

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-81797

(P2019-81797A)

(43) 公開日 令和1年5月30日(2019.5.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 M	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	4 C 0 8 5
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2019-36141 (P2019-36141)	(71) 出願人	502233344
(22) 出願日	平成31年2月28日 (2019.2.28)		エスバテック - ア ノバルティス カ
(62) 分割の表示	特願2017-130349 (P2017-130349)		ンパニー エルエルシー
原出願日	平成25年1月31日 (2013.1.31)		スイス国 4 0 5 6 バーゼル, リヒト
(31) 優先権主張番号	61/594,099		シュトラーセ 35, ノバルティス ファ
(32) 優先日	平成24年2月2日 (2012.2.2)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	ジョン グリムショー
			スイス国 シーエイチ-8047 チュー
			リッヒ, アイホーフ 31
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 点眼用抗体含有徐放性製剤

(57) 【要約】

【課題】眼疾患を治療する目的でのタンパク質投与のための改善された徐放性送達システムおよび製剤を提供する。

【解決手段】本発明は、単鎖抗体 F v フラグメント (s c F v) と疎水性ポリエステルヘキシル置換ポリ乳酸 (h e x P L A) とを含有する徐放性医薬製剤を提供する。1つの態様において、本発明の製剤は、それを必要とする被験者への点眼を目的とする。ある種の態様において、本発明の製剤は、最終的な分子量が少なくとも約 1.25% (w/w) で存在する s c F v を含有する。他の態様において、本発明の製剤は、少なくとも約 1500 g/mol の濃度で存在する h e x P L A を含有する。1つの態様において、本発明の製剤を含有する硝子体内徐放性デポーが提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

徐放性医薬製剤または硝子体内徐放性デポーまたは送達システムまたは方法またはプロセスまたは安定した単鎖抗体製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条の下、2012年2月2日出願の米国仮特許出願第61/594,099号の優先権を主張し、この出願の内容全体は参照により本明細書に援用される。

【0002】

本発明は、眼にタンパク質を投与するための徐放性医薬製剤に関する。特に、本発明は、単鎖抗体と疎水性ポリエステルヘキシル置換ポリ乳酸（hex PLA）とを含有する製剤に関する。さらに、本発明は、徐放性医薬製剤の製造のプロセスおよびそれらの医療用途に関する。

【背景技術】

【0003】

ここ数年で、数多くの小分子用硝子体内徐放性製剤が研究され、市場に出荷された。ガンシクロビル（Vitrasert（商標））やフルオシノロン（Retisert（商標））を送達する初期のインプラントは、長期の放出期間を示したが、非生分解性だった（Muschら、1997年、New England Journal of Medicine 337:83; Jaffeら、2005年、Ophthalmology 112:119）。数多くの副作用、材料問題および外科手術の問題が、眼からインプラントを除去する際に報告された（Martinら、1997年、Arch Ophthalmol-Chic 115:1389; Boyerら、1999年、Am J Ophthalmol 127:349）。したがって、関心は生分解性インプラントへと移った。

【0004】

硝子体内投与向けに現在認可されている生分解性インプラント（Ozurdex（商標））は、ポリ（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）をベースにしており、約6ヶ月間、デキサメタゾンを放出する（Kuppermannら、2007年、Arch Ophthalmol-Chic 2007年、125:309）。PLGAインプラントの調製では、圧力、熱、溶剤またはこれらの組合せが活性物質の組み込みおよびインプラントの形成に使用される（Kimuraら、2001年、Ophthalmologica 215:143）。これは、タンパク質の製剤には、多くの小分子と比較して、内因的に安定性が低いことを原因とする問題があることを暗示している。

【0005】

徐放用タンパク質の製剤の問題に対する可能な解決策としては、固体のインプラントの代わりに、粘性のある賦形剤を使用することが考えられる。これらは、凍結乾燥したタンパク質と単純に混合して、最終的な製剤を形成することができる。第3世代のポリ（オルトエステル）（POE）は、持続的な硝子体内放出に向けて最初に研究された粘性のある高分子液だった（Einmahlら、2000年、J Biomed Mater Res 50:566）。しかし、貯蔵安定性の不足（Merkliら、1996、Biomaterials 17:897）、滅菌性に関する困難（Sintzelら、1998年、International Journal of Pharmaceutics 175:165）ならびに合成およびスケールアップの困難（Behar-Cohenら、2006年、Advanced Drug Delivery Reviews 58:1182）が原因で、まもなくして新世代のPOEが後を継いだ。

【0006】

10

20

30

40

50

第4世代のPOE (POE IV) は、合成がより容易で、使用するモノマーの割合を調整することにより、分解速度の制御が可能だった (Gurny ら, 1998 年, Biomaterials 19:791)。POE IV は、臨床フェーズ II 試験まで評価され、ヒトの眼の中で良好な生体適合性を示した (Behar-Cohen ら, 2006 年, Advanced Drug Delivery Reviews 58:1182)。しかしながら、それらのインビボにおける分解期間は、薬物放出期間より遥かに長期だったため、関心は眼中における徐放性送達のための新しい液状ポリマーへと移った。したがって、眼疾患を治療する目的でのタンパク質投与のための改善された徐放性送達システムおよび製剤のニーズが存在する。

【先行技術文献】

10

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Musch ら、New England Journal of Medicine (1997 年) 337:83

【非特許文献2】Jaffe ら、Ophthalmology (2005 年) 112:119

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、単鎖抗体 Fv フラグメント (scFv) と疎水性ポリエステルヘキシル置換ポリ乳酸 (hexPLA) とを含有する徐放性医薬製剤を提供する。1つの態様において、本発明の製剤は、それを必要とする被験者への点眼を目的とする。

20

【0009】

ある種の態様において、本発明の製剤は、最終的な分子量が少なくとも約 1.25% (w/w) で存在する scFv を含有する。

【0010】

他の態様において、本発明の製剤は、少なくとも約 1500 g/mol の濃度で存在する hexPLA を含有する。

【0011】

1つの態様において、本発明の製剤を含有する硝子体内徐放性デポーが提供される。

30

【0012】

別の態様において、本発明は、scFv と hexPLA との徐放性医薬製剤を含有する送達系およびシリンジを提供する。

【0013】

さらに、本発明は、徐放性医薬製剤の調製のためのプロセスを提供し、そのプロセスは、scFv と疎水性ポリエステルヘキシル置換ポリ乳酸 (hexPLA) との凍結粉碎を含む。ある種の態様において、さらに、本プロセスは、真空中で室温まで本製剤を加温することを含む。

【0014】

また、本発明は、scFv と hexPLA との徐放性医薬製剤の有効量を患者に投与することを含む、患者における眼疾患の治療の方法も提供する。

40

【0015】

加えて、本発明は、単鎖抗体とヘキシル置換ポリ乳酸 (hexPLA) とを含む、安定した単鎖抗体製剤を提供し、その単鎖抗体は 37°C にて安定である。

【0016】

本発明は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目1)

単鎖抗体 (scFv) およびヘキシル置換ポリ乳酸 (hexPLA) を含有する、被験者に対する眼に投与するための徐放性医薬製剤。

(項目2)

50

前記 s c F v が少なくとも約 1. 25 % (w/w) の最終濃度で存在する、項目 1 に記載の製剤。

(項目 3)

前記 s c F v が、少なくとも約 2. 5 % (w/w) の最終濃度で存在する、項目 1 に記載の製剤。

(項目 4)

前記 s c F v が、少なくとも約 5. 0 % (w/w) の最終濃度で存在する、項目 1 に記載の製剤。

(項目 5)

前記 h e x P L A が、少なくとも約 1500 g/mol の分子量で存在する、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の製剤。

10

(項目 6)

前記 h e x P L A が、少なくとも約 2500 g/mol の分子量で存在する、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 7)

前記 h e x P L A が、少なくとも約 3500 g/mol の分子量で存在する、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 8)

項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の製剤を含有する硝子体内徐放性デポー。

(項目 9)

20

項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の徐放性医薬製剤およびシリンジを含有する送達システム。

(項目 10)

項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の徐放性医薬製剤の有効量を患者に投与することを含む、前記患者における眼疾患の治療のための方法。

(項目 11)

前記眼疾患が網膜疾患である、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

徐放性医薬製剤の調製のためのプロセスであって、単鎖抗体およびヘキシル置換ポリ乳酸 (h e x P L A) の凍結粉碎を含むプロセス。

30

(項目 13)

