



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2197919 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 17/08 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.09.08
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.04.09
(86)	Europeisk søknadsnr	08787525.8
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.08.27
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.06.23
(30)	Prioritet	2007.08.27, EP, 07115047
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	ratiopharm GmbH, Graf-Arco-Strasse 3, 89079 Ulm, Tyskland
(72)	Oppfinner	HINDERER, Walter, Dekan-Schuster-Strasse 25, 63110 Rodgau, Tyskland SCHECKERMANN, Christian, Sägegasse 1c, 79238 Ehrenkirchen, Tyskland
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Flytende formulering av G-CSF konjugat
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 1 260 230 WO-A-2005/039620 WO-A-2006/074467 WO-A-2007/099145 PIEDMONTE ET AL: "Formulation of Neulasta(R) (pegfilgrastim)" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 60, no. 1, 11 August 2007 (2007-08-11), pages 50-58, XP022370571 ISSN: 0169-409X SCHNEIDER ARMIN ET AL: "A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system" CELL CYCLE, vol. 4, no. 12, December 2005 (2005-12), pages 1753-1757, XP002501967 ISSN: 1538-4101 HERMAN A C ET AL: "Characterization, formulation, and stability of Neupogen (Filgrastim), a recombinant human granulocyte-colony stimulating factor.", PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 1996, vol. 9, 1996, pages 303-328, ISSN: 1078-0467

Flytende formulering av G-CSF konjugat

Beskrivelse

Foreliggende oppfinnelse angår et flytende farmasøytisk preparat omfattende et granulocyt-kolonistimulerende faktor-polypeptid konjugert med en polymer, hvor preparatet har en pH-verdi i området på 4,5 til 5,5. Preparatet omfatter videre en surfaktant og eventuelt ett eller flere andre farmasøytisk akseptable hjelpestoffer. Videre er preparatet ifølge oppfinnelsen fritt for vinsyre eller salter derav og ravsyre og salter derav som bufringsmidler og inneholder ikke aminosyrer som stabiliseringsmiddel. Preparatet oppviser god lagringsstabilitet og er spesielt anvendelig for profylakse og behandling av lidelser og medisinske indikasjoner hvor granulocyt-kolonistimulerende faktor-preparater anses som anvendelig behandling.

Granulocyt-kolonistimulerende faktor (G-CSF) er en hematopoietisk vekstfaktor som stimulerer proliferasjon og differensiering av hematopoietiske forløperceller og aktivering av modne nøytrofiler. G-CSF er i stand til å støtte nøytrofil proliferasjon *in vitro* og *in vivo*. Den humane formen av G-CSF ble klonet av grupper fra Japan og USA i 1986 (se f.eks. Nagata et al. (1986) Nature 319: 415 - 418). Det naturlige humane glykoproteinet finnes i to former, hvorav det ene har 174 og det andre har 177 aminosyrer. Den mer tallrike og mer aktive formen på 174 aminosyrer har blitt anvendt ved utvikling av farmasøytiske produkter ved rekombinant DNA-teknologi.

Store mengder av rekombinant G-CSF har blitt produsert i genetisk konstruert *Escherichia coli* og har blitt vellykket anvendt i kliniske anvendelser for behandling av kreftpasienter som lider av kjemoterapi-indusert neutropeni. G-CSF produsert av *Escherichia coli* er en polypeptidkjede på 175 aminosyrer som inneholder en ekstra metionin ved den N-terminale enden. Dette proteinet har blitt fremstilt ved å uttrykke et G-CSF-gen i *E. coli* og rense proteinproduktet til homogenitet. Det er et hydrofobt protein som har fem cysteinrester, hvorav fire er involvert i disulfidbinding. Den frie cysteinresten er generelt implisert i dannelse av høyere molekylvekt-aggregater ved lagring i løsning. Aggregater av proteinene kan også dannes fra oksiderte former av proteinet som oppstår ved oksidasjon av de interne metioninrestene i primærsekvensen av proteinet. Av de fire metioninrestene er én ved den N-terminale enden og de andre tre er interne. De oksiderte formene av proteinet som inneholder oksidert metionin ved posisjon 122 kan separeres fra formene inneholdende oksiderte metioniner ved posisjonene 127 eller 138 og det native proteinet ved vanlig reversfase HPLC

separasjonsmetoder (posisjonene er beregnet for Metionyl-G-CSF bestående av 175 aminosyrer).

Rekombinant human G-CSF syntetisert i et *E. coli* ekspresjonssystem kalles filgrastim (internasjonalt generisk navn ("international non-proprietary name"), INN). Strukturen av filgrastim er litt forskjellig fra det naturlige glykoproteinet. Den andre formen av rekombinant human G-CSF kalles lenograstim (INN) og blir syntetisert i ovarieceller fra kinesisk hamster (CHO-celler). Filgrastim og lenograstim markedsføres i Europa under henholdsvis varenavnene Neupogen® og Granocyte.

De kommersielt tilgjengelige formene av rekombinant human G-CSF har imidlertid en kortvarig farmakologisk effekt og må ofte administreres mer enn én gang daglig så lenge leukopeni-tilstanden varer. Et molekyl med lengre halveringstid i sirkulasjonen ville redusere antall administreringer nødvendig for å lindre leukopeni og forebygge følgende infeksjoner.

Et annet problem med rekombinante human G-CSF-produkter som for øyeblikket er tilgjengelige er forekomsten av doseavhengig bensmerte. Siden bensmerte erfares av pasienter som en betydelig bivirkning ved behandling med rekombinant human G-CSF, ville det være ønskelig å tilveiebringe et rekombinant humant G-CSF-produkt som ikke forårsaker bensmerte, enten ved hjelp av et produkt som i seg selv ikke har denne effekten eller som er effektivt i en dose som er tilstrekkelig liten til å ikke forårsake, eller i det minste forårsaker mindre, bensmerte. Følgelig er det et klart behov for forbedrede rekombinante G-CSF-molekyler og farmasøytiske preparater inneholdende G-CSF-molekyler som stabile bruksferdige preparater.

Proteinkonstruksjon-varianter av human G-CSF har blitt rapportert, f.eks. i G-CSF varianter er beskrevet i WO 01/87925, EP 0 456 200 A, US 6,166,183, US 6,004,548, US 5,580,755, US 5,582,823, US 5,675,941, US 5,416,195, US 5,399,345, WO 2005/055946 og WO 2006/074467.

Modifikasjon av human G-CSF og andre polypeptider for å introdusere minst én ytterligere karbohydratkjede sammenlignet med det native polypeptidet har også blitt rapportert (US 5,218,092). I tillegg har polymermodifikasjoner av nativ human G-CSF, inkludert binding av poly(etylenglykol) (PEG)-grupper, blitt rapportert og studert (US 5,824,778, US 5,824,784, WO 96/11953, WO 95/21629 og WO 94/20069).

Det er generelt anerkjent at stabiliteten av proteiner kan forbedres og immunresponsen mot disse proteinene reduseres når disse proteinene er koblet til polymeriske molekyler.

WO 94/28024 beskriver at fysiologisk aktive proteiner modifisert med PEG oppviser redusert immunogenisitet og antigenisitet og sirkulerer i blodbanen betydelig lengre enn ukonjugerte proteiner, dvs. har redusert clearance rate.

Binding av syntetiske polymerer til peptid-ryggraden i et forsøk på å forbedre de farmakokinetiske egenskapene av glykoprotein-terapeutika er kjent på området. Et eksempel på en polymer som har blitt konjugert til peptider er PEG. Anvendelse av PEG for å derivatisere peptid-terapeutika har blitt vist å redusere immunogenisiteten av peptidene. For eksempel beskriver US Patent nummer 4,179,337 ikke-immunogene polypeptider slik som enzymer og peptidhormoner bundet til PEG eller poly(polypropylenglykol) (PPG). I tillegg til redusert immunogenisitet blir "clearance-tiden" i sirkulasjonen forlenget på grunn av den økte størrelsen av PEG-konjugatet av de aktuelle polypeptidene.

