

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7631358号
(P7631358)

(45)発行日 令和7年2月18日(2025.2.18)

(24)登録日 令和7年2月7日(2025.2.7)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	Z N A
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/10 (2006.01)	A 6 1 P	31/10	
請求項の数 22 (全19頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2022-548034(P2022-548034)	(73)特許権者	522312539	
(86)(22)出願日	令和3年3月17日(2021.3.17)		ドラッグリキュア エーピーエス	
(65)公表番号	特表2023-517480(P2023-517480 A)		デンマーク 2 9 7 0 ホルスホルム ス	
			ロッツマークン 1 7 2 . ティーバイ.	
(43)公表日	令和5年4月26日(2023.4.26)	(74)復代理人	110003797	
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/056851		弁理士法人清原国際特許事務所	
(87)国際公開番号	WO2021/185921	(74)代理人	100082072	
(87)国際公開日	令和3年9月23日(2021.9.23)		弁理士 清原 義博	
審査請求日	令和6年3月11日(2024.3.11)	(72)発明者	スクリバー, ラース	
(31)優先権主張番号	62/990,810		デンマーク 2 9 7 0 ホルスホルム ス	
(32)優先日	令和2年3月17日(2020.3.17)		ロッツマークン 1 7 1 ティーエイチ.	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ワット, アラン	
(31)優先権主張番号	20164648.6		デンマーク 2 9 7 0 ホルスホルム ス	
(32)優先日	令和2年3月20日(2020.3.20)		ロッツマークン 1 7 1 ティーエイチ	
	最終頁に続く	審査官	濱田 光浩	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 吸入のためのGM－CSFの液体製剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

a. 150～500 μg/mLの濃度のrhGM－CSFと、
b. 0.5～1.50mg/mLの濃度の組換えヒトアルブミン(rHA)と、
c. 0.05～0.15mg/mLの濃度のポリエチレングリコール4000(PEG－4000)と、
d. 45～100mg/mLの濃度のマンニトールと
を含む、組換えヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(rhGM－CSF)の安定した液体製剤。

【請求項2】

前記rhGM－CSFの濃度は、200～300 μg/mLであり、
前記rHAの濃度は、0.5～1.50mg/mLであり、
前記PEG－4000の濃度は、0.05～0.15mg/mLであり、および
前記マンニトールの濃度は、45～100mg/mLである、請求項1に記載の液体製剤。

【請求項3】

前記rhGM－CSFは、モルグラモスチム(配列番号1)、サルグラモスチム(配列番号2)、またはレグラモスチムである、請求項1に記載の液体製剤。

【請求項4】

前記rhGM－CSFはモルグラモスチム(配列番号1)である、請求項3に記載の液体製剤。

【請求項 5】

25℃で6か月保存した後に、前記安定した液体製剤中に5%未満の不純物が形成される、請求項1に記載の液体製剤。

【請求項 6】

前記不純物は、HPLCを使用して決定される、請求項5に記載の液体製剤。

【請求項 7】

緩衝液をさらに含む、請求項2に記載の液体製剤。

【請求項 8】

前記緩衝液がクエン酸一水和物または Na_2HPO_4 である、請求項7に記載の液体製剤。

【請求項 9】

前記 rhGM-CSF は、モルグラモスチム（配列番号1）であり、
ここで、前記液体製剤は、Tween 80、 Na_2HPO_4 、およびクエン酸一水和物の1つ以上をさらに含む、

前記Tween 80、前記 Na_2HPO_4 、および前記クエン酸一水和物の1つ以上は、
0mg/mL～0.1mg/mLのTween 80の濃度、
2.6mg/mL～15.5mg/mLの Na_2HPO_4 の濃度、および／または
0.28mg/mL～1.7mg/mLのクエン酸一水和物の濃度を含む、

請求項8に記載の液体製剤。

【請求項 10】

前記液体製剤の重量モル浸透圧濃度は、250～375mOsm/Lである、請求項1に記載の液体製剤。

【請求項 11】

3か月保存した後に残存する rhGM-CSF の%は60%を超え、および／または5%未満の不純物が25℃で6か月保存した後に前記安定した液体製剤中に形成される、請求項1に記載の液体製剤。

【請求項 12】

前記不純物は、HPLCを使用して決定される、請求項11に記載の液体製剤。

【請求項 13】

前記液体製剤が噴霧化される、請求項1～12のいずれか1つに記載の液体製剤。

【請求項 14】

前記 rhGM-CSF の生物学的効力の少なくとも90%は噴霧化後に保持される、請求項13に記載の液体製剤。

【請求項 15】

請求項1に記載の液体製剤を含む吸入器。

【請求項 16】

前記液体製剤が噴霧化される、請求項15に記載の吸入器。

【請求項 17】

経肺投与のための請求項1に記載の液体製剤。

【請求項 18】

肺への投与のための請求項1に記載の液体製剤。

【請求項 19】

吸入のための請求項1に記載の液体製剤。

【請求項 20】

肺感染症、若しくは、肺における細菌、ウイルス、または真菌の感染症の処置のための請求項1に記載の液体製剤。

【請求項 21】

自己免疫性肺胞たんぱく症（ aPAP ）感染症の処置のための請求項1に記載の液体製剤。

【請求項 22】

非結核性抗酸菌（ NTM ）感染症の処置のための請求項1に記載の液体製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組換えヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（rhGM-CSF）を含む吸入のための液体製剤に関する。

【背景技術】

【0002】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）は、もともと造血成長因子として同定されていた。ヒトGM-CSFは、インビトロの骨髄球ならびに赤血球前駆細胞の成長を刺激し、いくつかの免疫および炎症性のプロセスにおいて単球、マクロファージならびに顆粒球を活性化する（Gasson JC et al. Prog Clin Biol Res. 1990; 352: 375-384.; Gasson JC et al. Prog Clin Biol Res. 1990; 338: 27-41; Hart SP et al. Biochem Soc Trans. 1998; 26(4): 650-652; Rapoport AP et al. Blood Rev. 1992; 6(1): 43-57.）。それは、リンパ球、単球、内皮細胞、線維芽細胞および一部の悪性細胞を含む多くの細胞型によって産生される（Metcalfe D. Blood. 1986; 67(2): 257-267; Clark SC, Kamen R. Science. 1987; 236(4806): 1229-1237; Hart PH et al. J Immunol. 1988; 141(5): 1516-1521; Metcalfe D et al. Blood. 1986; 67(1): 37-45）。造血前駆細胞上の成長刺激および分化の機能を有することに加えて、GM-CSFは、GM-CSF受容体を発現する免疫系の細胞に様々な作用を及ぼすことも発見された（概説としてはHamilton JA. Trends Immunol. 2002; 23(8): 403-408; de Groote RP et al. Cell Signal. 1998; 10(9): 619-628を参照）。