単鎖抗体およびヘキシル置換ポリ乳酸 (h e x P L A) を含有し、前記単鎖抗体が 37 °C にて安定である、安定した単鎖抗体製剤。

本発明の具体的な好ましい実施形態は、特定の好ましい実施形態の下記のより詳細な記述および特許請求の範囲から明白になるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図 1】凍結粉碎後に製剤化された 2500 g/mol の h e x P L A 中に 1. 25 % の E S B A 903 を含有する製剤の光学顕微鏡画像を示す。

【図 2】図 2 A は、2. 5 % の定常薬物負荷にて、温度を増加したときの E S B A 903 - h e x P L A 製剤の粘度の変化および粘度のポリマー分子量に対する依存性を示す。図 2 B は、2500 g/mol の定常分子量にて、温度を増加したときの E S B A 903 - h e x P L A 製剤の粘度の変化および粘度の薬物負荷に対する依存性を示す。

40

【図 3】図 3 A は、E S B A 903 基準の S E C - H P L C クロマトグラムを示す。図 3 B は、凍結粉碎により調製された h e x P L A を含有する製剤から抽出後の E S B A 903 の S E C - H P L C クロマトグラムを示す。

【図 4】球形液滴デポーを形成する、クエン酸緩衝液中の E S B A 903 - h e x P L A 製剤を示す。

【図 5】図 5 A は、薬物負荷が 1. 25 % ~ 5. 0 % で、h e x P L A の分子量が 2500 g/mol である製剤からの E S B A 903 の累積放出を示す。図 5 B は、薬物負荷が

50

1. 25%～5.0%で、hexPLA分子量が2500g/molである製剤からのESBA903モノマーの1日当たりの放出を示す。

【図6】図6Aは、2.5%の薬物負荷で、1500g/mol～5000g/molの異なるhexPLA分子量を有する製剤からのESBA903の累積放出を示す。図6Bは、2.5%の薬物負荷で、1500g/mol～5000g/molの異なるhexPLA分子量を有する製剤からのESBA903モノマーの1日当たりの放出を示す。

【図7】図7Aは、2500g/molのhexPLA中に2.5%のESBA903を含有する製剤50mgおよび25mgからのESBA903の累積放出を示す。図7Bは、2500g/molのhexPLA中に2.5%のESBA903を含有する製剤50mgおよび25mgからのESBA903モノマーの1日当たりの放出を示す。

【図8】37℃にて貯蔵された2-ヒドロキシオクタン酸の存在下でのクエン酸緩衝液中ESBA903モノマーの10週間にわたる濃度低下を示す。

【図9】ESBA903基準と比較した、14週間後のESBA903-hexPLA製剤からの放出試料のSDS-PAGEを示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

I. 徐放性製剤

【0019】

本発明は、単鎖抗体とヘキシル置換ポリ乳酸(hexPLA)とを含有する安定した単鎖抗体製剤を提供し、この単鎖抗体は37℃にて安定である。また、本発明は、単鎖抗体とhexPLAとの徐放性医薬製剤も提供する。本製剤は、高いタンパク質濃度および低い粘度を有し、安定である。本明細書中に記述するように、驚くことに、単鎖抗体は、hexPLAの基質中で安定であり、持続した形で基質から放出することが可能である。

【0020】

本発明の意味において「安定した」製剤は、その中に含まれる抗体が、貯蔵時に、その物理的および化学的安定性ならびに完全性を基本的に維持する製剤である。タンパク質の安定性を測定するための様々な解析技法が当該技術分野では利用可能である。安定性を、選択した期間、選択した温度にて測定することができる。化学的安定性は、例えば、トリプシン消化後のRP-HPLCなど、逆相クロマトグラフィー(RP)によって測定され得る。例えば、約4℃にて少なくとも1年間貯蔵した後、トリプシン消化後のRP-HPLCでの非修飾単鎖抗体を表すピークは、貯蔵前の単鎖抗体懸濁液と比較した場合、減少率は20%以下、好ましくは10%以下、より好ましくは5%以下、さらに好ましくは1%以下である。本発明の懸濁液の安定性を測定するために適した方法は他にも存在することは、当業者であれば容易に理解するであろう。例えば、化学的安定性は、キャピラリー電気泳動によっても測定され得る。

【0021】

安定性を測定するための特定の技法は、本明細書中の実施例で記述される。

【0022】

室温における本発明の安定した製剤の粘度は、細い針(例えば27G針)を通じて投与することを可能にするのに十分なだけ低い。好ましくは、粘度は約100Pa×s以下である。より好ましくは、粘度は約38Pa×s以下である。本発明の製剤は、室温または多少温かい(例えば25℃)温度にて注射するのに適している。本発明の製剤の投与には、さらなる賦形剤(例えば、溶剤または可塑剤)は必要とされないが、望ましい場合は含有されてもよい。

【0023】

本発明の意味における「徐放性」医薬製剤は、その中に含有される単鎖抗体が長期間に渡り、分解または排出から保護され、特定の部位または身体区画に局所的に送達されることにより、全体の全身曝露を低下させる医薬製剤である。好ましくは、この長期間は少なくとも6週間かつ最大14週以上(すなわち、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間またはそれ以上)である。水性環境に曝露

10

20

30

40

50

されると、本明細書中に記述されるように、単鎖抗体は、本発明の製剤からゆっくりと放出される。

【0024】

1つの実施形態において、本発明の製剤は、それを必要とする患者に、硝子体内注射などの眼内注射により投与される。眼中において、本発明の製剤は、低速放出性硝子体内デポーを形成し、そこから、単鎖抗体が長期間をかけてゆっくりと放出される。

【0025】

本発明の製剤中の単鎖抗体の濃度（すなわち、薬物負荷）は、少なくとも約1.0%（w/w）、好ましくは1.0%を超え（当業者であれば、望ましい濃度を容易に判定することができ、それは最高で約15%以上、例えば、1.0%、1.25%、1.50%、1.75%、2.0%、2.25%、2.5%、2.75%、3.0%、3.25%、3.5%、3.75%、4.0%、4.25%、4.5%、4.75%、5.0%、7.5%、10%、12.5%、15%またはそれ以上となり得）、hexPLAの分子量は少なくとも約1500g/mol（例えば、1500g/mol、2000g/mol、2500g/mol、3000g/mol、3500g/mol、4000g/mol、4500g/mol、5000g/molまたはそれ以上）である。好ましくは、このポリマー重量は、単鎖抗体と混合されたとき、製剤が眼に注射されると同時に眼底に沈殿することにより視線に影響を及ぼすことがないようにするために、本発明の製剤を安定した形態（例えば、球形）に維持するのに十分であるとする。特定の実施形態において、当業者に知られている可塑剤を本発明の製剤に含んでもよい。特定の実施形態において、可塑剤を本発明の製剤に含んでもよい。かかる状況では、当業者は、本発明の製剤に使用するhexPLAの分子量には明確な制限がない（例えば、hexPLAは5000g/molを遥かに超える分子量を有し得る）ことを認識するであろう。

【0026】

被験者への投与では、具体的な用途に対する望ましい単鎖抗体の量に応じて、異なる大きさの製剤の液滴を選択することができる。特定の実施形態において、被験者への投与のための製剤質量は、1.0mg～約100mgである。好ましい実施形態において、本製剤の質量は約10mg～約100mgである。

【0027】

本明細書中で用いられる場合、「抗体」、「単鎖抗体」または「scFv」という用語は、リンカーによって連結された抗体重鎖可変ドメイン（または領域；V_H）と抗体軽鎖可変ドメイン（または領域；V_L）を含む分子を指す。このようなscFv分子は、一般構造として、NH₂-V_L-リンカー-V_H-COOHまたはNH₂-V_H-リンカー-V_L-COOHを有することができる。

【0028】

1つの実施形態において、単鎖抗体は（その内容全体が参照により本明細書に援用される国際公開第2009/155724号により定義されているように）ESBA903であり、それは以下の配列番号1の配列を含む：

EIVMTQSPSTLSASVGDRI IITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTITSSSLQPD D F A T Y Y C Q N V Y L A S T N G A N F G Q G T K L T V L G G G G S G G G S G G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C T A S G F S L T D Y Y Y M T W V R Q A P G K G L E W V G F I D P D D D P Y Y A T W A K G R F T I S R D T S K N T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A G G D H N S G W G L D I W G Q G T L V T V S S。