Pegfilgrastim (INN) er et kovalent konjugat av rekombinant metionyl human G-CSF (filgrastim) og et enkelt 20 kDa monometoksy-PEG-molekyl. Monometoksy-PEG-molekyl er kovalent bundet til den N-terminale metionylresten av filgrastim. Pegfilgrastim markedsføres i Europa under varenavnet Neulasta®.

Den viktigste metoden for binding av PEG, og derivater derav, til peptider er en ikke-spesifikk binding gjennom en aminosyrerest i peptidet (se f.eks., US 4,088,538 US 4,496,689, US 4,414,147, US 4,055,635 og WO 87/00056). En annen metode for binding av PEG til peptider er gjennom ikke-spesifikk oksidasjon av glykosylrester på et glykopeptid (se f.eks., WO 94/05332).

I disse ikke-spesifikke metodene blir PEG tilføyd på en tilfeldig, ikke-spesifikk måte til reaktive rester i en peptid-ryggrad. Tilfeldig tilføydelse av PEG-molekyler har sine ulemper, inkludert mangel på homogenitet av sluttproduktet, og muligheten for reduksjon av den biologiske eller enzymatiske aktiviteten av peptidet. Derfor er det i de siste årene gjort bestrebelser på å utvikle mere setespesifikke metoder for å binde en syntetisk polymer eller annet merke til et peptid og det er funnet at spesifikt konjugerte, homogene peptid-terapeutika kan fremstilles *in vitro* gjennom virkningen av enzymer. Disse enzym-baserte konjugasjonene har fordelene med regioselektivitet og stereoselektivitet. To hovedklasser av enzymer for anvendelse ved syntese av konjugerte peptider er glykosyltransferaser (f.eks. sialyltransferaser, oligosakkaryltransferaser, N-acetylglukosaminyltransferaser) og glykosidaser. Disse enzymene kan anvendes for spesifikk binding av sukker som deretter kan modifiseres til å omfatte en terapeutisk gruppe. Alternativt kan glykosyltransferaser og modifiserte glykosidaser anvendes for å

direkte overføre modifiserte sukkere til peptidryggraden (se f.eks. US 6,399,336 og US 2003/0040037, US 2004/0132640, US 2004/0137557, US 2004/0126838 og US 2004/0142856). Metoder som kombinerer både kjemisk og enzymatisk syntetiske elementer er også kjent (se f.eks. US 2004/137557).

De forskjellige metodene for å konjugere polypeptider som G-CSF med polymeriske grupper som PEG er velkjente og omfattende beskrevet i teknikkens stand. Fremstilling av glyko-pegylert G-CSF er, for eksempel, beskrevet i WO 2005/055946. En annen patentsøknad som angår fremstilling av konjugater mellom G-CSF og PEG-grupper er WO 2006/074467. Ved denne metoden blir konjugatene forbundet via en intakt glykosyl bindingsgruppe som er anbrakt mellom og kovalent bundet til G-CSF polypeptidet og den modifierende gruppen. Konjugatene er dannet fra både glykosylerte og uglykosylerte G-CSF polypeptider ved virkningen av glykosyltransferase. Glykosyltransferase ligerer en modifisert sukkergruppe til enten en aminosyre eller glykosylrest av polypeptidet. Beskrivelsene fra WO 2005/055946 og WO 2006/074467 er uttrykkelig referert til i konteksten til foreliggende oppfinnelse.

I tillegg til PEG er også andre polymeriske grupper beskrevet som anvendelige konjugater med G-CSF og andre terapeutiske proteiner. WO 02/09766 beskriver, blant andre, biokompatible protein-polymerforbindelser fremstilt ved konjugering av biologisk aktivt protein med et biokompatibelt polymer-derivat. De biokompatible polymerene anvendt er høyst reaktive forgrenede polymerer, og de resulterende konjugatene inneholder en lang linker mellom polymerderivat og protein. Eksempler på biokompatible polymerer i henhold til WO 02/09766 er PEG, PPG, polyoksyetylen (POE), polytrimetylenglykol, polymelkesyre og derivater derav, polyakrylsyre og derivater derav, polyaminosyrer, polyuretan, polyfosfazen, poly(L-lysin), polyalkylenoksid (PAO), vannløselige polymerer slik som polysakkarid, dekstran, og ikke-immunogene polymerer slik som polyvinylalkohol og polyakrylamid.

WO 94/01483 beskriver biokompatible polymerkonjugater som er dannet ved kovalent binding av en biologisk inaktiv polymer eller polymerderivat til en farmasøytisk ren, syntetisk hydrofil polymer via spesifikke typer kjemiske bindinger. Som naturlig forekommende polymerer og derivater derav er polysakkarider slik som hyluronsyre, proteoglykaner slik som kondroitinsulfat A, B og C, kitin, heparin, heparinsulfat, dekstran slik som syklodekstran, hydroksyetylcellulose, celluloseeter og stivelse, lipider slik som triglyserider og fosfolipider beskrevet.

WO 96/11953 beskriver N-terminalt kjemisk modifiserte proteinforbindelser og fremgangsmåter for fremstilling derav. Spesielt er det beskrevet G-CSF-preparater som er et resultat av binding av en vannløselig polymer til den N-terminale enden av G-CSF. Eksempler på vannløselige polymerer listet opp i WO 96/11953 er kopolymerer av etylenglykol og propylenglykol, karboksymetylcellulose, dekstran, polyvinylalkohol, polyvinyl pyrrolidon, poly-1,3-dioksolan, poly-1,3,6-trioksan, etylen/malein anhydrid kopolymer, polyaminosyrer (enten homopolymerer eller tilfeldige ("random" kopolymerer), poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylenglykol, PPG homopolymerer, polypropylenoksid/etylenoksid kopolymerer eller polyoksyetylerter polyoler.

WO 97/30148 beskriver polypeptidkonjugater med redusert allergenisitet, omfattende et polymerisk bærermolekyl som har to eller flere polypeptidmolekyler bundet dertil. Disse konjugatene fremstilles ved å aktivere et polymerisk bærermolekyl, omsette to eller flere polypeptidmolekyler med det aktiverte polymeriske bærermolekylet og blokkere gjenværende aktive grupper på konjugatet. WO 97/30148 lister opp mange forskjellige polymeriske bærermolekyler, inkludert naturlige eller syntetiske homopolymerer slik som polyoler, polyaminer, polykarboksylsyrer og heteropolymerer omfattende minst to ulike bindingsgrupper. Eksempler er gitt, hvilke omfatter star PEGs, forgrenede PEG, polyvinylalkoholer, polykarboksylater, polyvinylpyrrolidoner og poly-D,L-aminosyrer. Konjugatene ifølge WO 97/30148 omfatter også slike som innbefatter dekstraner slik som karboksymetyldekstran, celluloser slik som hydroksyetylcellulose eller hydroksypropylcellulose, hydrolysater av kitosan, stivelser slik som hydroksyetylstivelser eller hydroksypropylstivelser, glykogen, agarose, guar gummi, inulin, pullulan, xantangummi, karrageenan, pektin, alginat osv.

WO 03/074087 angår en metode for å binde proteiner til et stivelse-avledet modifisert polysakkarid. Bindingen mellom proteinet og polysakkaridet, hydroksyalkylstivelse, er en kovalent binding som dannes mellom den terminale aldehydgruppen eller en funksjonell gruppe som er et resultat av kjemisk modifikasjon av nevnte terminale aldehydgruppe av hydroksyalkylstivelsesmolekylet, og en funksjonell gruppe fra proteinet. Som reaktiv gruppe fra proteinet er aminogrupper, tiogrupper og karboksygrupper beskrevet.

