯 (succinimidyl butanoate ;mPEG-SBA) :

[0028]



[0029] 和 mPEG-琥珀酰亚胺 α -甲基丁酸酯 (mPEG-succinimidyl α -methylbutanoate) (mPEG-SMB) :

[0030]



[0031] mPEG-SPA、mPEG-SBA 和 mPEG-SMB 可从 Nektar Therapeutics 获得 ; 参见 Nektar Advanced PEGylation Catalog 2004 和 2005-2006, 《PolyethyleneGlycol and Derivatives for Advanced PEGylation》。其它胺特异性活化 PEG 衍生物包括可从 SunBio Corporation 获得的 PEG-SS (Succinimidyl Succinate ; 琥珀酰亚胺琥珀酸酯), PEG-SG (Succinimidyl Glutarate ; 琥珀酰亚胺戊二酸酯), PEG-NPC (碳酸对硝基苯酯) 和 PEG-异氰酸酯 (isocyanate) ; 和可从 NOFCorporation 获得的 PEG-SCM。

[0032] “不稳定”PEG 部分在本发明的上下文中指连接于多肽的羟基,尤其是通过酯键连接于丝氨酸、酪氨酸或苏氨酸残基的羟基的 PEG 部分。如上所述,这些 PEG 部分通过羟基的连接有不稳定的倾向,因此随着时间的推移这些 PEG 部分倾向于通过酯键的水解而从多肽脱离,例如当包含这些部分的多肽以水溶液的形式贮存时。

[0033] 如在本文中所用,“稳定性”指 PEG 部分结合于多肽的连接稳定性,即这些 PEG 部分是否随着时间的推移保持结合于多肽,例如在贮存于水溶液期间,或它们是否倾向于脱离,例如由于酯键水解。

[0034] 如在本文中所用,术语蛋白质的“PEG 位置异构体”指蛋白质的不同聚乙二醇化形式,其中 PEG 基团位于该蛋白质中不同的氨基酸位置。术语蛋白质的“赖氨酸 /N 末端 PEG 异构体”的意思是 PEG 基团连接于蛋白质的氨基末端和 / 或连接于蛋白质中赖氨酸残基的 ϵ -氨基。例如,短语“连接有 3 个 PEG 部分的赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体”,如用于 G-CSF 时,意思是 G-CSF PEG 位置异构体的混合物,所述异构体中有三个 PEG 基团连接于所述蛋白质的赖氨酸残基 ϵ -氨基和 / 或所述蛋白质的 N 末端。典型地,“连接有 3 个 PEG 部分的赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体”将具有两个连接于赖氨酸残基的 PEG 部分和一个连接于 N 末端的 PEG 部分。PEG 位置异构体的分析可以如以下实施例中所述使用阳离子交换 HPLC 来进行。

[0035] 多肽的“赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体的基本上纯化的混合物”指已经经过层析或其它纯化程序以去除杂质(例如非赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体)的赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体混合物。例如,在缺少如本文所述的部分脱聚乙二醇化步骤及后续纯化的情况下会存在的连接于羟基的不稳定 PEG 部分,大多数不会包含在所述“赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体的基本上纯化的混合物”中;并且所述“赖氨酸 /N 末端 PEG 位置异构体的基本上纯化的混合物”中有通常少于大约 20%,更通常少于 15%的多肽包含连接于羟基的不稳定 PEG 部分。优选将有少于大约 10%,例如少于大约 5%的多肽包含连接于羟基的不稳定 PEG 部分。

[0036] 术语“多肽变体的 PEG 位置异构体的均质混合物”意思是不同 PEG 位置异构体的多肽部分是相同的。这意味着所述混合物中不同的 PEG 位置异构体全部基于单个多肽变体序列。例如,聚乙二醇化 G-CSF 多肽变体的 PEG 位置异构体的均质混合物的意思是所述混合物中不同的 PEG 位置异构体是基于单一的 G-CSF 多肽变体。

[0037] 如本文中所用,“均匀性(uniformity)”指聚乙二醇化多肽就不同的位置异构体(即包含连接在不同位置、不同数量的 PEG 部分的不同多肽异构体)的数量以及这些位置异构体的相对分布而言的均质性。对于意在供人或动物中治疗用途的药用多肽而言,通常期望的是将不同的 PEG 位置异构体的数量最小化。

[0038] “部分脱聚乙二醇化”指本发明的方法起去除连接于羟基的不稳定 PEG 部分的作用,而同时更稳定地连接于 N 末端或赖氨酸残基的氨基的 PEG 部分保持完整。如下文将说明的,所述脱聚乙二醇化方法的进行取决于具体的高 pH 值和处于所述高 pH 的持续时间。因此,取决于在任何具体情况下所选择的条件,有可能一小部分多肽在脱聚乙二醇化步骤结束时仍然具有结合于羟基的 PEG 部分。但是,本领域技术人员基于本文所提供的信息和蛋白质分析技术领域的一般常识将能够对所述方法加以调整,从而使基本上所有不稳定的 PEG 部分均得以去除,并且任何剩余的不稳定 PEG 部分对最终产品的期望性质均无显著影

响。在本文中任何对“脱聚乙二醇化”的述及应该理解为意指“部分脱聚乙二醇化”。

[0039] 详述

[0040] 如上所示,本发明的一个具体方面涉及用于增加聚乙二醇化 G-CSF 多肽的稳定性和均匀性的方法,所述多肽具有至少一个连接于赖氨酸残基 ϵ -氨基或 N 末端氨基的 PEG 部分和至少一个连接于羟基的 PEG 部分,所述方法包括以一段适于去除连接于羟基的 PEG 部分的时间对所述多肽施加 8.0 以上的高 pH,然后将 pH 降低至大约 8.0 或更低。虽然此方法适合于任何哺乳动物 G-CSF 多肽,但所述多肽优选是人 G-CSF 多肽,即具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,任选地在 N 末端添加有甲硫氨酸残基,或其变体。在 G-CSF 变体的情况下,相比于天然的、野生型 G-CSF 多肽,典型地,相比于人 G-CSF (SEQ ID NO:1),这些变体可以具有一个或多个取代、插入或缺失,并且 / 或者 N 末端和 / 或 C 末端截短一个或多个氨基酸残基;例如 1-15 个取代,例如至多 6、8、10 或 12 个取代。优选的 G-CSF 变体包括公开于 WO 01/51510 和 WO03/006501 中的那些变体。

[0041] 例如在 WO 03/006501 中所述, hG-CSF 在第 16、23、34 和 40 位包含四个赖氨酸残基,当使用优先与赖氨酸残基或 N 末端结合的活化 PEG 对 G-CSF 进行聚乙二醇化时,通常期望去除这些赖氨酸残基中的至少一个,例如去除两个、三个或所有这些残基,例如通过缺失,但优选通过取代。因此用于本发明方法的 G-CSF 多肽可以是这样的变体,其中选自 K16、K23、K34 和 K40 的氨基酸残基的至少一个已经缺失或为其它氨基酸残基所取代。典型地,赖氨酸残基的去除将通过取代来实现,一般通过用 R 或 Q 残基,优选 R 残基取代。由此,所述 G-CSF 多肽可以具有选自 K16R/Q、K23R/Q、K34R/Q、K40R/Q 的取代中的一个、两个、三个或四个(其中,例如,“K16R/Q”表示第 16 位的赖氨酸替换为精氨酸或谷氨酰胺残基)。优选所述多肽包括取代 K16R+K34R+K40R,而第 23 位的赖氨酸保留不变。

[0042] 除了在不期望聚乙二醇化时去除赖氨酸残基之外,WO 03/006501 还描述了添加赖氨酸残基以产生用于聚乙二醇化的位点。这些位点可以通过插入来添加,但优选通过取代来添加。对于引入聚乙二醇化位点而言优选的氨基酸取代的实例包括 Q70K、Q90K、T105K、Q120K、T133K、S159K 和 H170K 的一个或多个,例如这些取代中的两个、三个、四个或五个,优选的取代是 T105K+S159K。在一个优选的实施方式中,所述 G-CSF 多肽包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K。在具体的实施方式中,所述 G-CSF 多肽相对于 hG-CSF 仅具有这五个取代。

[0043] G-CSF 多肽的产生

[0044] 将根据本发明加以聚乙二醇化的 G-CSF 多肽可以通过本领域已知的任何合适的方法来产生,例如本文引证的 WO 03/006501 中所述。这些方法包括构建编码多肽的核苷酸序列及在合适的转化或转染宿主中表达该序列。然而,尽管效率较低,本发明的多肽可以通过化学合成或化学合成的组合或化学合成和重组 DNA 技术的组合来产生。可以通过分离或合成编码亲本 G-CSF 的核苷酸序列,例如具有 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的 hG-CSF,来构建编码本发明的多肽或本发明的偶联物 (conjugate) 的多肽部分的核苷酸序列,继而改变所述核苷酸序列从而实现相关氨基酸残基的引入(即插入或取代)或缺失(即去除或取代)。

[0045] 所述核苷酸序列可便宜地根据常规方法通过位点定向诱变来修饰。或者,通过化学合成制备所述核苷酸序列,例如通过使用寡核苷酸合成仪,其中寡核苷酸以期望多肽的

