



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 38/17	A1	(11) 国際公開番号 WO99/44630 (43) 国際公開日 1999年9月10日(10.09.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01080 (22) 国際出願日 1999年3月5日(05.03.99) (30) 優先権データ 特願平10/54799 1998年3月6日(06.03.98) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 住田秀司(SUMIDA, Shuji)[JP/JP] 佐藤 泰(SATO, Yasushi)[JP/JP] 〒171-8545 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: PROTEIN-FREE PREPARATIONS (54) 発明の名称 蛋白非添加製剤 (57) Abstract Stable preparations containing granulocyte colony stimulating factor which contain the granulocyte colony stimulating factor and 1 part by weight or less, per 1 part by weight of the granulocyte colony stimulating factor, of at least 1 pharmaceutically acceptable surfactant and have a pH value of 7 or lower.		

(57)要約

顆粒球コロニー刺激因子と、顆粒球コロニー刺激因子 1 重量部に対して 1 重量部以下の少なくとも 1 種以上の製薬上許容される界面活性剤を含み、pH 7 以下である、安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ			TR	トルコ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国	RU	ロシア		

明細書

蛋白非添加製剤

技術分野

- 5 本発明は顆粒球コロニー刺激因子含有製剤に関し、特に容器壁上への吸着又は会合、重合、酸化等による活性成分の損失、不活性化を防止し、安定化させた顆粒球コロニー刺激因子含有製剤に関する。

背景技術

- 10 顆粒球コロニー刺激因子（以下において、G-CSFということもある）は、好中球の前駆細胞に作用し、その増殖ならびに分化成熟を促進する分子量約2万の糖タンパク質である。

- 本出願人によって、口腔底癌患者の腫瘍細胞から採取した細胞株を培養することにより高純度のヒトG-CSFが精製されて以来、これを契機に、ヒトG-CSF遺伝子のクローニングに成功し、現在では遺伝子工学的方法によって動物細胞で組換えヒトG-CSFを大量に生産することが可能になった。また、本願出願人はこの精製したG-CSFの製剤化に成功し、これを感染防御剤として市場に製品を供給している（特許第2116515号）。

- 20 G-CSFは極めて微量で使用され、通常成人一人当たり、0.1～1000 μg （好ましくは5～500 μg ）のG-CSFを含有する製剤を1～7回/週の割合で投与する。しかしながら、このG-CSFは例えば注射用アンプル、注射器等の器壁に対し吸着性を示す。また、G-CSFは不安定で、外的因子の影響を受けやすく、温度、湿度、酸素、紫外線等に起因して会合、重合あるいは酸化等の物理的、化学的変化を生じ、結果として大きな活性の低下を招く。

- 25 そこで安定なG-CSF製剤を市場に供給するために種々の処方設計がなされている。例えば、酢酸、乳酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸及びその塩又はアルギニン及びその塩から選ばれる緩衝剤を含む製剤（特表平8-505610号）等が提案されている。また、安定化剤としてG-CSF1重量部に対して1重量部～10,000重量部の界面活性剤を含むG-CSF製剤がある（特開昭

63-146826号)。この公開公報には、G-CSF含有溶液製剤において、G-CSFの損失を防止し、安定化を達成するためには界面活性剤の添加量、特にその下限が臨界的であることが記載されている。

本発明の目的は、製造工程の煩雑さを少なくし、かつ長期の保存にもより安定なG-CSFの製剤を提供することである。

発明の開示

上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは安定化剤として極めて少量の界面活性剤を添加した場合であっても、安定なG-CSF溶液製剤となしうることを見だし本発明を完成した。

すなわち、本発明は、顆粒球コロニー刺激因子と、顆粒球コロニー刺激因子1重量部に対して0.0001～1重量部の少なくとも1種の製薬上許容される界面活性剤を含み、pH7以下である、安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤を提供する。

本明細書中で安定化とは、G-CSF含有溶液製剤を25℃の保存条件下で6ヶ月保存した後のG-CSF残存率が95%以上、あるいは40℃の保存条件下で2週間保存した後のG-CSF残存率が75%以上保たれることを意味する。

図面の簡単な説明

図1は、40℃-2週間加速試験を行った後の、pHとG-CSF残存率の関係を示すグラフである。

図2は、40℃-2週間加速試験を行った後の、pHとG-CSF糖鎖分解体生成比との関係を示すグラフである。

図3は、充填後24時間経過後の、G-CSF 1重量部に対するポリソルベート20の重量部と吸着抑制率との関係を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の溶液製剤に使用するG-CSFは高純度に精製されたヒトG-CSFであれば全て使用できる。具体的には、哺乳動物、特にヒトのG-CSFと実質

的に同じ生物学的活性を有するものであり、天然由来のもの、および遺伝子組換え法によって得られたものを含む。遺伝子組換え法によって得られるG-C S Fには天然のG-C S Fとアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列の1または複数を欠失、置換、付加したもので前記生物学的活性を有するものを含む。本発明におけるG-C S Fは、いかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト腫瘍細胞の細胞株を培養し、これから種々の方法で抽出し分離精製したもの、あるいは遺伝子工学的手法により大腸菌、イースト菌、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、C 1 2 7細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。最も好ましくはCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。

本発明の安定なG-C S F含有製剤を得るのに使用する界面活性剤としては、非イオン界面活性剤、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル；デカグリセリルモノステアレート、デカグリセリルジステアレート、デカグリセリルモノリノレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリスステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビットテトラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル；ポリオキシエチレングリセリルモノステアレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレングリコールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル；

ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキル
フェニルエーテル；ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマ
シ油（ポリオキシエチレン水素ヒマシ油）等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油
；ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導
5 体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；ポリ
オキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のH
LB 6～18を有するもの；陰イオン界面活性剤、例えばセチル硫酸ナトリウム、
ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10～18の
アルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウ
10 ム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2～4でアルキル基の炭素原子数
が10～18であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスル
ホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が8～18のアル
キルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセ
ロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数12～18
15 の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げることができる。本発
明の溶液製剤には、これらの界面活性剤の1種または2種以上を組み合わせで添
加することができる。

好ましい界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、
特に好ましいのはポリソルベート20、21、40、60、65、80、81、
20 85であり、最も好ましいのはポリソルベート20及び80である。

本発明のG-C-S-F含有製剤に添加する界面活性剤の添加量は、一般にはG-C-S-F
1重量部に対して0.0001～1重量部であり、好ましくはG-C-S-F
1重量部に対して0.01～1重量部であり、さらに好ましくはG-C-S-F 1重
量部に対して0.2～1重量部であり、さらに好ましくはG-C-S-F 1重量部に
25 対して0.2～0.8重量部であり、最も好ましいのは、G-C-S-F 1重量部に
対して0.4重量部～0.8重量部である。特に、製剤量1mL当たりのG-C-S-F
含有量が125 μ gあるいは250 μ gの場合、界面活性剤の添加量は10
0 μ gが好ましい。従って、G-C-S-F 1重量部当たり、0.4重量部又は0.
8重量部の界面活性剤の添加量が特に好ましい。アルブミン等のタンパク質を安

定化剤として添加しない場合には、界面活性剤の添加量がG-C S F 1重量部に対して1重量部を越えると、長期保存後のG-C S F残存率が低下する傾向が見られた。また、界面活性剤の添加量がG-C S F 1重量部に対して1重量部以下の場合であっても、G-C S Fの容器への吸着を十分に抑制することができる。

- 5 本発明の好ましいG-C S F含有製剤には安定化剤として実質的にタンパク質を含まない。現在市場に供給されている製品には、G-C S Fの化学的、物理的変化を抑制するために安定化剤としてヒト血清アルブミンあるいは精製ゼラチンなどのタンパク質が添加されているものがある。しかしながら、タンパク質を安定化剤として添加することに関しては、ウイルスのコンタミを除去するために非
- 10 常に煩雑な工程を必要とすることになるなどの問題がある。