WO 2005/014050 beskriver fremstilling av konjugater av hydroksyalkyl stivelse (HAS) og et G-CSF-protein, hvori minst én funksjonell gruppe fra polymeren eller derivat derav omsettes med minst én funksjonell gruppe fra proteinet, for derved å danne en kovalent binding. Andre tidligere kjente dokumenter som angår "HASylation", foretrukket "HESylation", av polypeptider er WO 2005/014655, WO 2005/092390, WO 2007/031266, WO 2005/092928 og WO 2005/092391.

Selv om det i teknikkens stand er beskrevet flere metoder for å modifisere terapeutiske polypeptider slik som G-CSF ved polymeriske grupper for å forlenge clearance tiden og for å redusere immunogenisitet, synes det å ha blitt gjort lite innsats med hensyn til å utvikle fordelaktige formuleringer for slike polymer-G-CSF-konjugater.

Det ovenfor nevnte Neulasta®-produktet er et flytende preparat ment for subkutan injeksjon. Preparatet omfatter pegfilgrastim, natriumacetat, sorbitol, polysorbat 20 og vann for injeksjon og har en pH på 4,0 (se <http://www.neulasta.com>, og ROTE LISTE 2007). Produktene Neulasta® og Neupogen®, begge markedsført av Amgen, er nesten identiske med hensyn til buffermiddel, hjelpestoffer og pH-verdi av løsningen: Neupogen® omfatter filgrastim (i stedet for pegfilgrastim), natriumacetat, sorbitol, polysorbat 80 og vann for injeksjon og har også en pH på 4,0 (se <http://www.neupogen.com>, og ROTE LISTE 2007).

Foreliggende oppfinnelse angår flytende farmasøytiske preparater omfattende et polymer-G-CSF-konjugat, hvori preparatene har blitt spesielt utviklet til å ta hensyn til egenskapene av polymer-G-CSF-konjugater. Selv om flere metoder har blitt rapportert i tidligere kjent teknikk med hensyn til formuleringer omfattende ukonjugert G-CSF, er lite kjent angående anvendelige preparater av polymer-G-CSF konjugater.

Selv om noen farmasøytiske preparater utviklet for ukonjugert G-CSF er presentert i patentlitteraturen på en slik måte at de omfatter preparater i hvilke det ukonjugerte G-CSF er erstattet av et PEG-G-CSF-konjugat, er det innlysende at preparatene er skreddersydd for, og testet for, kun ukonjugert G-CSF.

For eksempel beskriver WO 2005/042024 stabile farmasøytiske preparater omfattende G-CSF hvori preparatet har en pH-verdi på mer enn 4,0 og videre omfatter en syre, men er fri for surfaktanter. Selv om det farmasøytiske preparatet beskrevet i WO 2005/042024 tydelig har blitt utviklet for ukonjugert G-CSF, er det nevnt i beskrivelsen at det også omfatter G-CSF som er kjemisk modifisert med PEG eller lignende som oppviser samme eller forbedret biologisk aktivitet.

Et annet eksempel er WO 2005/039620 som også angår et stabilt vandig G-CSF-inneholdende preparat. Preparatet inneholder ravsyre eller vinsyre eller salter derav som bufringsmidler og har en foretrukket pH i området 4,0 og 5,8. I henhold til beskrivelsen, kan G-CSF-proteinet også være syntetisk modifisert, f.eks. ved enzymatisk glykosylering eller kjemisk PEGylering.

EP 1 260 230 A1 beskriver stabile proteinformuleringer inneholdende tryptofan som et stabiliseringsmiddel. Listen over proteiner omfatter G-CSF, og også G-CSF kjemisk modifisert med PEG eller lignende. Det blir nevnt at G-CSF-formuleringene foretrukket har en pH på 5-7, mer foretrukket 6,0-6,7.

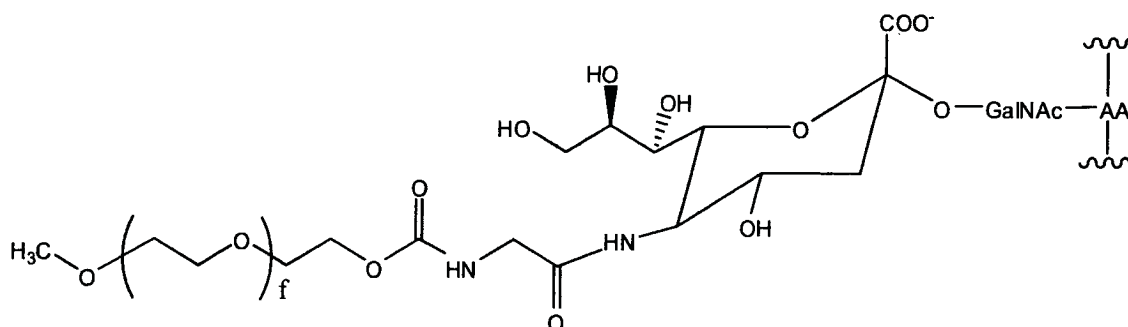
Et annet eksempel er EP 1 336 410 A1, som beskriver injiserbare farmasøytiske formuleringer inneholdende et fysiologisk aktivt protein som en aktiv ingrediens og minst ett sukker som et beroligende middel og med en pH på 6,5-7,4. Igjen i dette tilfellet er det nevnt at G-CSF som er kjemisk modifisert med PEG eller lignende også er omfattet.

EP 1 329 224 A1 beskriver en G-CSF løsningsformulering som inneholder minst én aminosyre eller et salt derav, foretrukket metionin, som et stabiliseringsmiddel. G-CSF løsningsformuleringene har foretrukket en pH på 5-7, mer foretrukket 5,5-6,8. Atter en gang sies G-CSF som er kjemisk modifisert med PEG eller lignende også å være inkludert.

Imidlertid er ingen av formuleringene beskrevet i teknikkens stand en spesifikk polymer-G-CSF-konjugat-formulering. Snarere har oppløsningene beskrevet i patentlitteraturen kun blitt utviklet og testet for ukonjugert G-CSF.

Problemet som ligger til grunn for foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe et polymer-G-CSF- konjugat-preparat som er tilpasset til slike konjugater og som er stabile ved forhøyede temperaturer, dvs. over kjøleskapstemperatur som vanligvis er mellom 2 og 8 °C. Videre er det et formål ifølge oppfinnelsen å tilveiebringe et farmasøytisk preparat som ikke trenger å rekonstitueres ved noe som helst stadium i dets fremstilling og som forårsaker så lite irritasjon som mulig når det administreres til en pasient.

Disse problemene blir løst i henhold til foreliggende oppfinnelse ved å tilveiebringe et farmasøytisk vandig preparat omfattende et polymer-G-CSF-konjugat som aktivt middel med formelen



hvor AA er treonin 133, eller treonin 134 dersom en N-terminal metionin er til stede, av G-CSF, og hvor f er et helt tall valgt fra 1 til 2500, Polysorbat 20 og/eller Polysorbat 80 som surfaktant, sorbitol og/eller mannitol som tonisitetstjusterende middel, acetat som buffer og natrium, og ingen andre hjelpestoffer, hvor preparatet har en pH i området 4,5 til 5,5.

Det er overraskende funnet at formulering av et polymer-G-CSF-konjugat i et preparat med en pH-verdi i området på fra 4,5 til 5,5, foretrukket 5,0, forhindrer sur hydrolyse av konjugat-bindingen. Dette pH-området forbedrer stabiliteten av oppløsningen ved temperaturer over kjøleskapstemperatur (2 - 8 °C), spesielt ved romtemperatur (dvs. under 25 °C) og til og med ved høyere temperaturer, f.eks. 40 °C. Dette betyr at preparatet kan lagres uten kjøling i en lang tidsperiode, uten betydelig tap av aktivitet og uten betydelig degradering.