【0003】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子吸入療法は、自己免疫性肺胞たんぱく症（aPAP）（Tazawa R et al. N Engl J Med. 2019; 381(10): 923-932）非結核性抗酸菌（NTM）の感染（Scott JP et al. Eur Respir J. 2018; 51(4): 1702127）、急性放射線症候群（Singh VK et al. Cytokine. 2015; 71(1): 22-37）、急性呼吸窮迫症候群（Herold S et al. Am J Respir Crit Care Med. 2014; 189(5): 609-611）および嚢胞性線維症（Heslet L et al. J Inflamm Res. 2012; 5: 19-27.）に苦しむ患者を噴霧化によって処置するために開示されてきた。

【0004】

吸入療法は、全身性副作用を軽減するとともに肺への最適に送達する最良の可能性を提供する。吸入処置は、最適な有効性に必要な薬物の量を低下させて、気道を標的とする。さらに、通常、薬物の急速な作用発現に伴って、全身性副作用の発生率が低くなる。噴霧器は、肺のすべての部位で堆積させ得る呼吸可能な液滴の非常に微細なミストで空気を満たすため、真菌類または細菌の肺感染に非常に適切な処置方法である。

【0005】

しかしながら、吸入療法用の液体としてのタンパク質製剤は、噴霧器への添加が可能、かつエアロゾル生成中に安定した状態を維持できる製品が必要となるため、非常に複雑なプロセスである。製剤は、長期間保存の際に安定性を維持し、タンパク質の完全性に対する噴霧化の影響を最小限に抑え、経肺送達に適切な張性を有するべきである。したがって、安定性と、潜在的毒性を含む肺での耐容性と等張性との間の微妙なバランスが、吸入療法のための有効なタンパク質製剤を達成する秘訣である。

【0006】

タンパク質が、再懸濁のための凍結乾燥された製品として製剤される時、再懸濁の際に

10

20

30

40

50

等張性が達成できる長期安定性が確保されるため、同じ課題は発生しない。したがって、同じ賦形剤組成物は、必ずしも2つの異なる製剤に適用可能とは限らない。

【0007】

GM-CSFの液体製剤（LEUKINE（登録商標））は、以前静脈内投与のために開示された（US2002141970A1）。US2002141970A1は、化合物の安定性を増大させるため、賦形剤としてキレート化剤の添加を示唆する。

【0008】

噴霧化のための薬液の製剤は、薬物の溶解性および安定性を最適化することを目指しており、製剤のわずかな変化が、吸入量、粒度分布および処置時間にも影響する場合がある。

【0009】

噴霧化は、タンパク質を不安定にする固有のリスクを内在する。噴霧化の際のタンパク質不安定性の主な原因は、気液界面でのアンフォールディングおよび凝集であるため、噴霧化のためのGM-CSFの使用には、吸入のために使用準備ができており、かつ噴霧化の際に有意な変化をもたらさない安定した液体製剤が必要とされる。

【発明の概要】

【0010】

本発明は、吸入のために使用準備ができており、かつ噴霧化の際、妥当な不安定性を示さないrhGM-CSFの安定した液体製剤を開示する。

【0011】

本発明の1つの実施形態では、糖アルコールまたは糖、アルブミン、およびポリエチレングリコール（PEG）と水の組み合わせは、高度に安定したrhGM-CSFの液体製剤を提供する。

【0012】

1つの実施形態では、上記に記載された液体製剤は、噴霧化のために薬剤として使用されるものである。

【0013】

1つの実施形態では、rhGM-CSFの液体製剤は、aPAPまたはNTM感染の処置に使用するものである。

【0014】

1つの実施形態では、rhGM-CSF、糖アルコール、アルブミンおよびPEGを噴霧化する工程を含む組換えrhGM-CSFを経肺送達するための方法が開示される。

【0015】

さらなる実施形態では、rhGM-CSFの液体製剤を含む噴霧器が、aPAPまたはNTM感染の処置に使用するために開示される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、40℃で3ヶ月後に残存するrhGM-CSF%に対するマンニトールの影響。3ヶ月にわたって加速条件でrhGM-CSFの液体製剤の安定性に対するマンニトール濃度の影響が評価された。マンニトールの濃度は、薬物安定性に影響を及ぼすことが発見された。マンニトールのより高い濃度（50mg/mL）によって、rhGM-CSFの安定性が改善した。Y軸は、T0と比較して、残存するrhGM-CSF含有量%である。

【図2】図2は、マンニトールの濃度の群化内のrhGM-CSFレベルの40℃で3ヶ月後に残存するGM-CSFに対する影響。3ヶ月にわたる加速条件で液体製剤の安定性へrhGM-CSFの濃度の影響も評価された。rhGM-CSFの濃度は、薬物安定性に影響を及ぼすことが発見された。特定のマンニトールの濃度でのrhGM-CSFのより高い濃度（400μg/mL）によって、液体製剤中のrhGM-CSFの安定性が改善した。Y軸は、T0と比較して、残存する%rhGM-CSF含有量%である。

【図3】図3は、rhGM-CSF不純物形成へのrHAおよびPEG4000の影響。安定化剤としてrHAとPEG4000を含む製剤では、6ヶ月にわたる冷却状態と加速

10

20

30

40

50

条件でより少ない r h G M - C S F 不純物が形成された。簡易型製剤（白丸）は、r H A または P E G 4 0 0 0 を含有していない。複合型体製剤（黒丸）は 1 . 0 m g / m L の r H A および 0 . 1 m g / m L の P E G 4 0 0 0 を含有している。

【図 4 A】図 4 A は、r h G M - C S F 複合型体製剤の 1 8 ヶ月間の性能の安定性。噴霧化の際の複合型 r h G M - C S F 製剤の性能の安定性は、5 °C と 2 5 °C で 1 8 ヶ月間の保存まで評価された。以下の 3 つのパラメータ：D D = シミュレートされた呼吸での送達量（U S P < 1 6 0 1 >、成人による）、F P F = 微粒子フラクション（5 μm 未満の液滴）および M M A D = 空気動力学的質量中央径が評価された。噴霧化の際、1 8 ヶ月間までの時点で性能の安定性の変動は、ほとんどまたはまったく発見されなかった。

