

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6522711号
(P6522711)

(45) 発行日 令和1年5月29日 (2019.5.29)

(24) 登録日 令和1年5月10日 (2019.5.10)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 38/24 (2006.01) A 6 1 K 38/24
A 6 1 K 9/08 (2006.01) A 6 1 K 9/08
A 6 1 K 47/02 (2006.01) A 6 1 K 47/02
A 6 1 K 47/26 (2006.01) A 6 1 K 47/26
A 6 1 K 47/18 (2006.01) A 6 1 K 47/18

請求項の数 4 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-212395 (P2017-212395)
 (22) 出願日 平成29年11月2日 (2017.11.2)
 (62) 分割の表示 特願2015-245748 (P2015-245748)
 の分割
 原出願日 平成23年7月28日 (2011.7.28)
 (65) 公開番号 特開2018-48188 (P2018-48188A)
 (43) 公開日 平成30年3月29日 (2018.3.29)
 審査請求日 平成29年12月1日 (2017.12.1)
 (31) 優先権主張番号 10171428.5
 (32) 優先日 平成22年7月30日 (2010.7.30)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 500297535
 フェリング ベスローテン フェンノート
 シャップ
 オランダ エヌエルー 2 1 3 2 ジェイエ
 ックス ホーフドルプ ポラリス アベニ
 ユー 1 4 4
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100119183
 弁理士 松任谷 優子
 (74) 代理人 100149076
 弁理士 梅田 慎介
 (72) 発明者 シェーグレン, ヘレン ウルリカ
 スウェーデン王国 エス-2 2 6 4 7 ル
 ンド, カラレクロケン 4 0
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F S H の安定化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

F S H 液体製剤の安定化のための薬剤的に許容されるアルカリ金属カチオンを含む塩の使用であって、塩が、薬剤的に許容される Na^+ 塩および K^+ 塩、またはそれらの組合せからなる群から選択され、

F S H 液体製剤が、
 5 0 I U / m l ~ 8 0 0 I U / m l の r F S H、
 0 . 0 0 1 m g / m l ~ 0 . 0 5 m g / m l のポリソルベート 2 0、
 0 . 1 m g / m l ~ 1 0 m g / m l の L - メチオニン、
 0 . 5 m g / m l ~ 5 0 m g / m l のフェノール、
 1 m g / m l ~ 1 0 0 m g / m l の硫酸二ナトリウム、および
 0 . 1 m M ~ 1 0 m M のリン酸ナトリウム緩衝液を含み、p H 6 ~ 8 である、
使用。

【請求項 2】

F S H 液体製剤が、
 1 0 0 I U / m l ~ 6 0 0 I U / m l の r F S H、
 0 . 0 0 5 m g / m l のポリソルベート 2 0、
 1 . 0 m g / m l の L - メチオニン、
 5 . 0 m g / m l のフェノール、
 1 4 m g / m l の硫酸二ナトリウム、および

1 mMのリン酸ナトリウム緩衝液を含み、pH 6.5である、
請求項1に記載の使用。

【請求項3】

FSH液体製剤であって、
50 IU/ml～800 IU/mlのrFSH、
0.001 mg/ml～0.05 mg/mlのポリソルベート20、
0.1 mg/ml～10 mg/mlのL-メチオニン、
0.5 mg/ml～50 mg/mlのフェノール、
1 mg/ml～100 mg/mlの硫酸二ナトリウム、および
0.1 mM～10 mMのリン酸ナトリウム緩衝液を含み、pH 6～8である、
製剤。

10

【請求項4】

FSH液体製剤であって、
100 IU/ml～600 IU/mlのrFSH、
0.005 mg/mlのポリソルベート20、
1.0 mg/mlのL-メチオニン、
5.0 mg/mlのフェノール、
14 mg/mlの硫酸二ナトリウム、および
1 mMのリン酸ナトリウム緩衝液を含み、pH 6.5である、
製剤。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般に、FSH製剤、特にFSH液体製剤の安定化の分野に関する。安定化は、塩の添加によって実現され、好ましい実施形態においては、薬剤的に許容される塩のアルカリ金属カチオンとの塩、すなわちNa塩もしくはK塩またはそれらの組合せの添加によって実現される。

【背景技術】

【0002】

ゴナドトロピンは、女性および男性における受胎周期に本質的に主に関与するホルモンの1つのファミリーである。ゴナドトロピンは、研究と治療の両方の目的で尿から得ることができるが、いくつかのゴナドトロピンは、組換え技術によって作製することができる。

30

【0003】

特に、ゴナドトロピンは、不妊症の治療に使用することができる。

【0004】

この場合に関与する、全て同じ糖タンパク質ファミリーに属する4種類の主要なゴナドトロピンは、卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、黄体形成ホルモン(LH)、および絨毛性ゴナドトロピン(hCG)である。これらのゴナドトロピンは全て、 α サブユニットと β サブユニットからなる。 α サブユニットは、全てに共通であり、すなわち上記の4種類全てのゴナドトロピンで同じである一方、 β サブユニットはそれぞれ異なる。

40

【0005】

前述のように、ゴナドトロピンは、男性および女性において性腺機能を調節するヘテロ二量体糖タンパク質ホルモンの1つの群である。これには、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、および(ヒト)絨毛性ゴナドトロピン(hCG)が含まれる。

【0006】

FSHは、脳下垂体前葉によって自然分泌され、卵胞発育および排卵を助けるように機能する。FSHは、他の糖タンパク質ホルモン、例えばLHおよびhCGにも共通である

50

、92個のアミノ酸からなる α サブユニットと、FSHに独特であり、このホルモンの生物学的特異性を付与する、111個のアミノ酸からなる β サブユニットを含む(PierceおよびParsons、1981年、Glycoprotein hormones: structure and function、Ann Rev Biochem.、50巻:465~495頁)。各サブユニットは、複合糖質残基の添加によって翻訳後修飾される。両サブユニットは、N-結合グリカン結合のための部位を2つ有する。 α サブユニットはアミノ酸52および78に、 β サブユニットはアミノ酸残基7および24に有する(RathnamおよびSaxena、(1975年)、Primary amino acid sequence of follicle stimulating hormone from human pituitary glands. I. a 10
alpha subunit、J Biol Chem. 250巻(17号):6735~6746頁;SaxenaおよびRathnam、(1976年)、Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands、J Biol Chem. 251巻(4号):993~1005頁))。FSHは、このようにして約30質量%までグリコシル化される(DiasおよびVan Roey、(2001年)、Structural biology of human follitropin and its receptor、Arch Med Res.、32巻(6号):510~519頁;Foxら、(2001年)、T 20
hree-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone、Mol Endocrinol.、15巻(3号)、379~89頁)。

【0007】

自然生殖における排卵を促進するおよび生殖補助医療(assisted reproduction technologies)用の卵母細胞を提供するという両方の目的で、ヒト閉経後尿から精製されたFSHが不妊症治療において長年使用されてきた。組換え型FSHであるGonal-f(Merck Serono)とPuregon(Schering-Plough)の2種類が、1990年代中頃に利用可能になった。これらは両方とも、チャイニーズハムスター卵巢(CHO)細胞において発現される(How 30
les、C. M.、(1996年)、genetic engineering of human FSH(Gonal-f)、Hum Reprod. Update、2巻:172~191頁)。CGはLH活性を有するため、不妊症治療で多用されている。

【0008】

ヒトFSHとhCGは両方とも、 α サブユニットと β サブユニットから構成されるヘテロ二量体である。両ホルモンの α サブユニットは同一である。2種類のホルモン間の違いは、 β サブユニットによってもたらされる。FSHの成熟した β サブユニットは、111個のアミノ酸から構成されるが、hCGの成熟した β サブユニットは、145個のアミノ酸から構成され、さらにFSHおよびhCGの β サブユニットの一次アミノ酸配列は、 β 鎖全体にわたって異なっている。FSHとhCGの両方の β 鎖には、6個のジスルフィド架橋が含まれているが、それらのアミノ酸配列が異なるため、高次構造が異なり、荷電、 40
極性、および疎水性領域のフォールディングおよび分布が異なることになる(Foxら、(2001年)、Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone、Mol Endocrinol.、15巻(3号)、379~89頁)。