Videre er, uavhengig av lagringsstabilitet, preparatene ifølge oppfinnelsen fordelaktige fremfor et sammenlignbart preparat med en pH på 4,0, siden et preparat som er mindre surt forårsaker mindre irritasjon ved administrering til en pasient.

Dersom ikke annerledes angitt er de følgende definisjonene forklart for å illustrere og definere betydningen og omfanget av de ulike betegnelse anvendt for å beskrive oppfinnelsen heri.

Betegnelsen "polymer-G-CSF-konjugat" refererer til et konjugat mellom et G-CSF polypeptid og en polymer hvor konjugatet er dannet ved en kovalent binding mellom en funksjonell gruppe av polymeren og en funksjonell gruppe av polypeptidet. Konjugatene kan omfatte én eller flere polymeriske grupper.

Betegnelsen "G-CSF" (eller G-CSF polypeptid eller G-CSF protein eller G-CSF peptid) refererer til et protein som har *in vivo* biologisk aktivitet som naturlig forekommende human G-CSF, dvs. et protein som er i stand til å stimulere differensiering og proliferasjon av hematopoietiske progenitorceller. G-CSF kan umiskjennelig identifiseres som G-CSF i henhold til analysen beskrevet i Stute, N., et al. "Pharmacokinetics of subcutaneous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children" (1992) Blood 79 (11), side 2849-2854.

I et eksempel på en utførelsesform har G-CSF en aminosyresekvensen i henhold til følgende SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO:2, hvor SEQ ID NO: 1 viser villtype aminosyresekvensen av human metionyl-G-CSF som produsert i *E. coli*, og SEQ ID NO:2 viser

aminosyresekvensen av human G-CSF som produsert i mammalske celler, f.eks. i CHO-celler. SEQ ID NO:1 er varianten på 175 aminosyrer, hvori den første aminosyren er metionin og det er en treoninrest ved Thr 134. SEQ ID NO:2 er en variant på 174 aminosyrer som har samme sekvens som varianten på 175 aminosyrer med unntak av at det ledende metionin mangler, følgelig starter sekvensen med T og det er en treoninrest ved posisjon 133.

SEQ ID NO: 1:

**MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPEELV
LLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPE
LGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQ
RRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP (175 aminosyrer)**

SEQ ID NO: 2

**TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVL
LGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPEL
GPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQR
RAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP (174 aminosyrer)**

Fagfolk på området vil enkelt forstå at foreliggende oppfinnelse ikke er begrenset til sekvensene vist heri, men også omfatter varianter av G-CSF. Slike varianter er velkjent på området. De kan inneholde delesjoner, substitusjoner eller addisjoner av én eller flere aminosyrer i de ovenfor viste aminosyresekvensene samtidig som de beholder den biologiske aktiviteten av naturlig forekommende G-CSF. Som eksempler, men ikke på noen måte ment å være begrensende for foreliggende oppfinnelse, er G-CSF-varianter beskrevet i WO 01/87925, EP 0 456 200 A, US 6,166,183, US 6,004,548, US 5,580,755, US 5,582,823, US 5,675,941, US 5,416,195, US 5,399,345, WO 2005/055946 og WO 2006/074467.

G-CSF-polypeptidet kan være glykosylert eller ikke-glykosylert. I en foretrukket utførelsesform er G-CSF-polypeptidet rekombinant human G-CSF produsert i *E. coli*, dvs. har aminosyresekvensen vist ovenfor i SEQ ID NO: 1 eller en variant derav.

Polymeren er PEG.

Alle spesifiseringer av konsentrasjoner i mg/ml anvendt i det følgende i forbindelse med konjugatet er relatert kun til G-CSF-gruppen. PEG-gruppen er per definisjon ikke tatt i betraktning for masse konsentrasjonen.

Mens filgrastim has en molekylvekt på omtrent 18-19 kD, er pegfilgrastim mye større på grunn av monometoksy-PEG-gruppen og har en molekylvekt på omtrent 39 kD. Polymer-G-CSF-konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan ha en molekylvekt i området på 20 til 60 kD, foretrukket i området 35 til 45.

Egnede PEG er beskrevet i teknikkens stand, f.eks. i WO 2005/055946, WO 2006/074467 og WO 01/87329. PEG-gruppen kan være lineær eller forgrenet og ha størrelser på 5 til 40 kD. Foretrukket har PEG-gruppen en molekylvekt på 15 til 25 kD, mest foretrukket omtrent 20 kD.

Fremgangsmåter for fremstilling av polymer-G-CSF-konjugater er også beskrevet i teknikkens stand. Dokumentene nevnt ovenfor i forbindelse med fremstilling av konjugater mellom polypeptider og polymeriske grupper er omfattet hermed som referanser.

Betegnelsen "PEG-G-CSF" (pegylert-G-CSF) refererer til et G-CSF-protein som er kovalent forbundet med én eller flere polyetylenglykol-grupper som beskrevet nedenfor. PEG-gruppen(e) og G-CSF-proteinet er bundet til hverandre gjennom en linker, som definert i formelen ifølge krav 1.

Et slikt konjugat blir referert til som "glyko-pegylert" G-CSF.

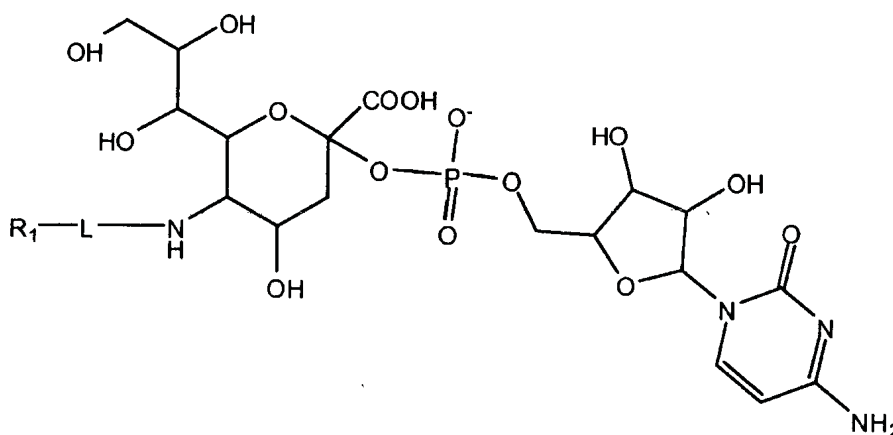
I et eksempel på en utførelsesform blir "glyko-pegylerte" G-CSF-molekyler ifølge oppfinnelsen fremstilt ved enzym-mediert dannelse av et konjugat mellom et glykosylert eller ikke-glykosylert G-CSF-peptid og en enzymatisk overførbar sakkarylgruppe som omfatter en poly (etylenglykol)-gruppe innenfor sin struktur. PEG-gruppen er bundet til sakkarylgruppen direkte (dvs., gjennom en enkelt gruppe dannet ved omsetning av to reaktive grupper) eller gjennom en linker-gruppe, f.eks., substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert heteroalkyl, osv. Glykosyl bindingsgruppen kan være sialinsyre-grupper som er derivatisert med PEG.

Glykosyl-linkeren blir bundet til G-CSF-proteinet via O-glykosylering, ved en treonin-rest fra G-CSF-proteinet.

Glykosyl-linkeren omfatter sialinsyre og N-acetylgalaktosamin.