【図 4 B】図 4 B は、r h G M - C S F 複合型体製剤の 1 8 ヶ月間の性能の安定性。噴霧化の際の複合型 r h G M - C S F 製剤の性能の安定性は、5 °C と 2 5 °C で 1 8 ヶ月間の保存まで評価された。以下の 3 つのパラメータ：D D = シミュレートされた呼吸での送達量（U S P < 1 6 0 1 >、成人による）、F P F = 微粒子フラクション（5 μm 未満の液滴）および M M A D = 空気動力学的質量中央径が評価された。噴霧化の際、1 8 ヶ月間までの時点で性能の安定性の変動は、ほとんどまたはまったく発見されなかった。図 4 A および 4 B は 2 つの別個のバッチを示す。

【図 5】図 5 は、r H A 低濃度の製剤の 3 ヶ月間の安定性。r H A 低濃度（0 . 2 m g / m L）を有する複合型の r h G M - C S F のバージョンは、評価され、および r H A または P E G 4 0 0 0 を含まなかった簡易型製剤より、改善された安定性を示した。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 7】

本発明は、吸入による投与に使用するための組換えヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（r h G M - C S F）の液体製剤であって、ここで、液体製剤は、r h G M - C S F、糖アルコールまたは糖、アルブミンおよび水を含む、液体製剤に関する。

【0 0 1 8】

特定の賦形剤の組み合わせによって、吸入療法に使用する準備ができている液体製剤中の r h G M - C S F の高安定性が保証される。

【0 0 1 9】

1 つの実施形態では、前記 r h G M - C S F は、モルグラモスチム（配列番号：1）、サルグラモスチム（配列番号：2）、またはレガラモスチム（R e g r a m o s t i m）である。

【0 0 2 0】

モルグラモスチムのアミノ酸配列は、内在性ヒト G M - C S F のアミノ酸配列と同一である。サルグラモスチムのアミノ酸配列は、位置 2 3 でのロイシンの置換で天然の G M - C S F と異なる。好ましい実施形態では、前記 r h G M - C S F はモルグラモスチム（配列番号：1）である。モルグラモスチムは、大腸菌中で発現された非グリコシル化 r h G M - C S F である。

【0 0 2 1】

1 つの実施形態では、r h G M - C S F の液体製剤は糖を含み、ここで、前記糖は、マルトース、トレハロース、スクロース、マンノース、ラクトースまたはガラクトースからなる群から選択される。

【0 0 2 2】

本発明の別の実施形態では、r h G M - C S F の液体製剤は、マンニトールまたはソルビトールからなる群から選択された糖アルコールを含む。r h G M - C S F の液体製剤へのポリオール糖の添加によって、安定性が上昇する。さらに、ポリオール糖は、製剤がヒト血漿と等張であることを保証するための等張化剤として使用される。好ましい実施形態では、前記糖アルコールはマンニトールである。

【0 0 2 3】

アルブミンは、球状タンパク質のファミリーであり、最も一般的なのは血清アルブミンである。ヒト血清アルブミン（H S A）は、ヒト血漿に含まれる最も一般的なタンパク質

10

20

30

40

50

である。HSAの添加は、rhGM-CSF液体製剤の安定性に貢献する。また、存在量およびアルブミンへの天然の自己寛容によって、ある患者集団においてHSAが免疫応答を誘発する可能性を最小限に抑えることができる。したがって、本発明の1つの実施形態では、rhGM-CSFの液体製剤はアルブミンを含む。好ましい実施形態では、前記アルブミンはHSAである。本発明の別の実施形態では、アルブミンが組換えヒトアルブミン(rHA)である。

【0024】

本発明の1つの実施形態では、rhGM-CSFの液体製剤は、PEGをさらに含む。そのようなPEGは、PEG1000、PEG1550、PEG2000、PEG3000、PEG3350、PEG4000、またはPEG8000を含むが、それらに限定されない。したがって、1つの実施形態では、rhGM-CSFの液体製剤は、PEG1000、PEG1550、PEG2000、PEG3000、PEG3350、PEG4000またはPEG8000からなる群から選択されたPEGをさらに含む。好ましい実施形態では、前記PEGはPEG-4000である。

【0025】

タンパク質の濃度は、安定的かつ使用する準備ができた製剤を保証するために決定的である。rhGM-CSFの濃度を増加させると、rhGM-CSFの液体製剤の安定性を上昇させ得る。本発明の1つの実施形態では、rhGM-CSFの濃度は少なくとも150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。本発明のさらなる実施形態では、開示された液体製剤中のrhGM-CSFの濃度は、少なくとも150~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲にある。本発明の別の実施形態では、開示された液体製剤中のrhGM-CSFの濃度は、200~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲にある。本開示は、糖アルコールのマンニトールの存在下において、rhGM-CSFの濃度を増加させると、液体製剤を安定化させることを示す(図2)。

【0026】

吸入用のrhGM-CSFの液体製剤の等張性と安定性との間のバランスを保証するために、本発明の実施形態は、rhGM-CSFの液体製剤を開示し、ここで、糖アルコールの濃度は、少なくとも25 mg/mL である。本発明のさらなる実施形態では、糖アルコールの濃度は、45~100 mg/mL の範囲にある。本発明の別の実施形態では、糖アルコールの濃度は、45~55 mg/mL の範囲にある。本開示の図1で見えるように、糖アルコールのマンニトールの濃度を増加させると、rhGM-CSFの安定性が改善する。マンニトールの安定化効果は、25 mg/mL の糖アルコールの濃度で確認される。この効果は、50 mg/mL の濃度で大幅に増加する。

【0027】

本発明の1つの実施形態では、rhGM-CSFの液体製剤は、少なくとも0.2 mg/mL の濃度でのアルブミンを含む。さらなる実施形態では、rhGM-CSFの液体製剤は、0.2~10 mg/mL の濃度範囲内、例えば、0.3~5 mg/mL 、例えば、0.5~1.5 mg/mL のアルブミンを含む。本開示の図3では、冷却状態および加速条件の両方において安定化剤としてのrHAおよびPEG4000を含有しているrhGM-CSF液体製剤(複合型体製剤)でrhGM-CSFはほとんど含まれていない不純物は形成されることが示される。さらに、図5は、0.2 mg/mL の濃度でアルブミンの安定化効果が既に確認され得、安定化効果は濃度を増加させることで増加することを示す。

【0028】

本発明の1つの実施形態では、rhGM-CSFの液体製剤は、PEGを含み、例えば、PEGの濃度は、最大50、例えば、最大40、例えば、最大30、例えば、最大20、例えば、最大10、例えば、最大1 mg/mL である。本発明の別の実施形態では、PEGの濃度は、例えば、0.05~0.5 mg/mL 、例えば、0.05~0.3 mg/mL 、例えば、0.05~0.2 mg/mL の濃度範囲にある。本発明のさらなる実施形態では、rhGM-CSFの液体製剤は、0.05~0.15 mg/mL の濃度範囲内のPEGを含む。