【0009】

FSHの β サブユニットおよびhCGの β サブユニットは両方とも、グリコシル化されるが、FSHの β サブユニットにはN-グリコシル化(N-7およびN-24)しか含まれていないが、hCGの β サブユニットには、N-グリコシル化とO-グリコシル化の両方が含まれている(N-13、N-30、O-121、O-127、O-132、およびO-138)。hCGの β サブユニット中の余分なグリコシル化によって、FSHのグリ 50

コシル化より親水性になる。 β サブユニットは、受容体相互作用に特異性をもたらす。

【0010】

CHO細胞は、組換え医薬タンパク質の生成によく使用される。構造分析によって、シアル酸は、 $\alpha 2, 3$ -結合で排他的に結合していることが確認された。多くのヒト糖タンパク質には、シアル酸残基について $\alpha 2, 3$ -結合と $\alpha 2, 6$ -結合の両方の混合物が含まれている。したがって、CHO系を使用して発現させた組換えタンパク質は、末端のシアル酸結合のタイプが天然のカウンターパートと異なることになる。

【0011】

不妊症

本発明との関連では、「不妊症」は、子孫を妊娠し、もうける能力の低下またはないことと定義されるものとする。妊娠はできるものの反復流産する女性も、不妊症であると言われる。不妊症はまた、具体的には、避妊することなく通常の性交を1年行った後に妊娠できないことと定義される。

10

【0012】

不妊症は、多くの原因によると考えられる。諸研究によって、不妊症の原因は、半数より少し多くが、女性の状態に起因することが明らかになった。残りは、精子障害および未解明の要因によって引き起こされる。現在、不妊症を治療する可能性がいくつかある。

【0013】

それらは、タイミングを合わせた性交、生殖補助医療 (assisted reproductive technologies) (ART) の使用、子宮内膜症、子宮筋腫および女性性機能不全 (FSI) の医学的管理、ならびに異常を治すための手術である。

20

【0014】

生殖補助医療では、排卵を刺激する薬物が使用される。LHおよびhCGに次いで、FSHは、これに関連して使用される化合物のうちの1つである。

【0015】

投与するには、これらの化合物の液体製剤が好適である。残念なことに、液体製剤に添加された保存剤、特にベンジルアルコール (BA)、フェノールおよびトリクレゾールは、タンパク質に不安定化作用を及ぼすことが過去に明らかになっている (Maa, Y. F. および Chung, C. H.、1996年、Aggregation of recombinant human growth hormone induced by phenolic compounds、Int. J. Pharm.、140巻:155~168頁; Lam, X. M.、Patapoff, T. W. および Nguyen, T. H.、1997年、The effect of benzyl alcohol on recombinant human interferon-gamma、Pharm. Res.、14巻:725~729頁; Hoffmann, J. A. および Lu, J.、2002年、FSH and FSH variant formulations comprising benzyl alcohol as a preservative、欧州特許第0974359号 (B1)、1~50頁)。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0016】

したがって、特に、投与されるFSHの投与量は免疫原性応答のような解離または凝集型の副作用のリスクを低下させるべきであるということを考えると、非天然FSHが存在する場合、安定化された製剤を提供することが重要である。しかし、保存剤によって生ずる不安定化事象は、液体製剤内の活性ゴナドトロピン、すなわちFSHの実際のレベルを低下させる。したがって、本発明の目的は、安定なFSH製剤、特に液体製剤およびその安定化方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、FSH液体製剤を安定化するために、FSH液体製剤の安定化のための薬剤

50

的に許容されるアルカリ金属カチオンを含む塩の使用に関する。安定化させる液体製剤は、保存剤を含むまたは含まない製剤であることができる。

【0018】

以下の実施形態が好ましい：

1. FSH液体製剤の安定化のための薬剂的に許容されるアルカリ金属カチオンを含む塩の使用であって、塩が、薬剂的に許容される Na^+ 塩および K^+ 塩、またはそれらの組合せからなる群から選択される使用。

2. 塩が Na^+ 塩である、項目1に記載の使用。

3. 塩が NaCl または Na_2SO_4 である、項目1または2のいずれかに記載の使用。

4. 塩が Na_2SO_4 である、項目1または2のいずれかに記載の使用。

5. 塩が NaCl と Na_2SO_4 の組合せである、項目1または2のいずれかに記載の使用。

6. 塩が、20～500mMの量、または30～300mMの量、または50～200mMの量で含まれる、項目1から5のいずれか1つに記載の使用。

7. FSH製剤がrFSH製剤である、項目1から6のいずれか1つに記載の使用。

8. 製剤が、保存剤をさらに含む、項目1から7のいずれか1つに記載の使用。

9. 製剤が、ベンジルアルコール、フェノール、および／またはm-クレゾールを含む、項目8に記載の使用。

10. 製剤が注射用製剤である、項目1から9のいずれか1つに記載の使用。

11. FSH液体製剤の安定化方法であって、薬剂的に許容されるアルカリ金属カチオンを含む塩を前記製剤に添加するステップを含み、前記塩は、 Na^+ 塩および K^+ 塩、またはそれらの組合せからなる群から選択される方法。

12. 塩が、上記の項目2から6で定義される、項目11に記載の方法。

13. 安定化させるFSHがrFSHである、項目11および／または12に記載の方法。

14. 製剤が、保存剤をさらに含む、項目11から13のいずれか1つに記載の方法。

15. 保存剤が、ベンジルアルコール、フェノール、およびm-クレゾールからなる群から選択される、項目14に記載の方法。

16. 液体製剤が、凍結乾燥製剤から得られた再構成液体製剤である、項目1から10のいずれか1つに記載の使用。

17. 塩を添加するステップが凍結乾燥ステップの前に実施される、項目11から15のいずれか1つに記載の方法。

18. 再構成ステップが、凍結乾燥ステップの後に実施される、項目17に記載の方法。

19. 塩が凍結乾燥製剤中に含まれ、または塩が再構成液体中に含まれる、項目17および／または18に記載の方法。

したがって、代替的实施形態において、安定化塩を含む製剤は凍結乾燥状態で貯蔵される。凍結乾燥は、当業者に一般的に知られているように実施される。次いで、凍結乾燥製剤を、患者が最終的に使用するまで貯蔵することができる。次いで、凍結乾燥製剤は、投与前に、公知の再構成媒体のいずれか1つ、例えば滅菌水で再構成する。塩は、凍結乾燥製剤中または再構成液体中に含まれる。

20. 液体製剤が、好ましくは注射用の単回使用製剤または複数回投与製剤である、上記の項目のいずれかに記載の使用または方法。

【0019】

好ましい実施形態において、塩は、凍結乾燥されておらず、液体として貯蔵されている液体製剤それ自体に含まれる。

【0020】

特に、好ましい実施形態において、本発明は、FSH液体製剤の安定化方法であって、アルカリ金属カチオンが、 Na^+ と K^+ からなる群から選択される方法に関する。特に好ましくは、塩が NaCl または Na_2SO_4 である。

【0021】

上述されたように、不妊症の治療にはF S H液体製剤が適している。その関連で、F S H液体製剤が不安定であり得ることが明らかになってきた。これは、単回使用向けのものを含めて、F S H液体製剤全てに当てはまる。F S H液体製剤が、例えば全ての複数回投与製剤に必要な保存剤を含む場合、不安定性ははるかに著しいものとなるおそれがある。この保存剤は、F S H製剤を保存するのに有用なあらゆる保存剤であり得る。したがって、保存剤は、例えばベンジルアルコール、フェノール、および／またはm-クレゾールのようなF S H製剤用にF D Aによって認可されたような保存剤、特に例えば非経口F S H製剤用に認可されたF D A認可保存剤であることができる。しかし、保存剤は、決してそれらの例に限定されない。F S Hの安定性は、例えばベンジルアルコール、フェノール、および／またはm-クレゾールによって低下する。