氨基酸序列为基础来设计,并且优选将产生重组多肽的宿主细胞中偏好的那些密码子。例如,可以通过 PCR、连接反应或连接链式反应(LCR)来合成和装配若干编码期望多肽的一部分的小寡核苷酸(Barany,PNAS 88:189-193,1991)。单独的寡核苷酸通常包含用于互补装配的 5' 或 3' 突出端。

[0046] 一旦编码多肽的核苷酸序列完成装配(通过合成、位点定向诱变或其它方法),则将其插入到重组载体中并且与 G-CSF 在期望的转化宿主细胞中表达所必需的调控序列可操作地连接。

[0047] 本领域技术人员将能够选择适于表达所述多肽的载体、表达调控序列和宿主。重组载体可以是自主复制载体,即作为染色体外实体存在、其复制独立于染色体复制的载体,例如质粒。或者,所述载体可以是当被引入宿主细胞时,整合至宿主细胞基因组并同其所整合的染色体一起复制的载体。

[0048] 所述载体优选是这样的表达载体,其中编码本发明多肽的核苷酸序列可操作地连接至所述核苷酸序列转录所必需的其它片段。所述载体通常源自质粒或病毒 DNA。许多适合用于在本文所提及的宿主细胞中表达的载体是可通过商业途径获得或在文献中有所描述的。关于适用于表达 G-CSF 的载体的详细信息可以参见 WO 03/006501。

[0049] 术语“调控序列”在本文定义为包括所有包括对本发明多肽的表达是必需的或有利的成分。各种调控序列对于编码所述多肽的核苷酸序列可以是天然的或外源的。这些调控序列包括但不限于前导序列、聚腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、增强子或上游激活序列、信号肽序列、合成内含子和转录终止子。至少,调控序列包括启动子。许多种表达调控序列均可在本发明中使用,例如公开于 WO 03/006501 中的任何调控序列。

[0050] 编码呈现 G-CSF 活性的本发明的核苷酸序列,无论是通过位点定向诱变、合成、PCR 还是其它方法制备,均可任选地还包括编码信号肽的核苷酸序列。当多肽将从表达该多肽的细胞分泌时,则有信号肽存在。这种信号肽,如果有的话,应该是由选择用于表达该多肽的细胞所识别的多肽。信号肽对于所述多肽可以是同源的(例如是通常与 hG-CSF 有关的信号肽)或异源的(即源自 hG-CSF 以外的其它来源);或者,信号肽对于所述宿主细胞可以是同源的或异源的,即是通常从所述宿主细胞表达的信号肽或是通常不从宿主细胞表达的信号肽。因此,信号肽可以是原核的,例如源自细菌如大肠杆菌,或是真核的,例如源自哺乳动物,或源自昆虫或酵母细胞。有关合适信号肽的其它信息可参见 WO 03/006501。

[0051] 任何合适的宿主均可用于产生 G-CSF 多肽,包括细菌(尽管不特别优选)、真菌(包括酵母)、植物、昆虫、哺乳动物,或其它合适的动物细胞或细胞系,以及转基因动物或植物。哺乳动物细胞是优选的。细菌宿主细胞的实例包括革兰氏阳性细菌例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株,例如短芽孢杆菌(*B. brevis*)或枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)菌株,假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株或链霉菌属(*Streptomyces*)菌株;或革兰氏阴性细菌,例如大肠杆菌菌株。合适的丝状真菌宿主细胞的实例包括曲霉属(*Aspergillus*)菌株,例如米曲霉(*A. oryzae*)、黑曲霉(*A. niger*)或构巢曲霉(*A. nidulans*)菌株,镰孢属(*Fusarium*)菌株或木霉属(*Trichoderma*)菌株。合适的酵母宿主细胞的实例包括酵母属(*Saccharomyces*)菌株,例如酿酒酵母(*S. cerevisiae*),裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)菌株,克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)菌株,毕赤酵母属(*Pichia*)菌株,例如巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)或 *P. methanolica* 菌株,汉逊酵母属(*Hansenula*)菌株,例如多形汉逊酵母

(H. Polymorpha) 菌株, 或西洋蓍霉属 (Yarrowia) 菌株。合适的昆虫宿主细胞的实例包括鳞翅目 (Lepidoptera) 细胞系, 例如 *Spodoptera frugiperda* (Sf9 或 Sf21) 或 *Trichoplusia ni* 细胞 (High Five) (US 5, 077, 214)。合适的哺乳动物宿主细胞的实例包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系, (例如 CHO-K1 ; ATCC CCL-61), 非洲绿猴细胞系 (Green Monkey cell lines ; COS) (例如 COS 1 (ATCC CRL-1650)、COS 7 (ATCC CRL-1651)) ; 小鼠细胞 (例如 NS/O), 幼小仓鼠肾 (Baby Hamster Kidney ; BHK) 细胞系 (例如 ATCC CRL-1632 或 ATCC CCL-10), 和人细胞 (例如 HEK 293 (ATCC CRL-1573))。其它合适的细胞系是本领域已知并且可以从公共保藏机构例如美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), Rockville, Maryland 获得。

[0052] 在本发明的产生方法中, 使用本领域已知的方法在适合于产生所述多肽的营养培养基中培养细胞。例如, 可以通过在合适培养基中和允许表达和 / 或分离所述多肽的条件下进行的摇瓶培养, 实验室或工业发酵罐中的小规模或大规模发酵 (包括连续、分批、补料分批或固态发酵) 来培养细胞。使用本领域已知的方法在合适的包含碳源、氮源和无机盐营养培养基中进行培养。合适的培养基能够从商业供应商获得或可以根据公布的组成 (例如, 在美国典型培养物保藏中心的目录中) 制备。如果多肽被分泌到营养培养基中, 该可从所述培养基中直接回收多肽。如果多肽不被分泌, 则从细胞裂解物 (lysate) 加以回收。

[0053] 可通过本领域已知方法回收所得多肽。例如, 可以通过常规方法从营养培养基中回收多肽, 所述常规方法包括但不限于离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。

[0054] 所述多肽可以通过多种本领域已知的方法纯化, 所述方法包括但不限于层析 (例如, 离子交换、亲和、疏水、层析聚焦和大小排阻)、电泳方法 (例如, 制备型等电聚焦)、差示溶解度 (例如, 硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE 或萃取 (参见, 例如, Protein Purification, J. -C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989)。D. Metcalf 和 N. A. Nicola 在 The hemopoietic colony-stimulating factors, P. 50-51, Cambridge University Press (1995), by C. S. Bae et al, Appl. Microbiol. Biotechnol, 52 : 338-344 (1999) 中和 US 4, 810, 643 中描述了用于纯化呈现 G-CSF 活性的多肽的具体方法。

[0055] 聚乙二醇化

[0056] 随后可将纯化的 G-CSF 多肽通过多种本领域普通技术人员已知的方法聚乙二醇化。例如, 可以使 G-CSF 多肽与胺特异性活化聚乙二醇 (PEG) 发生聚乙二醇化。

[0057] 所述胺特异性活化 PEG 可以是上文提到的任一种, 例如 mPEG-琥珀酰亚胺丙酸酯 (mPEG-SPA)、mPEG-琥珀酰亚胺丁酸酯 (mPEG-SBA) 或 mPEG-琥珀酰亚胺 α -甲基丁酸酯 (mPEG-SMB)。PEG 部分的分子量可以基于例如待连接到多肽的 PEG 部分的数量来选择, 通常会在大约 1kDa 至大约 20kDa 的范围内, 诸如大约 1kDa 至大约 12kDa, 例如大约 2kDa 至大约 10kDa, 诸如大约 4kDa 至大约 6kDa, 例如大约 5kDa。例如, 活化 PEG 可以是分子量大 约为 5kDa 的 mPEG-SPA。聚乙二醇化例如可以在大约 7.5-9.0 的 pH, 例如大约 8.0-8.5 的 pH 进行。当本文中使用时, 词语“大约”指近似的平均分子量, 并且反映出在给定的聚合物制备物中将存在特定分子量分布的事实。对于其它有关聚乙二醇化方法的概括说明, 参见例如, Nektar Advanced PEGylation Catalog 2004 和 2005-2006, 以及本文所引用的参考文献。WO 03/006501 中也提供了对于 G-CSF 多肽的聚乙二醇化方法更详细的描述。

[0058] 部分脱聚乙二醇化

[0059] 用于脱聚乙二醇化步骤的高 pH 是基于例如脱聚乙二醇化步骤发生的温度、脱聚乙二醇化步骤的持续时间和包括进行聚乙二醇化的 pH 在内的用于聚乙二醇化的条件等因素来进行选择的。通常而言,脱聚乙二醇化期间使用的 pH 越高,脱聚乙二醇化发生得越快。因此本领域技术人员将意识到,可以将脱聚乙二醇化条件例如 pH、时间和温度相对彼此加以调节,以在任何给定的情况下获得期望的结果。例如,虽然有可能使用相对低的高 pH,例如 8 和 9 之间,但使用较高 pH 例如 9 到 11 之间、诸如 9 到 10 之间,将导致更快的脱聚乙二醇化。因此,典型地,高 pH 将在大约 8.5 至大约 11.0 的范围内,例如大约 8.5 至大约 10.5,诸如大约 9.0 至大约 10.0 的范围内。所述高 pH 可以是例如在大约 9.2 至大约 9.8 的范围内,例如大约 9.5。