【0029】

II. デバイス

本発明の製剤は、例えば、標準的なアンプル、バイアル、充填済みのシリンジまたは複数の投与系により使用され得る。特定の実施形態において、本発明の製剤は、眼周囲、結膜、テノン嚢下、前房内、硝子体内、眼球内、網膜下、結膜下、眼球後または毛細管内注

射などの眼組織内注射により投与される。好ましい実施形態において、本製剤は、硝子体内投与により患者に投与される。例えば、かかる目的には、本製剤はシリンジを使用して注射されてもよい。したがって1つの態様において、本発明は、単回使用注射シリンジの群から選択される液状製剤を含む送達システムも提供する。

【0030】

特定の実施形態において、送達システムは容器を含む。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル（例えば、デュアルチャンバーバイアル）、シリンジ（デュアルチャンバーシリンジなど）および試験管が挙げられる。容器はガラスまたはプラスチックなど、様々な材料から形成され得る。容器は製剤を保管し、その容器に貼られたラベルまたは関連づけられたラベルにより、使用の指示を明記してもよい。このラベルは、例えば、製剤が、硝子体内投与に有用であるか、または硝子体内投与向けであることを表してもよい。製剤を保管している容器は、多用途バイアルであってもよく、製剤の反復投与（例えば2～6回の投与）に使用できる。

10

【0031】

したがって、疾患の治療に使用するための送達システムの作成のために、本発明に従う製剤の使用も提供される。

【0032】

本発明の別の実施形態において、本発明の製剤を含有し、その使用のための指示を提供する製品が提供される。したがって、本明細書中で提供される製品は、a) 単鎖抗体とhexPLAとの濃縮製剤を保管する容器、およびb) 取り扱い指示を含む。

20

【0033】

この製品はさらに、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジおよび取り扱い指示の付いた添付文書も含め、商業的および利用者の観点から望ましい他の物質をさらに含んでもよい。

【0034】

IV. 調製のためのプロセス

また、本発明は、単鎖抗体とhexPLAとを含有する徐放性製剤を調製するプロセスも提供する。

【0035】

ポリ乳酸（PLA）誘導体ヘキシル置換ポリ乳酸（hexPLA；ポリ（2-ヒドロキシオクタン酸））は、PLA骨格上の全てのメチル基がヘキシル基によって置換され、室温では、粘性液体である。これは、開環重合によって合成することが可能である（Trimailleら、2004年、Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry 42:4379）ならびにグリーンケミストリー重縮合（Asmusら、2011年、European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 79:584）。hexPLAの調製については、本明細書中の実施例で記述される。HexPLAは、乾熱滅菌の条件下で安定であり、親油性の小分子を有する製剤は、数週間にわたって活性化合物を放出した。

30

【0036】

製剤化の前に、製剤用の単鎖抗体は、好ましくは、本明細書中に記述された要領で凍結乾燥される。凍結乾燥は、当業者によく知られた技法を使用して達成することができる。

40

【0037】

特定の実施形態において、本発明の製剤は凍結粉碎により調製される。例えば、凍結乾燥された単鎖抗体タンパク質およびhexPLAポリマーは、SPEX 6700フリーザーミル（SPEX Industries製、Edison、米国）で、ゆっくりと-80℃に凍結され、5分間、液体窒素下で、一緒に粉碎される。この凍結粉碎手順は、固体化合物の粒径を減少させることと、固体化合物をポリマー基質中に均一に分散させることを同時に行って、懸濁製剤を形成する。特定の実施形態において、粉碎後、本製剤を、生成物上での水分凝縮を避けるのに適切な条件下（例えば、真空、不活性ガス、または密閉

50

されたシリンダー)で、室温までゆっくりと加温する。他の実施形態において、単鎖抗体とhexPLAとの混合は、凍結乾燥された単鎖タンパク質が安定する温度で、好ましくは室温より低い温度で、好ましくは冷却される条件で、好ましくはhexPLAポリマーのガラス転移点より低い温度で、好ましくは凍結粉碎下で実施される。

【0038】

さらに、治療用途のための単鎖抗体とhexPLAとを含有する徐放性製剤を調製するプロセスも提供され、ここで単鎖抗体は凍結乾燥され、その凍結乾燥された抗体とhexPLAとは、懸濁液を形成するために一緒に凍結され、粉碎される。

【0039】

特定の実施形態において、凍結ステップは、 -80°C の温度までゆっくりと実施され、粉碎ステップは、約5分間、液体窒素下で実施される。

10

【0040】

別の実施形態において、本プロセスは、さらに、得られた懸濁液を室温またはわずかに上の温度(例えば 25°C)まで加温することを含む。

【0041】

V. 医療用途

また、本発明は、医療で使用するための本発明の製剤も提供する。特に、眼疾患などの疾患の治療用薬剤を製造するための製剤の使用が提供される。

【0042】

特定の実施形態において、眼疾患は、眼血管新生に関連する疾患などの網膜疾患である。特定の実施形態において、眼疾患は黄斑変性、糖尿病網膜症、網膜虚血に関連する後遺症、後眼部新血管形成、網膜浮腫、地図状萎縮、糖尿病黄斑浮腫などである。

20

【0043】

抗体の適切な投与量は、例えば、治療の対象とする症状、症状の重症度および過程、タンパク質が予防または治療の目的で投与されているかどうか、前回の治療、患者の病歴およびタンパク質に対する反応、使用された抗体の種類、ならびに主治医の裁量に依存する。抗体は、1回、または一連の治療に渡り、患者に適切に投与され、診断以後、任意の時期に患者に投与されてよい。抗体は単独の治療として投与されても、問題の症状の治療に有用である他の薬物または治療と併用して投与されてもよい。

【0044】

治療の対象とする疾病または疾患に応じて、治療に有効な量の抗体が患者に投与されてよい。

30

【0045】

本明細書中に引用されるいかなる特許、特許出願および参考文献の内容も、その全体が参照により本明細書中に援用される。

【0046】

文脈により別途要求されている場合を除き、本明細書中で使われる単数の用語はその複数形も含有し、複数の用語はその単数形も含有するものとする。

【0047】

実施例

40

本開示は、さらに以下の実施例により解説されるが、それらはさらなる限定であると見なされるべきではない。全ての図面ならびに本出願中に引用される全ての文献、特許および公開特許出願は、その全体が参照により、本明細書中に明示的に援用される。

【0048】

材料

【0049】

ヒト化抗体フラグメントESBA903を、ESBATech社Alcon Biomedical Research Unit (Schlieren、スイス国)により、社内で製造および凍結乾燥した。3mLのESBA903(クエン酸ナトリウム20mM中10mg/mL、pH6.25)を10mLの円筒形バイアルに添加し、凍結乾燥に適

50

したプロモブチルストッパーで栓をした。凍結乾燥は、一体化された封栓機構および Leybold Trivac B 高性能真空ポンプ (D4B/D6B、Oerlikon Corporate 製、スイス国) を装備した、VirTis Advantage Plus 凍結乾燥機 (Wizard 2.0 プロセスコントローラー、SP Scientific 社製、Warminster、米国) を使用して実施した。このプロセスを実際の棚温度を使って制御し、プロセスデータを記録した (Mentor/Wizard Synoptic 6.0、SP Scientific 社製、Warminster、米国)。この成果物の温度を、凍結乾燥バイアル中に入れておいた熱電対を使用して記録した。バイアルを -55°C まで凍結し、凍結乾燥チャンバーの吸引 (0.15 ミリバール) の後、数時間で棚温度を -10°C に上昇させた。2 次乾燥を完全な真空下で 25°C にて実施した。湿気が再度導入されることを防ぎ、潜在的な酸化分解工程を最小限に抑えるために、封栓の前に、凍結乾燥機には窒素ガスを充填した。復元後、タンパク質は完全にモノマーであることが明らかになった。