10

【0022】

したがって、本出願において特許請求および記載される、薬剤的に許容されるカチオンを含む塩を、単回使用F S H製剤の安定化のために使用する。

【0023】

さらに、本出願において特許請求および記載される、薬剤的に許容されるカチオンを含む塩を、複数回投与F S H製剤の安定化のために使用する。このような製剤は保存剤を含む必要はないが、保存剤も含んでよい。

【0024】

本出願において特許請求される、薬剤的に許容されるカチオンを含む塩、すなわちNa⁺塩およびK⁺塩の添加によって、F S H液体製剤が安定化する。特に好ましい実施形態において、塩は、薬剤的に許容される塩である。安定化が、単回使用または複数回投与の製剤において、特により長期間におよぶ貯蔵において実現され、別の可能な実施形態においては、ベンジルアルコール、フェノール、および／またはm-クレゾールのような保存剤の不安定化作用に対する対策として有利であり得る。

20

【0025】

好ましい実施形態において、本発明に従って使用することができる塩としては、NaClまたはNa₂SO₄が挙げられる。

【0026】

塩は、好ましくは20～500mMの量で含まれ、さらにより好ましくは30～300mMの量で含まれ、特定の好ましい実施形態においては、50～200mMの量で含まれる。

30

【0027】

塩の最大添加量は、溶液オスモル濃度に制限される。注射時の疼痛を最小限に抑えるには、溶液は、好ましくは等張であるべきであり、または少なくとも高張であるべきでない。溶液中の添加剤は全て、オスモル濃度に寄与するので、溶液に添加することができる塩の最大量は、存在する他成分の量に左右される。

【0028】

塩は、好ましくは最高オスモル濃度350mosmol/kgをもたらす量、さらにより好ましくは最高オスモル濃度320mosmol/kgをもたらす量で含まれ、特定の好ましい実施形態においては、最高オスモル濃度300mosmol/kgをもたらす量で含まれる。

40

【0029】

オスモル濃度理論

オスモル濃度は、溶液中に存在する種々の溶質の、溶液の浸透圧への寄与を測る全体的な基準を示す実用的手段である。オスモル濃度は、ヨーロッパ薬局方2.2.35、第7版、補遺2011(7.2)、Osmolality, 01/2008:20235に従って測定することができる。

【0030】

本発明との関連において、「塩」は、酸から、金属または電気陽性基による水素の全置換または部分置換によって得られる化学物質である。

50

【0031】

「薬剤的に許容される塩のカチオンを有する（または含む）塩」の定義は、FDA不活性成分リストに従って筋肉内または皮下送達用に認可されたカチオンによって形成される全ての塩を指す。この群のアルカリ金属カチオンは、ナトリウム（ Na^+ ）およびカリウム（ K^+ ）である。

【0032】

本発明者らは、驚くべきことに、まさに2つの特定のカチオンがFSH製剤の安定化に特に適していることを見出した。

【0033】

したがって、塩は、以下の薬剤的に許容されるカチオン：カリウム（一塩基性、二塩基性または三塩基性）、またはナトリウム（一塩基性または二塩基性または三塩基性）によって形成することができる。好ましくは、塩はナトリウム塩である。

【0034】

特に好ましいのは、 NaCl および Na_2SO_4 である。

【0035】

本発明に従って安定化することができるゴナドトロピンは、FSH、すなわち卵胞刺激ホルモンであり、別の活性成分と場合によって組み合わせたものである。

【0036】

FSHは、尿由来もしくは血漿由来FSH、または組換えFSH（rFSH）である。好ましい実施形態において、FSHは、尿由来FSHまたはrFSHであり、特に好ましいのは、rFSHである。

【0037】

前述のように、FSHを組換え技術によって作製することは、現在可能である。したがって、本明細書中でFSHに言及する場合、一般的に尿由来ゴナドトロピンと組換え（r）ゴナドトロピンとを常に包含する。したがって、FSHという言葉はrFSHも包含する。

【0038】

本発明の好ましい実施形態において、製剤は、rFSH液体製剤、最も好ましくは注射用製剤であり、 Na_2SO_4 または NaCl で安定化される。

【0039】

本発明の好ましい実施形態において、製剤は、rFSH液体製剤、最も好ましくは注射用製剤であり、 Na_2SO_4 または NaCl で安定化される。

【0040】

代替的实施形態において、全ての実施形態のrFSHは、長時間作用型のFSHである。長時間作用型のFSH製剤は、当業者に一般的に知られているように、例えば、FSH分子を修飾するまたは製剤を修飾することによって得ることができる。

【0041】

したがって、本明細書中で、FSHは、可能な全ての尿由来型または組換え型の上記FSH、およびFSHの型の可能な全ての組合せを包含する。単回使用製剤および（同じまたは異なるゴナドトロピンの）複数回投与使用の1種または複数の別の製剤も包含される。

【0042】

1つの可能な製品は、異なるバイアル中に（場合によってはCG、LH、LH活性などを有する）FSHを全て含む製剤とすることができる。LH活性が存在する場合それは、LHまたはCGに由来することがある。LHは、等価用量のCGで置換することができ、逆の場合も同様である。それに関連して、「等価用量」は、Pharmacopeia Van Helle Bioassayにおける1IUのCGが5~7IUのLHに等しいということに基づいて算出することができる（Van Helle, Hra, Acta Endocrin., 47巻、409~418、1964年）。

【0043】

10

20

30

40

50

好ましい組合せは、全てが異なるバイアル中に含まれる (r) FSH、(r) LHおよび (r) hCGの組合せである。

【0044】

異なるバイアル中の可能な組合せにはまた、尿由来 (u) FSHおよび u hCGまたは u FSHおよび u LH；さらに (r hCGまたは r LHまたは r FSH) および (u hCGまたは u LHまたは r hCGまたは r LH)、ならびに可能な全てのそれらの順列が含まれる。

【0045】

別の好ましい組合せは、それぞれ異なるバイアル中の (r) FSHおよび (r) hCGの組合せである。

10

【0046】

別の好ましい組合せは、それぞれ異なるバイアル中の (r) FSHおよび (r) LHの組合せである。

【0047】

本発明の FSH製剤は液体製剤である。

【0048】

好ましくは、製剤は注射用製剤である。製剤は、別々にまたは一緒に投与するための FSHまたは FSH/hCGを含む1種または2種以上の医薬組成物を有する製品として供給することができる。別々に投与する場合、連続投与とすることができる。製品は、適切な任意のパッケージで供給することができる。例えば、製品には、いくつかの充填済みシリンジを入れることができる。それぞれのシリンジには、FSH (FSH組成物)、またはさらに hCG (hCG組成物)が入っており、例えば、注射器をブリストア包装または他の手段で包装して、滅菌状態を維持することができる。製品には、FSH製剤を使用するための指示書の場合によっては入れることができる。別の態様によれば、本発明の FSH製剤は、複数回投与調製物として提供される。しかし、本発明が単回使用向けの製剤も対象とすることは明白である。本発明は、キットの一部としての製剤の安定化にも関する。このようなキットは、1つもしくは複数の一日量の FSHを含む少なくとも1つの容器、またはそれぞれに異なるゴナドトロピンが含まれている例えば2つの容器 (例えば、バイアル)、ならびに例えば別の指示書 (例えば、投与用指示書)、および例えば注射するための別の手段を備える。好ましい実施形態において、FSH溶液が各カートリッジに充填される頻回注射用のペン型注射器を使用する。

20

30

【0049】

好ましい実施形態において、FSHは、35~850 IU/ml、好ましくは50~800 IU/ml、さらにより好ましくは100~600 IU/mlで含まれる。

【0050】

例えば、600 IU/mlの r FSHについて特に好ましい製剤は、以下の組成を有する：

600 IU/ml r FSH

0.001~0.05、好ましくは0.005 mg/ml ポリソルベート20

0.1~10、好ましくは1.0 mg/ml L-メチオニン

0.5~50、好ましくは5.0 mg/ml フェノール

1~100、好ましくは14 mg/ml 硫酸ナトリウム (すなわち、0.1 M)