- 本発明のG-C S F含有製剤のpHは7以下であり、好ましくはpHが5～7であり、さらに好ましくはpHが6～6.8であり、最も好ましくはpHが6.2～6.8である。後述するように、40℃-2週間加速試験を行った後のG-C S F残存率はpHが7以下で安定である。この観点からはpHが約7.0以下
- 15 であることが好ましい。また、40℃-2週間加速試験後にG-C S Fの糖鎖分解体の生成比を測定したところ、pHが4以下になると糖鎖分解体の含量が急速に増加することが観察された。従って、この観点からはpHが約5以上であることが好ましい。さらに、注射剤として投与するには人体への刺激が少ない中性に近い方が好ましく、これらを総合すると、pHを6.2～6.8とすることが最
- 20 も好ましい。

- 本発明のG-C S F含有製剤には、希釈剤、溶解補助剤、等張化剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含有してもよい。例えば、等張化剤としては、ポリエチレングリコール；デキストラン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、グルコース、フラクトース、ラクトース、
- 25 キシロース、マンノース、マルトース、シュクロース、ラフィノースなどの糖類を用いることができる。含硫還元剤としては、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、並びに炭素原子数1～7のチオアルカン酸等の

スルフヒドリル基を有するもの等が挙げられる。また、酸化防止剤としては、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤が挙げられる。賦形剤としてグリシン、システイン、スレオニン、シスチン、トリプトファン、メチオニン、リジン、ヒドロキシリジン、ヒスチジン、アルギニン等のアミノ酸を添加してもよい。さらには、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩などの溶液製剤に通常添加される成分を含んでいてよい。

本発明の溶液製剤中に含まれるG-C-S-Fの量は、治療すべき疾患の種類、疾患の重症度、患者の年齢などに応じて決定できるが、一般には $1 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは $10 \sim 800 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは $50 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ である。

本発明の溶液製剤はこれらの成分をリン酸及び／又はクエン酸緩衝液などの溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって調製できる。リン酸緩衝液は、リン酸一水素ナトリウム-リン酸二水素ナトリウム系が好ましく、クエン酸緩衝液としてはクエン酸ナトリウムの緩衝液が好ましい。

本発明の安定化されたG-C-S-F含有製剤は通常非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下注、静注又は筋注）、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与されるが、経口投与も可能である。

本発明のG-C-S-F含有製剤は、通常密封、滅菌されたプラスチックまたはガラス容器中に収納されている。容器はアンプル、バイアルまたはディスポーザブル注射器のような規定用量の形状で供給することができ、あるいは注射用バックまたは瓶のような大用量の形状で供給することもできる。好ましくは、バイアル、注射器用アンプル又はプレフィルドシリンジに充填された形態のG-C-S-F含有

製剤として供給する。

- 本発明のG-C S F含有製剤は後述の実施例に示すように、40℃-2週間の加速試験あるいは25℃-6ヶ月間の保存を行った後にも、極めて良好なG-C S F残存率を示す。また、G-C S Fは糖鎖末端に1ないし2個のシアル酸をもつが、長期保存中にシアル酸が分解された分解体を生じることがある。本発明のG-C S F含有製剤は、40℃-2週間の加速試験を行った後にも、分解体の生成比を低く保つことが示された。さらに、本発明のG-C S F含有製剤は容器への吸着を十分に抑制することができ、またバイアル充填製剤、シリンジ充填製剤等の容器の形状にかかわらず、40℃-2週間の加速試験後、及び25℃-6ヶ月の保存後に極めて良好なG-C S F残存率を示す。

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。

実施例

15 試験方法

250mgのG-C S F、0.1gのポリソルベート20、30gのD-マンニトールを秤量し、リン酸ナトリウム緩衝液にて、下記の第1表に示す各種pHとなるように調整した後、全量を1Lとした。

【表1】

調剤液pH	G-CSF	ポリソルベート 20	マンニトール	リン酸ナトリウム 緩衝剤	全量
4.0	250 mg	0.1 g	30 g	25 mM相当量	1 L
5.0	250 mg	0.1 g	30 g	25 mM相当量	1 L
5.5	250 mg	0.1 g	30 g	25 mM相当量	1 L
6.0	250 mg	0.1 g	30 g	25 mM相当量	1 L
6.5	250 mg	0.1 g	30 g	25 mM相当量	1 L
7.0	250 mg	0.1 g	30 g	25 mM相当量	1 L
7.5	250 mg	0.1 g	30 g	25 mM相当量	1 L
8.0	250 mg	0.1 g	30 g	25 mM相当量	1 L

各調剤液は無菌的に調製を行い、濾過を行った後、無菌的にバイアルに1mL

ずつ充填、密封し、G-C S F 溶液製剤を製造した。

このようにして無菌的に調製したG-C S F 250 μ g/mL 含有製剤を、40℃の恒温槽内に2週間静置した。

バイアル中のG-C S F 含有量を下記の方法1に基づき測定した。また、バイアル中のG-C S F 糖鎖分解体含量を下記の方法2に基づき測定した。

方法1

C4逆相カラム(4.6mm x 250mm、300オングストローム)を用い、純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた。逆相系高速液体クロマトグラフィー法によりG-C S F 含量を測定した。G-C S F として5 μ g 相当量を注入し、アセトニトリルのグラジエントによりG-C S F を溶出させ、215nmの波長で分光学的に検出した。

本方法で測定したG-C S F 含量を用い、下記の式に基づき、40℃-2週間加速後の残存率(%)を算出した。

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{(\text{40℃-2週間加速後品のG-C S F 含量})}{(\text{未加速品のG-C S F 含量})} \times 100$$

方法2

陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー法により、G-C S F 糖鎖分解体(糖鎖末端に存在するシアル酸が全て分解されたもの)、及びG-C S F (未変化体)を検出した。即ち、陰イオン交換カラム(TSKgel DEAE)を用い、20mM トリス-HCl 緩衝液(pH 7.4)を移動相とし、NaCl グラジエント(0-500mM)により溶出させ、215nmの波長で分光学的に検出した。

本方法で測定したG-C S F 糖鎖分解体とG-C S F 未変化体の測定値を用い、下記の式に基づき、40℃-2週間加速後のG-C S F 糖鎖分解体生成比(%)を算出した。

$$\text{G-CSF 糖鎖分解体生成比 (\%)} = \frac{(\text{G-CSF 糖鎖分解体})}{(\text{G-CSF 糖鎖分解体}) + (\text{G-CSF 未変化体})}$$

実施例 1：各種 pH の G-C S F 残存率に及ぼす効果

第 1 表に記載の各種 pH で調製した溶液製剤を、40℃-2 週間加速試験を行った後の G-C S F 残存率を方法 1 に記載の式により算出した。得られた結果を
5 図 1 に示す。

pH が 7 以下において G-C S F 残存率は 75% 以上であった。

実施例 2：各種 pH の G-C S F 糖鎖分解体生成に及ぼす効果

第 1 表に記載の各種 pH で調製した溶液製剤を、40℃-2 週間加速試験を行
10 った後の G-C S F 糖鎖分解体生成比をを方法 2 に記載の式により算出した。得られた結果を図 2 に示す。

pH が約 5～7 の範囲では、G-C S F 糖鎖分解体の生成比がきわめて低かった。

15 実施例 3：界面活性剤濃度の容器への G-C S F 吸着に及ぼす効果

250mg の G-CSF、5.844g の塩化ナトリウムを添加した後、さらに下記の表 2 に示す各ポリソルベート 20 濃度となるように添加し、リン酸ナトリウム緩衝液にて pH を 6.5 に調整し、全量を 1L とした。

【表 2】

ポリソルベート 20	G-CSF	塩化ナトリウム	リン酸ナトリウム 緩衝液	pH	全量
0 g	250 mg	5.844 g	15mM 相当量	6.5	1 L
0.02 g	250 mg	5.844 g	15mM 相当量	6.5	1 L
0.05 g	250 mg	5.844 g	15mM 相当量	6.5	1 L
0.1 g	250 mg	5.844 g	15mM 相当量	6.5	1 L
0.2 g	250 mg	5.844 g	15mM 相当量	6.5	1 L
0.5 g	250 mg	5.844 g	15mM 相当量	6.5	1 L