10

【0050】

ヘキシル置換ポリ乳酸 (hexPLA) を、公開された方法 (Asmus ら、2011 年、European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics 79:584) に従って、2-ヒドロキシオクタン酸の重縮合により合成した。ENREF 20 簡単に言うと、 $0.5\text{mol}\%$ の硫酸 (Acros Organics、New Jersey、米国) を重縮合触媒として使用し、モノマーを 120°C まで加熱することにより、 2500g/mol と 5000g/mol のポリマーとを合成した。適切な分子量が得られるまで、反応は 0.001 バールの油ポンプ真空下で実施された。NaHCO₃ 溶液 0.1M へのアセトンからの沈殿によりポリマーを精製した後、アセトンに溶解し、Celite (商標) 545 粗目を通じて濾過し、溶剤を真空下で除去した。 1500g/mol と 3500g/mol の hexPLA ポリマーを、触媒を使用せずに、改善方法で調製した。モノマーを単純に 150°C に加熱し、溶解生成物を、 0.001 バールの真空下で攪拌した。これらの hexPLA ポリマーに対しては、触媒または溶剤などの追加物質が存在していないため、追加的な合成ステップまたは精製は実施しなかった。標準的なヨーロッパ薬局方の乾熱滅菌方法を使用して、30 分間、 180°C に加熱することにより、4 つのポリマー全てを滅菌した。Waters 515 HPLC ポンプ、Waters 410 注射器、Styragel HR 1~4 カラムおよび Waters 717 GPC 検出器 (Waters Corporation 製、Milford、米国) を使用したゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) によって、分子量を測定した。連続相は THF だった。校正には、ポリスチレン標準 (PSS 製、Mainz、ドイツ国) を使用した。全ての化学物質および溶剤は受け取った状態のまま使用した。

20

30

【0051】

実施例 1：製剤の調製および特性評価

凍結乾燥した ESB A903 タンパク質と hexPLA ポリマーとを、SPEX 6700 フリーザーミル (SPEX Industries 製、Edison、米国) 中で、5 分間、液体窒素下で一緒にゆっくりと -80°C に凍結し、粉碎した。この凍結粉碎手順では、固体化合物の粒径を減少させることと、固体化合物をポリマー基質中に均一に分散させることを同時に行い、懸濁製剤を形成する。粉碎後、生成物上での水分凝縮を避けるために、真空下で、製剤を室温までゆっくりと加温した。

40

【0052】

ポリマー中のタンパク質の平均分子量を 1500g/mol ~ 5000g/mol とし、薬物負荷を 1.25% ~ 5.0% (w/w) の範囲で変化させて、合計 7 種類の製剤を調製した (表 1)。組み込んだ凍結乾燥物の粒径および hexPLA 内での均一な分散を、Optiphot-2 顕微鏡 (ニコン社製、東京、日本国) を使って、光学顕微鏡法で確認した。

【表 1】

【表 1】

		ポリマー分子量 M_w			
		1500g/mol	2500g/mol	3500g/mol	5000g/mol
タンパク質 負荷 (w/w)	1.25%	—	✓	—	—
	2.50%	✓	✓	✓	✓
	5.00%	—	✓	—	✓

10

【0053】

凍結乾燥された E S B A 9 0 3 は、粘性の親油性ポリマーであるヘキシル置換ポリ乳酸 (h e x P L A) と懸濁液を形成した。したがって、固形の凍結乾燥生成物の粒子は、細い針を通過する良好な注射性、物理的な懸濁安定性および基質からの制御された放出を可能にするために十分なだけ小さく、かつ均一に分散している必要があるため、点眼用の注射液としての E S B A 9 0 3 - h e x P L A 製剤の安定性にとって、組み込んだタンパク質凍結乾燥生成物の粒径は重要な要因であった。タンパク質の場合、活性化化合物の剪断応力および加温は、タンパク質の構造を変化させ、それによってその活性をも変化させることができるため、製剤プロセスは重要である。したがって、これらの影響を限定する調製方法が必要である。E S B A 9 0 3 の凍結乾燥生成物をポリマー基質と一緒に凍結粉碎することは、固形粒子の粉碎とポリマーへの分散を同時に行うことを可能にするため、選択すべき方法となった。液体窒素は、タンパク質変性のリスクを減少させ、粉碎プロセス中に温点が形成されることを防止した。

20

【0054】

図 1 に、凍結粉碎方法により得られた製剤の光学顕微鏡画像を表示する (図 1)。このプロセスの間に、粒径は、最高直径 200 μm から、10 μm 未満へと効果的に減少され、粒子の大半は 2 μm 未満となった。粒径が小さいことにより、27 G の皮下注射針など、内径が約 210 μm の細い針を通じて、懸濁製剤を注射することが可能となった。この迅速かつ単純な単一ステップの微粒子化および製剤プロセスは、h e x P L A を使用して、E S B A 9 0 3 の懸濁製剤を調製するのに適していた。

30

【0055】

実施例 2：製剤のレオロジーおよび注射性

レオロジーおよび注射性の特性に対する薬物負荷およびポリマー分子量の影響を研究するために、7 種の E S B A 9 0 3 - h e x P L A 製剤 (表 1) を調製した。タンパク質製剤のレオロジー的挙動は、注射性および懸濁安定性にとって重要である。粘度に影響を及ぼす 2 つの固有要因、h e x P L A 分子量および組み込まれた薬物の割合を、製剤温度とは独立して、別個に試験した。

【0056】

R h e o S t r e s s 1 H a a k e 応力レオメーター (V r e d e n、ドイツ国) を使用し、隙間間隔を 0.10 mm、角度を 2°、プレート直径を 35 mm としてコーンプレートを設定し、製剤のレオロジー的挙動を研究した。剪断速度 0.1 s^{-1} 、15°C ~ 37°C に変動する 10 分の加熱サイクルで、測定を実施した。

40

【0057】

図 2 A および図 2 B は、全ての製剤の粘度は、温度による影響を顕著に受け、温度が高くなるほど、粘度は低くなったことを示している。この挙動は、温度が高いほど、ポリマー鎖の柔軟性が高くなり、その結果、巨大分子間の相互作用が減少することが原因だった。ストークスの法則によって表されている通り、小さい粒径の効果に加えて、高粘度媒質では、活性化化合物の沈降を減少させることができるため、低温度における高粘度は、懸濁の貯蔵安定性を増加させ得る。さらに、室温または体温への加温により、眼科治療で通常適用される、細い 27 G の針を通じてさえも、治療量を注射可能な製剤が得られた。

50

【0058】

しかしながら、注射の容易さは、図2Aに示す通り、製剤の粘度に影響を及ぼす重要な要因の1つであるポリマー分子量に大きく依存した。1500 g/molから2500 g/molに増加すると、粘度は5倍の増加率を示した。分子量が2500 g/molを超えると、差はそれほど顕著ではなくなった。3500 g/molのポリマーは、多分散性(PD)が多少高くなるため、多少低い粘度を示した。2500 g/molのポリマーのPDは1.55、3500 g/molのポリマーのPDは1.62を示し、これは後者のポリマーに対して使用された単純化した無触媒合成法に因る。精製せずに直接使用したため、小さなポリマー鎖がより多く基質に残った。hexPLAに存在したこれらの小さなポリマー鎖またはオリゴマーは、絡み合うには小さ過ぎるので、粘度を低下させるため、内部可塑剤として動作する。

10

【0059】

予期されていた通り、薬物負荷が高くなるほど、組み込んだ粒子は、液状hexPLAポリマーの自由流を妨げるため、結果として、製剤の粘度は増加した。図2Bに表示されているように、5.0%のESBA903凍結乾燥生成物を2500 g/molのポリマーに添加すると、純粋なポリマーと比較して、37℃にて、粘度が35%増加した。したがって、タンパク質-hexPLAの製剤は、典型的な懸濁と同様の挙動を示し、注射の容易さは、薬物負荷により影響を受けた。しかしながら、注射性に関しては、薬物負荷5.0%が可能だった。

【0060】

15~37℃の研究した範囲で、温度と粘度との相関性は、全ての製剤に対して、単純な指数方程式により表すことができ、相関係数が0.99を超えるとき、次の形式になる： $y = m \times e^{(n \times x)}$ 。

20

【0061】

指数因子(n)は、ポリマーの種類によって決定され、したがって、分子量によっても決定され、増倍係数(m)は、薬物負荷の割合に依存する。したがって、ESBA903-hexPLA製剤の粘度は、純粋なポリマーがそのレオロジーに対して既に特性を決定されていた場合、特定の薬物負荷および定義された温度に対して計算することが可能である。