0.1~10、好ましくは1 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6~8、好ましくは pH 6.5)。

40

【0051】

溶液オスモル濃度は、好ましくは300 mosmol/kgである。

(pHは、溶液全体のpHを指す)

【0052】

注射可能なデポー剤形は、生分解性ポリマー中 FSH (および存在する場合には他の作用剤) のマイクロカプセルマトリックスを形成することによって作製することができる。

50

ポリマーベースのデポー剤形／徐放性システムは、それらの化学的性質に依存して、例えばマイクロ粒子もしくはナノ粒子、ヒドロゲル、ミセル、エマルジョンまたはインプラントであることができる。F S Hとポリマーの比および使用する特定のポリマーの性質に応じて、F S H放出速度を制御することができる。生分解性ポリマーの例としては、ポリラクチド／ポリグリコリドコポリマー系、ポリビニルピロリドン、ポリ（オルトエステル）、ポリ（無水物）、ポリ（エチレングリコール）、ポリアミノ酸、多糖、例えばヒアルロン酸ナトリウム（N a H A）またはこの他の塩、ゼラチン、キトサンなどが挙げられる。記載のポリマーは全て、誘導体化または修飾して、タンパク薬物送達またはその安定性を最適化することができる。デポー注射用製剤は、F S Hを、脂質系に、または体組織と相溶性があるミセル、リポソーム、もしくはマイクロエマルジョンとしてのポリマー脂質混合物に閉じ込めることによって調製される。

10

【0053】

注射用製剤は、例えば細菌保持フィルターに通す濾過によって、あるいは使用する直前に滅菌水または他の注射用滅菌媒体に溶解または分散することができる滅菌固体組成物の形で滅菌剤を組み込むことによって、滅菌することができる。注射用製剤は、上述されたように適切な任意の容器、例えばバイアル、充填済みシリンジ、注射用カートリッジなどで供給することができる。

【0054】

医薬組成物の種々の成分のp Hおよび正確な濃度は、この分野の慣行に従って調整する。GOODMAN and GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7th editionを参照のこと。好ましい実施形態において、本発明の組成物は、非経口投与用の組成物として供給される。非経口製剤を調製する一般方法は、当技術分野において公知であり、REMNIGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY、前掲、780～820頁に記載されている。非経口組成物は、液体製剤で、または投与直前に注射用滅菌媒体と混合される固体として供給することができる。特に好ましい実施形態において、非経口組成物は、投与を容易にし、投与量を均一にするために投与単位形態で供給される。

20

【0055】

本発明のF S Hは、通常的手段で尿から得ることができ、または組換え技術によって作製することができる。可能な作製方法については、例えばWO 2009/127826をさらに参照されたい。

30

【0056】

h C Gは、当技術分野において公知である任意的手段で得ることができる。本明細書では、h C Gは、ヒト由来h C Gおよび組換えh C Gを包含する。ヒト由来h C Gは、適切な供給源（例えば、尿および胎盤）から、当技術分野において公知である任意の方法で精製することができる。組換えh C Gを発現および精製する方法は、当技術分野において周知である。

【0057】

L Hは、当技術分野において公知である任意的手段で得ることができる。本明細書では、L Hは、ヒト由来L Hおよび組換えL Hを包含する。ヒト由来L Hは、適切な供給源（例えば、尿）から、当技術分野において公知である任意の方法で精製することができる。組換えL Hを発現および精製する方法は、当技術分野において公知である。

40

【0058】

医薬組成物は、不妊症の治療、例えば生殖補助医療（assisted reproductive technologies）（ART）、排卵誘発（OI）、または子宮内人工授精（IUI）における使用を目的とすることができる。医薬組成物は、例えば、公知のF S H調製物が使用される医学的適応において使用することができる。本発明は、本明細書に記載される（本発明の態様による）安定化されたF S H調製物の不妊症治療のための使用または不妊症治療用医薬品の製造における使用も提供する。医薬組成物は、任

50

意の薬物投与経路、例えば経口、直腸、非経口、経皮（例えば、パッチ技術）、静脈内、筋肉内、皮下、嚢内、腔内、腹腔内、局所（散剤、軟膏剤、またはドロップ剤）投与経路用の、またはバツカルもしくは鼻スプレー剤としての周知の組成物に製剤化することができる。典型的な組成物は、とりわけRemington's Pharmaceutical Sciences fifteenth edition (Matt Publishing Company、1975年)、1405～1412頁および1461～87頁、および米国国民医薬品集XIV fourteenth edition（米国薬剤師会、1975年）に記載されているような、水溶液などの薬剤的に許容される担体、塩および保存剤を含めて非毒性添加剤、緩衝剤などを含む。

【0059】

10

好適な水性および非水性の医薬担体、希釈剤、溶媒またはビヒクルの例としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、カルボキシメチルセルロース、およびそれらの好適な混合物、植物油（オリーブ油など）、ならびにオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。

【0060】

組成物は、保存剤、湿潤化剤、乳化剤、緩衝剤、および分散剤などの添加物も含有することができるが、これらに限定されるものではない。微生物の増殖を防止するために、抗菌剤および抗真菌剤を含めることができ、その例としては、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などが挙げられる。さらに、等張化剤を含むことが望ましいことがある。

20

【0061】

場合によっては、持続性作用をもたらすために、皮下または筋肉内注射からのF S H（および他の活性成分が存在する場合それら）の吸収を遅くすることが望ましい。これは、水溶性が不十分な結晶質または非晶質の材料の液体懸濁剤を使用することによって実現することができる。その場合、例えばF S Hの吸収速度はその溶解速度に依存し、溶解速度は結晶サイズおよび結晶形に依存することがある。あるいは、非経口投与されたF S H組合せの形の遅延吸収は、F S H組合せを油ビヒクルに溶解または懸濁させることによって実施される。

【0062】

本発明によれば、本発明者らによって、ゴナドトロピン液体製剤の安定性に対する、ある種の化合物の効果を検討する取組みがなされた。ここで、ある種の化合物の安定化および不安定化作用が検討された。

30

【0063】

「安定性」という用語は、アミノ酸配列における共有結合的修飾が関与する化学的安定性を指すことがあるが、タンパク質安定性に関連して、タンパク質のフォールディング状態（すなわち、天然状態）の変化が関与するが、共有結合の開裂を伴わない物理的安定性を指すこともある。

【0064】

本発明において、「安定性」という用語は、本発明のゴナドトロピン、特にF S Hの製剤の物理的安定性を指す。タンパク質製剤の物理的不安定性は、高次の凝集塊を形成するタンパク質分子の凝集、ヘテロ二量体から単量体への解離、または本発明において含まれているF S Hタンパク質の少なくとも1つの生物活性を低減させる他の何らかのコンフォメーション変化によって引き起こされることがある。

40

【0065】

「安定な」溶液または製剤とは、その中に存在するタンパク質の凝集、解離、コンフォメーション改変、生物活性の喪失などの程度が、許容できる程度に制御され、経時的に許容できない程度に増加しないものである。安定性は、試料の光散乱、透明度および／もしくは呈色の目視検査、吸光度もしくは光学密度、分子サイズ決定（例えば、サイズ排除クロマトグラフィーまたはフィールドフローフラクショネーション）、インビトロもしくはインビボ生物活性の測定を含めて、当技術分野において周知である方法によって、かつ／