【0029】

賦形剤と生化学的製剤 (bi o t h e r a p e u t i c) の最適な組み合わせおよび濃度の選択は、非常に特異的で複雑なプロセスであり、個々のタンパク質製剤に特有である。本発明は、r h G M - C S F の液体製剤の1つの実施形態を開示し、ここで、r h G M - C S F は、モルグラモスチム (配列番号: 1) であり、前記糖アルコールはマンニトールであり、前記アルブミンは組換えヒトアルブミンであり、前記 P E G は P E G - 4 0 0 0 である。

【0030】

1つの実施形態では、r h G M - C S F の濃度は、少なくとも $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、マンニトールの濃度は少なくとも $25 \text{mg}/\text{mL}$ であり、組換えヒトアルブミンの濃度は少なくとも $0.2 \text{mg}/\text{mL}$ であり、および P E G - 4 0 0 0 の濃度は最大 $1 \text{mg}/\text{mL}$ である。

10

【0031】

本発明の別の実施形態では、r h G M - C S F の濃度は、 $150 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、マンニトールの濃度は $45 \sim 100 \text{mg}/\text{mL}$ であり、組換えヒトアルブミンの濃度は $0.5 \sim 1.5 \text{mg}/\text{mL}$ であり、および P E G - 4 0 0 0 の濃度は $0.05 \sim 0.15 \text{mg}/\text{mL}$ である。

【0032】

好ましい実施形態では、r h G M - C S F の濃度は $200 \sim 300 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲にあり、マンニトールの濃度は $50 \text{mg}/\text{mL}$ であり、組換えヒトアルブミンの濃度は $1 \text{mg}/\text{mL}$ であり、および P E G - 4 0 0 0 の濃度は $0.1 \text{mg}/\text{mL}$ である。

20

【0033】

緩衝液は、pH を調節し、安定化させ、および薬物溶解性および安定性を最適化するために製剤に添加された。吸入用の薬物については、生成物の pH が生理的な pH に接近していることが望ましい。本発明の1つの実施形態では、r h G M - C S F の液体製剤は緩衝液をさらに含む。好ましい実施形態では、前記緩衝液がクエン酸一水和物または Na_2HPO_4 を含む。

【0034】

液体製剤の重量モル浸透圧濃度は、液体製剤が吸入に適しているための重要なパラメータである。好ましくは、液体製剤は本質的に等張である。したがって、本発明の1つの実施形態では、製剤の重量モル浸透圧濃度は、 $250 \sim 375 \text{mOsm}/\text{L}$ 、好ましくは $325 \sim 335 \text{mOsm}/\text{L}$ である。

30

【0035】

本発明の1つの実施形態では、 40°C で3ヶ月保存した後に残存する r h G M - C S F の % が 60 % を超える r h G M - C S F の液体製剤が開示される。本発明のさらなる実施形態では、 25°C で6ヶ月後の不純物形成のレベルが 5 % 未満である r h G M - C S F の液体製剤が開示される。

【0036】

本発明は、1つの実施形態では、r h G M - C S F、糖アルコール、アルブミンおよび P E G の噴霧化を含む、r h G M - C S F を肺に送達する方法をさらに開示する。

40

【0037】

本明細書に提示される r h G M - C S F の液体製剤は、特に噴霧化によく適している。本開示のデータは、r h G M - C S F、糖アルコールまたは糖、アルブミン、P E G および水を含む液体製剤に対するモルグラモスチムの効力が、噴霧化時に r h G M - C S F の生物学的効力の 99.4 % を保持することを実証する。さらに、r h G M - C S F のこの液体製剤の噴霧化の後で、r h G M - C S F が噴霧化プロセスの後に大部分は元の状態のままであることが見出された。最後に、最大 18 ヶ月の時点で本明細書に提示される液体製剤を噴霧化しても、性能安定性の変化はほとんど見られないか、またはまったく見られない。

【0038】

50

本発明の1つの実施形態では、r h G M - C S Fの生物学的効力の少なくとも90%、例えば、少なくとも95%、例えば、少なくとも98%、例えば、少なくとも99%は噴霧化後に保持される。

【0039】

本発明のさらなる実施形態では、製剤は、25℃で少なくとも18ヶ月間の保存安定性である。

【0040】

本発明の別の実施形態では、液体製剤は経肺投与に使用するためのものである。経肺投与を容易にするために、製剤は小さな呼吸可能な液滴にエアロゾル化されなければならない、その液滴の大部分は直径5 μm未満である。生物学的調製物の場合、製剤はエアロゾル化プロセス中に安定性を維持しなければならない、このプロセスでは、高レベルの機械エネルギーおよび気液界面の面積の増加によって、タンパク質の変性および／または凝集が引き起こされる可能性がある。製剤は、肺への投与に安全、かつ適切な範囲のpH及び等張性の賦形剤も含む必要がある。

【0041】

本発明の別の実施形態では、r h G M - C S Fの液体製剤は肺感染症の処置で使用するのためのものである。

【0042】

さらなる実施形態では、r h G M - C S Fの液体製剤は、肺における細菌、ウイルス、または真菌類の感染症の処置で使用するのためのものである。1つの実施形態では、細菌感染症は、肺炎球菌、ヘモフィルス属種、黄色ブドウ球菌および結核菌から成る群から選択される。別の実施形態では、ウイルス感染症は気管支炎、肺炎および毛細気管支炎からなる群から選択される。さらに別の実施形態では、真菌感染症は、アスペルギルス、クリプトコックス、ニューモシスティスおよび地方病性の真菌類から成る群から選択される。

【0043】

好ましい実施形態では、r h G M - C S Fの液体製剤は、自己免疫性肺胞たんぱく症（a P A P）または非結核性抗酸菌（N T M）感染症の処置、結核、A R D S、インフルエンザ感染症、コロナウイルス感染症、急性および慢性の放射線症候群、気管支喘息、C O P D、肺線維症、肺癌および呼吸器系の炎症性障害の処置で使用するのためのものである。製剤はさらに、免疫学的反応を刺激し、肺感染症から保護するために予防的に使用されてもよい。

【0044】

本発明の実施形態では、r h G M - C S Fの液体製剤は、噴霧化のための薬物として使用するために開示される。別の実施形態では、r h G M - C S Fの液体製剤は、a P A PまたはN T M感染症の処置で使用するのために開示される。

【0045】

1つの実施形態では、病状を治療する方法であって、対象に噴霧化によってr h G M - C S Fの液体製剤を投与することを含む。別の実施形態では、a P A PまたはN T M感染症を処置する方法が提供され、該方法は対象にr h G M - C S Fの液体製剤を投与することを含む。