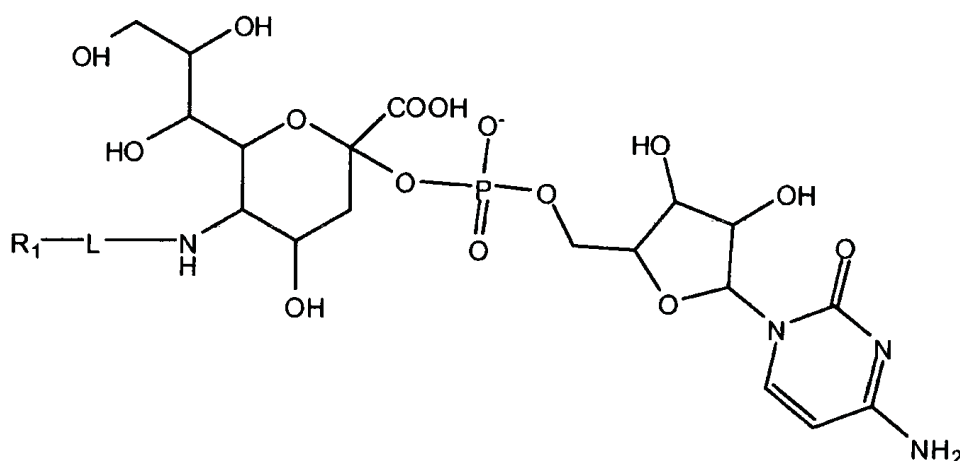
G-CSF-peptidet er glykosylert ved en treonin-rest, foretrukket ved treonin-resten i posisjon 134 (beregnet for metionyl-G-CSF-polypeptidet, dvs. har en N-terminal metionin og 175 aminosyrer totalt).

G-CSF peptid-konjugatet beskrevet ovenfor kan fremstilles i henhold til en fremgangsmåte omfattende (a) bringe et substrat G-CSF-peptid i kontakt med en PEG-sialinsyre donor med formelen:



hvor R_1 og L er i henhold til formelen i krav 1, og et enzym som er i stand til å overføre PEG-sialinsyre-gruppen fra donoren til glykosylresten av substrat G-CSF-peptidet. I en foretrukket utførelsesform er enzymet en sialyltransferase, f.eks. ST6GalNAcI, som beskrevet i WO 2005/055946.

G-CSF peptid-konjugatet beskrevet ovenfor kan fremstilles i henhold til en fremgangsmåte omfattende (a) bringe et uglykosylert substrat G-CSF-peptid i kontakt med en glykosyl-donor og et enzym som er i stand til å overføre glykosyl-gruppen fra donoren til substrat G-CSF-peptidet, og (b) bringe det glykosylerte G-CSF-peptidet i kontakt med en PEG-sialinsyre-donor med formelen:



hvor R_1 og L er i henhold til formelen i krav 1, og et enzym som er i stand til å overføre PEG-sialinsyre-gruppen fra donoren til glykosylresten fra substrat G-CSF-peptidet, hvor (a) og (b) er enten sekvensielle eller samtidige reaksjoner. I en foretrukket utførelsesform er glykosyl-donoren UDP-N-acetylgalaktosamin. I en foretrukket utførelsesform er enzymet i (a) en N-acetylgalaktosaminyltransferase og enzymet i (b) er en sialyltransferase, f.eks. GalNAcT2 i (a) og ST6GalNAcI i (b).

G-CSF kan fremstilles ved kjemisk syntese-metoder eller kan være fra hvilken som helst human eller annen mammalsk kilde og kan oppnås ved rensing fra naturlig forekommende kilder som human placenta, humant blod eller human urin. I tillegg er mange epitelkarsinomer, akutt myeloid leukemi-celler og ulike tumorcellelinjer i stand til å uttrykke denne faktoren.

Foretrukket blir G-CSF rekombinant fremstilt. Dette omfatter ekspresjon i prokaryot eller eukaryot vert av eksogene DNA-sekvenser oppnådd ved genomisk eller cDNA-kloning eller ved DNA-syntese. Egnede prokaryote verter omfatter forskjellige bakterier slik som *E. coli*, som er den foretrukne verten. Egnede eukaryote verter omfatter gjær slik som *S. cerevisiae* og mammalske celler slik som ovarieceller fra kinesisk hamster (CHO-celler) og apeceller.

Rekombinant fremstilling av et protein slik som G-CSF er kjent på området. Generelt omfatter dette transfeksjon av vertsceller med en egnet ekspresjonsvektor, dyrking av vertscellene under betingelser som muliggjør produksjon av proteinet og rensing av proteinet fra vertscellene. For detaljert informasjon se f.eks. Souza, L.M. et al. 1986, Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells, *Science* (1986) 232: 61-65; Nagata, S. et al. 1986, Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor, *Nature*

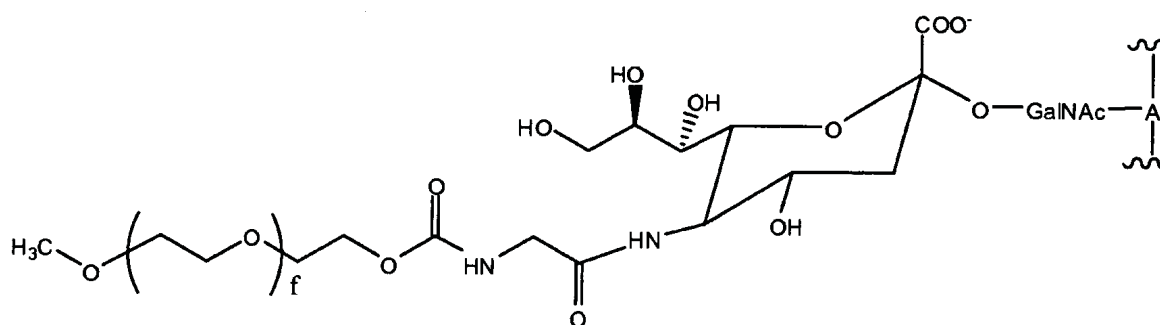
(1986) 319: 415-418; Komatsu, Y. et al. 1987, Cloning of granulocyte colony-stimulating factor cDNA from human macrophages and its expression in *Escherichia coli*, Jpn. J. Cancer Res. (1987) 78: 1179-1181.

I en foretrukket utførelsesform har G-CSF aminosyresekvensen av human moden G-CSF (se f.eks.; Nagata, S. et al. (1986), se ovenfor), og kan videre inneholde en metionin ved den aminoterminalen enden, som da resulterer i et protein på 175 aminosyrer (se SEQ ID NO: 1 ovenfor). Videre kan G-CSF inneholde en serin- eller en treoninrest i stedet for metionin.

Proteinet blir deretter renset i henhold til en konvensjonell nedstrøms prosessering-metode. Egnede rensemetoder for G-CSF er beskrevet i teknikkens stand, f.eks. i WO 87/01132, EP 0 719 860 A, EP 1 458 757 A, EP 1 527 188 A, WO 03/051922, WO 01/04154 og WO 2006/097944.

I én utførelsesform av foreliggende oppfinnelse blir polymer-G-CSF peptid-konjugatet fremstilt som beskrevet i Eksempel 1 gitt heri. Dette konjugatet er karakterisert ved at G-CSF-polypeptidet og PEG-gruppen er forbundet via en N-acetylgalaktosaminy (GalNAc)-gruppe og en sialinsyre (SA)-gruppe.

Polymer G-CSF-konjugatet har følgende formel:



hvor AA er treonin 133 (treonin 134 dersom en N-terminal metionin er til stede) fra G-CSF; og f er et helt tall valgt fra 1 til 2500.

Det farmasøytiske preparatet ifølge foreliggende oppfinnelse er en vandig oppløsning. For injeksjonsformål er anvendelse av rent vann som løsningsmiddel foretrukket. Andre løsningsmidler som er egnet og konvensjonelle for farmasøytiske preparater kan, imidlertid, også anvendes. I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, er de farmasøytiske preparatene isotone løsninger.

Videre er det ikke behov for rekonstituering ved noe som helst stadium av fremstillingen av den flytende løsningsformuleringen ifølge oppfinnelsen. Oppløsningen er en bruksferdig formulering.

Det farmasøytiske preparatet ifølge oppfinnelsen har en pH i området på 4,5 til 5,5. I en foretrukket utførelsesform er pH-verdien mellom 4,7 til 5,3, mer foretrukket mellom 4,8 til 5,2 og mest foretrukket mellom 4,9 og 5,1.