[0060] 通常而言,脱聚乙二醇化步骤将紧接着聚乙二醇化立即发生,因为这一般是最有效率的,并且将导致较短的处理时间和较高的产率。因此在其基本形式中,本发明的特征在于对大部分聚乙二醇化的中间体进行部分脱聚乙二醇化,然后进行常规分离,例如使用如下所述的层析纯化。然而,如果因为任何原因而有需要,可在聚乙二醇化步骤之后进行中间体纯化步骤,然后再进行脱聚乙二醇化。所述中间体纯化步骤可以例如包含如下所述的层析纯化,随后是超滤和 / 或渗滤。如有需要,可在脱聚乙二醇化和任何后续的纯化步骤之前,将从任何这种中间体纯化步骤获得的中间产物贮存起来。在这种情况下,可使用本领域公知的方法将所述聚乙二醇化的中间产物通过例如冷冻或冻干法来贮存。

[0061] 脱聚乙二醇化可在任何在其它情况下适合于所述多肽的温度进行,例如大约 5°C 至大约 40°C,例如大约 10°C 至大约 35°C。脱聚乙二醇化将通常在大约 15°C 至大约 25°C 的温度进行,例如在大约 20-22°C 的环境温度。

[0062] 如上所述,尽管为了获得期望的结果而在高 pH 下进行的脱聚乙二醇化步骤的持续时间将依赖于其它因素例如 pH 和温度,但所述持续时间将通常在大约 2 小时至大约 100 小时的范围内,通常大约 4 小时至大约 72 小时,更通常是大约 8 小时至大约 48 小时。由于一般来说进行脱聚乙二醇化步骤的时间越短越好,通常将对所述多肽施加高 pH 的时间不多于大约 24 小时,例如大约 12 小时至大约 30 小时,诸如大约 18 小时至大约 24 小时。如上文所指出的,在高 pH 下相对短的脱聚乙二醇化时间将通常伴随着相对高的 pH,例如大约 9-10。

[0063] 在高 pH 脱聚乙二醇化之后,将 pH 降低至大约 8.0 或更低,具体的 pH 根据需要的多肽贮存条件来选择。对于 G-CSF 而言,适合于长期贮存的 pH 将通常在大约 2.0 至大约 5.0 的范围内,例如大约 2.5 至大约 4.5,例如大约 4.0。在某些情况下,依赖于例如要使用的具体制剂,可选择稍高的 pH,即大约 5.0-8.0 的 pH,例如大约 6.0-7.5,诸如大约 7.0-7.5。G-CSF 的各种药用制剂在例如 US 5,104,651、US 5,919,757、US 6,497,869 和 US 6,776,983 中有所描述。

[0064] 对于本发明上下文中 pH 的调节,可使用任何合适的酸或碱,包括有机和无机的酸和碱。类似地,可使用任何合适的缓冲液来保持 pH 在期望的水平。本领域技术人员熟知任何给定情况下适用的酸、碱和缓冲液,根据例如所述的多肽和期望的 pH 而定。

[0065] 降低 pH 之后,通常将对多肽进行至少一个层析纯化步骤,例如离子交换层析或凝胶过滤层析,以分离连接有期望数量的 PEG 基团的多肽。可使用本领域公知的方法进行层析纯化。例如,若脱聚乙二醇化之后降低的 pH 在大约 7.0 以下,则可以使用阳离子交换层

析。或者 / 并且,层析可以在降低 pH 之前进行,在所述高 pH 值下使用阴离子交换层析。也可使用本领域已知的标准方法进行进一步的纯化以及任何期望的产物分析。例如,可以使用例如超滤或渗滤在层析纯化步骤之后进行进一步的纯化。

[0066] 如上所述,本发明的另一方面涉及用于产生聚乙二醇化 G-CSF 多肽的方法,包括用胺特异性活化聚乙二醇 (PEG) 将 G-CSF 多肽聚乙二醇化,随后以一段适合于去除连接于羟基的 PEG 部分的时间对所述聚乙二醇化多肽施加至少大约 9.0 的高 pH。这种方法产生具有至少一个连接于赖氨酸残基 ϵ -氨基或 N 末端氨基的 PEG 部分、并且基本上没有连接于羟基的 PEG 部分的聚乙二醇化 G-CSF。在一个实施方式中,本发明的此方面使用在大约 pH7.0-9.0 条件下的聚乙二醇化来进行,随后提高 pH 以去除不稳定的 PEG 部分。在另一个实施方式中,可在 9.0 以上的更高 pH,例如 9-11 范围内的 pH,例如大约 9.2 至 10.0,例如大约 9.5 的 pH 进行聚乙二醇化。在这种情况下,聚乙二醇化和脱聚乙二醇化可以作为单一步骤在单一的 pH 值进行,所持续的时间足以导致 N 末端和赖氨酸残基发生期望的聚乙二醇化而同时避免 PEG 部分与羟基发生不期望的结合。

[0067] 胺特异性活化 PEG 可以是上述的任何一种,例如 mPEG-琥珀酰亚胺丙酸酯 (mPEG-SPA)、mPEG-琥珀酰亚胺丁酸酯 (mPEG-SBA) 或 mPEG-琥珀酰亚胺 α -甲基丁酸酯 (mPEG-SMB)。PEG 部分的分子量将类似于如上所述,例如在大约 1kDa 至大约 20kDa 的范围内,诸如大约 1kDa 至大约 12kDa,例如大约 2kDa 至大约 10kDa,诸如大约 4kDa 至大约 6kDa,例如大约 5kDa。例如,活化 PEG 可以是分子量大约 5kDa 的 mPEG-SPA。聚乙二醇化可以例如在大约 7.5-9.0,例如大约 8.0-8.5 的 pH 进行。取决于聚乙二醇化期间所用的 pH,所选择的高 pH 也将类似于上文一般描述的范围,例如在大约 9.2 至 11.0 的范围内,例如大约 9.2 至 10.0。类似地,处于高 pH 的时间段也可如上所述地选择,对后续的纯化等也是如此。

[0068] 本文描述的方法为旨在产生均匀和稳定聚乙二醇化蛋白的生产方法提供了许多优势,包括:该方法简单快捷,仅需要将 pH 改变一段有限的时间的单个额外步骤,并且无需另外改变既定生产方法中所用的聚乙二醇化或纯化方法。因此,同样的将 pH 改变足以去除不稳定 PEG 基团的一段时间的一般方法可用于任何聚乙二醇化蛋白的生产。一般而言,碱性或酸性 pH 均可用于去除连接于羟基的不稳定 PEG 部分,其中当 pH 越呈酸性(对于酸性 pH 而言)或越呈碱性(对于碱性 pH 而言)时,不稳定 PEG 部分的脱离发生得越快。对于实现不稳定 PEG 脱离的条件,将基于例如具体蛋白质的结构特征,包括 PEG 部分连接位点的微环境,来加以选择。

[0069] 聚乙二醇化 G-CSF 多肽

[0070] 如上所述,本发明方法的优势在于,其导致聚乙二醇化多肽的就不同 PEG 位置异构体的数量而言的均匀性增加。取决于连接基团的数量和所用的具体聚乙二醇化化学,所述方法与其它可能手段相比,可以分离到更加均匀,且在贮藏期间更加稳定的聚乙二醇化 G-CSF。例如已经发现,相对于野生型人 G-CSF 具有取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K 的聚乙二醇化 G-CSF 多肽有可能获得其中至少大约 90-95% 的多肽 PEG 位置异构体连接有 3 个 PEG 部分的产品。

[0071] 本发明的另一个实施方式涉及一种包含聚乙二醇化 G-CSF 多肽变体的 PEG 位置异构体的均质混合物的组合物,其中所述混合物中至少大约 80%,优选至少大约 85%,更优选至少大约 90%,例如至少大约 95% 的 PEG 位置异构体由两种 PEG 位置异构体组成,每一

种都具有由两个结合于赖氨酸残基 ϵ -氨基的 PEG 部分和一个结合于 N 末端氨基的 PEG 部分组成的 PEG 部分。

[0072] 因此本发明的另一个实施方式涉及一种相对于野生型人 G-CSF 包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K 的聚乙二醇化 G-CSF 多肽,其中所述多肽的至少大约 80% 的 PEG 位置异构体连接有 3 个 PEG 部分。典型地,连接有 3 个 PEG 部分的 PEG 位置异构体的比例将大于 80%,例如至少大约 85%或至少大约 90%,并且甚至可以更高,例如至少大约 91%,至少大约 92%,至少大约 93%,至少大约 94%,或至少大约 95%。而在又一个实施方式中,本发明涉及一种相对于野生型人 G-CSF 仅包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K 的聚乙二醇化 G-CSF 多肽,其中所述多肽的至少 80% 的 PEG 位置异构体连接有 3 个 PEG 部分。通常而言,连接有 3 个 PEG 部分的 PEG 位置异构体的比例将大于 80%,例如至少大约 85%或至少大约 90%,并且甚至可以更高,例如至少大约 91%,至少大约 92%,至少大约 93%,至少大约 94%,或至少大约 95%。