【0062】

針の長さを眼内注射で一般に用いられている12 mmに、内径を27 Gの針に対応するように0.210 mmに設定し、非経口製剤の注射性を調査した。薬物負荷によっては、50 μLの量の製剤は、3~6ヶ月の治療期間に対して十分であるべきである。眼科医による迅速で実践的な注射を可能にするために、投与プロセスの継続時間は、15秒未満とすべきである。ESBA903-hexPLAの50 μLの投与に適切な0.5 mLのシリンジのプランジャーの内径は、通常、約4.0 mmである。最終的に、良好な注射性のための最大限の適用可能性を、50 Nに固定した。これらのパラメータを使用すると、ハーゲン・ポアズイユの法則により、38 Pa·s未満の粘度は容易な注射を可能にする。したがって、図2に表示されているように、ポリマー分子量が3500 g/mol未満の研究した製剤は全て、室温にて、または多少加温して25℃にした後、注射可能であり、溶剤または可塑剤などのさらなる賦形剤を、投与のために必要としなかった。

30

40

【0063】

実施例3：ESBA903-hexPLAの適合性

タンパク質の立体構造に対する製剤プロセスの影響をサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により解析し、それを用いて、ESBA903モノマーをダイマーおよびその他のオリゴマーから分離し、定量化することができた。したがって、凍結粉碎調製プロセスの直後に、2500 g/molと5000 g/molのhexPLA中にタンパク質を5.0%含有する2つの製剤からタンパク質を抽出し、その抽出物を元の凍結乾燥生成物の純粋な単鎖抗体フラグメントと比較した。

【0064】

50

ヒト化VEGF-抗体フラグメントESBA903を定量化し、タンパク質のモノマー比を、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を使用して評価した。解析はTSK-Gel Super SW2000、4.6mm×30cmのカラム（東ソーバイオサイエンス製、山口県、日本国）を装備したDionex Ultimate 3000 HPLC系（Sunnyvale製、カリフォルニア、米国）で実施した。PBSランニング緩衝液（ Na_2HPO_4 25mM、 NaCl 0.1M、pH 6.5）の流速を0.35mL/分に設定して、イソクラティック法を使用した。カラム温度を30℃に維持し、タンパク質を214nmにて、UV吸光により検知した。ESBA903の校正標準液をクエン酸緩衝液（クエン酸ナトリウム20mM、 NaCl 125mM、pH 6.25）中で調製し、試料溶液をそういうものとして解析した。適用した方法によって、ESBA903モノマーをより低次のオリゴマーおよび水溶性凝集体から分離することができた。

【0065】

それぞれ2500g/molと5000g/molのhexPLAに5.0%のESBA903を含有する2つの製剤10mgを各々3個のエッペンドルフ型カップに分散させた。0.7mLのクエン酸緩衝液（クエン酸ナトリウム20mM、 NaCl 125mM、pH 6.25）を添加し、タンパク質を1.5時間の間、抽出した。抽出プロセス中の取り扱いによるタンパク質の立体構造への影響を除去するために、以下の3つの異なる抽出方法を使用した：i）穏やかな攪拌、ii）37℃でのインキュベーションおよび60rpmでの振盪（インビトロの放出条件）、iii）集中的なボルテックス混合（vortexing）。その後、SEC-HPLCを使用して、モノマー対マルチマーの比率に関して、上澄み試料を解析した。

【0066】

図3に表示するように、SEC-HPLCでは、ESBA903基準（図3A）とhexPLA製剤から抽出したタンパク質（図3B）との間で、SECクロマトグラムに有意な違いは明らかにならなかった。抽出方法に関係なく、タンパク質分子は、主にモノマーとして存在し、ダイマーと他のオリゴマーは3%未満で存在した。オリゴマーは親油性ポリマー中に、または抽出中に組み込まれたが、調製プロセス中には形成されなかったため、hexPLAは、ESBA903オリゴマーの形成を誘導しなかった。これは、タンパク質が、固形凍結乾燥生成物として基質に組み込まれ、そこで、ESBA903は安定し、液状賦形剤との相互作用は、凍結乾燥生成物表面に限定されたことによると推定される。また、凍結粉碎プロセスも、タンパク質がこのプロセス後も活性モノマーの形態を維持したため、ポリマー基質中でのESBA903の微粒子化および分散に適性があることを示した。液体窒素中での粉碎は、活性物質の加熱およびタンパク質の熱を原因とする分解を効果的に防止した。最終的に、ESBA903をhexPLA基質からクエン酸緩衝液に放出したが、見たところ、立体構造上の改変は起こらなかった。これらの結果は、hexPLAには、単鎖抗体フラグメントとの適合性があるため、hexPLAはESBA903の徐放性製剤用の賦形剤として適性があることを証明した。また、凍結粉碎は、タンパク質の立体構造を変化させることなく、凍結乾燥タンパク質の調製物を効果的に微粒子化し、同時に、均一な懸濁製剤を調製する実現可能な方法である。

【0067】

実施例4：hexPLA中のESBA903の貯蔵安定性

hexPLA基質中のESBA903の貯蔵安定性を、2500g/molおよび5000g/molのhexPLA中に5.0%のESBA903を含有する懸濁製剤を使用して評価した。50mgをエッペンドルフ型カップに充填し、光防護下で、それぞれ4℃と37℃で貯蔵した。4週間後と10週間後に、上述したように、クエン酸緩衝液とボルテックス混合することにより、タンパク質を10mgの試料製剤から抽出した。全体のピーク領域と相対したESBA903モノマーピーク領域の比率に関して、上澄みをSEC-HPLCにより解析した。

【0068】

長期間における安定性は、タンパク質製剤にとっての懸案事項である。タンパク質製剤

は、一般に、凍結乾燥生成物としてさえも変性を防ぐために、冷蔵条件下で貯蔵される。したがって、ESBA903-hexPLA製剤の安定性の試験を実施した。2500 g/molおよび5000 g/molのhexPLA中に5.0%のESBA903を含有する試料を4℃にて貯蔵した。4週間後と10週間後に、ポリマーからタンパク質を抽出し、SEC-HPLCにより解析した。

【0069】

表2に、抽出したタンパク質全体のピークエリアと比較したESBA903モノマーの相対ピークエリアの要約を示す。どちらの製剤も、hexPLAの分子量とは関係なく、等しい貯蔵条件下では類似した結果を示した。分子量は、存在するポリマー鎖の数を決定し、したがってポリマー末端基の数も決定するため、タンパク質へのヒドロキシ部分およびカルボキシ部分の相当な影響は、除外はできないとしても、最小だった。4℃において、タンパク質モノマーの比率は、試験期間全体で97%超を維持し、ESBA903がhexPLAと適合性があるだけでなく、ポリマーの内部でも安定であることを証明した。したがって、すぐに投与できるESBA903-hexPLA製剤を、ICHによる定義に従って、標準的な冷蔵庫条件下で貯蔵することができた。モノマーの値は、負の傾向を示すことなく、97%超を維持したため、10週間を超える貯蔵時間も、取り扱いを便利にするために必要であれば、それに応じて実現可能であると思われる。

【表2】

【表2】

5.00%のESBA903 を含有する製剤	貯蔵温度 (℃)	相対エリア ESBA903 モノマー (%)		
		0 週	4 週	10 週
hexPLA 2500g/mol	4	97.4	98.4	97.5
	37	97.4	94.8	94.5
hexPLA 5000g/mol	4	97.7	98.0	98.3
	37	97.7	96.0	92.5

【0070】

実施例5：ESBA903に対するhexPLAの防護効果

体温でのESBA903の安定性を研究するために、製剤を37℃で貯蔵し、4週間後と10週間後に、SEC-HPLCにより解析した（表2）。

【0071】

それぞれ2500 g/molと5000 g/molのhexPLAを有するどちらの製剤も、モノマーがわずかに減少する傾向を示し、ESBA903のダイマーおよびマルチマーが基質上に形成された。しかしながら、モノマーの比率は、10週間後も90%より上を維持し、ESBA903-hexPLA懸濁液が37℃では相当安定であり、見たところ、タンパク質の立体構造において顕著な変化は起こらなかったことを示唆している。最も興味深いことに、活性モノマーの含有量が90%を超えた状態では、タンパク質は、緩衝液中よりも、この温度では、hexPLAポリマー基質中の方が、凍結乾燥状態でより安定していた。緩衝液中からは、10週間後には、活性タンパク質はわずか71%しか回収されなかった。凍結乾燥タンパク質は、疎水性基質により防護され、その放出まで、水性環境との接触が防止されていた。