無菌的に調整・濾過を行い製造した、表 2 記載の G-CSF 各調剤液は、バイアル（村瀬硝子株式会社製無処理白色ガラスバイアル（5mL））に対して 1mL ずつ充填し、充填直後、および、充填後 24 時間経過後に方法 1 記載の逆相系高速液体クロマトグラフィー法により G-CSF 含量を測定した。

本方法で測定した G-CSF 含量を用い、下記の式に基づき、充填後 24 時間経過後の吸着抑制率（%）を算出した。

（充填後 24 時間経過後の G-CSF 含量）

$$\text{吸着抑制率（\%）} = \frac{\text{（充填直後の G-CSF 含量）}}{\text{（充填後 24 時間経過後の G-CSF 含量）}} \times 100$$

得られた結果を表 3 及び図 3 に示す。

【表 3】

	重量部 ^{*)}	吸着抑制率
	0	94.5 %
15	0.08	95.0 %
	0.2	97.5 %
	0.4	97.0 %
	0.8	100 %
	2	99.5 %

^{*)}重量部：G-CSF 1 重量部に対するポリソルベート 20 の重量部

G-CSF 1 重量部に対するポリソルベート濃度が 1 重量部以下の場合にも吸着抑制率は十分であった。

実施例 4：バイアル又はシリンジ充填製剤の安定性

25 250mg の G-CSF、0.1g のポリソルベート 20、7g の塩化ナトリウムを秤量し、リン酸ナトリウム緩衝液にて pH を 6.5 に調整した全量 1L の調剤液を無菌的に調製し、濾過を行った後、無菌的にバイアル（同上）又はシリンジ（日本ベクトン・ディッキンソン社製ハイバック SFC、1mL ロング）に 1mL ずつ充填、密封し、表 4 に示す G-CSF 溶液製剤を製造した。

【表 4】

G-CSF	ポリソルベート 20	塩化ナトリウム	リン酸ナトリウム緩 衝剤	調剤pH	全量
250 mg	0.1 g	7.0 g	15mM	6.5	1 L

- 5 このようにして無菌的に調製したG-CSF 250 μ g/mL含有製剤を、40℃の恒温槽内に2週間静置、又は25℃の恒温槽内に6ヶ月静置した。

バイアル中、又はシリンジ中のG-CSF含有量を方法1に基づき測定し、40℃-2週間加速後のG-CSF残存率、及び25℃-6ヶ月保存後のG-CSF残存率を方法1記載の式により算出した。

- 10 得られた結果を表5に示す。

【表 5】

容器形態	残存率	
	40℃-2週加速品	25℃-6ヶ月保存品
バイアル充填製剤	89.6 %	98.4 %
シリンジ充填製剤	90.7 %	97.9 %

- 15 本発明のG-CSF製剤は、バイアル充填製剤、シリンジ充填製剤のいずれにおいても、40℃-2週加速後の残存率は75%以上であり、25℃-6ヶ月保存後の残存率は95%以上であり、優れた安定性を示した。

産業上の利用可能性

- 20 本発明のG-CSF含有製剤は、G-CSF 1重量部に対して1重量部以下という極めて少量の界面活性剤を含むことにより、製剤中に微量で存在するG-CSFの温度、湿度、酸素、紫外線等の外的因子に基づく会合、重合、あるいは酸化もしくは容器壁への吸着の結果として生じる、有効成分の損失、活性の低下等に関する問題点を効果的に解決することができる。従って、本発明は製造工程に
- 25 おける煩雑さ、コストを少なくし、また長期保存にも安定な溶液製剤を提供するものである。

請求の範囲

1. 顆粒球コロニー刺激因子と、顆粒球コロニー刺激因子 1 重量部に対して 1 重量部以下の少なくとも 1 種の製薬上許容される界面活性剤を含み、pH 7 以下
5 である、安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。
2. 界面活性剤を顆粒球コロニー刺激因子 1 重量部に対して 0.2～1 重量部の範囲内の量で含む請求項 1 記載の顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。
3. 界面活性剤を顆粒球コロニー刺激因子 1 重量部に対して 0.2～0.8 重量部の範囲内の量で含む請求項 2 記載の顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。
- 10 4. 界面活性剤を顆粒球コロニー刺激因子 1 重量部に対して 0.4～0.8 重量部の範囲内の量で含む請求項 2 記載の顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。
5. 界面活性剤を顆粒球コロニー刺激因子 1 重量部に対して 0.4 又は 0.8 重量部含む請求項 2 記載の顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。
6. 安定化剤として実質的にタンパク質を含まない請求項 1 記載の顆粒球コロ
15 ニー刺激因子含有製剤。
7. 界面活性剤が非イオン界面活性剤であるソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エス
20 テル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンミツロウ誘導体、ポリオキシエチレンラノリン誘導体、ポリオキシエチレン脂肪酸アミド；陰イオン界面活性剤であるアルキル硫酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、アル
25 キルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤であるレシチン、グリセリン脂質、スフィンゴリン脂質、ショ糖脂肪酸エステルからなる群から選択される少なくとも 1 種である請求項 1 記載の顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。
8. 界面活性剤がポリソルベート 20 及びポリソルベート 80 からなる群から選択されるポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルである請求項 1 記載の

顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

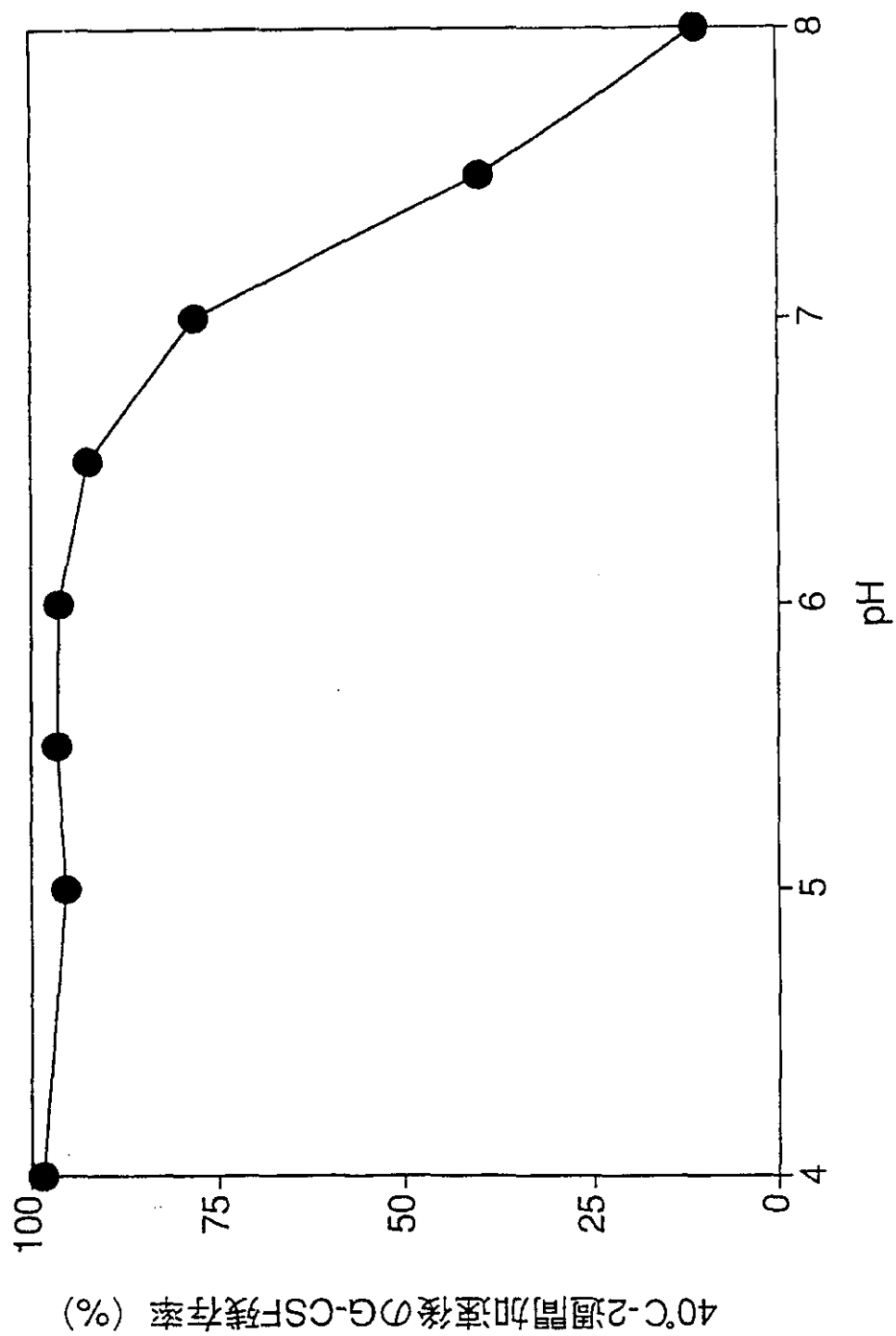
9. pHが5～7である請求項1記載の顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