[0073] 在另外的实施方式中,本发明涉及一种包含聚乙二醇化 G-CSF 多肽混合物的组合物,所述多肽相对于野生型人 G-CSF 包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K,其中所述混合物中至少大约 80%,优选至少大约 85%,更优选至少大约 90%,例如至少大约 95% 的聚乙二醇化 G-CSF 多肽由两种 G-CSF PEG 位置异构体组成,每一种都包含三个 PEG 基团,其中一种异构体具有连接在 N 末端、Lys23 和 Lys159 的 PEG 基团,另一种异构体具有连接在 N 末端、Lys105 和 Lys159 的 PEG 基团。在另一个实施方式中,本发明涉及一种包含聚乙二醇化 G-CSF 多肽混合物的组合物,所述多肽相对于野生型人 G-CSF 仅包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K,其中所述混合物中至少大约 80%,优选至少大约 85%,更优选至少大约 90%,诸如至少大约 95% 的聚乙二醇化 G-CSF 多肽由两种 G-CSF PEG 位置异构体组成,每一种都包含三个 PEG 基团,其中一种异构体具有连接在 N 末端、Lys23 和 Lys159 的 PEG 基团,而另一种异构体具有连接在 N 末端、Lys105 和 Lys159 的 PEG 基团。

[0074] 已经发现根据本发明产生的聚乙二醇化 G-CSF 多肽相对于它们的聚乙二醇化程度而言是高度贮藏稳定性的。如下文中实施例所示,这些聚乙二醇化 G-CSF 多肽的含水制剂 (aqueous formulations) 能够长期贮藏而聚乙二醇化模式大体上没有改变。所述组合物贮存在 5°C 的温度时尤其如此,但令人惊奇的是,发现即使将所述组合物贮存在 25°C 或 35°C 的高温时其也是相对稳定的。

[0075] 因而本发明的另一方面涉及贮存稳定 (storage-stable) 的聚乙二醇化 G-CSF 多肽,所述多肽相对于野生型人 G-CSF 包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K,其中在含水参考组合物中于 5°C 的温度贮存 3 个月之后,所述多肽的至少大约 80% 的 PEG 位置异构体连接有 3 个 PEG 部分。典型地,于 5°C 的温度贮存 3 个月之后,连接有 3 个 PEG 部分的 PEG 位置异构体的比例将大于 80%,诸如至少大约 85%或至少大约 90%。在某些情况下这个比例甚至可能更高,诸如至少大约 91%,至少大约 92%,至少大约 93%,至少大约 94%或至少大约 95%。为了测定根据本发明生产的聚乙二醇化 G-CSF 多肽的稳定性的目的,可如实施例 4 中所述测试稳定性,例如使用其中所述的制剂 A、B、C 或 D 之一,尤其是制剂 D,作为所述参考组合物。

[0076] 药用组合物

[0077] 本发明的另一个方面涉及包含根据本发明的聚乙二醇化 G-CSF 多肽的药用组合

物。因此本发明的一个实施方式涉及一种组合物,其包含药用载体和聚乙二醇化 G-CSF 多肽,其中所述多肽相对于野生型人 G-CSF (SEQ ID NO :1) 包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K,并且其中所述多肽的至少大约 80% 的 PEG 位置异构体连接有 3 个 PEG 部分。典型地,连接有 3 个 PEG 部分的 PEG 位置异构体的比例将是至少大约 85%,优选至少大约 90%,甚至可以更高,例如至少大约 91%,至少大约 92%,至少大约 93%,至少大约 94% 或至少大约 95%。在另一个实施方式中,本发明涉及一种药用组合物,其包含药用载体和聚乙二醇化 G-CSF 多肽,其中所述多肽相对于野生型人 G-CSF (SEQ ID NO :1) 仅包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K,并且其中所述多肽的至少大约 80% 的 PEG 位置异构体连接有 3 个 PEG 部分。典型地,连接有 3 个 PEG 部分的 PEG 位置异构体的比例将是至少大约 85%,优选至少大约 90%,甚至可以更高,例如至少大约 91%,至少大约 92%,至少大约 93%,至少大约 94% 或至少大约 95%。

[0078] 本发明的另一个实施方式涉及一种药用组合物,其包含聚乙二醇化 G-CSF 多肽变体的 PEG 位置异构体的均质混合物,其中所述混合物中至少大约 80%,优选至少大约 85%,更优选至少大约 90%,例如至少大约 95% 的 PEG 位置异构体由两种 PEG 位置异构体组成,每一种都具有由两个结合于赖氨酸残基 ϵ -氨基的 PEG 部分和一个结合于 N 末端氨基的 PEG 部分组成的 PEG 部分。

[0079] 在本发明另一实施方式中涉及一种包含药用载体和聚乙二醇化 G-CSF 多肽混合物的药用组合物,所述聚乙二醇化 G-CSF 多肽相对于野生型人 G-CSF 包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K,其中在所述混合物中至少大约 80%,优选至少大约 85%,更优选至少大约 90%,例如至少大约 95% 的聚乙二醇化 G-CSF 多肽由两种 PEG G-CSF 位置异构体组成,每一种都包含三个 PEG 基团,其中一种异构体具有连接在 N 末端、Lys23 和 Lys159 的 PEG 基团,而另一种异构体具有连接在 N 末端、Lys105 和 Lys159 的 PEG 基团。而在另一个实施方式中,本发明涉及一种包含药用载体和聚乙二醇化 G-CSF 多肽混合物的药用组合物,所述多肽相对于野生型人 G-CSF 仅包含取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K,其中所述混合物中至少大约 80%,优选至少大约 85%,更优选至少大约 90%,例如至少大约 95% 的聚乙二醇化 G-CSF 多肽由两种 PEG G-CSF 位置异构体组成,每一种都包含三个 PEG 基团,其中一种异构体具有连接在 N 末端、Lys23 和 Lys159 的 PEG 基团,而另一种异构体具有连接在 N 末端、Lys105 和 Lys159 的 PEG 基团。

[0080] 包含本发明的 G-CSF 多肽的药用组合物可配制成多种形式,例如冻干形式,或优选稳定的液体制剂,典型的是配制为含水制剂。这些组合物通常包含一种或多种选自下组的成分:缓冲剂、防腐剂、等渗剂 (isotonicifier)、稳定剂、非离子表面活性剂或洗涤剂,和附加的各种赋形剂 (excipients) 诸如膨胀剂 (bulking agent) 或填充剂 (filler)、螯合剂、抗氧化剂和助溶剂 (cosolvent)。G-CSF 的合适制剂的一个实例是用于 Neulasta® (pegfilgrastim) 的制剂,其以 pH4.0 的水溶液提供,每 0.6ml 包含 0.35mg 乙酸盐 (acetate)、30.0mg 山梨糖醇、0.02mg 聚山梨醇酯 20 和 0.02mg 钠。

[0081] 药用组合物的一个实例是设计用于肠胃外施用 (parenteral administration) 的溶液。尽管在许多情况下药用溶液制剂是以适于直接使用的液体形式提供的,这些肠胃外制剂也可以冷冻或冻干的形式提供。在前一种情况下,所述组合物在使用前必须解冻。后一种形式通常用来增强所述组合物中所含活性化合物在更多不同贮存条件下的稳定性,因

为本领域技术人员公认冻干制剂通常比它们的液体对应物更加稳定。在使用之前通过添加一种或多种合适的药用稀释剂例如注射用无菌水或无菌生理盐水来复原这些冻干制剂。然而,本发明的组合物优选为水溶液的形式。

[0082] 对于肠胃外制剂 (parenterals), 将它们制备成冻干制剂或水溶液以便贮存, 所述制备是通过适当混合具有期望纯度的多肽与一种或多种通常用于本领域的药用载体、赋形剂或稳定剂 (其均可称为“赋形剂”), 例如缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子洗涤剂、抗氧化剂和 / 或其它各种添加剂。

[0083] 缓冲剂有助于将 pH 保持在期望的范围。它们通常以大约 2mM 至大约 50mM 的浓度范围存在。合适的缓冲剂包括有机和无机酸以及它们的盐, 例如柠檬酸缓冲剂 (例如柠檬酸一钠 - 柠檬酸二钠混合物、柠檬酸 - 柠檬酸三钠混合物、柠檬酸 - 柠檬酸一钠混合物等)、琥珀酸缓冲剂 (例如, 琥珀酸 - 琥珀酸一钠混合物、琥珀酸 - 氢氧化钠混合物、琥珀酸 - 琥珀酸二钠混合物等)、酒石酸缓冲剂 (例如, 酒石酸 - 酒石酸钠混合物、酒石酸 - 酒石酸钾混合物、酒石酸 - 氢氧化钠混合物等)、延胡索酸缓冲剂 (例如, 延胡索酸 - 延胡索酸一钠混合物、延胡索酸 - 延胡索酸二钠混合物、延胡索酸一钠 - 延胡索酸二钠混合物等)、葡糖酸缓冲剂 (例如, 葡糖酸 - 葡糖酸钠混合物、葡糖酸 - 氢氧化钠混合物、葡糖酸 - 葡糖酸钾混合物等)、草酸缓冲剂 (例如, 草酸 - 草酸钠混合物、草酸 - 氢氧化钠混合物、草酸 - 草酸钾混合物等)、乳酸缓冲剂 (例如, 乳酸 - 乳酸钠混合物、乳酸 - 氢氧化钠混合物、乳酸 - 乳酸钾混合物等) 和乙酸缓冲剂 (例如, 乙酸 - 乙酸钠混合物、乙酸 - 氢氧化钠混合物等)。其它可能性是磷酸缓冲剂、组氨酸缓冲剂和三甲胺盐例如 Tris。