50

または示差走査熱量測定（DSC）によって評価することができる。安定性を評価する他の方法は、当技術分野において周知であり、本発明に従って使用することもできる。

【0066】

いくつかの保存剤は、ゴナドトロピン製剤に対する不安定化作用が顕著であることが知られており、驚くべきことに、塩、特にNaClまたは Na_2SO_4 など、FSH液体製剤の安定化に適していることが今回明らかになった、薬剂的に許容されるアルカリ金属カチオン、特に Na^+ または K^+ を含む塩がさらに、医学的使用のための複数回投与FSH液体製剤中に含める必要があるベンジルアルコール、フェノール、およびm-クレゾールのような保存剤の不安定化作用を防止するのに有用であることがわかった。本出願において特許請求される塩は、FSH液体製剤に対する安定化作用を示し、その安定化作用は、有利にかつ驚くほど、例えばスクロースのような公知の安定化剤の安定化作用よりはるかに顕著である。スクロースのような公知の安定化剤に比べて改善された安定化作用は、特に驚くべきものである。さらに、全く予想外なことに、本発明の塩の安定化作用はFSH製剤に対して示すことができたが、非常に類似したhCGに対しては安定化作用を示すことができなかった。さらに驚くべきことに、観測された安定性作用は、いわゆるホフマイスター系列（下記も参照のこと）に従うものではなく、実際には反するものであった。

10

【0067】

FSHの分解がFSH医薬製剤中で起こることは先行技術から公知であり、これは、本実施例の第1のセットで確認された。

【0068】

FSHは、時間に応じてかつ温度に応じて分解する。特に、室温を超える温度では、2次、3次、および4次構造が変化する。

20

【0069】

加熱したときに起こる3次および2次FSH構造のコンフォメーションのアンフォールディングは、（タンパク質凝集が限定されているとき）2状態の遷移であると思われる。このアンフォールディングは、サブユニット解離（4次構造の変化）に依存しないことがある。

【0070】

さらに、ベンジルアルコールまたはフェノールのような保存剤が、例えばFSH液体製剤中に抗菌剤として必要な場合に、このような保存剤を含有するFSHは、複数回投与FSH製剤の安定性に明らかな悪影響を及ぼすことが、本発明で明らかになる。この場合、FSHの長期安定性は低下し、FSHの変性温度は低下し、すでに変性した形態は、2次構造のレベルが保存剤を含有しないFSH製剤より低下する。

30

【0071】

FSH液体製剤の安定化のための薬剂的に許容されるアルカリ金属カチオン、すなわちNaおよびKを含む塩が、FSH液体製剤の安定性に著しい効果があることも、本発明が初めて示す。これらの塩を含むFSH液体製剤中のFSHの2次構造が、 76.5°C に加熱したとき著しく変化しないことを示すことができた。変性した形態は、例えば Na_2SO_4 の存在下で比較的明確な構造をもち、これによって変性がより可逆的になり、したがって、タンパク質の速度論的安定性が大幅に向上する。これは、本発明において示されたリアルタイム安定性データによって裏付けられる。このデータから、FSHのヘテロ二量体構造に対する安定化作用が顕著であることが明らかである。

40

【0072】

ここでの結果から、本出願において特許請求される塩、例えば硫酸ナトリウムおよび塩化ナトリウムは、FSH分子の解離傾向を制限し、したがって貯蔵安定性を大幅に向上させることが明らかに示される。

【0073】

本発明はまた、FSH液体製剤の安定化方法であって、上記の塩を前記製剤に添加するステップを含む方法に関する。

【0074】

50

全ての研究は、さらに実施されたリアルタイムデータによって確認された。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】 r F S Hについて、種々の温度におけるC D（円偏光二色性、下記を参照のこと）信号（m d e g r e e）を波長（n m）の関数として示す図である。24.0℃→45.9℃のスペクトル間に有意差は認められなかったが、50℃を超えると、C D信号の温度依存性低下が認められた。r F S Hタンパク質（0.93mg/ml）を、0.0036mg/ml ポリソルベート20を含有する3.57mMリン酸緩衝液（pH 6.3）に溶解した。24.0℃（太い実線トレース）、50.3℃（破線トレース）、54.7℃（点線トレース）、59.0℃（一点鎖線トレース）、63.4℃（星印）、67.8℃（菱形印）、および76.5℃（実線トレース）における走査。

10

【図2】 Na₂SO₄を含有するr F S Hについて、種々の温度におけるC D信号（m d e g r e e）を波長（n m）の関数として示す図である。24.0℃→45.9℃のスペクトル間に有意差は認められなかった。r F S Hタンパク質を、0.0036mg/ml ポリソルベート20および8.6mg/ml 硫酸ナトリウム（Na₂SO₄）を含有する3.57mMリン酸緩衝液（pH 6.3）に溶解した。24.0℃（太い実線トレース）、50.3℃（破線トレース）、54.7℃（点線トレース）、59.0℃（一点鎖線トレース）、および76.5℃（実線トレース）における走査。

【図3】 ベンジルアルコールを含有するr F S Hについて、種々の温度におけるC D信号（m d e g r e e）を波長（n m）の関数として示す図である。24.0℃→45.9℃のスペクトル間に有意差は認められなかった。r F S Hタンパク質（0.93mg/ml）を、0.0036mg/ml ポリソルベート20および0.17mg/ml ベンジルアルコールを含有する3.57mMリン酸緩衝液（pH 6.3）に溶解した。24.0℃（太い実線トレース）、45.9℃（丸印）、50.3℃（破線トレース）、54.7℃（点線トレース）、59.0℃（一点鎖線トレース）、63.4℃（星印）、67.8℃（菱形印）、および76.5℃（実線トレース）における走査。

20

【図4】 h C Gおよびr F S Hのその後のD S C走査を示す図である。0.005mg/ml ポリソルベート20、0.5mg/ml L-メチオニン、1mM リン酸緩衝液（pH 6.5）中の5mg/ml h C G、および0.005mg/ml ポリソルベート20、0.5mg/ml L-メチオニン、0.24M NaCl、1mM リン酸緩衝液（pH 6.5）中の2.4mg/ml r F S Hに関するD S Cデータ。走査速度2.0℃/分。1回目のr F S H走査（実線トレース）、2回目のr F S H走査（一点鎖線トレース）、1回目のh C G走査（破線トレース）、および2回目のh C G走査（点線トレース）。1回目の走査の後、2回目の走査を行う前に、試料を20℃に冷却した。

30

【図5】 種々の糖または塩を含むh C GのD S C走査を示す図である。0.005mg/ml ポリソルベート20、0.5mg/ml L-メチオニン、および1mM リン酸緩衝液（pH 6.5）中の5mg/ml h C GのD S Cデータ。糖も塩も添加せず（太い実線トレース）、0.1M Na₂SO₄（実線トレース）、0.1M NaCl（点線トレース）、0.1M NaClO₄（破線トレース）、および0.1M スクロース（一点鎖線トレース）。走査速度2.0℃/分。

40

【図6】 種々の糖および塩を含むr F S HのD S C走査を示す図である。0.005mg/ml ポリソルベート20、0.5mg/ml L-メチオニン、および1mM リン酸緩衝液（pH 6.5）中の2.4mg/ml r F S HのD S Cデータ。糖も塩も添加せず（太い実線トレース）、0.1M Na₂SO₄（実線トレース）、0.1M NaCl（点線トレース）、0.1M NaClO₄（破線トレース）、および0.1M スクロース（一点鎖線トレース）。走査速度1.0℃/分。

【発明を実施するための形態】

【0076】

以下の実施例によって、本発明をさらに説明するが、実施例は、決してその範囲を限定するものと解釈してはならない。

50

【実施例】

【0077】

(実施例1) シンクロトロン放射光円偏光二色性分光法 (SRCD)

方法

デンマークのオルフス大学 (University of Aarhus, Denmark) にて、シンクロトロン設備を使用して、円偏光二色性分光法を行った。全てのCDスペクトルは、光路長0.1mmのスプラシル石英セル (Hellma GmbH, Germany) を使用して、波長範囲180~270nmにわたって、ステップ1nmおよび滞留時間3秒/波長で記録した。rFSH試験と参照 (プラセボ) 試験の両方の各実験について、3つの同一CD走査を記録した。この報告で提示されたrFSHのCDスペクトルは、対応するプラセボの平均走査を平均タンパク質走査から引き算することによって得られた。CD走査の各セットについて、約120μlの溶液 (約112μgのrFSHに相当する) を使用した。