10. pHが6～6.8である請求項1記載の顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

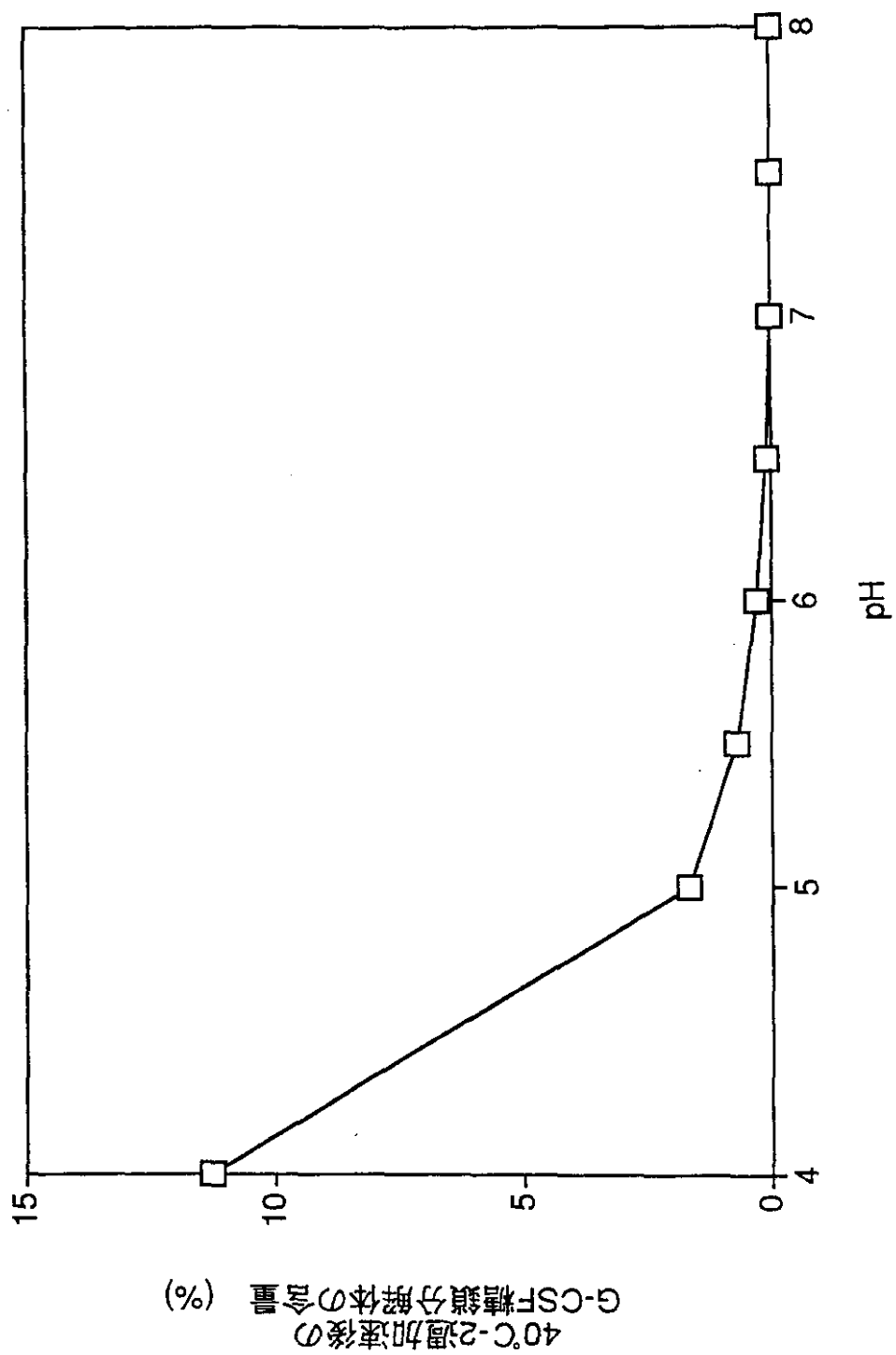
11. pHが6.2～6.8である請求項1記載の顆粒球コロニー刺激因子含有
5 製剤。

12. バイアル、注射器用アンプル又はプレフィルドシリンジに充填された請求
項1記載の顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

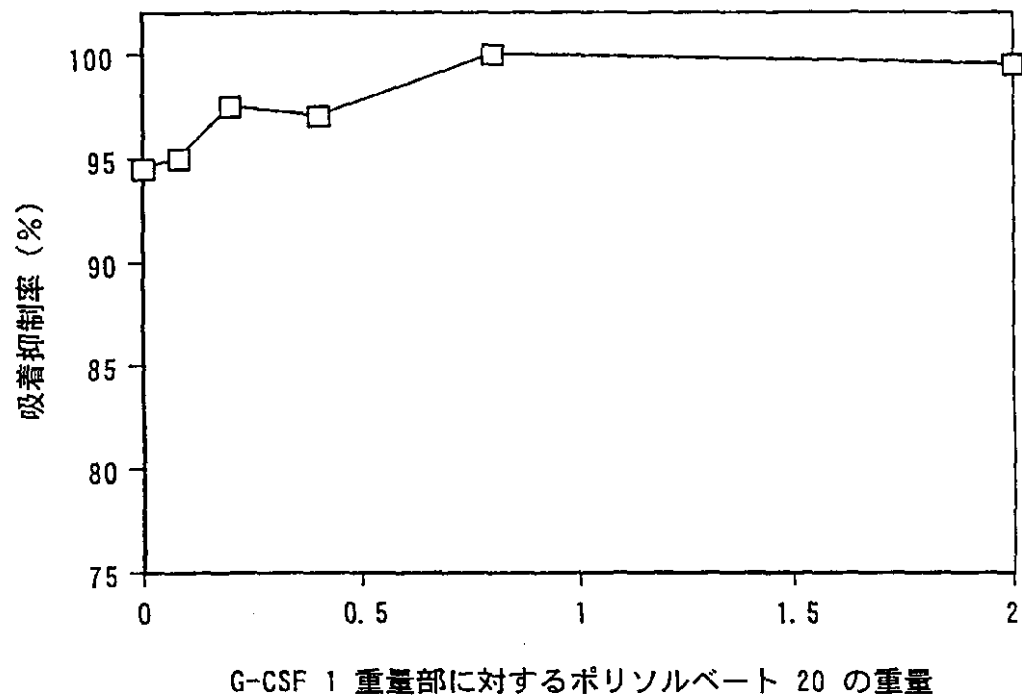
【図1】



【図2】



【図 3】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁶ A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ A61K38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), WPIL (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 8-505610, A (Boehringer Mannheim GmbH.), 18 June, 1996 (18. 06. 96) & DE, 4242919, A1 & WO, 94/14466, A1 & EP, 674525, A1 Claims ; Examples 4, 5, 7 to 9	1-12
X	JP, 6-510031, A (Boehringer Mannheim GmbH.), 10 November, 1994 (10. 11. 94) & DE, 4126983, A1 & EP, 528313, A1 & WO, 93/03744, A1 & US, 5503827, A Claims ; Examples 6 to 9	1-12
X	JP, 8-504784, A (Boehringer Mannheim GmbH.), 21 May, 1996 (21. 05. 96) & DE, 4242863, A1 & WO, 94/14465, A1 & EP, 674524, A1 Claims ; Examples 6, 7, 10	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
11 May, 1999 (11. 05. 99)Date of mailing of the international search report
8 June, 1999 (08. 06. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01080