Dersom en justering er nødvendig for å oppnå det ønskede pH-området, blir pH-verdien justert ved hjelp av egnede oppløsninger; med sure løsninger hvis en reduksjon av pH-verdien er indikert og med alkaliske løsninger hvis en økning av pH-verdien er indikert. Egnede sure løsninger er f.eks. saltsyre, fosforsyre, sitronsyre og natrium eller kalium hydrogenfosfat. Egnede alkaliske løsninger er alkali- og jordalkali-hydroksider, alkalikarbonater, alkaliacetater, alkalisitrater og dialkali-hydrogenfosfater, f.eks. natriumhydroksid, natriumacetat, natriumkarbonat, natriumsitrat, dinatrium- eller dikalium-hydrogenfosfat eller ammoniakk.

Foretrukket blir pH av oppløsningen justert ved anvendelse av natriumhydroksid. Natrium er vanligvis til stede i en konsentrasjon på mindre enn 10 mmol/l, typisk mindre enn 6 mmol/l.

Det farmasøytiske preparatet ifølge oppfinnelsen omfatter én eller flere surfaktanter, Polysorbat 20 og 80.

Konsentrasjonen av detergenten i formuleringen er typisk i området på fra 0,0005 % (vekt/volum) til 0,05 % (vekt/volum), foretrukket fra 0,001 % (vekt/volum) til 0,01 % (vekt/volum), mer foretrukket fra 0,002 % (vekt/volum) til 0,006 % (vekt/volum) og mest foretrukket fra 0,003 % (vekt/volum) til 0,004 % (vekt/volum), basert på det totale volumet av løsningsformuleringen.

Vanligvis inneholder formuleringene ifølge oppfinnelsen surfaktanten Polysorbat 20 eller 80 i en konsentrasjon på 0,003 % (vekt/volum), 0,0033 % (vekt/volum) eller 0,004 % (vekt/volum). Polysorbat 20 er foretrukket.

Formuleringen i henhold til oppfinnelsen omfatter et fysiologisk akseptabelt bufringsmiddel, nemlig en acetatbuffer, dvs. acidic syre eller et salt derav, f.eks. alkali eller ammoniumsalter, er foretrukket.

Acetatbufferen er vanligvis til stede i formuleringen i en konsentrasjon på 1 til 100 mmol/l, foretrukket 2 til 50 mmol/l og mest foretrukket 5 til 20 mmol/l. I en foretrukket utførelsesform er bufferen til stede ved 10 mmol/l, mest foretrukket er det acetat til stede ved 10 mmol/l.

Konsentrasjonen av acetat, blir valgt på en slik måte at den pH-stabiliserende virkningen så vel som tilstrekkelig bufringskapasitet tilveiebringes. Imidlertid blir samtidig ionekonsentrasjonen og følgelig konduktiviteten av løsningen holdt så lav som mulig for å unngå dannelsen av aggregater.

I en utførelsesform ifølge oppfinnelsen er konduktiviteten av den endelige løsningsformuleringen mindre enn 1,0 mS/cm, foretrukket mindre enn 0,8 mS/cm og mer foretrukket mindre enn 0,5 mS/cm.

I en utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter formuleringen videre mannitol og/eller sorbitol som et tonisitetstjusterende middel. Sorbitol er spesielt foretrukket. Mengden av sorbitol eller mannitol er vanligvis opp til 10,0 % (vekt/volum), basert på det totale volumet av løsningen. Foretrukket er konsentrasjonen opp til 8,0 % (vekt/volum), mer foretrukket opp til 6,0 % (vekt/volum) og mest foretrukket 5,0 % (vekt/volum). I en foretrukket utførelsesform er sorbitol til stede i en mengde på 5,0 % (vekt/volum).

De polymer-G-CSF konjugatet-inneholdende formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse blir vanligvis administrert via parenterale administreringsveier som for eksempel injeksjon (subkutan, intravenøs eller intramuskulær injeksjon) eller perkutan, mukosal, nasal eller pulmonær administrering, men kan også administreres oralt.

Polymer-G-CSF-konjugatet er vanligvis til stede i formuleringen i en konsentrasjon på fra 1,0 til 30,0 mg/ml, foretrukket fra 5,0 til 20,0 mg/ml og mest foretrukket fra 8,0 til 12,0 mg/ml. I en foretrukket utførelsesform er polymer-G-CSF-konjugatet til stede i en mengde på 10,0 mg/ml.

Det vandige preparatet i henhold til oppfinnelsen inneholder et glyko-pegylert G-CSF som definert i krav 1 som et aktivt middel, Polysorbat 20 og/eller Polysorbat 80 som surfaktant, sorbitol og/eller mannitol som tonisitetstjusterende middel, acetat som buffer og natrium, og ingen andre hjelpestoffer.

I et annet aspekt av oppfinnelsen blir det vandige preparatet ifølge oppfinnelsen som beskrevet ovenfor fortynnet for å oppnå et vandig fortynningspreparat som er passende

for pediatriisk anvendelse. Passende fortynninger for behandling av barn blir oppnådd ved å fortynne den ovenfor beskrevne oppløsningen ifølge oppfinnelsen 1:2 til 1:8.

Oppfinnelsen angår også en farmasøytisk beholder inneholdende det vandige preparatet ifølge oppfinnelsen eller en fortynnings løsning oppnådd derfra ved fortynning. Egnede farmasøytiske beholdere er kjent fra teknikkens stand. Beholderen kan, for eksempel, være en sprøyte, hetteglass, infusjonsflaske, ampulle eller karpyle ("carpoule"). I en foretrukket utførelsesform, når beholderen er en sprøyte, er sprøyten utstyrt med et nålbeskyttelse-system. Slike nålbeskyttelse-systemer som er velkjent fra teknikkens stand bidrar til å redusere risikoen for skader. I en annen utførelsesform er beholderen en karpyle inne i en injeksjonspenn.

Foreliggende oppfinnelse angår også en fremgangsmåte for fremstilling av et vandig preparat ifølge oppfinnelsen, hvori polymer-G-CSF-konjugatet som det aktive midlet blir formulert i et vandig preparat som har en pH i området 4,5 til 5,5 og omfattende en surfaktant og ytterligere farmasøytiske hjelpestoffer.

I et annet aspekt angår oppfinnelsen et vandig preparat ifølge oppfinnelsen for anvendelse ved behandling eller forebygging av neutropeni. Videre kan det vandige preparatet ifølge oppfinnelsen fordelaktig anvendes ved behandling eller forebygging av nevrologiske forstyrrelser eller i forbindelse med benmargs-transplantasjon. Generelt er de farmasøytiske løsningene ifølge oppfinnelsen anvendelige for stamcellemobilisering.

Den farmasøytiske flytende formuleringen i henhold til oppfinnelsen ble funnet å oppvise en svært god lagringsstabilitet. Innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse skal betegnelsen "lagringsstabil" forstås å bety at innholdet av aktivt polymer-G-CSF-konjugat fortsatt beløper seg til 80 % eller mer av den initielle konsentrasjonen etter tre måneders lagring av formuleringen ved 25 °C. Foretrukket er, etter lagring i tre måneder ved 25 °C, det gjenværende innholdet av G-CSF-aktivitet fortsatt minst 85 %, mer foretrukket minst 90 %, og mest foretrukket minst 95 % av den opprinnelige aktiviteten.

Aktiviteten av polymer-G-CSF-konjugatet kan bestemmes ved hjelp av konvensjonelle aktivitetstester, som de er beskrevet i tidligere kjent teknikk for G-CSF; se f.eks. Draft Monographie "Filgrastim Concentrated Solution" PharmEur. Vol.19, Nr. 1, Jan. 2007, eller Stute, N., et al. "Pharmacokinetics of subcutaneous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children 1" (1992) Blood 79 (11), side 2849-2854.