【0046】

A P A Pはまれな自己免疫性の肺疾患である。それは、肺胞たんぱく症（P A P）の最も一般的な形態（症例の90%）である。ほとんどの症例は、20～50歳の成人が発症する。症状を示さない人もいれば、呼吸困難が進行し、労作時に息切れがする人もいる。他の徴候や症状は、乾燥した慢性咳、疲労、体重減少、胸痛、および不定愁訴を含む場合がある。まれな症例では、喀血、指先の丸みかつ腫れ、およびチアノーゼが存在することがある。自己免疫性P A Pは、G M - C S F効果を遮断するI g G抗体による免疫系の機能不全によって引き起こされる。G M - C S Fは、肺胞マクロファージによるサーファクタント（タンパク質と脂肪の混合物）の排除を調節する。サーファクタントは肺（肺胞）の気嚢に蓄積し、および最終的には呼吸が不可能になる。標準処置は、肺洗浄と呼ばれる

10

20

30

40

50

手技である。

【0047】

NTMは、結核やハンセン病を引き起こさないマイコバクテリアである。NTMは、結核に似た肺疾患を引き起こす。NTM疾患の最も一般的な臨床症状は肺疾患であるが、リンパ、皮膚／軟部組織、および播種性の疾患も重要である。NTMによって引き起こされる肺疾患は、閉経後の女性、および嚢胞性線維症、気管支拡張症、および結核の前などの基礎肺疾患を有する患者に最もよく見られる。アルファ１－アンチトリプシン欠乏症、マルファン症候群、および原発性線毛機能不全の患者が、肺のNTMコロニー形成および／または感染症を発症することは珍しくない。肺性NTMはさらに、AIDSおよび悪性疾患の個体にも発見され得る。

10

【0048】

臨床症状の範囲および強度は変動するが、一般的に化膿性痰を伴う慢性咳を含む。喀血がみられることもある。全身症状は、進行した疾患における倦怠感、疲労、および体重減少を含む。マイコバクテリウム・アブセサス（*M. abscessus*）肺感染症の診断には、症状の存在、放射線学的異常、および微生物培養が必要とされる。

【0049】

本開示に係るrhGM-CSFの液体製剤を含む吸入器。好ましい実施形態では、吸入器は噴霧器である。噴霧器のタイプは、ジェット噴霧器、超音波および振動メッシュを含む。他の実施形態は、ソフトミスト吸入器、表面音響波噴霧化、および毛細管エアロゾル発生器を含む。

20

【0050】

1つの実施形態では、本発明は、rhGM-CSFの液体製剤の噴霧化を含む、rhGM-CSFを肺に送達するための方法を開示し、ここで、液体製剤はrhGM-CSF、糖アルコールまたは糖、アルブミンおよび水を含み、該方法により前記rhGM-CSFが肺に送達される。

【0051】

別の実施形態では、本発明は、aPAPまたはNTM感染症の処置で使用されるためのrhGM-CSFの液体製剤を含む噴霧器を開示する。これはジェット噴霧器、超音波および振動メッシュ噴霧器を含む。

【実施例】

30

【0052】

rhGM-CSFの安定性に対する異なる製剤の効果を、HPLCを使用して研究した。各製剤の含有量と純度は、逆相高圧クロマトグラフィー（RP-HPLC）によって評価された。高次構造（凝集体）およびrhGM-CSFの分解生成物の決定は、サイズ排除高圧クロマトグラフィー（SE-HPLC）によって評価された。

【0053】

実施例1（図1）－マンニトール濃度の効果

- モルグラモスチムの3つの製剤パラメータは、下記の表（表1）に従って変更された。
1. マンニトールレベル（0～50mg/mL）：製剤が等張性を維持するように、緩衝液濃度も同時に調整した。
 2. 安定化剤（4つのオプションのうちの1つ）：rHAおよびPEG、rHA単独で、安定化剤不在、およびTween 80単独で
 3. モルグラモスチムレベル（0.1～0.4mg/mL）

40

【0054】

50

【表 1】

表 1

安定化剤							
F #	マンニ トール 濃度 (mg/ml)	組換えヒ トアルブ ミン(rHA) (mg/mL)	PEG 4000 (mg/mL)	Tween 80 (mg/mL)	モルグラモス チム濃度 (mg/ml)	リン酸水素ナ トリウム (mg/ml)	クエン酸一 水和物 (mg/ml)
1	50	0	0	0.1	0.4	2.580	0.283
2	25	0	0	0.1	0.1	7.740	0.850
3	25	0	0	0	0.2695	7.740	0.850
4	25	1	0	0	0.4	7.740	0.850
5	0	1	0.1	0	0.25	15.480	1.699
6	0	0	0	0.1	0.4	15.480	1.699
7	25	1	0	0	0.25	7.740	0.850
8	50	1	0	0	0.2095	2.580	0.283
9	50	1	0.1	0	0.4	2.580	0.283
10	25	0	0	0	0.25	7.740	0.850
11	0	1	0	0	0.1	15.480	1.699
12	50	0	0	0	0.1	2.580	0.283
13	0	0	0	0.1	0.208	15.480	1.699
14	0	1	0.1	0	0.4	15.480	1.699
15	33.25	1	0.1	0	0.1	6.450	0.708

【 0 0 5 5 】

データを R P - H P L C 方法によって収集した。バイアルを 4 0 ° C で 3 ヶ月保存した。上の表の 1 5 の製剤の各々に 2 つの調製物があった。この研究の主な発見は、図 1 に示されるものであった。マンニトールのレベルは 3 ヶ月で加速条件での安定性に顕著な影響を及ぼした。

【 0 0 5 6 】

実施例 2 (図 2) - r h G M - C S F 濃度の効果

実施例 1 で記載されているように収集されたデータから、r h G M - C S F 濃度が増加すると、マンニトールの特定の濃度での r h G M - C S F 製剤の安定性にも顕著な効果が見られることをさらに観察した。

【 0 0 5 7 】

実施例 3 — r H A および P E G — 4 0 0 0 の効果（図 3）

噴霧化のためのモルグラモスチム製剤の安定性に対する r H A および P E G — 4 0 0 0 の効果を、以下の条件で研究した。

【 0 0 5 8 】

【表 2】

表 3：単一製剤の安定性サンプル配置

保存条件	安定性時点当たりのサンプル						予備	一条件当たり要求される総量
	初期 T=0	0.5か月	1か月	3か月	6か月	任意の		
4°C/周囲のRH	9A°イA		12A°イA	12A°イA	18A°イA	18A°イA	12A°イA	81A°イA
25°C/60% RH			12A°イA	12A°イA	18A°イA	18A°イA	12A°イA	72A°イA
40°C/75% RH		12A°イA	12A°イA	12A°イA		18A°イA	12A°イA	66A°イA
合計			129A°イA			54A°イA	36A°イA	219A°イA