【0072】

実施例6：インビトロ放出用緩衝液中ESBA903製剤の安定性

0.12 mg/mLのESBA903を含有するクエン酸緩衝液中試料を10週間、37℃にて貯蔵した。同一の貯蔵条件下での別のアプローチでは、2.2 mg/mLの2-ヒドロキシオクタン酸を、最終的な分解生成物として添加しタンパク質の安定性に対する分解ポリマーの影響を研究した。全ての実験は繰り返し実施した。ESBA903モノマーの量を2週間後と10週間後に、SEC-HPLCにより測定した。

【0073】

異なる緩衝系のプレスクリーニングにより、pH 6.5のクエン酸緩衝液がこの抗体フラグメントにとって最適の選択肢であることが明らかになった。この作業では、この緩衝液中の安定性をSEC-HPLCにより評価し、hexPLAの最終的な分解生成物として、2-ヒドロキシオクタン酸の存在下と非存在下でのESBA903のモノマー濃度を定量化した。放出条件下での純粋な緩衝液中では、ESBA903のモノマー濃度は、凝集により、10週間後には、その初期値の84%まで低下した。ポリマー分解生成物を添加した緩衝液中では、モノマー含有量は、10週間後、71%と多少低下し、これはpH値の低下に関係するものと見なされる。徐放特性の意図した実現可能性試験では、70%を超えるモノマーの安定性は、数週間に渡る放出試験には十分であると評価した。しかしながら、モノマー抗体フラグメントの量が時間に依存して減少することは、インビトロ放出実験では、特に後の時点で、放出されるESBA903濃度の過小評価に繋がった。

10

【0074】

ESBA903-hexPLA製剤を緩衝液に入れた後、製剤は、ポリマーの疎水性の高さと親水性環境においてその表面を最小化しようとする傾向によって、球状の単一の液滴を形成した(図4)。ポリマー分子量が1500g/mol~3500g/molの全ての製剤は、研究した3ヶ月の全体を通して球状を維持した。5000g/molのhexPLA中の最も粘度の高い製剤のみが、最初の72時間にかかなり迅速に分解し、小さな製剤液滴を形成した。これは、凍結乾燥タンパク質の調製物によって生じた製剤への溶媒牽引により、水の連続的な流入がチャンネルを形成し、分岐するまで製剤液滴を引っ張ったことによるものと推定される。対照的に、分子量が低いhexPLAを含有する粘度が比較的低い製剤はより柔軟で、それが初期の溶媒牽引を補償し、それにより形状を維持した。

20

【0075】

実施例7:ESBA903のインビトロ放出

放出系の適性をまず確認するために、水性の放出環境において製剤およびタンパク質の挙動を試験した。後で、眼科の徐放性投与のための良好な製剤の候補を明らかにするために、薬物負荷、ポリマー分子量および投与した製剤の量の放出特性への影響を網羅するインビトロ試験を実施した。

【0076】

50+0.5mgの製剤を、20mLの密封可能なガラス製のバイアルに量り取った。2500g/molのhexPLA中に5.0%の薬物を含有する製剤を、25+0.5mgの製剤を使用して、追加的に研究した。放出媒質として20mLのクエン酸緩衝液(クエン酸ナトリウム50mM、NaCl72mM、NaN₃8mM、pH値6.25)を添加した。試料を37℃にてインキュベートし、60rpmで振盪した。1mLの放出液を1日後と3日後、1週間後、2週間後、3週間後および4週間後に各バイアルから抽出し、その後は第14週間まで、2週間に1回、抽出した。毎回、同一容量の新鮮なクエン酸緩衝液を再充填し、緩衝液の容量を一定に保った。放出試料中のESBA903の濃度を、SEC-HPLCにより測定した。

30

【0077】

放出挙動への製剤薬物負荷の影響を研究するために、2500g/molの同一のhexPLAポリマーを使用し、ESBA903負荷を1.25%、2.5%、および5.0%として、3種類の製剤を調製した。図5は、SEC-HPLCにより解析したESBA903モノマーの累積的インビトロ放出および6週間に渡るこれらの製剤の毎日の放出を示している。3種類の製剤は全て類似した放出プロファイルを示し、単鎖抗体フラグメントの放出されたモノマーの量だけが異なった。最初の2~3週間、ESBA903モノマーは、ポリマー基質からより迅速に放出され、以降は6週目まで一定のより低い速度で放出された。

40

【0078】

より詳しく放出曲線を見ると、最初の3週間の迅速な放出は、デボアの表面に近いタン

50

パク質分子の放出により説明することができる。最も興味深いのは、多くの徐放性製剤、例えば、ポリ乳酸（Maincentら、2009年、European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 73:337）で知られているような、顕著なバースト放出がESBA903-hex PLA製剤では、観察されなかったことだ。液状のhex PLAポリマーが組み込んだ凍結乾燥タンパク質の調製物の全体を覆い、それが即時に溶解することから守ったと推定される。3週間以後、放出速度は減少したが、これは活性化合物に溶液が接近しにくくなったためと推定される。

【0079】

3種類の薬物負荷製剤間での相対的な放出速度の違いは、最初の2～3週間でのみ検知可能だった。薬物負荷が高くなると、タンパク質モノマー放出は、1.25%～5.0%の範囲で増加した。初期は分解する必要があるポリマーが少なく、凍結乾燥した薬物の調製物の溶解により、水の追加的な浸入が容易になるため、5.0%のESBA903を有する製剤は、初期の段階で最も迅速に放出された。

【0080】

これらの古典的なインビトロ試験では、徐放は、ESBA903-hex PLA製剤では、6週間、検知可能だった。この長い期間は、現在市場に出荷されている即時放出型製剤と比較して、大幅な改善である。

【0081】

図6に、薬物負荷は2.5%と同一だが、hex PLAの分子量が1500 g/mol、2500 g/mol、3500 g/mol、および5000 g/molと異なる、4種類の製剤について、6週間の抗体モノマーの放出データの要約を示す。5000 g/molのhex PLAを含有する製剤の放出プロファイルでは、著しい放出があり、より分子量が小さな製剤とは、顕著に異なっていた。ポリマーを分解し、薬物を放出するには、その前により多くのエステル結合を加水分解する必要があるため、分子量がより大きな製剤では、より遅い放出になると予想されてもおかしくない。しかしながら、前述したように、緩衝液中の5000 g/molの製剤の球状デポーの分解は、製剤の表面の大幅な増加に繋がり、その結果、より迅速な放出がもたらされる。

【0082】

3500 g/molと2500 g/molの懸濁液は、予想されていた通りにタンパク質を解放し、分子量がより大きな製剤では、より遅い放出を示した。さらに、顕著な放出の期間は、3500 g/molの製剤では、より長期になり、4週間に達した。6週間の後半の段階では、どちらの製剤も、類似の放出速度を示した。

【0083】

1500 g/molのポリマーを含有するESBA903-hex PLA製剤は、初日に2500 g/molおよび3500 g/molポリマーと比較して、より迅速な放出を示したが、その後、毎日の放出速度の落ち込みはより急速だった。初期に濃度がより高かったのは、粘度がより低いことと、接近可能な水溶性hex PLAオリゴマーがより迅速に溶解することに起因し、これは水のより容易な浸入と活性化合物の放出に通じた可能性がある。続いて、タンパク質の遊離ポリマーの層がデポーの表面上に形成されたことで、放出速度が急速に低下したと推定される。それでも、この製剤も、少なくとも6週間の放出期間を示した。

【0084】

図7では、2500 g/molのhex PLAポリマー中に2.5%のESBA903を含有する2つの試料の放出プロファイルを表示しており、2つは製剤液滴の質量に違いがあった。どちらの試料も、6週間全体に渡り、類似した放出プロファイルを示し、放出特性は、製剤の量には影響を受けないことを明らかにした。

【0085】

6週間を超えるESBA903放出の研究

【0086】

10

20

30

40

50

タンパク質のインビトロ徐放性試験についての一般的な問題は、水溶性の緩衝液では、それらの安定性に限界があり、潜在的に放出された活性物質の分解、オリゴマー化および沈殿に通じることである。図8は、ESBA903について、10週間のクエン酸緩衝液のモノマー濃度の低下を示している。時間の経過とともに、溶液中で、放出されたタンパク質がより多く分解されていき、基質からの新しい放出を中和するため、実際のタンパク質放出の過小評価に繋がる。したがって、6～14週間の研究した放出期間について、時間とともにESBA903濃度が低下していくため、ここでは、最初の6週間とは分けて論じる。