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 63-146826, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 June, 1988 (18. 06. 88) & DE, 3723781, A & GB, 2193631, A & SE, 8702966, A & DK, 8703683, A	1-12

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/01080

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁶ A 61 K 38/17

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁶ A 61 K 38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), WPIL (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 8-505610, A (ベーリンガー マンハイム ゲゼル シャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング), 18. 6月. 1996 (18. 06. 96), & DE, 4242919, A1, & WO, 94/14466, A1, & EP, 674525, A1, 請求の範囲, 実施例 4, 実施例 5, 実施例 7-9	1-12
X	J P, 6-510031, A (ベーリンガー マンハイム ゲーエ ムベアー), 10. 11月. 1994 (10. 11. 94), & DE, 4126983, A1, & EP, 528313, A1,	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 05. 99

国際調査報告の発送日

08.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬下 浩一

4C

9736

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	& WO, 93/03744, A1, & US, 5503827, A, 請求の範囲, 実施例6-9	1-12
	JP, 8-504784, A (ベーリンガー マンハイム ゲゼル シャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング), 21. 5月. 1996 (21. 05. 96), & DE, 4242863, A1, & WO, 94/14465, A1, & EP, 674524, A1, 請求の範囲, 実施例6-7, 実施例10	
A	JP, 63-146826, A (中外製薬株式会社), 18. 6月. 1988 (18. 06. 88), & DE, 3723781, A, & GB, 2193631, A, & SE, 8702966, A, & DK, 8703683, A	1-12

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 38/17

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99803735.4

[43]公开日 2001 年 4 月 25 日

[11]公开号 CN 1292705A

[22]申请日 1999.3.5 [21]申请号 99803735.4

[30]优先权

[32]1998.3.6 [33]JP [31]54799/1998

[86]国际申请 PCT/JP99/01080 1999.3.5

[87]国际公布 WO99/44630 日 1999.9.10

[85]进入国家阶段日期 2000.9.6

[71]申请人 中外制药株式会社

地址 日本东京

[72]发明人 住田秀司 佐藤泰

[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 陈文平

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 无蛋白制剂

[57]摘要

本发明涉及一种稳定的含粒细胞集落刺激因子制剂,该制剂含有粒细胞集落刺激因子和至少一种药学上可接受的表面活性剂并且具有等于或小于 7 的 pH,所述表面活性剂的含量是以每 1 重量份粒细胞集落刺激因子计等于或小于 1 重量份的表面活性剂。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种稳定的含粒细胞集落刺激因子制剂，该制剂含有粒细胞集落刺激因子和至少一种药学上可接受的表面活性剂并且具有等于或小于 7 的 pH，所述表面活性剂的含量是以每 1 重量份粒细胞集落刺激因子计等于或小于 1 重量份。
2. 权利要求 1 所述的含粒细胞集落刺激因子制剂，其中所述表面活性剂的含量是 0.2 至 1 重量份，以每 1 重量份粒细胞集落刺激因子计。
3. 权利要求 2 所述的含粒细胞集落刺激因子制剂，其中所述表面活性剂的含量是 0.2 至 0.8 重量份，以每 1 重量份粒细胞集落刺激因子计。
4. 权利要求 2 所述的含粒细胞集落刺激因子制剂，其中所述表面活性剂的含量是 0.4 至 0.8 重量份，以每 1 重量份粒细胞集落刺激因子计。
5. 权利要求 2 所述的含粒细胞集落刺激因子制剂，其中所述表面活性剂的含量是 0.4 至 0.8 重量份，以每 1 重量份粒细胞集落刺激因子计。
6. 权利要求 1 所述的含粒细胞集落刺激因子制剂，该制剂基本上不含蛋白质作为稳定剂。
7. 权利要求 1 所述的粒细胞集落刺激因子制剂，其中所述表面活性剂是至少一种选自下列的表面活性剂：非离子表面活性剂，如脱水山梨糖醇脂肪酸酯、甘油脂肪酸酯、聚甘油脂肪酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯甘油脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯聚氧化丙烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯硬化蓖麻油、聚氧乙烯蜂蜡衍生物、聚氧乙烯羊毛脂衍生物、聚氧乙烯脂肪酰胺；阳离子表面活性剂，例

如烷基硫酸盐、聚氧乙烯烷基醚硫酸盐、磺基琥珀酸烷基酯盐；和天然表面活性剂，例如卵磷脂、甘油磷脂、神经磷脂、蔗糖脂肪酸酯。

8. 权利要求 1 所述的含粒细胞集落刺激因子制剂，其中所述表面活性剂是选自吐温 20 和吐温 80 的聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯。

9. 权利要求 1 所述的含粒细胞集落刺激因子制剂，该制剂的 pH 为 5-7。

10. 权利要求 1 所述的含粒细胞集落刺激因子制剂，该制剂的 pH 为 6-6.8。

11. 权利要求 1 所述的含粒细胞集落刺激因子制剂，该制剂的 pH 为 6.2-6.8。

12. 权利要求 1 所述的含粒细胞集落刺激因子制剂，该制剂包装在小瓶、安瓿或预装注射器中。

说明书

无蛋白制剂

发明领域

本发明涉及含有粒细胞集落刺激因子的制剂，并且特别涉及通过防止因在容器壁上吸附、聚集、聚合、氧化等所致的活性组分损失和失活来稳定化的含粒细胞集落刺激因子制剂。

现有技术

粒细胞集落刺激因子(此后也称作“G-CSF”)是分子量约为 20,000 并作用于嗜神经(neutrophil)前体细胞促进其增殖和分化至成熟的糖蛋白。

通过培养获自口腔基底癌患者肿瘤细胞的细胞系，我们提纯出高纯度的人 G-CSF，由此成功克隆了人 G-CSF 基因，而且目前可以通过遗传工程在动物细胞中大量生产重组人 G-CSF。我们还成功地将这种纯化 G-CSF 转化为制剂产品，在市场上它作为抗感染剂供应(日本特许公告号 2116515)。

G-CSF 以极小的量应用，即含有 0.1-1000 μ g(优选 5-500 μ g)G-CSF 的制剂每周向每个成年人给药 1 至 7 次。然而，这种 G-CSF 被吸附在安瓿、注射器等的侧壁上。G-CSF 对于外部因素如温度、湿度、氧、紫外线等不稳定且敏感以致发生包括聚集、聚合或氧化在内的物理或化学变化，导致活性严重损失。

因此，已提出多种制剂设计以为市场提供稳定的 G-CSF 制剂。例如，已推荐一种含有选自醋酸、乳酸、柠檬酸、马来酸、磷酸及其盐或精氨酸及其盐的缓冲剂的制剂(JPA 号 505610/96)。也有建议含有 1-10,000 重量份表面活性剂/重量份 G-CSF 的 G-CSF 制剂(JPA 号 146826/88)。后一文献描述了表面活性剂的水平，特别是其下限极其严格以防止 G-CSF 的损失并且在含 G-CSF 液体制剂中实现稳定化作用。

本发明的一个目的是提供一种 G-CSF 制剂，该制剂能够减小制备方法的复杂性并且该制剂对于长时间储存更加稳定。

发明概述

作为达到上述目进行的缜密研究的成果，我们发现即使当制剂只含有极少量表面活性剂作为稳定剂时也可以获得稳定的 G-CSF 制剂，基于该发现我们完成了本发明。

因此，本发明提供一种稳定的含有粒细胞集落刺激因子和以每 1 重量份粒细胞集落刺激因子计 0.0001 - 1 重量份的至少一种药学上可接受表面活性剂并且 pH 等于或小于 7 的含粒细胞集落刺激因子制剂。

在此所用的“稳定化”是指在 25℃ 下保存 6 个月后剩余的 G-CSF 为 95% 或更多，或在 40℃ 下保存 2 周后剩余的 G-CSF 等于或多于 75%。