【 0 0 5 9 】

製剤調製

以下に記載するように、モルグラモスチム製剤のバージョン（複合型および簡易型）を使用して、安定性試験を実施した。

【 0 0 6 0 】

モルグラモスチム複合型製剤

複合型製剤を、以下の記載に従って重量ベースで調製した。除菌は、最終的に製剤された産物に対してのみ行った。最終的に製剤された産物の内容は下記の表の通りである。

【 0 0 6 1 】

【表 3】

成分	バイアル当たりの量 (1.2 mL)
モルグラモスチム	0.300 mg
マンニトール	60 mg
クエン酸一水和物	0.34 mg
リン酸水素二ナトリウム、無水	3.1 mg
Recombunin Prime (rHSA)	1.2 mg
PEG 4000	0.120 mg
注射用水	1.2 mLまで

【 0 0 6 2 】

複合型 r h G M — C S F 製剤を製造するために、最初に下記の手順に従って緩衝液を調製した。

【 0 0 6 3 】

クエン酸／リン酸／H S A 緩衝液（例バッチサイズは = 2 0 0 0 g）の調製

【 0 0 6 4 】

10

20

30

40

50

【表 4】

成分	2000 g バッチ用の量
マンニトール	94.87±0.9 g
PEG 4000	0.190 ±0.002 g
クエン酸一水和物	0.531 ± 0.05 g
リン酸水素二ナトリウム、無水	4.934 ± 0.49 g
Recombunin Prime (rHSA)	9.488 ± 0.09 g
注射用水	2000.0 ± 1.0 g まで

10

【0065】

r H S A を 2 ～ 8 ° C の貯蔵庫から取り出し、室温に平衡化させた。必要とされた量のマンニトール、PEG 4000、クエン酸一水和物、リン酸水素二ナトリウム（無水）および r H S A を適切な容器に事前に秤量した。清潔なビーカー／ボトルと攪拌棒をトップローディング天秤の上に置き、ビーカーと攪拌棒の重量を記録して風袋を計った。約 800 g の注射用水（W F I）をビーカーに添加した。必要量のクエン酸一水和物、リン酸水素二ナトリウム（無水）、マンニトールおよび PEG 4000 を W F I に加え、ビーカーを攪拌プレートに移し、すべての固体が溶解するまで混合物を攪拌した。ビーカーをトップローディング天秤に戻し、必要量の r H S A をビーカーに添加した。その後、ビーカーを攪拌プレートに移し、約 5 分間または溶液が均質になるまで穏やかに攪拌した。発泡は回避するべきである。最後に、W F I を目標量 2000 g まで添加し、発泡を避けながら再び約 10 分間溶液を穏やかに攪拌した。緩衝液にラベル付けし、さらに処理するまで 2 ～ 8 ° C で保存した。緩衝液は 2 ～ 8 ° C で 100 時間まで保存することができる。

20

【0066】

r h G M - C S F の製剤化産物の調製（実施例のバッチサイズ = 1000 g）

緩衝液の調製後、下記の手順で r h G M - C S F 複合型製剤を調製する。

r h G M - C S F 溶液の重量 (g) = A

製剤化産物の重量 (g) = A + (10.1507 × A)

【0067】

【表 5】

成分	1000 g バッチ用の量
rhGM-CSF (2.74 mg/mL)	100 g
HSAを含むクエン酸リン酸緩衝液	1115.71 ± 1.11 g まで

30

【0068】

r h G M - C S F を、2 ～ 8 ° C で 24 時間 ± 4 時間解凍した。この時間内にバルク材が解凍されない場合は、室温でボトルを静かに回して解凍を継続する。ボトルを振るべきでなく、発泡を回避するべきである。必要量の r h G M - C S F を適切な大きさの容器に事前に秤量した。清潔なボトルと攪拌棒をトップローディング天秤の上に置いた。ビーカーと攪拌棒の重量を記録して風袋を計った。約 800 g のクエン酸／リン酸／r H A 緩衝液をビーカーに添加し、その後、事前に秤量された量の r h G M - C S F もビーカーに添加した。r h G M - C S F の容器をクエン酸／リン酸／H S A 緩衝液ですすぎ、すすぎ液をビーカーに移した。その後、ビーカーを攪拌プレートの上に置き、発泡を避けながら約 5 分間穏やかに攪拌した。混合物が完全に均質であることを確認した。クエン酸／リン酸／H S A 緩衝液を最終重量が 1000 g になるように添加し、続いて発泡を避けながら約 10 分間穏やかに攪拌した。製剤化産物は、Millipore Stericup フィルタユニット（P V D F 膜（Durapore）、非常に低いタンパク質結合、孔径 0.2

40

50

2 μm) を使用して濾過し、光から保護し 2 ～ 8 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

【 0 0 6 9 】

モルグラモスチム簡易型製剤

rhGM-CSF の簡易型製剤は、簡易型製剤用緩衝液の密度が不明なため、容量ベースで調製している。最終的な製剤化産物の 1 バイアルあたりの成分濃度および配合量は下記の表に示される。

【 0 0 7 0 】

【表 6】

成分	濃度 (mg/mL)	バイアル当たりの量 (1.2 mL)
モルグラモスチム	0.250	0.300 mg
マンニトール	50.0	60 mg
クエン酸一水和物	0.283	0.34 mg
リン酸水素二ナトリウム、無水	2.58	3.1 mg
注射用水	1 mLまで	1.2 mLまで

10

【 0 0 7 1 】

rhGM-CSF の製剤化産物の調製（実施例バッチサイズ = 1 0 0 0 mL）

【 0 0 7 2 】

【表 7】

成分	1000 g バッチ用の量
rhGM-CSF (2.74 mg/mL, 密度 = 1 g/mL))	91.24 $\pm$ 0.10 g
マンニトール	50.0 $\pm$ 0.5 g
クエン酸一水和物	0.283 $\pm$ 0.003 g
リン酸水素二ナトリウム、無水	2.58 $\pm$ 0.03 g
注射用水	1000.0 g $\pm$ 1.0 gまで