Måling av G-CSF-aktivitet *in vitro* er f.eks. beskrevet av Shirafuji, N. et al. 1989, A new bioassay for human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) using murine myeloblastic NFS-60 cells as targets and estimation of its levels in sera from normal healthy persons and patients with infectious and hematological disorders, Exp. Hematol. (1989) 17, 116-119. For måling av G-CSF-aktivitet *in vivo* se f.eks. Tanaka, H. et al. 1991, Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor conjugated to polyethylene glycol in rats, Cancer Research (1991) 51,3710- 3714. Ytterligere publikasjoner hvor tester for måling av aktiviteten av G-CSF er beskrevet er US 6,555,660; Nohynek, G.J. et al.1997, Comparison of the potency of glycosylated and nonglycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factors in neutropenic og non-neutropenic CD rats, Cancer Chemother. Pharmacol. (1997) 39, 259-266.

Renheten av polymer-G-CSF-konjugatet anvendt i formuleringen i henhold til oppfinnelsen skulle være minst 95 %, foretrukket minst 97, mer foretrukket minst 99 % og mest foretrukket mer enn 99 %. Graden av renhet kan bestemmes ved hjelp av HPLC-analyse. Egnede materialer og metoder for gjennomføring av slike analyser kan oppnås fra kommersielle leverandører slik som Vydac eller TOSOH Bioscience (<http://www.tosohbiosep.de>).

Komponentene for formulering av løsningene i henhold til oppfinnelsen kan oppnås fra konvensjonelle kilder, for eksempel fra selskap slik som Sigma eller Merck.

Fremstilling av formuleringen ifølge oppfinnelsen kan utføres i henhold til konvensjonelle metoder. Komponentene av formuleringen kan oppløses i en vandig buffer. Alternativt kan konjugatet allerede oppnås i en vandig buffer som resultatet av renseprosessen.

Til slutt blir den ferdige flytende formuleringen fylt i en egnet farmasøytisk beholder, hvor den blir lagret inntil administrering.

De følgende eksemplene er ment å illustrere oppfinnelsen.

Eksempler

Eksempel 1. Fremstilling av G-CSF-GalNAc-SA-PEG

Det følgende eksemplet illustrerer fremstilling av G-CSF-GalNAc-SA-PEG i (a) en metode med to sekvensielle trinn hvori hvert mellomprodukt blir rensset før det anvendes i neste trinn, og (b) en ett-trinns metode ved anvendelse av samtidig tilsetning av enzymer

a. To-trinns metoden

Fremstilling av G-CSF-GalNAc (pH 6,2) fra G-CSF og UDP-GalNAc ved anvendelse av GalNAc-T2.

G-CSF (960 µg) i 3,2 ml pakket buffer ble konsentrert ved ultrafiltrering ved anvendelse av et UF-filter (MWCO 5K) og deretter rekonstituert med 1 ml 25 mM MES-buffer (pH 6,2, 0,005 % NaN₃). UDP-GalNAc (6 mg, 9,24 mM), GalNAc-T2 (40 µl, 0,04 U), og 100 mM MnCl₂ (40 µl, 4 mM) ble deretter tilsatt og den resulterende løsningen ble inkubert ved romtemperatur.

Etter 24 timer indikerte MALDI at reaksjonen var fullstendig. Reaksjonsblandingen ble direkte underlagt HPLC-rensing ved anvendelse av SEC (Superdex 75 og Superdex 200) og en elueringsbuffer utgjort av PBS (fosfatbufret saltløsning, pH 4,9 og 0,005 % Tween 80). Den oppsamlede toppen av G-CSF-GalNAc ble konsentrert ved anvendelse av et Centricon 5 KDa MWCO filter til omtrent 150 µl og volumet justert til 1 ml ved anvendelse av PBS (fosfatbufret saltløsning, pH 4,9 og 0,005 % Tween 80). Endelig proteinkonsentrasjon 1 mg/ml (A₂₈₀), utbytte 100 %. Prøven ble lagret ved 4 °C.

Fremstilling av G-CSF-GalNAc-SA-PEG ved anvendelse av rensset G-CSF-GalNAc, CMP-SA-PEG (20 KDa) og mus ST6GalNAc-TI (pH 6,2).

G-CSF-GalNAc-løsningen inneholdende 1 mg protein ble buffer utvekslet til 25 mM MES-buffer (pH 6,2, 0,005 % NaN₃) og CMP-SA-PEG (20 KDa) (5 mg, 0,25 µmol) ble tilsatt. Etter oppløsning ble MnCl₂ (100 µl, 100 mM løsning) og ST6GalNAc-I (100 µl, mus-enzym) tilsatt og reaksjonsblandingen rugget langsomt ved 32 °C i tre dager. Reaksjonsblandingen ble konsentrert ved ultrafiltrering (MWCO 5K) og buffer utvekslet med 25 mM NaOAc (pH 4,9) én gang og deretter konsentrert til 1 ml totalt volum. Produktet ble deretter rensset ved anvendelse av SP-Sepharose (A: 25 mM NaOAc+0,005 % tween-80 pH 4,5; B: 25 mM NaOAc+0,005 % Tween-80 pH 4,5+2M NaCl) ved retensjonstid 13-18 min. og SEC (Superdex 75; PBS-pH 7,2, 0,005 % Tween 80) ved retensjonstid 8,6 min (Superdex 75, strømning 1 ml/min) De ønskede fraksjonene ble oppsamlet, konsentrert til 0,5 ml og lagret ved 4 °C.

b. Ett-trinns metode

One Pot-prosess ved anvendelse av mus ST6GalNAc-I (pH 6,0).

G-CSF (960 µg protein oppløst i 3,2 ml av produkt formuleringsbufferen) ble konsentrert ved ultrafiltrering (MWCO 5K) til 0,5 ml og rekonstituert med 25 mM MES-buffer (pH 6,0, 0,005 % NaN₃) til et totalt volum på omtrent 1 ml eller en proteinkonsentrasjon på 1 mg/ml. UDP-GalNAc (6 mg, 9,21 µmol), GalNAc-T2 (80 µl, 80 mU), CMP-SA-PEG (20 KDa) (6 mg, 0,3 µmol) og mus-enzym ST6GalNAc-I (120 µl) og 100 mM MnCl₂ (50 µl) ble deretter tilsatt. Løsningen ble rugget ved 32 °C i 48 timer og renses ved anvendelse av standard kromatografi-betingelser på SP-Sepharose. Totalt 0,5 mg protein (A₂₈₀) ble oppnådd eller omtrent 50 % totalt utbytte. Produkt strukturen ble bekreftet ved analyse med både MALDI og SDS-PAGE.

One pot-prosess ved anvendelse av kylling SToGalNAc-I (pH 6,0) .

14,4 mg G-CSF; ble konsentrert til 3 ml endelig volum, buffer utvekslet til 25 mM MES buffer (pH 6,0, 0,05 % NaN₃, 0,004 % Tween 80) og volumet ble justert til 13 ml. UDP-GalNAc (90 mg, 150 µmol), GalNAc-T2 (0,59 U), CMP-SA-PEG-20 KDa (90 mg), kylling ST6GalNAc-I (0,44 U) og 100 mM MnCl₂ (600 µl) ble deretter tilsatt. Den resulterende blandingen stod ved romtemperatur i 60 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter konsentrert ved anvendelse av en UF (MWCO 5K) og sentrifugering. Residuet (omtrent 2 ml) ble oppløst i 25 mM NaOAc-buffer (pH 4,5) og konsentrert igjen til 5 ml endelig volum. Denne prøven ble renses ved anvendelse av SP-Sepharose i omtrent 10-23 min, SEC (Superdex 75, 17 min, strømningshastighet 0,5 ml/min) og en ytterligere SEC (Superdex 200, 23 min, strømningshastighet 0,5 ml/min), hvilket ga 3,6 mg (25 % totalt utbytte) G-CSF-GalNAc-SA-PEG-20 KDa (A₂₈₀ og BCA-metode).