附图简述

图 1. 是表示在 40℃ 下 2 周的加速试验中 pH 和剩余 G-CSF 的百分比之间关系的曲线图。

图 2 是表示在 40℃ 下 2 周的加速试验中 pH 和脱唾液酸化 (desialylated) G-CSF 的产率之间关系的曲线图。

图 3 是表示在包装后经过 24 小时以每 1 重量份 G-CSF 计的吐温 20 重量份和吸附抑制率之间关系的曲线图。

本发明的最优选实施方案

任何高纯人 G-CSF 均可以用于本发明的液体制剂。具体说，G-CSF 可以衍生自天然原料或得自于遗传重组，只要该 G-CSF 具有和哺乳动物的 G-CSF，尤其是人 G-CSF 基本上相同的生物活性。遗传重组 G-CSF 可以具有和天然 G-CSF 相同的氨基酸序列或可以在该氨基酸序列中含有缺失、取代或添加的一个或多个氨基酸，只要该遗传重组 G-CSF 具有所述的生物活性。本发明中的 G-CSF 可以通过任何方法制备，例

如它们可以通过多种技术由人肿瘤细胞系的培养物提取和纯化，或可以通过在大肠杆菌、酵母、中国仓鼠卵巢(CHO)、C127 等中的遗传工程来制备且随后通过多种技术提取和纯化。首选在 CHO 细胞中通过遗传工程制备的 G-CSF。

适合获得本发明的含 G-CSF 稳定制剂的表面活性剂的典型实例包括：非离子表面活性剂，例如脱水山梨糖醇脂肪酸酯，如脱水山梨糖醇一辛酸酯、脱水山梨糖醇一月桂酸酯、脱水山梨糖醇一棕榈酸酯；甘油脂肪酸酯，例如甘油一辛酸酯、甘油一肉豆蔻酸酯、甘油一硬脂酸酯；聚甘油脂肪酸酯，例如十甘油基一硬脂酸酯、十甘油基二硬脂酸酯、十甘油基一亚油酸酯；聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯，例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇一月桂酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇一油酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇一硬脂酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇一棕榈酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇三油酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇三硬脂酸酯；聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯，例如聚氧乙烯山梨糖醇四硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨糖醇四油酸酯；聚氧乙烯甘油脂肪酸酯，例如聚氧乙烯甘油基一硬脂酸酯；聚乙二醇脂肪酸酯，例如聚乙二醇二硬脂酸酯；聚氧乙烯烷基醚、例如聚氧乙烯月桂基醚；聚氧乙烯聚氧化丙烯烷基醚，例如聚氧乙烯聚氧丙烯甘醇醚、聚氧乙烯聚氧丙烯丙基醚、聚氧乙烯聚氧丙烯鲸蜡基醚；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，例如聚硬化乙烯蓖麻油、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，例如聚氧乙烯山梨糖醇蜂蜡；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，例如具有 6-18 HLB 的聚氧乙烯硬脂酰胺；阳离子表面活性剂，例如具有 C10-18 烷基的烷基硫酸盐，如鲸蜡基硫酸钠、月桂基硫酸钠、油基硫酸钠；EO 的平均摩尔数为 2-4 且具有 C10-18 烷基的聚氧乙烯烷基醚硫酸盐，如聚氧乙烯月桂基硫酸钠；具有 C8-18 烷基的磺基琥珀酸烷基酯盐，例如磺基琥珀酸月桂基酯钠；天然表面活性剂，例如卵磷脂；甘油磷脂类；神经磷脂类，例如鞘磷脂；其中脂肪酸含有 12 至 18 个碳原子的蔗糖脂肪酸酯。可以在本发明的

液体制剂中加入一种或两种或多种的上述表面活性剂。

优选的表面活性剂是聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯，更优选吐温(polysorbates)20、21、40、60、65、80、81、85，首选吐温 20 和 80。

表面活性剂在本发明含 G-CSF 制剂中的加入量以每 1 重量份 G-CSF 计一般为 0.0001-1 重量份，优选以每 1 重量份 G-CSF 计为 0.1-1 重量份，特别优选以每 1 重量份 G-CSF 计为 0.2-0.8 重量份，首选以每 1 重量份 G-CSF 计为 0.4-0.8 重量份。尤其当每 1ml 制剂中含有 125 μ g 或 250 μ g 的 G-CSF 时，适宜加入 100 μ g 的表面活性剂。因此，以每 1 重量份 G-CSF 计，尤其优选 0.4 重量份或 0.8 重量份的表面活性剂。当未加入任何蛋白质如白蛋白作为稳定剂时，在超过 1 重量份(以每 1 重量份 G-CSF 计)的表面活性剂的存在下长时间保存后，剩余 G-CSF 的百分比趋于降低。实际上 1 重量份或更少的表面活性剂(以每 1 重量份 G-CSF 计)就足以抑制 G-CSF 吸附在容器上。

本发明优选的含 G-CSF 制剂基本上不含有蛋白质作为稳定剂。一些上市产品含有蛋白质如人血清白蛋白或纯化明胶作为稳定剂来抑制 G-CSF 的化学或物理变化。但是，蛋白质作为稳定剂的加入包括一个极其复杂的用于消除病毒污染或其它问题的过程。

本发明的含 G-CSF 制剂的 pH 等于或小于 7，优选 5-7，更优选 6-6.8，首选 6.2-6.8。如下文的进一步说明，经过在 40 $^{\circ}$ C 下 2 周的加速试验后，剩余 G-CSF 的百分比在等于或小于 7 的 pH 下保持稳定。从这一点看，优选 pH 约是 7.0 或更低。经过在 40 $^{\circ}$ C 下 2 周的加速试验后测定的脱唾液酸化 G-CSF 的产率显示出在 4 或更小的 pH 下脱唾液酸化产物的含量急剧增加。从这一点看，优选 pH 约等于或大于 5。进一步考虑到中性条件适宜在作为注射制剂对人体给药时刺激性更小，首选 pH 为 6.2-6.8。

本发明的含 G-CSF 制剂含有稀释剂、增溶剂、等渗剂、赋形剂、pH 调节剂、柔化剂、含硫还原剂、抗氧化剂等。例如，等渗剂包括聚乙二醇；和糖类如葡聚糖、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、葡萄糖、果糖、

乳糖、木糖、甘露糖、麦芽糖、蔗糖、棉子糖。含硫还原剂包括 N-乙酰基半胱氨酸、N-乙酰基高半胱氨酸、硫辛酸、硫二甘醇、硫乙醇胺、硫代甘油、硫代山梨糖醇、硫代乙醇酸及其盐、硫代硫酸钠、谷胱甘肽和含巯基化合物如含有 1-7 个碳原子的巯基链烷酸。抗氧剂包括异抗坏血酸、二丁基羟甲苯、丁基羟基苯甲醚、 α -生育酚、醋酸生育酚、L-抗坏血酸及其盐、L-抗坏血酸棕榈酸酯、L-抗坏血酸硬脂酸酯、酸式亚硫酸钠、亚硫酸钠、没食子酸三戊酯、没食子酸丙酯或螯合剂如乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)、焦磷酸钠、偏磷酸钠。可以作为赋形剂加入的是氨基酸，例如甘氨酸、半胱氨酸、苏氨酸、胱氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、羟赖氨酸、组氨酸、精氨酸。也可以含有其它常加入液体制剂中的成分，例如无机盐如氯化钠、氯化钾、氯化钙、磷酸钠、磷酸钾、碳酸氢钠；和有机盐，如柠檬酸钠、柠檬酸钾、醋酸钠。

G-CSF 在本发明液体制剂中的含量取决于被治疗疾病的性质、疾病的严重程度、患者的年龄或其它因素，但通常是在 1 至 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，优选 10 至 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，更优选 50 至 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

本发明的液体制剂可以通过将这些组分溶解在液体制剂领域中已知的缓冲水溶液如磷酸盐和/或柠檬酸盐缓冲液中来制备。优选的磷酸盐缓冲液是磷酸氢二钠-磷酸二氢钠盐系列，并且优选的柠檬酸盐缓冲液是柠檬酸钠缓冲液。

本发明稳定的含 G-CSF 制剂一般经非肠道途径如注射(皮下、静脉内或肌肉内注射)给药或经皮、经粘膜、经鼻或经肺给药，但也可以口服给药。

本发明的含 G-CSF 制剂一般包装在密封和灭菌的塑料或玻璃容器中。所述容器可以作为规定剂型提供，例如安瓿、小瓶或一次性注射器，或可以作为大剂型提供，如注射用袋或瓶。优选含 G-CSF 制剂作为包装在小瓶、安瓿或预装注射器的剂型提供。