20

【 0 0 7 3 】

必要量のマンニトール、クエン酸一水和物、リン酸水素二ナトリウム（無水）を適切な容器に事前に秤量した。約 8 0 0 mL の注射用水（WFI）は攪拌棒を備えたビーカーに添加した。クエン酸一水和物、リン酸水素二ナトリウム（無水）およびマンニトールを WFI に添加した。その混合物を、すべての固体が溶解するまで攪拌した。必要量の rhGM-CSF をビーカーに添加し、rhGM-CSF の容器を WFI ですすぎ、すすぎ液をビーカーに移した。ビーカーを攪拌プレートの上に置き、発泡を避けながら混合物を約 5 分間穏やかに攪拌した。完全に均質であることをチェックする。ビーカーの内容物を 1 L メスフラスコに移した。ビーカーを WFI ですすぎ、すすぎ液はメスフラスコに移した。移動中に泡が立たないように注意するべきである。WFI は 1 L まで QS へのメスフラスコに添加された。また、内容物はフラスコを軽ひっくり返すことによって混合された。製剤化産物を、Millipore Stericup フィルタユニット（PVDF 膜（Durapore）、非常に低いタンパク質結合、孔径 0.22 μm ）を使用して濾過した。最終的な製剤化産物を、光から保護し 2 ～ 8 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

30

【 0 0 7 4 】

本研究の主な発見は、図 2 に示すようなものである。rHA および安定剤として PEG 4000 を含む製剤（複合型製剤）では、冷蔵と加速条件下の両方で、rhGM-CSF の不純物の形成が少なかった。さらに、下記の表では、複合型製剤は、40 $^{\circ}\text{C}$ で 12 日間保存した場合の純度が、簡易型製剤と比較して明らかに高いことが示される。

40

【 0 0 7 5 】

50

【表 8】

簡易型製剤 40 °C

包装器材	純度、 平均値	含有量 [mg/mL], 平均値
6R ガラス製バイアル	88,0%	0,30
PP 注射器	92,0%	0,30
ガラス製注射器	91,3%	0,30

10

【 0 0 7 6 】

【表 9】

複合型製剤 40 °C

20

包装器材	純度、 平均値	含有量 [mg/mL], 平均値
6R ガラスバイアル	94,7%	0,31
PP 注射器	94,9%	0,30
ガラス製注射器	94,9%	0,30

30

【 0 0 7 7 】

実施例 4－噴霧化後の安定性

噴霧化後の r h G M－C S F 複合型製剤の安定性は、非噴霧化製剤と濃縮噴霧化製剤とを比較し、検出された不純物およびタンパク質凝集体を比較することによって評価した。振動メッシュによって生成されたエアロゾルを、メッシュに対して配置されたポリプロピレンチューブに収集することにより、噴霧化の直後に収集した。不純物およびたんぱく質凝集体は、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）およびサイズ排除クロマトグラフィー（S E C）それぞれによって検出された。本研究で評価された製剤は、r h G M－C S F 濃度が 2 5 0 μ g / m L ではなく 3 0 0 μ g / m L であることを除いて、上記の r h G M－C S F 複合型製剤と同一であった。高濃度のモルグラモスチムは不安定性を示す可能性が高く、最悪のシナリオを表している。

40

【 0 0 7 8 】

H P L C によって決定された未知不純物の検出は、下記の表 2 に表記される。主ピークに対するこれらのピークの相対保持時間（R R T）は、0 . 8 7、0 . 9 6、1 . 0 7 であった。H e a d t y p e 3 0 装置を使用して噴霧化を行った後、噴霧化サンプルで R

50

R T 0.87の微上昇（0.26%）、リザーバーでの残留（0.32%）が検出された。これらの結果は、r h G M - C S Fが噴霧化プロセスの後に大部分は元の状態のままであることを実証する。

【0079】

【表10】

表2: RP-HPLCによる関連不純物の比較

	#	RTT 0.87 (% 面積)	RTT 0.96 (% 面積)	RTT 1.07 (% 面積)
未処理サンプル	1	0.22	0.48	0.49
	2	ピークなし	0.64	0.40
噴霧化されたサンプル	1	0.26	0.45	0.40
	2	0.26	0.45	0.27
	3	0.27	0.40	0.36
リザーバーに残ったサンプル	1	0.30	0.28	0.36
	2	0.36	0.56	0.44
	3	0.31	0.50	0.60

【0080】

噴霧化による不純物や凝集物の発生を、振動メッシュ式噴霧器（P A R I e F l o w）で產生されたエアロゾルを捕集して分析し、初期検討した。S E Cによる凝集の評価では、H M W 1およびH M W 2として表示されるアルブミン関連凝集体に観察可能な違いが認められた。このデータから、噴霧化プロセスでアルブミンのある程度の凝集が起こるが、製剤中のタンパク質の大部分は凝集しないままであることが推測される。

【0081】

【表11】

表3: SE-UPLCによる高分子量(HMW)の不純物の比較

	HMW 1 (% 全面積)	HMW 2 (% 全面積)	rHA (% 全面積)	rhGM-CSF (% 全面積)	LMW (% 全面積)	Unk (% 全面積)
未処理サンプル	--	1.89	69.53	26.55	2.03	--
噴霧化されたサンプル	0.69	8.73	62.62	25.71	2.02	--
リザーバに残ったサンプル	--	2.01	68.65	25.80	2.10	0.48

【0082】

【表 12】

表 4：噴霧化前後のモルグラモスチムの含有量

噴霧器の Head Type	サンプル	平均モルグラモスチム含有量 ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ S.D. (n=3)	噴霧化後に残った含有量 (%)
Head Type 30	噴霧化なし	297.9 $\pm$ 5.1	--
	噴霧化あり	282.5 $\pm$ 2.7	94.8
Head Type 40	噴霧化なし	290.8 $\pm$ 0.4	--
	噴霧化あり	277.9 $\pm$ 0.6	95.6

10

【0083】

表 4 に収集したデータは、振動メッシュ式噴霧器による噴霧化前後の複合型製剤の r h G M - C S F 濃度である。含有量を R P - H P L C で測定した。

【0084】

最後に、モルグラモスチムの効力の噴霧化前後での評価も行い、複合型製剤の場合、噴霧化に際して、G M - C S F の生物学的効力の 99.4% が保持されていることを確認した。生物学的効力を T F - 1 細胞株アッセイによって測定した。

20

【0085】

実施例 5 - r h G M - C S F 複合型製剤の性能安定性。

噴霧化の際の r h G M - C S F 複合型製剤の性能安定性を、5℃および 25℃で最大 18 ヶ月間の保存で評価した。以下の 3 つのパラメータを評価した：D D = シミュレートされた呼吸下での投与量 (U S P による < 1601 >、成人)、F P F = 微粒子フラクシオン (5 μm 未満の液滴)、および M M A D = 空気動力学的質量中央径。最大 18 ヶ月の時点では、噴霧化による性能安定性にほとんど変化は見られなかったか、または全く見られなかった。性能データは、U S P < 601 > に準拠した医薬品カスケードインパクションによって生成された。