【0087】

表3に、第6週～第14週の7種類の放出試料の放出媒質におけるESBA903モノマー濃度の要約を示す。放出後の緩衝液中でのタンパク質モノマーの公知の限られた安定性に関わらず、全ての試料は、ほぼ一定の濃度を示した。この一定のモノマー濃度は、緩衝液中のタンパク質モノマーの凝集が、ポリマー基質からのそのさらなる放出と平衡に到達したことにより説明できる。したがって、これらの製剤の全体の放出期間は、恐らく、それぞれ6週間および8週間よりも遥かに長いだろう。

【表3】

【表3】

製剤の量 [mg]	一定の分子量の hexPLA 中 ESBA903 の 試料組成物の量	放出媒質中の ESBA903 モノマー濃度 [μg/mL]				
		6週	8週	10週	12週	14週
50	1.25%-2500 g/mol	9.0	8.4	7.7	7.4	7.3
50	2.50%-2500 g/mol	17.0	17.4	16.2	15.2	14.7
50	5.00%-2500 g/mol	43.7	44.0	41.7	39.8	37.2
50	2.50%-1500 g/mol	9.3	9.2	8.5	8.6	8.4
50	2.50%-3500 g/mol	12.4	12.4	12.0	11.6	10.8
50	2.50%-5000 g/mol	28.5	28.8	26.8	26.6	26.1
25	5.00%-2500 g/mol	25.4	25.7	25.7	27.3	27.9

【0088】

2500 g/mol の hexPLA 中に 5.0% の ESBA903 を含有する 25 mg の製剤を含む試料は、14週間の期間全体に渡り、連続的にタンパク質を放出し、安定的に増加する ESBA903 モノマー濃度を示した。25 mg の製剤からのより顕著な放出は、恐らくは表面对容量の比率がより高いことに起因し、ポリマーの分解が容易になり、タンパク質放出の優位が生じた。しかしながら、少量の ESBA903-hexPLA 製剤は、投与の容易さおよびそれらの放出プロファイルに関して、有利であるかもしれない。

【0089】

実施例8：インビトロ放出後のタンパク質の完全性および活性

徐放プロファイルの次に、放出された単鎖抗体フラグメントの安定性および活性を測定し、放出されたタンパク質の品質を評価した。したがって、放出実験からの試料を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を使用して解析し、放出されたタンパク質モノマーの完全性を制御し、表面プラズモン共鳴解析を使用してその活性を研究した。第14週での最終時点のインビトロ放出試料を、新たに調製した ESBA903 基準と比較した。製造社により提供された緩衝液および試薬を使用して、タンパク質種を NuPAGE Novex 12% の Bis-Tris ゲル (Life Technologies Corporation 製、Grand Island、米国) 上で分離した。次に、タンパク質の帯域をクーマシーブルーで染色した。

【0090】

図9に、得られたSDS-PAGEゲルを表示した。基準と放出試料のどちらも、抗体フラグメントの計算した分子量で、25 kDaで1つの帯域のみを示した。これは、SECにより以前に得たデータを肯定し、放出された抗体フラグメントの化学構造が、hex PLA基質への組み込み中も維持され、緩衝液に放出されたことを示唆した。

【0091】

放出されたESBA903モノマーのヒトVEGFへのアフィニティを、新鮮なESBA903基準と比較して、表面プラズモン共鳴解析を使用して測定した。結合速度論の評価のために、Biacore T100を使用して、表面プラズモン共鳴測定を実施した。カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM4、GE Healthcare製、Uppsala、スウェーデン国）を、供給元の指示に従って、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩およびN-ヒドロキシコハク酸イミドにより活性化した。組換えヒトVEGF₁₆₅（Peprotech Ltd.、ロンドン、英国）を、標準のアミンカップリング手順を使用して、CM4センサーチップ上に固定し、約500共鳴ユニットの反応を達成した。HBS-EP緩衝液（HEPES 10 mM、NaCl 150 mM、EDTA 3 mM、および0.05%の界面活性剤P20、pH 7.4）中のESBA903標準試料および製剤試料の2倍の段階希釈（2.5~20 nM）を5分間、流速30 μL/分で、フローセルに注射した。CM4チップ上のVEGFからの抗VEGF scFvの解離を10分間、進行させた。各注射サイクルの後、NaOH 100 mMを2回注射することで、表面を再生させた。

【0092】

見かけの解離（ k_d ）および会合（ k_a ）速度定数ならびに見かけの解離平衡定数（ K_D ）を、1対1のラングミュア結合モデルを使用するBiacore T100 evaluation Softwareバージョン2.0.1（Biacore Inc.製、Uppsala、スウェーデン国）によって計算した。

【0093】

2500 g/molのhex PLA中に2.5%および5.0%のESBA903を含有する製剤、ならびに3500 g/molのポリマー中に2.5%のESBA903を含有する製剤も含めて、3つの製剤を解析した。表4では、3日後、4週後、最終の14週後の研究した3つの時点について、得られたアフィニティデータを要約している。

【表4】

【表4】

試料—特定分子量の hexPLA中のESBA903の量	時間	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_D [M]
緩衝液中100% ESBA903	0	9.56×10^{-5}	2.45×10^{-5}	2.56×10^{-11}
2.5 %-2500 g/mol	3日後	5.29×10^{-5}	2.59×10^{-5}	4.89×10^{-11}
	4週後	4.24×10^{-5}	2.34×10^{-5}	5.52×10^{-11}
	14週後	4.07×10^{-5}	3.11×10^{-5}	7.62×10^{-11}
5.0 %-2500 g/mol	3日後	4.65×10^{-5}	2.77×10^{-5}	5.94×10^{-11}
	4週後	5.54×10^{-5}	3.56×10^{-5}	6.43×10^{-11}
	14週後	4.21×10^{-5}	2.78×10^{-5}	6.60×10^{-11}
2.5 %-3500 g/mol	3日後	4.39×10^{-5}	3.00×10^{-5}	6.85×10^{-11}
	4週後	5.82×10^{-5}	3.03×10^{-5}	5.21×10^{-11}
	14週後	4.08×10^{-5}	3.37×10^{-5}	8.26×10^{-11}

3日後、4週後および14週後における3つの製剤の試料を、ESBA903基準と比較した（ k_a = 会合速度定数； k_d = 解離速度定数； K_D = 解離平衡定数）

【0094】

製剤と時点に関係なく、全ての試料は、会合速度定数および解離速度定数に関して類似

の結果を示し、したがって、解離平衡定数についても類似の結果を示した。放出試料は、s c F v 基準に匹敵する定数を示した。

【0095】

低い解離定数と一緒に、 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ を超える高い会合定数は、抗体フラグメントモノマーのヒト V E G F に対する高いアフィニティを反映しており、成長因子分子を除去するその潜在能を強調している。基準に比較した試料の多少低い会合定数は、タンパク質モノマーの定量化における不正確さが恐らくは原因だろう。この推定は、試料と基準とが、濃度とは無関係に、類似した解離速度定数を示したという事実によって裏付けられる。測定した解離速度定数では、最高14週間までの全ての時点において、放出試料に対し、低い解離平衡定数を得た。したがって、h e x P L A 基質から放出された抗体フラグメントモノマーは、3ヶ月を超える徐放期間全体に渡り、それらの生物学的に活性な形態であった。薬物負荷とポリマー分子量のどちらも、解離平衡定数には顕著な影響を及ぼさなかったもので、したがって、それらはタンパク質構造に影響を及ぼさない。もしそうでなかったならば、活性が減少する結果になっていただろう。これは、h e x P L A が抗体フラグメントの薬学的に活性なモノマーを維持し、放出したため、h e x P L A が E S B A 903 に対する非経口徐放性賦形剤としてインビトロで適性であることをさらに証明した。

【0096】

上記の開示は、本発明の特定の具体的な実施形態を強調するものであり、それらに相当する変更または代替方法は、付属の特許請求の範囲に規定される、本発明の趣旨および範囲内であることが理解されるべきである。