[0084] 防腐剂是添加来延缓微生物生长的, 并且当存在时通常以大约 0.2% - 1% (w/v) 的量添加。合适的防腐剂包括苯酚、苯甲醇、间甲苯酚 (meta-cresol)、对羟基苯甲酸甲酯 (methyl paraben)、对羟基苯甲酸丙酯 (propyl paraben)、氯化十八烷基二甲基苄基铵 (octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride)、卤化苯甲烃铵 (benzalkonium halides) (例如氯化苯甲烃铵、溴化苯甲烃铵或碘化苯甲烃铵)、六甲氯铵 (hexamethonium chloride)、对羟基苯甲酸烷基酯 (alkyl parabens) 例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和 3-戊醇。

[0085] 等渗剂是添加来保证液体组合物的等渗性的, 包括多羟基糖醇 (polyhydric sugar alcohols), 优选三羟基或高级糖醇 (trihydric or higher sugar alcohols), 例如丙三醇 (glycerin)、赤藓糖醇 (erythritol)、阿拉伯糖醇 (arabitol)、木糖醇 (木糖醇)、山梨糖醇 (sorbitol) 和甘露糖醇 (甘露糖醇)。考虑其它成分相对的量, 多羟基醇可以按重量计在 0.1% 和 25% 之间的量存在, 通常是 1% 至 5%。

[0086] 稳定剂是指一大类可具有不同功能的赋形剂, 从膨胀剂到溶解治疗剂或有助于防止变性或粘附容器壁的添加剂。典型的稳定剂可以是多羟基糖醇 (如上列举); 氨基酸例如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等; 有机糖或糖醇, 例如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌醇 (myoinisitol)、半乳糖醇、甘油 (glycerol) 等, 包括环多醇例如环己六醇 (inositol); 聚乙二醇; 氨基酸聚合物; 含硫还原剂, 例如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、硫代甘油、 α -一硫代甘油和硫代硫酸钠; 低分子量多肽 (即 < 10 个残基); 蛋白质例如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物例如聚乙烯

吡咯烷酮；单糖例如木糖、甘露糖、果糖和葡萄糖；二糖例如乳糖、麦芽糖和蔗糖；三糖例如棉子糖，和多糖例如葡聚糖。稳定剂可以例如基于活性蛋白质重量以按重量计从 0.1 份至 10,000 份的范围存在。

[0087] 可以有非离子表面活性剂或洗涤剂（也称为“润湿剂”）来帮助溶解治疗剂以及保护治疗用多肽免于搅拌所诱发的聚集，其还使得所述制剂能够经受剪切表面应力（shear surface stress）而不引起多肽的变性。合适的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯（20、80 等）、polyoxamers（184、188 等）、Pluronic® 多元醇、聚氧化乙烯山梨聚糖单醚（Tween® -20、Fween® -80 等）。

[0088] 其它可添加的各类赋形剂包括膨胀剂或填充剂（例如淀粉）、螯合剂（例如 EDTA）、抗氧化剂（例如，抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素 E）和助溶剂。

[0089] 在胶体药物递送系统（例如脂质体、白蛋白微球体、微乳状液、纳米颗粒 和 纳米胶囊）或在大乳状液（macroemulsion）中，活性成分还可以包埋到通过例如凝聚技术（coacervation technique）或界面聚合制备的微囊，例如羟甲基纤维素、明胶或聚（甲基丙烯酸甲酯）微囊中。

[0090] 将用于体内施用的肠胃外制剂必须是无菌的。这点通过本领域熟知的方法轻易地实现，例如，通过经无菌过滤膜的过滤。

[0091] 治疗方法

[0092] 本发明的另一方面涉及使用本发明的聚乙二醇化 G-CSF 多肽的治疗方法和制备药物的方法。白细胞减少（白细胞水平降低）和中性粒细胞减少（嗜中性粒细胞水平降低）是导致对多种类型感染的易感性增加的病症。中性粒细胞减少可以是慢性的，例如在感染了 HIV 的患者中；或是急性的，例如在经受化疗或放射疗法的癌症患者中。对于患有严重中性粒细胞减少，例如由化疗产生的严重中性粒细胞减少的患者而言，即使相对较小的感染也可能是严重的，而且中性粒细胞减少经常需要中断化疗方案。本发明的聚乙二醇化 G-CSF 多肽尤其适合于下述应用：预防或治疗正在经受某些类型的化疗、放射治疗和骨髓移植的癌症患者中的感染，在外周血祖细胞移植中动员祖细胞以便收集，治疗严重慢性或相对性白细胞减少，治疗患有急性髓性白血病的患者，治疗 AIDS 或其它免疫缺陷性疾病，以及抗真菌治疗，尤其是用于治疗全身性或侵入性念珠菌病。就本发明而言，“患者”同时包括人和其它哺乳动物，尽管本发明的治疗方法主要旨在治疗人类患者。

[0093] 因此本发明的这个方面涉及在患有或有风险患上嗜中性粒细胞水平不足的患者中提高嗜中性粒细胞水平的方法，包括向所述患者施用有效剂量的如上所述的聚乙二醇化 G-CSF 多肽，或包含该聚乙二醇化 G-CSF 多肽的如上所述的药用组合物。在本发明这个方面的一个实施方式中，患有或有风险患上嗜中性粒细胞水平不足的患者是癌症患者，尤其是正在接受化疗或放射疗法治疗，特别是化疗治疗的癌症患者。

[0094] 设想本发明的聚乙二醇化 G-CSF 多肽可用于在患有多种不同类型癌症的患者中刺激嗜中性粒细胞的产生，所述癌症包括乳腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、结肠直肠癌、子宫癌、卵巢癌、非霍奇金氏淋巴瘤（NHL）和霍奇金氏病。类似地，设想将本发明的多肽施用于接受多种不同类型化疗剂中任一种的患者，所述化疗剂包括：

[0095] • 烷化剂，例如芥子气衍生物，诸如环磷酰胺（Cyclophosphamide）、苯丁酸氮芥（Chlorambucil）、异环磷酰胺（Ifosfamide）、氮芥（Mechlorethamine）或美法仑

(Melfalan); 乙烯亚胺 (ethylenimines), 诸如六甲蜜胺 (Hexamethylmelamine) 或硫替派 (Thiotepa); 烷基磺酸盐 (alkylsulfonates) 例如白消安 (Busulfan); 肼 (hydrazines) 和三嗪 (triazines) 例如六甲蜜胺 (Altretamine)、达卡巴嗪 (Dacarbazine)、丙卡巴肼 (Procarbazine) 或替莫唑胺 (Temozolomide); 亚硝基脲 (nitrosoureas) 例如卡莫司汀 (Carmustine)、洛莫司汀 (Lomustine) 或链佐星 (Streptozocin); 和无机金属络合剂例如顺铂 (Cisplatin)、卡铂 (Carboplatin) 或奥沙利铂 (Oxaliplatin);

[0096] • 植物生物碱, 例如紫杉烷类 (taxanes) (例如, 多西紫杉醇 (Docetaxel) 或紫杉醇 (Paclitaxel))、长春花生物碱 (vinca alkaloids) (例如长春碱 (Vinblastine)、长春新碱 (Vincristine) 或长春瑞滨 (Vinorelbine))、喜树碱类似物 (camptothecin analogs) (例如伊立替康 (Irinotecan) 或托泊替康 (Topotecan)) 和鬼臼毒素 (podophyllotoxins) (例如, 依托泊苷 (Etoposide) 或替尼泊苷 (Teniposide));

[0097] • 抗肿瘤抗生素, 例如蒽环类 (anthracyclines), 例如柔红霉素 (Daunorubicin)、多柔比星 (Doxorubicin)、表柔比星 (Epirubicin)、依达比星 (Idarubicin) 或米托蒽醌 (Mitoxantrone); 色霉素 (chromomycins), 例如放线菌素 D (Dactinomycin) 或普卡霉素 (Plicamycin); 和其它抗肿瘤抗生素例如博来霉素 (Bleomycin) 或丝裂霉素 (Mitomycin);

[0098] • 抗代谢物, 例如叶酸拮抗物, 例如甲氨蝶呤 (Methotrexate); 嘧啶拮抗物, 例如卡培他滨 (Capecitabine)、阿糖胞苷 (Cytarabine)、5-氟尿嘧啶 (5-Fluorouracil; 5-FU)、Fluorouridine 或吉西他滨 (Gemcitabine); 嘌呤拮抗物, 例如 6-巯基嘌呤 (6-Mercaptopurine) 或 6-硫代鸟嘌呤 (6-Thioguanine); 腺苷脱氨酶抑制剂 (adenosine deaminase inhibitors), 例如克拉屈滨 (Cladribine)、氟达拉滨 (Fludarabine)、奈拉滨 (Nelarabine) 或喷司他丁 (Pentostatin); 和核糖核苷酸还原酶抑制剂, 例如羟基脲 (Hydroxyurea);