30

【0086】

実施例 6 - r H A 低濃度製剤の安定性

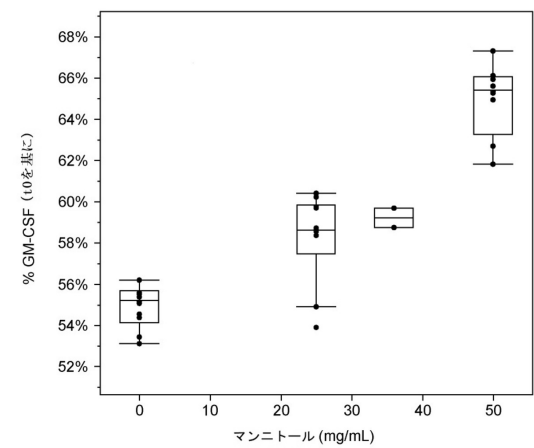
低濃度 (0.2 mg/mL) の r H A を含む複合型 r h G M - C S F のバージョンが評価され、r H A または P E G 4000 を含まない簡易型製剤よりも安定性が改善されていることが示された。r h G M - C S F の含有量を R P - H P L C で測定した。

40

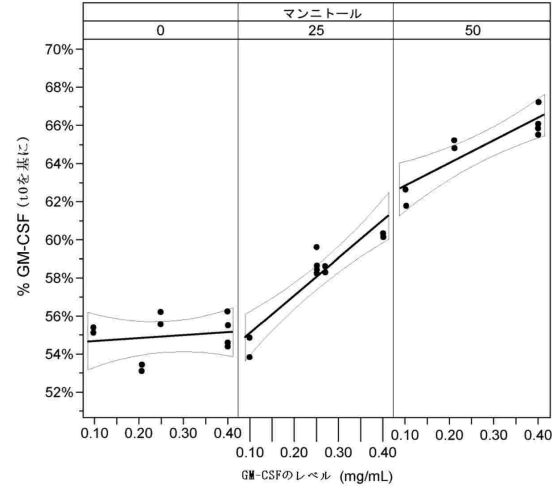
50

【図面】

【図 1】

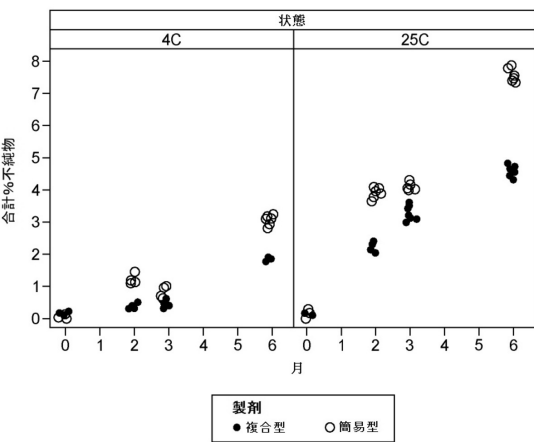


【図 2】

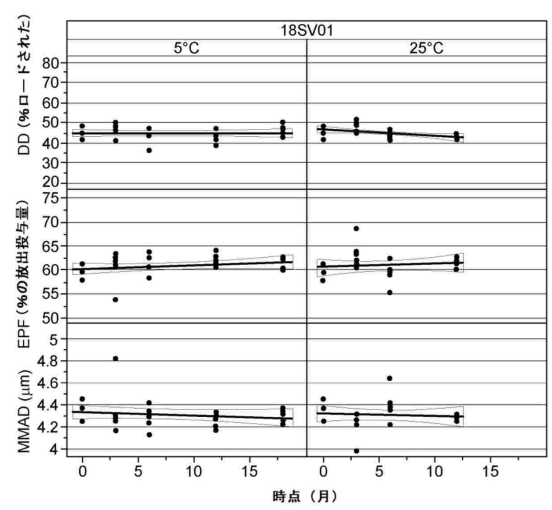


10

【図 3】



【図 4 A】



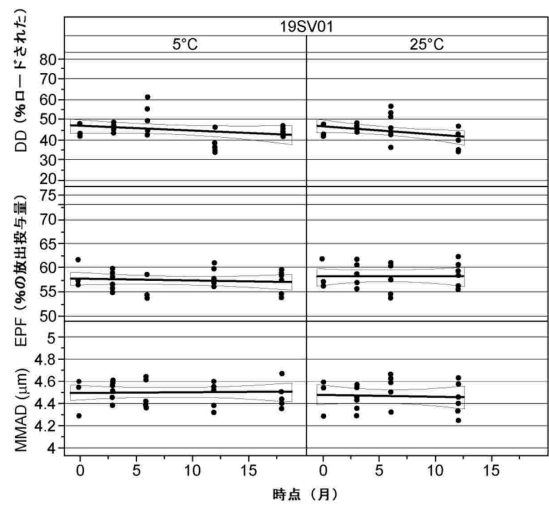
20

30

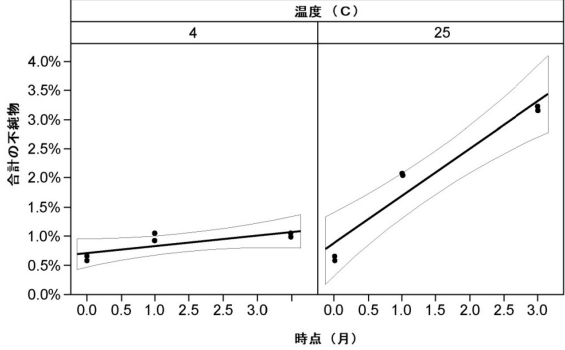
40

50

【図 4 B】



【図 5】



10

【配列表】

0007631358000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 K	9/72	(2006.01)	A 6 1 K	9/72
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K	47/42
A 6 1 K	47/10	(2017.01)	A 6 1 K	47/10
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/12
C 0 7 K	14/535	(2006.01)	C 0 7 K	14/535
C 0 7 K	14/765	(2006.01)	C 0 7 K	14/765
C 1 2 N	15/14	(2006.01)	C 1 2 N	15/14
C 1 2 N	15/27	(2006.01)	C 1 2 N	15/27

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

早期審査対象出願

(56)参考文献

国際公開第2020/002650 (WO, A1)
 欧州特許出願公開第01941901 (EP, A1)
 国際公開第2007/009208 (WO, A1)
 中国特許出願公開第1739793 (CN, A)
 国際公開第2012/021088 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 38/17
A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 31/00
A 6 1 K 9/00
A 6 1 K 47/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)