如下列实施例所示，本发明的含 G-CSF 制剂经过在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下 2 周的加速试验后或经过在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 6 个月后表现出极佳的剩余 G-CSF

百分比。G-CSF 的糖链具有一个或两个末端唾液酸，它们可在长时间保存的过程中断裂。发现本发明的含 G-CSF 制剂实际上经过在 40℃ 下 2 周的加速试验后脱唾液酸化产物保持在低比率。此外，不论容器是何种形状如小瓶或注射器，本发明的含 G-CSF 制剂可以充分抑制吸附在容器上，并且经过在 40℃ 下 2 周的加速试验后和在 25℃ 下 6 个月的保存后表现出极佳的剩余 G-CSF 百分比。

下列实施例进一步举例说明本发明，但不对本发明构成限制。

实施例

试验方法

将 250mg G-CSF, 0.1g 吐温 20 和 30g D-甘露糖醇的混合物称重并且用调至如下表所示的不同 pH, 和随后调节至 1L 的总量。

表 1

pH	G-CSF	吐温 20	甘露糖醇	磷酸钠缓冲液	总量
4.0	250mg	0.1g	30g	等于 25mM	1L
5.0	250mg	0.1g	30g	同上	1L
5.5	250mg	0.1g	30g	同上	1L
6.0	250mg	0.1g	30g	同上	1L
6.5	250mg	0.1g	30g	同上	1L
7.0	250mg	0.1g	30g	同上	1L
7.5	250mg	0.1g	30g	同上	1L
8.0	250mg	0.1g	30g	同上	1L

将各个配制溶液在灭菌条件下制备和过滤，此后将 1ml 各溶液灭菌包装在 1 个小瓶中并密封，制成 G-CSF 液体制剂。

将由此灭菌制备的含 250μg/ml G-CSF 的制剂在 40℃ 的恒温箱中放置 2 周。

按照下列方法 1 测定各瓶中 G-CSF 的含量。按照下列方法 2 测定各瓶中脱唾液酸化 G-CSF 的含量。

方法 1

在 C4 反相色谱柱(4.6mm×250mm, 300 埃)上用纯水、乙腈和三氟乙酸作为流动相。通过反相高效液体色谱测定 G-CSF 的含量。注射等价于 5μg G-CSF 的量并且用乙腈梯度剂洗脱 G-CSF, 用分光光度计在 215nm 的波长下检测。

利用通过这种方法测定的 G-CSF 含量按照下列公式计算出经过在 40℃ 下 2 周的加速试验后的剩余 G-CSF 百分比(%)。

剩余百分比(%) = [(40℃ 下加速 2 周后的 G-CSF 含量)/(未经加速的 G-CSF)] × 100

方法 2

通过阳离子交换高效液体色谱检测脱唾液酸化 G-CSF(糖链上的唾液酸全部断裂)和 G-CSF(完整)。换言之, 用氯化钠梯度(0-500mM)在阳离子交换色谱柱(TSK 凝胶 DEAE)上用 20mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)作为流动相来洗脱上述两种物质, 用分光光度计在 215nm 的波长下检测。

利用通过这种方法测定的脱唾液酸化 G-CSF 和完整 G-CSF 的数值按照下列公式计算出经过在 40℃ 下加速 2 周后的脱唾液酸化 G-CSF 产率。

脱唾液酸化 G-CSF 的产率(%) = {(脱唾液酸化 G-CSF)/[(脱唾液酸化 G-CSF)+(完整 G-CSF)]} × 100

实施例 1: 不同 pH 对剩余 G-CSF 百分比的影响

对在如表 1 所示的多种 pH 下制备的液体制剂进行 40℃ 下 2 周的加速试验, 此后按照方法 1 的公式计算出剩余 G-CSF 的百分比。结果如图 1 所示。

当 pH 等于或小于 7 时, 剩余 G-CSF 的百分比等于 75% 或更高。

实施例 2: 不同 pH 对脱唾液酸化 G-CSF 的生成的影响

对在如表 1 所示的多种 pH 下制备的液体制剂进行 40℃ 下 2 周的

加速试验，此后按照方法 2 的公式计算出脱唾液酸化 G-CSF 的产率。结果如图 2 所示。

当 pH 在 5-7 的范围内时，脱唾液酸化 G-CSF 的产率极低。

实施例 3: 表面活性剂的浓度对 G-CSF 在容器上的吸附作用的影响

向 250mg G-CSF 和 5.844g 氯化钠的混合物中加入吐温 20 达到如表 2 所示的浓度，并且用磷酸钠缓冲液将混合物的 pH 调至 6.5 和总量为 1L。

表 2

吐温 20	G-CSF	氯化钠	磷酸钠缓冲液	pH	总量
0g	250mg	5.844g	等于 15mM	6.5	1L
0.02g	250mg	5.844g	同上	6.5	1L
0.05g	250mg	5.844g	同上	6.5	1L
0.1g	250mg	5.844g	同上	6.5	1L
0.2g	250mg	5.844g	同上	6.5	1L
0.5g	250mg	5.844g	同上	6.5	1L

如表 2 所示的各种 G-CSF 配制溶液在灭菌条件下制备和过滤，此后将 1ml 的各个溶液灭菌包装在小瓶（未经处理的白色玻璃小瓶（5ml），Murase Glass 生产）中，并且通过方法 1 所示的反相高效液体色谱在包装后立刻和包装后经过 24 小时后测定 G-CSF 的含量。

利用通过这种方法测定的 G-CSF 含量按照下列公式计算出包装后经过 24 小时的吸附抑制率(%)。

吸附抑制率(%) = [(包装后经过 24 小时的 G-CSF 含量)/(包装后即刻的 G-CSF 含量)] × 100

结果如表 3 和附图 3 所示。

表 3

重量份*)	吸附抑制率
0	94.5%
0.08	95.0%
0.2	97.5%
0.4	97.0%
0.8	100%
2	99.5%

*)重量份: 以每 1 重量份 G-CSF 计的吐温 20 的重量份

当吐温浓度是 1 重量份(以每 1 重量份 G-CSF 计)或更少时也具有足够的吸附抑制率。

实施例 4: 包装在小瓶或注射器中的制剂的稳定性

灭菌条件下制备含有 250mg G-CSF、0.1g 吐温 20 和 7g 氯化钠的总量为 1L 和 pH 调至 6.5 的配制溶液, 过滤, 此后将 1ml 各个溶液灭菌包装在小瓶(参见上文)或注射器(Hypac SFC, 长 1ml, Nippon Becton Dickinson & Co., Ltd. 生产)中并密封, 制成如表 4 所示的 G-CSF 液体制剂。

表 4

G-CSF	吐温 20	氯化钠	磷酸钠缓冲液	pH	总量
250mg	0.1g	7.0g	15mM	6.5	1L

将由此灭菌制备的含有 250 μ g/ml G-CSF 的制剂在 40℃ 的恒温箱中放置 2 周或在 25℃ 的恒温箱中放置 6 个月。

按照方法 1 所述方法测定 G-CSF 的含量, 按照方法 1 中的公式分别计算出经过 40℃ 下 2 周的加速试验后或在 25℃ 下保存 6 个月后的剩余 G-CSF 的百分比。

结果如表 5 所示。

表 5

容器类型	剩余百分比	
	在 40℃ 下 2 周的加速试验	在 25℃ 保存 6 个月
小瓶	89.6%	98.4%
注射器	90.7%	97.9%

在小瓶和注射器中，经 40℃ 下 2 周的加速试验后的剩余百分比为 75% 或更高，经 25℃ 下保存 6 个月后的剩余百分比为 95% 或更高，由此证明本发明的 G-CSF 制剂极其稳定。