[0099] • 拓扑异构酶抑制剂, 例如拓扑异构酶 I 抑制剂 (topoisomerase I inhibitors), 例如伊立替康 (Irinotecan) 或托泊替康; 和拓扑异构酶 II 抑制剂 (topoisomerase II inhibitors), 例如安吡啶 (Amsacrine)、依托泊苷、依托泊苷磷酸 (Etoposide Phosphate) 或替尼泊苷。

[0100] 本发明的聚乙二醇化 G-CSF 多肽将以“有效的”或“治疗上有效的”剂量, 即相应于其施用条件足以产生期望效果的剂量, 具体而言在给定条件下足以导致期望的对嗜中性粒细胞的刺激的剂量施用于患者。确切的剂量可能依赖于患者个体和治疗的状况等因素, 并且能够由本领域技术人员来决定, 典型的是由医师 (medical doctor) 来决定。所述聚乙二醇化 G-CSF 多肽的剂量可以是例如与 pegfilgrastim (Neulasta®) 目前的推荐剂量在大约相同的数量级, 即每个成人患者 6mg。因此设想本发明的聚乙二醇化 G-CSF 多肽的合适剂量在大约 1mg 至大约 15mg 的范围内, 例如大约 2mg 至大约 15mg, 例如大约 3mg 至大约 12mg。由此合适的剂量可以是, 例如, 大约 3mg, 大约 6mg, 或大约 9mg。在所有情况下, 若所述患者是成人或体重至少为 45kg, 则剂量表示为每个患者的标准剂量。或者, 所述剂量可以根据患者的体重来确定, 由此本发明的 G-CSF 多肽的合适剂量在大约 10 μ g/kg 至大约 200 μ g/kg, 诸如大约 25 μ g/kg 至大约 150 μ g/kg, 例如大约 30 μ g/kg 至大约 120 μ g/kg。因而合适的剂量可以是, 例如, 大约 30 μ g/kg, 大约 60 μ g/kg, 大约 90 μ g/kg 或大约 120 μ g/kg。

[0101] 下面将通过非限定性的实施例对本发明作进一步的说明。

[0102] 实施例

[0103] 实施例 1

[0104] 部分脱聚乙二醇化 G-CSF 变体的制备和分析

[0105] 样品制备和脱聚乙二醇化

[0106] 基本如 WO 03/006501 中所述从 CHO-K1 细胞制备与野生型人 G-CSF (SEQ ID NO :1) 相比具有取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K 的 G-CSF 变体。使用 mPEG-SPA 5000 (Nektar Therapeutics) 将 200mL 4.5mg/mL 的所述 G-CSF 变体 (900mg G-CSF) 聚乙二醇化。简而言之, 在 10 分钟内将 100mL 的 13.2% (w/w)mPEG-SPA 5000 溶液添加至 200mL 的 G-CSF 溶液中并温和搅拌以确保充分混合。使样品在 $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、pH8.5 温育 44 分钟, 伴以温和的搅拌。接下来使用 pH10.0 的 800mM 硼酸母液将所述样品混合物调节至 pH9.5。随后将样品在 $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 无搅拌温育 24 小时。再将样品用 100mmol/kg 柠檬酸、20mmol/kg NaOH、pH2.5 稀释大约 2.5 倍, 至最终 pH3.5。

[0107] 部分脱聚乙二醇化 G-CSF 的分离

[0108] 将 pH 降低至 3.5 之后, 将所述样品立即加载至 VL44 (Millipore) 柱子上, 其中该柱子填充了大约 225mL SP-Sepharose HP (Amersham, GE Healthcare), 并用 20mmol/kg 柠檬酸、15mmol/kg NaOH、pH3.4 加以平衡。加载物料之后, 洗涤柱子以去除未结合的物料例如游离的 mPEG-酸。使用 25-100% 洗脱缓冲液 (20mmol/kg 柠檬酸、20mmol/kg NaOH、200mmol/kg NaCl、pH3.5) 的线性梯度以从柱子上洗脱聚乙二醇化 G-CSF。以 25 个 CV (column volumes; 柱容积) 展开所述梯度。柱步骤在 $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 进行, 并且将所用的全部缓冲液调节至相同温度。柱载量 (column load) 为 4.1mg 蛋白质 /ml 树脂, 流速 (flow) 为 8CV/ 小时。

[0109] 收集样品大小为 40mL 的级分并且通过 SDS-PAGE 加以分析。基于 SDS-PAGE 分析, 制成相应于大约 6.5CV 的 1440mL 的集合产物, 其主要包含每个 G-CSF 分子附有 3 个 PEG 基团的分离的 G-CSF。预期通过提高洗脱梯度的陡度 (steepness) 可降低所述集合产物的体积。

[0110] 将集合产物渗滤至大约 200mL, 接着在 10mM 乙酸钠, 43mg/mL 甘露糖醇, pH4.0 中渗滤, 然后使用装有两个分子量截留 (molecular weight cutoff; MWC0) 为 30kDa 的 50cm² Millipore Pellicon XL 膜的 Millipore LabScaleTFF-system 浓缩至 4.9mg/mL。

[0111] 结果

[0112] 将所述集合产物超滤和渗滤到 10mM 乙酸钠、43mg/mL 甘露糖醇、pH4.0 中, 并且进行物理化学表征。图 1 显示如上所述聚乙二醇化、部分脱聚乙二醇化和纯化的 G-CSF 变体的 SDS-PAGE 分析的扫描图, 所示七个泳道如下:

[0113] 1 分子量标记

[0114] 2 聚乙二醇化之后

[0115] 3 pH9.5, T = 0 小时

[0116] 4 pH9.5, T = 24 小时

[0117] 5 施加于阳离子交换柱时

[0118] 6 阳离子交换的穿透液 (flow through)

[0119] 7 纯化的产物

[0120] 泳道 7 中观察到单一的主带,相应于每个多肽分子携带 3 个 mPEG-SPA 5000 基团的 G-CSF 变体。此外,在泳道 7 中还观察到相应于携带 4 个 mPEG-SPA 5000 基团的 G-CSF 的小带。如有需要,利用本领域公知方法对所述纯化方法进行最优化或调整,将可减少或基本上消除这条相应于 4 个 PEG 基团的小带,尽管这样做将导致产率根据所需的纯度而稍有降低。

[0121] 这种方法的产率是 450mg 纯化的、每个多肽分子主要携带 3 个 PEG 基团且部分脱聚乙二醇化 G-CSF,相当于总产率为 50%。

[0122] 实施例 2

[0123] 部分脱聚乙二醇化 G-CSF 变体的制备和分析

[0124] 样品制备、脱聚乙二醇化和纯化

[0125] 基本如上实施例 1 中所述,从 CHO-K1 细胞制备与野生型人 G-CSF (SEQID NO:1) 相比具有取代 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K 的 G-CSF 变体,然后使用 mPEG-SPA 5000 将其聚乙二醇化,产生 29mL 3.5mg/mL 的聚乙二醇化 G-CSF 变体。使用装有 10kDa MWCO 滤器的 Vivaspin 过滤设备将其渗滤至 150mM 硼酸钠、pH9.5 中。最终样品浓度是 4.7mg/mL。随后将样品在 $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 温育 42 小时。

[0126] 温育之后,使用 30mM 柠檬酸、10mM NaOH、pH2.9 稀释样品以备阳离子交换层析。随后将样品施加到填充有 28mL SP-Sepharose HP 树脂的 XK16/20 柱 (Amersham Biosciences)。在加样之前,用 20mM 柠檬酸、15mM NaCl、pH3.5 的平衡缓冲液平衡柱子。加样之后,用相同的缓冲液洗涤柱子,再使用 20mM 柠檬酸、pH3.5 中从 15mM 至 200mM NaCl 的线性梯度进行洗脱,以分离不同种类的聚乙二醇化物。

[0127] 将级分收集至试管中并通过 SDS-PAGE 分析。基于 SDS-PAGE 分析制成包含主要含 3 个连接的 PEG 部分的聚乙二醇化 G-CSF 变体的集合产物。使用带有 10kDa 的 MWCO 的 Vivaspin 过滤设备对此集合产物进行渗滤并更换缓冲液。将样品渗滤至 10mM 琥珀酸钠, 43mg/mL 甘露糖醇, pH4.0 中,并且最终浓缩至 3.0mg/mL。

[0128] 位置异构体分析

[0129] 使用结合唾液酸酶预处理的阳离子交换 HPLC (CIEX-HPLC),获得了关于包含多种聚乙二醇化物的集合产物中不同 PEG 位置异构体之组成的数据。除了聚乙二醇化之后因存在不同位置异构体所致的异质性之外,聚乙二醇化 G-CSF 的异质性还因为其包含一个 O-糖基化位点 (Thr133),所述位点可连接有 0、1 或 2 个唾液酸基团。为了减少色谱中由于不同数量的唾液酸基团所致的峰的数量,在分析之前引入唾液酸酶预处理步骤。唾液酸酶预处理如下进行:首先,如有必要,用 50mM 乙酸钠缓冲液 (pH5.0) 将 G-CSF 溶液稀释至 1mg/mL,之后每 μg 蛋白添加 $0.05 \mu\text{l}$ (0.25mUnit) 的唾液酸酶,再将样品在 37°C 温育 18 小时以去除唾液酸。随后在同一天分析样品或将样品保存在 4°C 直到分析当日。使用 PolySULFOETHYL A™ 阳离子交换 HPLC 柱 (PolyLC Inc.) 进行 HPLC,在 214nm 进行 UV 检测。从 PolySULFOETHYL A™ CIEX 柱手动收集之后,通过 SDS-PAGE 分析进行不同峰的表征。