10

【0078】

rFSHのCDスペクトルに対する温度の影響を検討中に、加熱室の温度を、5℃間隔および平衡時間5分間で25℃から85℃に変更した。較正ファイルから、実際の実験温度 (スプラシル石英セル中の温度) を決定した。

【0079】

CDは、構造的非対称のため生ずる左回転および右回転の円偏光の吸収の差を測定する。

20

【0080】

タンパク質の2次構造を、CD分光法で遠UV領域 (約180~250nm) において検討することができる。一般に、規則正しい構造ほど、高い強度のCD信号 (正または負) に従う。しかし、異なる2次構造は異なるCDスペクトルを有するものであり、またα-ヘリックスはβ-構造より高いCD信号強度を有するので、異なるタンパク質間で直接比較をして、規則構造の程度について結論を出すことはできない。

【0081】

構造変化に対する感受性が高いため、CD分光法は、タンパク質の物理的安定性を検討する際に強力なツールである。このような研究は、通常、外的要因、例えば温度、pH、変性剤、界面活性剤または安定化剤の濃度の変化に応じて、CDスペクトルを検出することによって行われる。本研究において、rFSHのCDスペクトルは、温度に応じて検討される。さらに、rFSHの2次構造に対するベンジルアルコールおよび硫酸ナトリウム (Na₂SO₄) の効果を研究した。

30

【0082】

この実施例ならびに実施例2および3で使用されるゴナドトロピンは、組換え卵胞刺激ホルモン (rFSH) であるが、組換えDNA技術を使用して、ヒトPER.C6 (登録商標) 細胞株から発現させたヒトホルモンである。rFSHは、FSH、黄体形成ホルモン (LH)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG)、および甲状腺刺激ホルモン (TSH) に共通している、92個のアミノ酸からなるαサブユニットと、FSHに特異的な111個のアミノ酸からなるβサブユニットの2種類のグリコシル化単量体からなるヘテロ二量体タンパク質である。FSHを含む糖タンパク質ホルモンは全て、非共有結合で結合している単量体が解離したとき、ホルモンの生物活性を失う。以前の結果から、rFSHの不安定性は、主に二量体解離 (4次構造の分解と、これに付随して免疫結合反応の低下) に基づくことが示された。

40

【0083】

使用目的に応じて、現在販売されているrFSH製剤は、37.5IU/ml (Gonal-fの場合、約2.8μg/mlに相当する) から少なくとも833IU/ml (Puregonの場合、約83.3μg/mlに相当する) までの様々な濃度で提供されている。

【0084】

50

研究で使用される r F S Hは、皮下注射用の液体医薬品製剤（600IU r F S H／m l）向けのものである。この製品は、複数回投与注射を目的としているので、保存剤の添加が必要である。

【0085】

検討される製剤は、様々な材料の原液を混合することによって作製した。タンパク質と添加剤の両方の検討される濃度間隔は、使用方法によって制限される。すなわち、タンパク質濃度は、添加剤濃度に比べて比較的高く維持する必要があった。芳香族化合物が、検討される波長領域においてUV吸収するため、ベンジルアルコール濃度は低く維持する必要があった。下記の表は、本発明者らによる第1の実験計画において検討された異なる3種類の製剤の概要を記す。

10

【0086】

【表1】

表1

この表は、rFSHに対する温度の影響に関するSRCD研究に使用された3種類の製剤の内容を示す。

試料	内容
1	rFSH 0.93mg/ml、ポリソルベート20 3.6 μ g/ml、3.57mM リン酸緩衝液pH6.3
2	rFSH 0.93mg/ml、ポリソルベート20 3.6 μ g/ml、Na ₂ SO ₄ 、8.6mg/ml、3.57mM リン酸緩衝液pH6.3
3	rFSH 0.93mg/ml、ポリソルベート20 3.6 μ g/ml、ベンジルアルコール0.17mg/ml、3.57mM リン酸緩衝液pH6.3

20

【0087】

試料1

r F S Hの試料1（表1を参照のこと）について、24℃から77℃の間で異なる13の温度において、CDスペクトルを記録した。明確にするため、これらのスペクトルのうち7つだけを図1に示す。試料1は、表1から推論できるように、塩も保存剤も含んでいなかった。スペクトルを図1に示す。結果は、CD信号の強度が温度に応じて低下することを明らかに示し、これは、高温（>50℃）においては2次構造が分解することを示している。24.0℃→45.9℃のスペクトル間では有意差は検出されなかった。これは、約46℃に加熱したとき、測定時間（約20分間）中では、タンパク質の2次構造が変化していないことを示している。加熱したときのF S HのS R C Dスペクトルは、約193nmに等二色点（i s o d i c h r o i c p o i n t）を示す。等二色点は、試料2のスペクトルについても見られる。図2を参照のこと。

30

【0088】

試料2

r F S HのNa₂SO₄を含有する試料2（表1）について、CDスペクトルを記録した。スペクトルは、24℃から77℃の間で異なる13の温度において得られ、図2に示される。明確にするため、これらのスペクトルのうち5つだけを図2に示す。結果は、温度に応じた2次構造の分解を示している。データから、（実験時間中）約46℃に加熱したとき、試料2中のr F S Hの2次構造は変化していないことが明らかである。重要なことに、データから、変性した形態がNa₂SO₄の存在下で比較的確な構造をもつことも明らかである。

40

【0089】

試料3

r F S Hのベンジルアルコール（BA）を含有する試料3（表1）について、CDスペクトルを記録した。ベンジルアルコールは、F S H液体製剤用に非常によく選択される抗菌性保存剤である。例えば、m-クレゾールに比べて保存能力が比較的低いため、BAを高濃度（約10～15mg／m l）で使用しなければならない。r F S Hの使用目的が1カ月以下期間にわたる複数回の注射であり、かつr F S Hが通常は室温で貯蔵されるので

50

、保存剤が必要である。

【0090】

0.17 mg/ml BAの存在下 rFSHのスペクトルは、24℃から77℃の間で異なる13の温度で得られ、図3に示される。明確にするため、これらのスペクトルのうちの8つだけを図3に示す。ベンジルアルコールの非常に高いUV吸光度（および付随する低いCD信号）のため、検討されるBA濃度を上げることはできず、したがってrFSH製剤を保存するのに使用することになる濃度に近づけることができなかった。それにもかかわらず、BAの明らかな不安定化作用が認められた。CDの結果は、試料3中のrFSHの2次構造が、試料1および2中のrFSHの初期変性温度より若干低い42℃に加熱したとき変化していないことを示している。

10

【0091】

さらに、および重要なことに、データから、変性した形態には、規則構造が、保存剤の非存在下におけるFSHを著しく上回るほどないことが明らかである。

【0092】

温度誘導構造変化に対する添加剤の効果

本出願において特許請求される塩の代表例としてここで使用されたNa₂SO₄塩は、温度で変性したタンパク質の構造に対して著しい効果を示した。これは、明らかに重要な発見である。変性した（アンフォールディングしたまたは部分的にアンフォールディングした）タンパク質は、天然タンパク質より、会合して、凝集塊を形成する傾向が高い（Finck, A. L., 1998年、Fold Des., 3巻（1号）：R9～R23頁）、結果は、硫酸ナトリウムが、rFSH分子の変性する傾向を制限し、したがって凝集のリスクを制限することができ、それによって貯蔵安定性を大幅に増加させることを示している。一方、ベンジルアルコール（BA）は、高温において著しい構造分解を引き起こす。規則正しい2次構造は、SRC Dで検出されなかった。BAの観測された効果（さらにアンフォールディングした構造）は、他のタンパク質系でベンジルアルコールを添加したときに見られる凝集の増大の理由を部分的に説明できる（Maa, Y. およびHsu, C. C., 1996年、Int. J. Pharm., 140巻：155～168頁；Zhang, Y. ら、2004年、J. Pharm. Sci., 93巻（12号）：3076～3089頁）。