【図1】

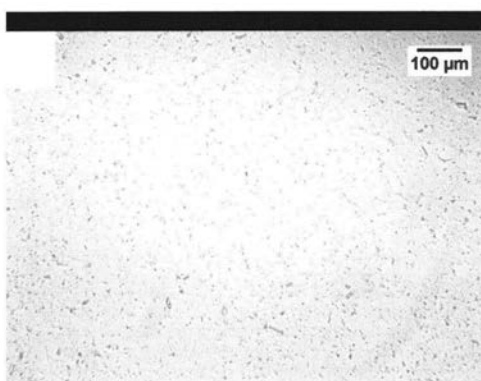


図1

【図2】

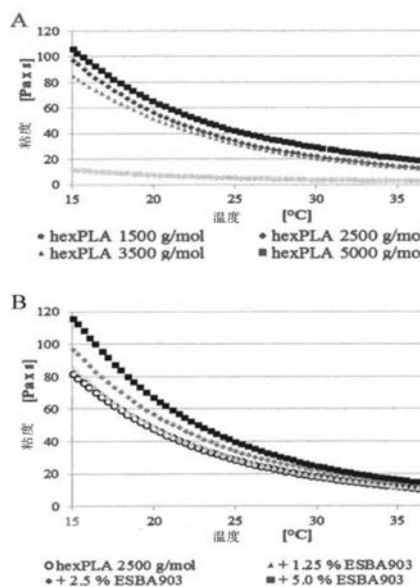


図2

【図 3】

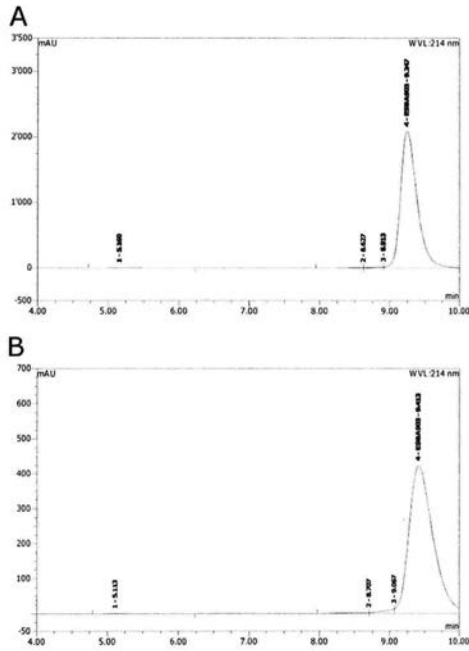


図 3

【図 4】

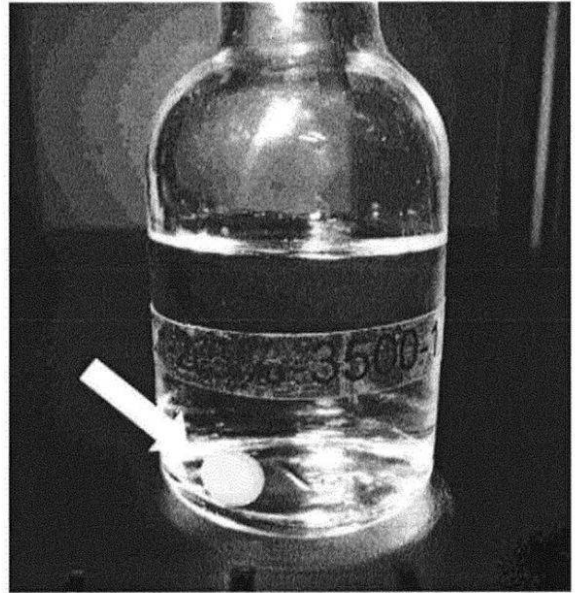


図 4

【図 5】

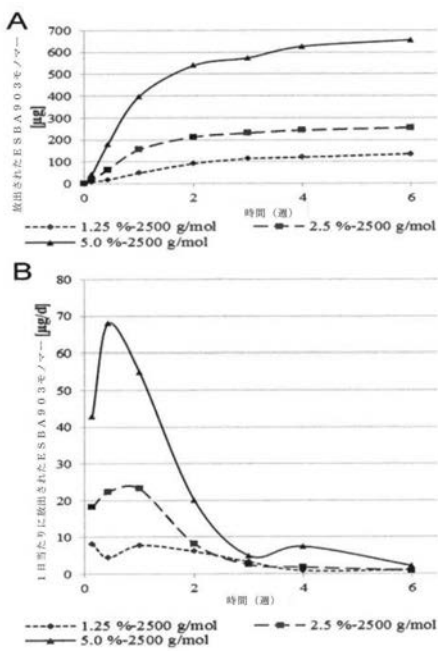


図 5

【図 6】

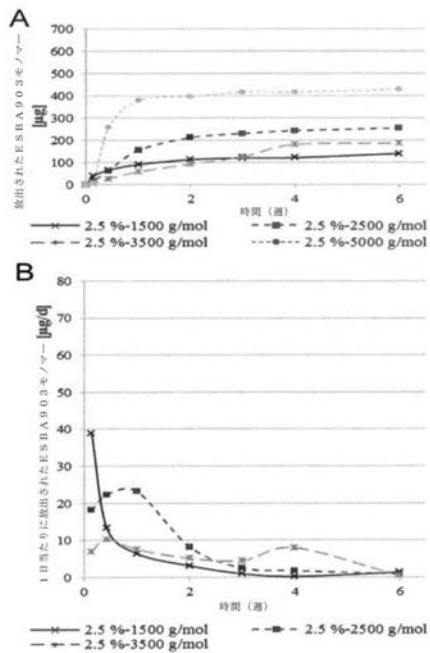


図 6

【図 7】

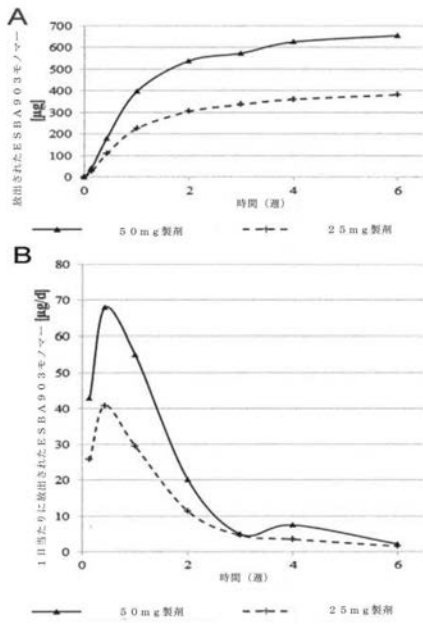


図 7

【図 8】

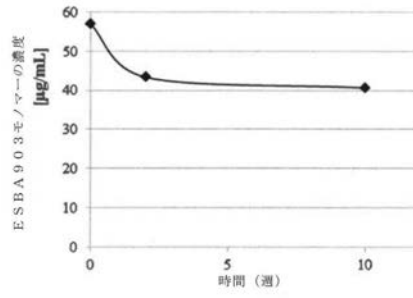


図 8

【図 9】

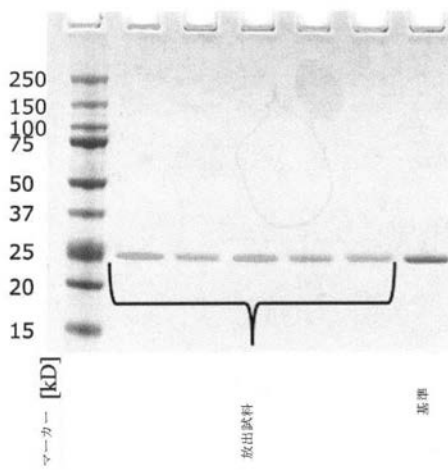


図 9

【配列表】

2019081797000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ルッツ アスムス

スイス国 シーエイチー１２０４ ジュネーブ, リュ フォレル

(72)発明者 ミヒャエル メラー

スイス国 シーエイチー１２６４ サンーセルグ, ラ シェヴレリ ドゥ ジュノリエ １

(72)発明者 ロベール ギュルニイ

スイス国 シーエイチー１２０４ ジュネーブ, リュ カルヴァン ７

Fターム(参考) 4C076 AA22 AA94 AA95 BB11 BB24 BB32 CC10 EE24 FF16 FF17

FF31 FF36

4C085 AA14 BB11 BB41 CC21 DD62 EE01 GG01

【外国語明細書】
2019081797000001.pdf