[0130] 结果——PEG 损失

[0131] 通过 SDS-PAGE 分析缓冲液更换的样品以评估作为时间的函数的 PEG 损失程度。结果 (参见图 2) 类似于图 1 所示的实施例 1 的结果,整体聚乙二醇化程度在温育 24 或 42 小时的样品之间 (图 2,泳道 4 和 5) 仅观察到极小的改变。

[0132] 结果——集合产物中位置异构体的评估

[0133] 图 3 显示如上所述获得的本发明的部分脱聚乙二醇化集合产物的阳离子交换层析图,所述集合产物根据 SDS-PAGE 判断主要包含三个 PEG 5000 基团。两个主峰各代表一种携带三个 PEG 5000 基团的主要位置异构体。三个小峰代表两种携带四个 PEG 基团的位置异构体和一种携带两个 PEG 基团的位置异构体。

[0134] 收集两种主峰并进行天然肽图谱分析 (native peptide map analysis) 以测定连接 PEG 基团的位置。发现两种主要位置异构体在以下氨基酸残基上被聚乙二醇化:

[0135] 异构体 A :N 末端、Lys23 和 Lys159

[0136] 异构体 B :N 末端、Lys105 和 Lys159

[0137] 这两种主要异构体代表了样品中存在的超过 95% 的位置异构体。

[0138] 实施例 3

[0139] 比较例

[0140] 为了进行比较,图 4 显示纯化的、未进行本发明的脱聚乙二醇化的聚乙二醇化 G-CSF 变体的阳离子交换层析图。这种情况下的 G-CSF 变体如以上实施例 1 和 2 中所述一样,与天然人 G-CSF 相比也具有相同的五个取代,即 K16R、K34R、K40R、T105K 和 S159K。该 G-CSF 变体基本上如实施例 1 中所述制备并用 mPEG-SPA 5000 聚乙二醇化,但不对其进行 pH9.5 条件下的温育以去除不稳定 PEG 部分。结果,所述聚乙二醇化变体包含许多不同的连接有 2-6 个 PEG 部分的 PEG 异构体混合物。基本上如实施例 1 中所述使用阳离子交换层析纯化该位置异构体混合物。分离主要含有 4-5 个连接的 PEG 部分的级分,基本上如实施例 1 中所述加以超滤和渗滤,然后对其进行如上所述的 CIEEX-HPLC 分析。这种级分相当于实施例 1 和 2 中所述的 3PEG 级分,但相对于部分脱聚乙二醇化的 3PEG 产物,它在一个或两个位置连接有额外的(不稳定的)PEG 基团,也就是说,在这种情况下纯化的产物主要包含 4-5 个连接的 PEG 基团。

[0141] 与根据本发明制备的部分脱聚乙二醇化产物(组成示于图 3)相比,图 4 所示的产物明显是更加复杂和异质的混合物。图 3 中根据本发明制备的产物包含超过 95% 的两种各具有 3 个 PEG 部分的主要的位置异构体,而图 4 所示产物包含六种主要的位置异构体,每种均连接有 4 或 5 个 PEG 部分。这六种 4-5PEG 位置异构体在 Ser66 或 Tyr165 中一处或两处包含不稳定 PEG 部分(数据未显示),并且在 N 末端和位置 K23、K105 和 K159 中一处或两处包含稳定 PEG 部分。由于位阻作用,单个 G-CSF 多肽上所有这些位置并非都可被 PEG 部分所占据。因此图 4 所示产物包含以下六种主要的 PEG 异构体的异质混合物:

[0142] N 末端、K23、S66、K159、Y165 (5-PEG)

[0143] N 末端、S66、K105、K159、Y165 (5-PEG)

[0144] N 末端、K23、S66、K159 (4-PEG)

[0145] N 末端、K23、S66、Y165 (4-PEG)

[0146] N 末端、S66、K105、K159 (4-PEG)

[0147] N 末端、S66、K105、Y165 (4-PEG)

[0148] 实施例 4

[0149] 稳定性数据

[0150] 在储存于四种不同温度的不同含水制剂中测试了连接的 PEG 部分的稳定性。多肽

是具有实施例 1 中所列五个取代的 G-CSF 变体,且同样如实施例 1 中所述进行制备、聚乙二醇化,并且加以部分脱聚乙二醇化继而纯化。所测试的制剂如下:

	单位	制剂			
		A	B	C	D
G-CSF	mg/ml	2	10	2	2
乙酸钠	mM	10	10	10	10
Tween®80	mg/ml	-	-	0.05	-
Tween®20	mg/ml	-	-	-	0.05
甘露糖醇	mg/ml	43	43	43	43

[0152] 各制剂的 pH 均是 4.0。

[0153] 在 26 天、56 天和 89 天之后使用 CIEH-HPLC 测定各样品中的 PEG 异构体分布以研究聚乙二醇化的稳定性。结果示于下表。

剂型	温度	天数	3 PEG	其它/未表征	2 PEG
A	-	0	92.3	7.8	0
	-80°C	26	93.3	6.6	0
	5°C		93.5	6.4	0.1
	25°C		94.1	5.5	0.3
	35°C		94.3	4.7	0.8
	-80°C	56	95.4	4.7	0
	5°C		95.3	4.7	0
	25°C		95.3	3.8	0.9
	35°C		95.3	3.0	1.7
	-80°C	89	96.1	3.9	0
	5°C		95.9	4.1	0
	25°C		96.1	3.1	0.8
	35°C		95.5	2.7	1.8
B	-	0	92.4	7.6	0
	-80°C	26	93.5	6.5	0.0
	5°C		93.4	6.5	0.1
	25°C		94.0	5.7	0.3
	35°C		94.2	5.0	0.8
	-80°C	56	95.1	4.9	0
	5°C		95.4	4.7	0
	25°C		95.2	4.3	0.6
	35°C		96.2	2.4	1.4
	-80°C	89	95.9	4.1	0
	5°C		95.9	4.1	0
	25°C		96.8	3.2	0
	35°C		95.5	2.6	1.9

[0155]

剂型	温度	天数	3 PEG	其它/未表征	2 PEG
C	-	0	92.1	7.9	0
	-80°C	26	93.8	6.1	0
	5°C		94.1	5.8	0
	25°C		94.0	5.7	0.3
	35°C		94.6	4.5	0.8
	-80°C	56	95.1	4.9	0
	5°C		95.1	4.9	0
	25°C		94.1	4.8	1.1
	35°C		95.1	3.0	1.9
	-80°C	89	95.9	4.1	0
	5°C		95.9	4.1	0
	25°C		96.1	3.2	0.7
	35°C		95.5	2.7	1.8
D	-	0	92.6	7.5	0
	-80°C	26	93.8	6.1	0.1
	5°C		93.6	6.3	0.1
	25°C		93.7	6.1	0.3
	35°C		94.4	4.9	0.8
	-80°C	56	95.3	4.7	0
	5°C		95.2	4.8	0
	25°C		95.2	4.0	0.8
	35°C		95.5	3.3	1.3
	-80°C	89	96.0	4.0	0
	5°C		96.0	4.0	0
	25°C		96.2	3.1	0.7
	35°C		95.7	2.5	1.8

[0156] 以上结果显示,与制剂和贮存温度无关,聚乙二醇化是高度稳定的;第 26、56 或 89 天取样时在所有温度下 3PEG 异构体所占比例均非常接近 95%。从表中显而易见的唯一差别是:主要对于贮存在 25°C 或 35°C 的样品而言,使用 -80°C 数据作为参考,随着时间的推移其它/未表征形式的比例稍有降低,并且这些样品的 2PEG 异构体的比例相应增加。