Eksempel 2. Flytende polymer-G-CSF-konjugat (PEG-SA-GalNAc-G-CSF) formulering

En flytende formulering omfattende glyko-pegylert G-CSF (konjugatet med strukturen: PEG-SA-GalNAc-G-CSF) ble fremstilt ved å formulere følgende komponenter i en vandig acetatbufferløsning.

Ingrediens	
glyko-pegylert G-CSF	10 mg/ml
Acetat	10 mM
Sorbitol	5,0 % (vekt/volum)

Polysorbat 20	0,0033 % (vekt/volum)
Natrium	4,38 mM
pH	5,0

pH-verdien av preparatet ble justert ved tilsetning av NaOH. Alle ingredienser er av en kvalitet i henhold til Den europeiske farmakopé (Ph. Eur.).

I tillegg ble det samme preparatet fremstilt med enten pH 4,5 eller pH 5,5 og proporsjonalt mindre eller mer natrium, henholdsvis. Det ble også fremstilt en komparativ formulering som hadde en pH på 4,0 (lik den for Neulasta®-preparatet).

Eksempel 3. Stabilitetstester av formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse

Preparatene, pH 4,5, 5,0 og 5,5, ble delt opp i alikvoter i 500 µl/hetteglass og lagret ved 2-8 °C og ved 25 °C). Etter 1, 2, 3, 4,5, 6, 8, 12 og 15 måneder ble prøver testet for test-parametrene gitt i tabellen nedenfor.

De forventede spesifiseringene var som følger for preparatet som har en pH på 5,0:

Test-Parameter	Metode	Spesifiseringer
Utseende	Visuell inspeksjon	Klar fargeløs
Innhold	UV-VIS	10,0 mg/ml $\pm$ 5 %
Innhold	RP-HPLC (30 °C)	10,0 mg/ml $\pm$ 5 %
Potens	Bioassay	54-156 %
Identitet	SDS-PAGE	I overensstemmelse med referansestandard
Renhet	Western Blot	I overensstemmelse med referansestandard
Renhet	RP-HPLC (60 °C)	Oksidasjon < 2,0 %
Renhet	RP-HPLC (30 °C)	Ikke-pegylert G-CSF 2,0 %
Renhet	SEC	Dimerer og aggregater < 2,0 %
Deaminering	IEF	Ingen ytterligere band detekterbare
pH	I henhold til Ph. Eur. 5 Og USP 28	5,0 $\pm$ 0,2
Endotoksiner	Test for bakterielle endotoksiner	< 5 EU/mg

	i henhold til Ph. Eur. 5	
Sterilitet	I henhold til Ph. Eur. 5	Steril
Usynlige ("sub-visible") partikler	Partikulær kontaminering: Usynlige partikler i henhold til Ph. Eur. 5	< 6000 partikler $\geq$ 10 μ m per hetteglass; < 600 partikler $\geq$ 25 μ m per hetteglass

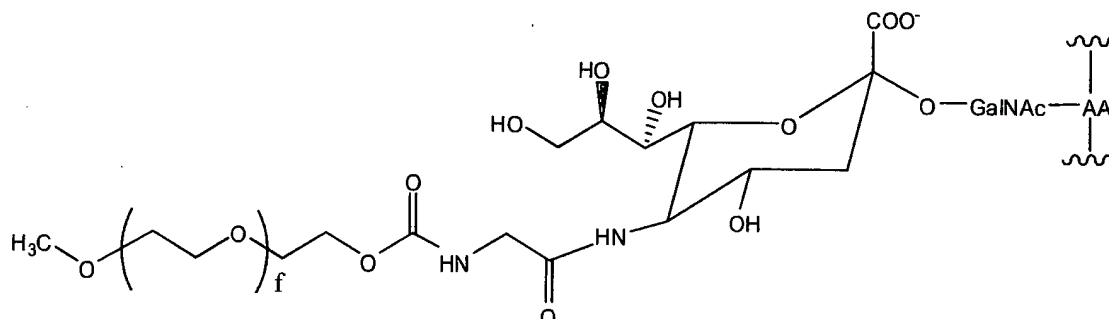
Alle prøver testet ved T = 0, 1 måned, 2 måneder, 3 måneder, 4,5 måneder, 6 måneder, 8 måneder, 12 måneder og 15 måneder innfridde de forventede spesifiseringene. Dette ble funnet for alle testede preparater omfattende glyko-pegylert G-CSF og med en pH på 4,5, 5,0 eller 5,5.

Preparatene ifølge oppfinnelsen ble sammenlignet med to komparative formuleringer: Neulasta® (pH 4,0) og et preparat av glyko-pegylert G-CSF (PEG-SA-GalNAc-G-CSF) med en pH på 4,0. Resultatene viser at sammenlignet med den komparative løsningen omfattende glyko-pegylert G-CSF og med en pH på 4,0, oppviser formuleringene som har høyere pH-verdier på 4,5, 5,0 og 5,5 bedre lagringsstabilitet. De oppsamlede data muliggjør konklusjonen om at de høyere pH-verdiene forhindrer sur hydrolyse av glykoPEG-bindingen.

Videre ble det observert at formuleringen ifølge foreliggende oppfinnelse har en stabilitet som er sammenlignbar med stabiliteten av PEG-G-CSF-konjugatet kjent som Neulasta®.

Patentkrav

1. Vandig preparat omfattende et polymer-G-CSF-konjugat som aktivt middel med formelen



hvor AA er treonin 133, eller treonin 134 dersom en N-terminal metionin er til stede, av G-CSF; og f er et helt tall valgt fra 1 til 2500, Polysorbat 20 og/eller Polysorbat 80 som surfaktant, sorbitol og/eller mannitol som tonisitetstjusterende middel, acetat som buffer og natrium, og ingen andre hjelpestoffer, hvori preparatet har en pH i området 4,5 til 5,5.

2. Vandig preparat ifølge krav 1, hvori surfaktanten er til stede i en konsentrasjon på 0,0001 % (vekt/volum) – 0,05 % (vekt/volum).
3. Vandig preparat ifølge krav 1 eller 2, hvori pH er i området 4,7 til 5,3.
4. Vandig preparat ifølge hvilke som helst av de foregående kravene, hvori pH er i området 4,9 til 5,1.
5. Vandig preparat ifølge hvilke som helst av de foregående kravene, hvori polymer-G-CSF-konjugatet er til stede i en konsentrasjon på 1 - 20 mg/ml, foretrukket 8 - 12 mg/ml.
6. Farmasøytisk beholder inneholdende et vandig preparat ifølge hvilke som helst av de foregående kravene.
7. Farmasøytisk beholder ifølge krav 6, hvori beholderen er en sprøyte, hetteglass, infusjonsflaske, ampulle, karpyle, en sprøyte utstyrt med et nålbeskyttelsessystem, eller en karpyle i en injeksjonspenn.

- 8.** Fremgangsmåte for fremstilling av et vandig preparat ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 5, hvori polymer-G-CSF-konjugatet som det aktive midlet er formulert i et vandig preparat som har en pH i området 4,5 til 5,5 og omfatter Polysorbat 20 og/eller Polysorbat 80 som surfaktant, sorbitol og/eller mannitol som tonisitetstjusterende middel, acetat som buffer og natrium.
- 9.** Fremgangsmåte for fremstilling av et vandig preparat ifølge krav 8, hvori det vandige preparatet er fortynnet 1:2 til 1:8.
- 10.** Vandig preparat ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 5 for anvendelse ved behandling eller forebygging av neutropeni, ved behandling eller forebygging av nevrologiske forstyrrelser, i forbindelse med benmargstransplantasjon, eller for stamcellemobilisering.
- 11.** Vandig preparat som kan oppnås ved fremgangsmåten ifølge krav 9 for pediatriisk anvendelse.