20

【0093】

しかし、保存剤の添加は、複数回投与製剤の開発に極めて重要であり、rFSH製品が市場に存在していることから、比較的高い含有量のベンジルアルコールを含む場合であっても、より安定な製剤が開発される必要があることがわかっている（Puregon（登録商標）は、10 mg/ml ベンジルアルコールを含有する）。

30

【0094】

ベンジルアルコールは、rFSHの安定性を低下させ、加熱したとき規則正しい2次構造の喪失を容易にすることがわかった。しかし、保存剤の添加は重要である。この研究によって、本出願において特許請求する塩は、加熱されたrFSH製剤における規則構造のレベルを向上させることが明らかになった。したがって、これらの塩は、rFSH液体製剤中の安定化剤（単数または複数）として、例えばベンジルアルコールまたは他のフェノール系保存剤の作用を代償するのによく適している。

40

【0095】

（実施例2） 示差走査熱量測定（DSC）

この実施例において代表的に使用されるFSHは、実施例1と同じである。一般に、タンパク質の天然（生理活性）構造は、その周囲の状況、例えば製剤の組成、容器システム、pHおよび温度に非常に感受性である。本実施例において、rFSH変性温度T_mを液体示差走査熱量測定（DSC）で検討した。rFSH変性温度は、溶液状態のタンパク質の安定性の指標をもたらし、より高いT_mは、より安定なタンパク質を示唆する。

【0096】

タンパク質の3次および4次構造は、主に非共有結合的相互作用で安定化される。これ

50

らの分子内相互作用の多くは、アンフォールディング時に水分子との非共有結合的相互作用で置換されるので、異なる構造形態（すなわち、天然と変性）間の熱力学的バランスが微妙である。一般に、これは、天然タンパク質の安定性が限定されることを意味する。多くのタンパク質は、約 70 °C で熱アンフォールディングする。タンパク質フォールディングまたは変性は、DSC を使用して直接研究および数量化することができる熱力学パラメータで説明することができる。したがって、DSC は、タンパク質安定性に対する添加剤の効果を研究し、したがってタンパク質治療に最適な製剤を特定するのに重要なツールである。

【0097】

液体示差走査熱量測定 (DSC)

10

理論

液体 DSC において、タンパク質試料を加熱する（すなわち、試料温度を上げる）と、わずかに上昇するベースラインだけが得られるが、加熱を続ける（すなわち、温度の上昇を続ける）と、熱がタンパク質に吸収され、タンパク質は、その研究されたタンパク質にとって特徴的な温度範囲にわたって熱アンフォールディングする。これによって、吸熱ピークが生じる。タンパク質アンフォールディング時に、より疎水性の鎖が露出されるので、タンパク質を囲む水分子は再編成する。アンフォールディングが完了すると、熱吸収は低下し、新しいベースラインが形成される。

【0098】

試料の熱容量 C_p の積算によって、式 (1) のアンフォールディングプロセスに伴うエンタルピー変化 ΔH が得られる。観測されたエンタルピー変化は、水素結合の破断などの吸熱過程およびタンパク質と周囲媒体の間の水素結合の形成などの発熱過程から生じる。熱転移の midpoint または転移 midpoint T_m (タンパク質変性温度と呼ばれることが多い) は、タンパク質分子の半分がフォールディングし、タンパク質分子の半分がアンフォールディングしている温度である。

20

【0099】

【数1】

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \quad (1)$$

30

【0100】

DSC 測定の生データ、すなわち、温度の関数としての熱発生率 (単位: W) を、容易に部分モル熱容量 (単位: J/mol·K) に再計算することができ、使用するタンパク質のモル質量および濃度がわかる。

【0101】

試験方法

タンパク質変性温度 T_m は、300 μ l のデュアルキャピラリーセルを装備した液体 DSC (TA Instruments の Nano DSC) で、以下のパラメータを使用して測定した:

40

走査速度: 0.5 ~ 2.0 °C/分、他に何も記載されていない場合、走査速度 1.0 °C/分を使用する (実施例 4 の場合、2.0 °C/分)

開始温度: 20 °C

最終温度: 100 °C

平衡: 900 s (または、実施例 4 の場合、900 s (1 回目走査) 600 s (2 回目走査))

定圧: 3 atm

【0102】

試料は全て、測定前に 15 分間脱気した。各タンパク質試料後に、試料セルを 50 % ギ酸で清浄した。さらに、各試料のランの後に、セルを 1000 ml の精製水ですすいだ。

50

試料は全て、対照セル中の対応するプラセボとともに測定した。対照セルと試料セルの両方に充填したプラセボ溶液について別個の走査から得られた結果を、評価前にデータから差し引いた。すなわち、ブランクの差し引きを行った。

【0103】

MALDX-TOF MS

酵素シアリダーゼで処理する前後の r F S H の試料を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) で分析して、脱シアリル化反応の程度を評価した。Autoflex II MALDI ToF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics) で、スペクトルを取得した。シナピン酸をマトリックスとして使用した。分析は、ディレイドエクストラクションを利用して、正イオンリニアモードで行った。4000~20893 Da の走査範囲を、外部較正して使用した。

10

【0104】

この実施例の目的

この実施例の目的は、液体示差走査熱量測定 (DSC) によって r F S H の熱安定性を検討すること、および保存剤 (フェノールまたはベンジルアルコール) が添加された場合と添加されていない場合の r F S H に対する種々の塩の安定化作用を研究することであった。

【0105】

この研究は以前の円偏光二色性 (CD) 分光法の研究 (上記実施例 1) およびリアルタイム安定性の研究 (下記の実施例 3) とともに全て、溶液状態の r F S H の安定性に対する塩および保存剤の作用を研究することを目的とする。

20

【0106】

研究対象の製品

r F S H バッチ情報

r F S H 原薬 (バッチ番号 08800020 およびバッチ番号 09PD80010) は、Bio-Technology General (BTG)、Israel で製造されたものである。

【0107】

r F S H の生物活性の決定は、ヨーロッパ薬局方に従って行った。使用された r F S H の 2 バッチの濃度は、それぞれバッチ 08800020 については 13, 223 IU/mg (9, 256 IU/ml が得られる) と、バッチ 09PD80010 については 15, 109 IU/mg (10, 576 IU/ml が得られる) と決定された。

30

【0108】

材料

添加剤

r F S H 溶液中で使用される添加剤のリストを、表 2 に記載する。

【0109】

【表 2】

表2:添加剤のリスト

名称	供給業者
リン酸水素二ナトリウム×2H ₂ O、ヨーロッパ薬局方	Merck
リン酸85%、ヨーロッパ薬局方	Merck
塩化ナトリウム、ヨーロッパ薬局方	Merck
硫酸二ナトリウム×10H ₂ O、ヨーロッパ薬局方	Merck
塩化マグネシウム×6H ₂ O、ヨーロッパ薬局方	Merck
塩化カリウム、p.a.	Merck
ヨウ化ナトリウム、ヨーロッパ薬局方	Merck
硫酸アンモニウム、ヨーロッパ薬局方	Merck
ヨウ化カリウム、ヨーロッパ薬局方	Merck
塩化亜鉛、ヨーロッパ薬局方	Riedel-de-Haen
クエン酸三ナトリウム×2H ₂ O、ヨーロッパ薬局方	Merck
酢酸アンモニウム、Ultra >99.0%	Fluka
酢酸ナトリウム、×3H ₂ O、ヨーロッパ薬局方	Merck
過塩素酸ナトリウム×H ₂ O、p.a.	Merck
ヨウ化亜鉛、p.a.	Merck
硫酸亜鉛、ヨーロッパ薬局方	Merck
硫酸二カリウム、ヨーロッパ薬局方	Merck
酒石酸二ナトリウム×2H ₂ O、p.a.	Merck
ヨウ化アンモニウム、p.a.	Merck
スクロース、ヨーロッパ薬局方	Merck
リン酸水素二カリウム×3H ₂ O、p.a.	Merck
硫酸マグネシウム×7H ₂ O、ヨーロッパ薬局方	Fluka
ポリソルベート20(Tween 20)ヨーロッパ薬局方	Merck
フェノール、ヨーロッパ薬局方	Merck
ベンジルアルコール、ヨーロッパ薬局方	Merck
L-メチオニン、ヨーロッパ薬局方	Sigma
ミリQ水	Millipore