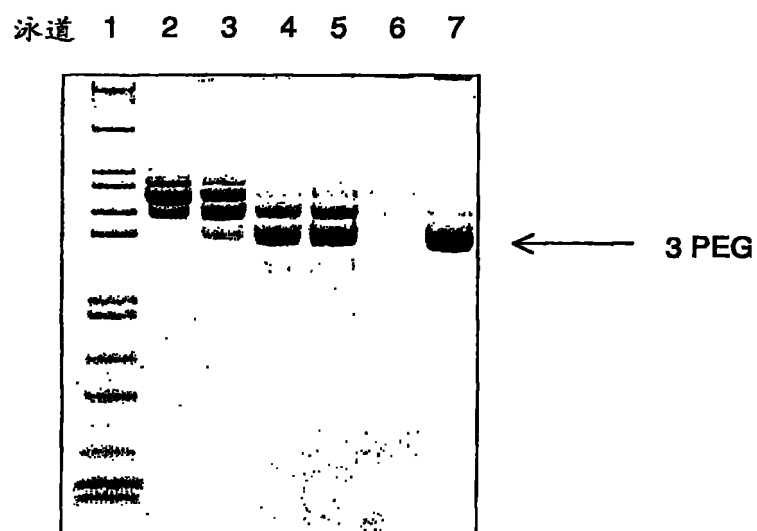
[0157] 相比之下,下表显示的是在与上述类似的制剂中的相同的 G-CSF 变体,但不经过本发明的脱聚乙二醇化步骤而制备,即对应于上文对比例 3 中所述的产物,贮存 20 和 83 天之后测得的类似数据。这种情况下的制剂具有 4.0 的 pH,由 15mM 乙酸钠、45mg/ml 甘露糖醇和 5mg/ml 的聚乙二醇化 G-CSF 变体组成,在实验开始时主要 (98-99%) 包含 4-5 个连接的 PEG 部分。下表显示的是于 83 天后在所示四个温度下测定的 PEG 异构体 (isoform) 分布,以及 20 天后在其中两个温度下的 PEG 异构体分布。可见贮存于 5°C 时,包含 4-5PEG 部分的 G-CSF 多肽的比例在 83 天后仅稍许降低,但贮存于 25°C 时 4-5 PEG 异构体有显著的损失而 3PEG 异构体相应地增加,而在 35°C 时有大得多的 4-5PEG 异构体损失和相应的 3PEG 异构体增加。这说明在没有本发明的脱聚乙二醇化方法的情况下,当贮存在含水制剂中时,如上制备的聚乙二醇化 G-CSF 多肽所包含的不稳定 PEG 基团将随着时间的推移以依赖于温度的方式从多肽脱离。

[0158]

温度	天数	4-5 PEG	3 PEG	其它/未表征
-	0	98.6%	0	1.4%
-80℃	20	98.1%	0.5%	1.4%
35℃		96.0%	2.9%	1.1%
-80℃	83	97.9%	0.6%	1.6%
5℃		97.6%	1.0%	1.5%
25℃		90.6%	8.4%	1.1%
35℃		78.1%	21.5%	0.5%

[0159] 为了阐述清晰且易于理解,在上文中对本发明进行了详细描述,尽管如此,对于本领域内技术人员显而易见的是,通过阅读本发明的公开文本,可在不背离本发明真实范围的前提下对形式和细节进行各种修改。应该理解的是,本文所描述的实例和实施方式仅出于说明性目的,本领域内技术人员将对其提出各种明显的修饰或改变,而这些修饰或改变将被包括在本申请和所附权利要求的宗旨和范围内。在此引证本申请引用的全部公开文献、专利、专利申请和 / 或其它文献的全部内容以用于所有目的,相当于分别单独引证所述公开文献、专利、专利申请和 / 或其它文献的全部内容以用于所有目的。

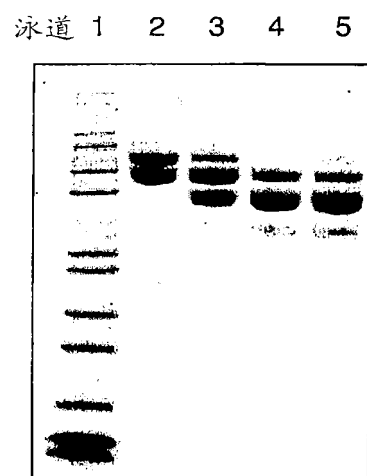
[0001]	序列表			
[0002]	<110> 马克西根控股公司 (Maxygen Holdings Ltd.)			
[0003]	<120> 聚乙二醇化 G-CSF 多肽及其产生方法			
[0004]	<130>0282wo210			
[0005]	<140>PCT/DK2006/000292			
[0006]	<141>2006-05-26			
[0007]	<150>US 60/686,726			
[0008]	<151>2005-06-01			
[0009]	<160>1			
[0010]	<170>PatentIn version 3.2			
[0011]	<210>1			
[0012]	<211>174			
[0013]	<212>PRT			
[0014]	<213> 人 (Homo sapiens)			
[0015]	<400>1			
[0016]	Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys			
[0017]	1	5	10	15
[0018]	Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln			
[0019]	20	25	30	
[0020]	Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val			
[0021]	35	40	45	
[0022]	Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys			
[0023]	50	55	60	
[0024]	Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser			
[0025]	65	70	75	80
[0026]	Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser			
[0027]	85	90	95	
[0028]	Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp			
[0029]	100	105	110	
[0030]	Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro			
[0031]	115	120	125	
[0032]	Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe			
[0033]	130	135	140	
[0034]	Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe			
[0035]	145	150	155	160
[0036]	Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro			
[0037]	165	170		



泳道

1	分子量标记
2	聚乙二醇化后
3	pH 9.5, T=0 h
4	pH 9.5, T=24 h
5	施加到阳离子交换柱时
6	从阳离子交换的穿透液
7	纯化产物

图 1



- 泳道
- | | |
|---|-----------------------|
| 1 | 分子量标记 |
| 2 | 聚乙二醇化后 |
| 3 | 渗滤过的物料, pH 9.5, T=0 h |
| 4 | pH 9.5, T=24 h |
| 5 | pH 9.5, T=42 h |

图 2

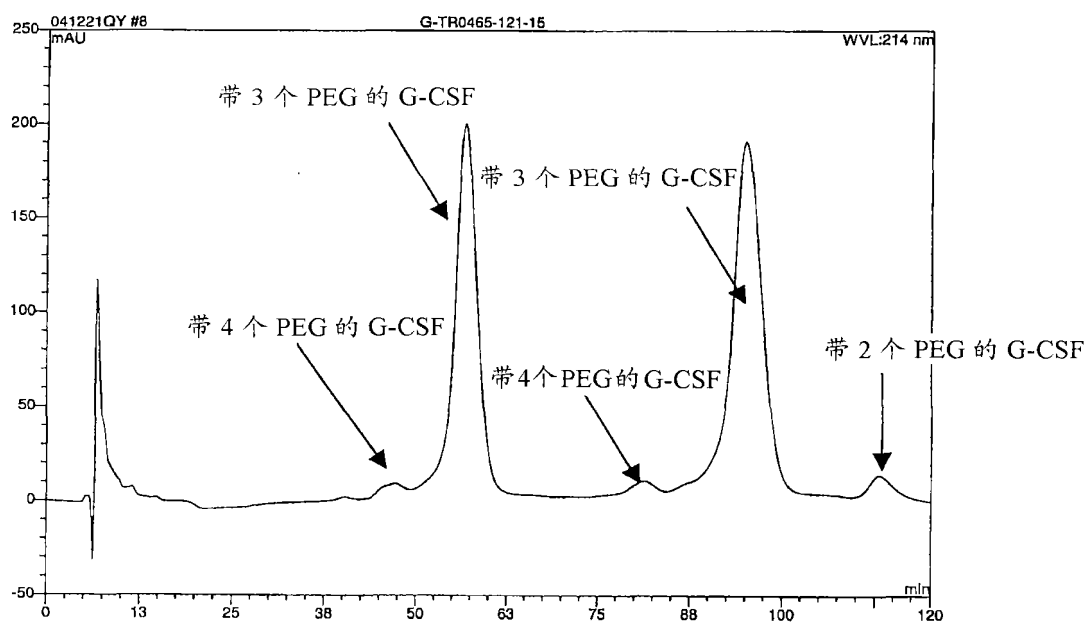


图 3

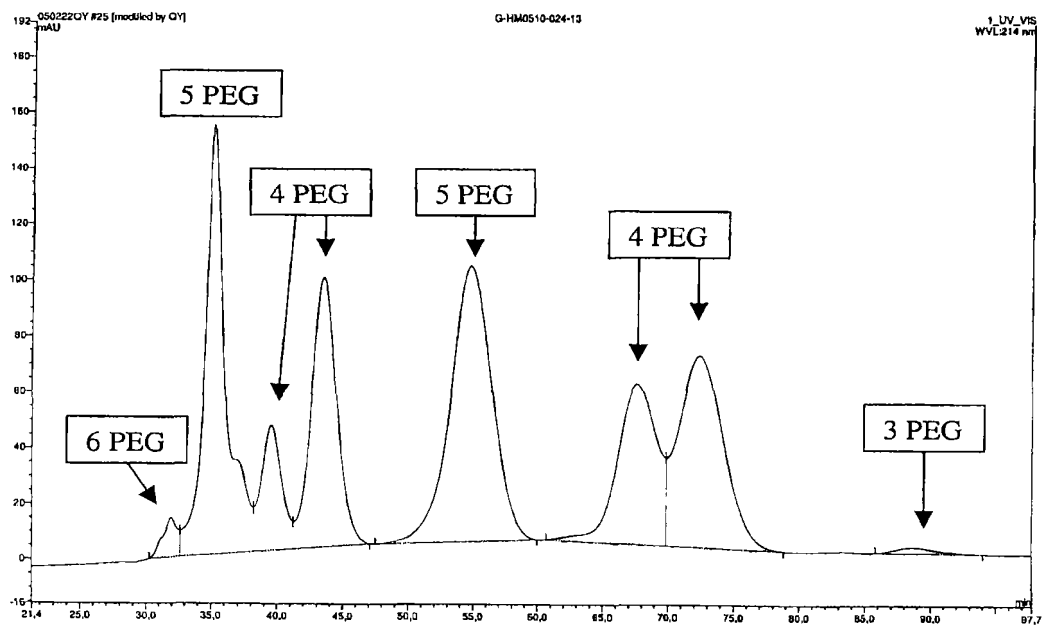


图 4