工业实用性

本发明的含 G-CSF 制剂，其中含有极少量表面活性剂，例如以每 1 重量份 G-CSF 计等于或小于 1 重量份的表面活性剂，可以有效解决有关因聚集、聚合、氧化或在容器壁上吸附所致的活性组分损失或活性降低的问题，这些问题是由外部因素，如制剂中存在的少量 G-CSF 的温度、湿度、氧、紫外线等造成。因此，本发明提供了降低生产过程中的复杂性和成本并且在长时间保存中保持稳定的液体制剂。

说明书附图

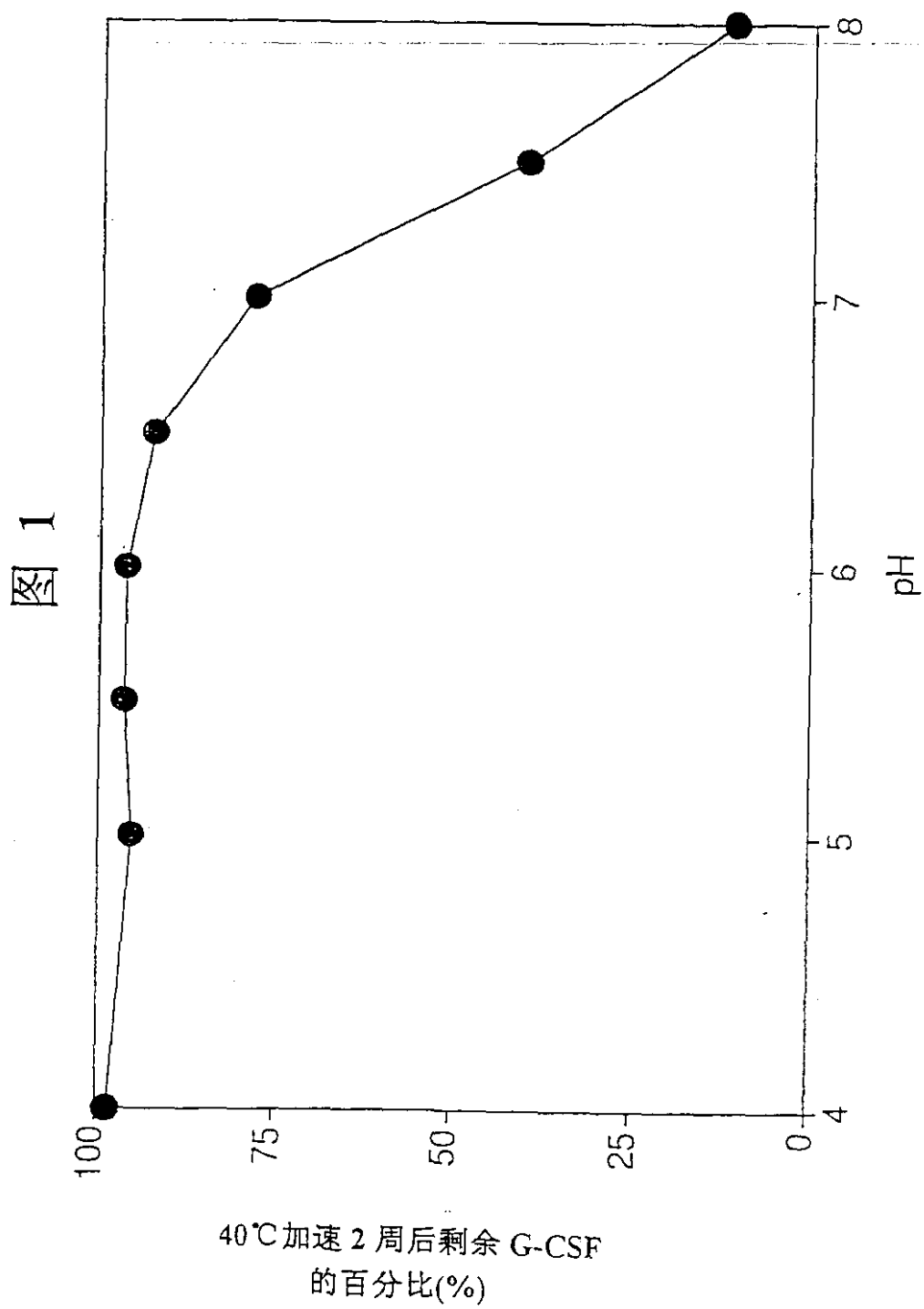
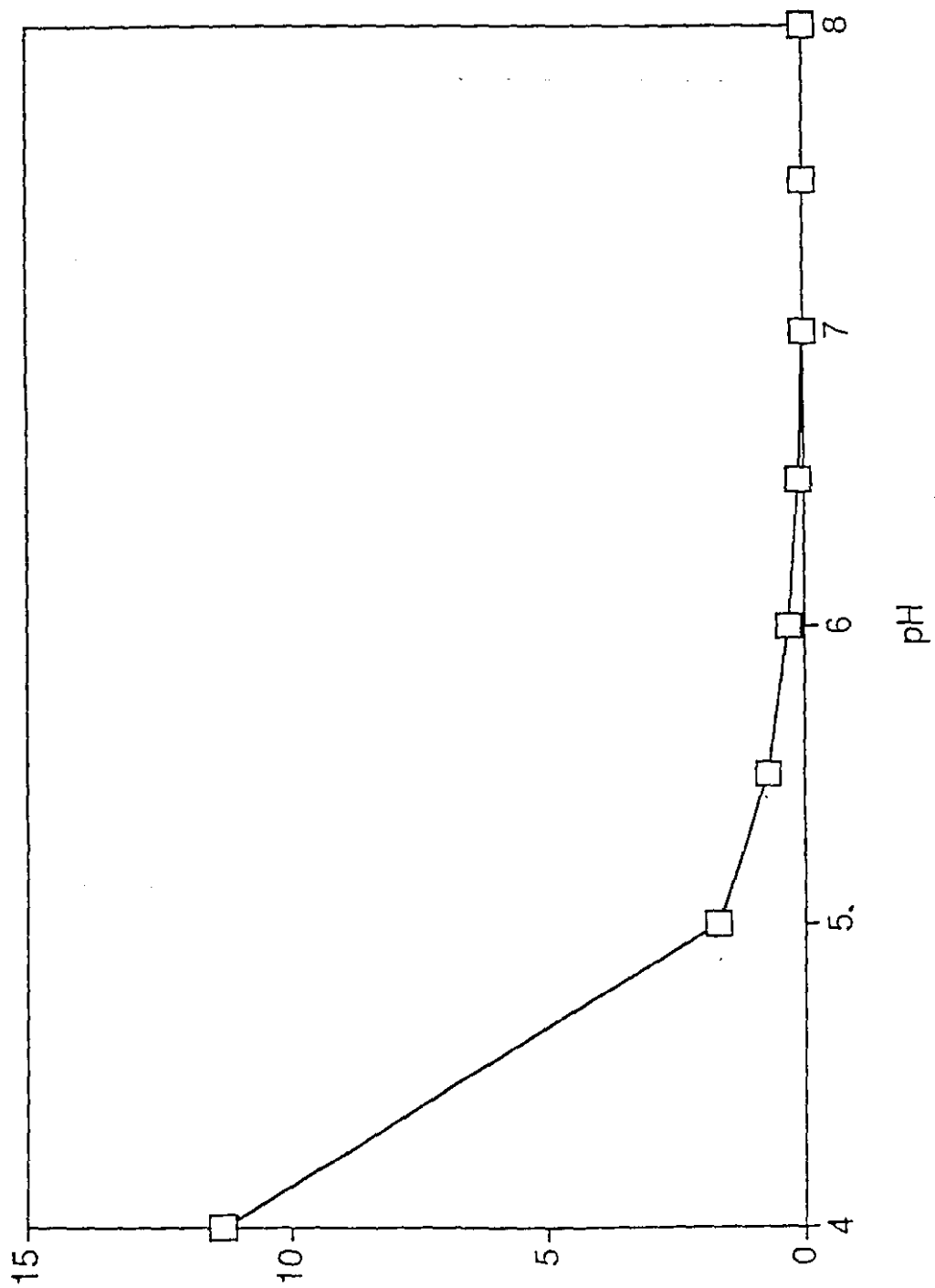


图 2



40°C加速 2 周后脱唾液酸化
G-CSF 的含量(%)

图 3