10

20

30

【0110】

被検溶液の組成

被検 r F S H および プラセボ 溶液 の 組成 を、表 3、表 4 および 表 5 に 記載 する。保存 剤 の 被 検 濃 度 は、ヨ ー ロ ッ パ 薬 局 方、非 経 口 使 用 を 目 的 と する 製 剤 の 保 存 有 効 性 に 関 する 基 準 (Ph. Eur. A criteria concerning preservation efficacy of a formulation aimed for parenteral use) を 満 た す の に 要 す る 濃 度 に 基 づ い て 選 択 さ れ る。

【0111】

被 検 塩 濃 度 は、被 検 溶 液 で 等 張 性 を 得 る の に 必 要 と さ れ た 硫 酸 ナ ト リ ウ ム の 濃 度、す な わ ち 0.1 M 硫 酸 ナ ト リ ウ ム に 基 づ い て い る。他 の 塩 は 全 て、硫 酸 ナ ト リ ウ ム と 同 じ モ ル 濃 度 で 試 験 し た。さ ら に、よ り 高 い お よ び よ り 低 い 濃 度 の 塩 化 ナ ト リ ウ ム を 試 験 し て、r F S H 変 性 温 度 T_m に 対 す る 塩 濃 度 の 影 響 を 評 価 す る。

40

【0112】

被 検 溶 液 中 の リ ン 酸 ナ ト リ ウ ム 緩 衝 液 の 濃 度 を 低 く 維 持 し て、緩 衝 塩 そ れ 自 体 の 安 定 化 / 不 安 定 化 作 用 の リ ス ク を 最 小 限 に 抑 制 す る。

【0113】

【表 3】

表3:rFSH溶液の組成

rFSH	緩衝液	界面活性剤	保存剤	酸化防止剤	安定化剤
2.4mg/ml	1mM リン酸緩衝液pH5.5またはpH6.5またはpH7.5	0.005mg/ml ポリソルベート20	5mg/ml フェノールまたは15mg/ml ベンジルアルコールまたはなし	0.5mg/ml L-メチオニン	0.1M Na ₂ SO ₄ または 0.24M NaClまたは 0.1M NaClまたは 0.07M NaClまたは 0.1M 酢酸Naまたは 0.1M クエン酸Na ₃ または 0.1M 酒石酸Na ₂ または 0.1M NaIまたは 0.1M NaClO ₄ または 0.1M K ₂ SO ₄ または 0.1M K ₂ HPO ₄ または 0.1M KClまたは 0.1M KIまたは 100mM(NH ₄) ₂ SO ₄ または 0.1M 酢酸NH ₄ または 0.1M NH ₄ Iまたは 0.1M MgSO ₄ または 0.1M MgCl ₂ または 0.1M ZnSO ₄ または 0.1M ZnCl ₂ または 0.1M ZnI ₂ または 0.1M スクロースまたは なし

10

20

【0114】

【表 4】

表4:脱シアリル化rFSH溶液の組成

脱シアリル化rFSH	緩衝液	界面活性剤	酸化防止剤	安定化剤
2.4mg/ml	1mM リン酸緩衝液pH6.5	0.005mg/ml ポリソルベート20	0.5mg/ml L-メチオニン	0.1M Na ₂ SO ₄ または 0.1M NaClO ₄ または なし

30

【0115】

【表 5】

表5: プラセボ溶液の組成

緩衝液	界面活性剤	保存剤	酸化防止剤	安定化剤
1mM リン酸緩衝液pH5.5またはpH6.5またはpH7.5	0.005mg/ml ポリソルベート20	5mg/ml フェノールまたは1.5mg/ml ベンジルアルコールまたはなし	0.5mg/ml L-メチオニン	0.1M Na ₂ SO ₄ または0.24M NaClまたは0.1M NaClまたは0.07M NaClまたは0.1M 酢酸Naまたは0.1M クエン酸Na ₃ または0.1M 酒石酸Na ₂ または0.1M NaIまたは0.1M NaClO ₄ または0.1M K ₂ SO ₄ または0.1M K ₂ HPO ₄ または0.1M KClまたは0.1M KIまたは100mM (NH ₄) ₂ SO ₄ または0.1M 酢酸NH ₄ または0.1M NH ₄ Iまたは0.1M MgSO ₄ または0.1M MgCl ₂ または0.1M ZnSO ₄ または0.1M ZnCl ₂ または0.1M ZnI ₂ または0.1M スクロースまたはなし

10

20

【0116】

製造手順

全ての溶液（表3、表4および表5）は、Ferring Pharmaceuticals A/S（Copenhagen, Denmark）にて実験室スケールで製造する。製造手順を以下にまとめる。

【0117】

rFSH原液調製

リン酸緩衝液中のrFSH原液は、出発材料としてバッチ08800020またはバッチ09PD80010のrFSH原薬溶液を使用して、濃縮ステップを加えることによって調製する。分画分子量（MWCO）10kDaの膜を備えたVivaspin 20デバイス（Vivascience）を使用して、濃縮（up concentration）を行う。膜は、1mM リン酸緩衝液（pH 5.5、6.5または7.5）中に0.5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20を含有する、対応するプラセボ溶液15mlを、フィルターに通して遠心分離することによって予洗する。遠心分離は、スイングアウト型ローターを使用して、3000×gで20分間行う。

30

40

【0118】

濃縮ステップを行うには、合計80mlのrFSH試料を使用して、4個のVivaspin 20デバイス（20ml/デバイス）を満たし、3000×gで15分間遠心分離する。各濃縮分を20mlのメスフラスコに移す。フィルターを、所望のプラセボ溶液の少量ずつで洗浄する。洗浄溶液をメスフラスコに移し、最後に同じプラセボ溶液を使用して一定体積になるまで希釈する。こうして、それぞれ1mM リン酸緩衝液（pH 5

50

． 5、 6、 5 または 7、 5） 中に 0、 5 m g / m l L - メ チ オ ニ ン、 0、 0 0 5 m g / m l ポ リ ソ ル ベ ー ト 2 0 を 含 有 す る 2、 8 m g / m l r F S H 原 液 が 得 ら れ る。

【 0 1 1 9 】

r F S H 溶 液 お よ び プ ラ セ ボ 溶 液 の 調 製

保 存 剤 を 除 く 全 て の 添 加 剤 の 原 液 を、 ミ リ Q 水 中 で 調 製 す る。

r F S H 溶 液 お よ び プ ラ セ ボ 溶 液 の 調 製 に は、 各 添 加 剤 の 原 液 を 混 合 し て、 表 3、 表 4 お よ び 表 5 に 記 載 の 所 望 の 濃 度 を 得 る。 保 存 剤 を 溶 液 に 直 接 添 加 す る。

【 0 1 2 0 】

r F S H の 脱 シ ア リ ル 化

1 m M リ ン 酸 緩 衝 液 (p H 6、 5) 中 に 0、 5 m g / m l L - メ チ オ ニ ン、 0、 0 0 5 m g / m l ポ リ ソ ル ベ ー ト 2 0 を 含 有 す る、 r F S H 濃 度 2、 8 m g / m l の 濃 縮 r F S H 溶 液 を 使 用 し て、 r F S H に 結 合 し て い る 糖 部 分 か ら シ ア ル 酸 を 取 り 除 く。 S i g m a の α (2 $\rightarrow$ 3, 6, 8, 9) ノ イ ラ ミ ニ ダ ー ゼ (シ ア リ ダ ー ゼ) を 使 用 し て、 酵 素 的 除 去 を 行 う。 3 7 $^{\circ}$ C で 振 盪 し な が ら、 r F S H を ノ イ ラ ミ ニ ダ ー ゼ で 終 夜 処 理 す る。 r F S H の 濃 縮 の た め に 上 述 し た V i v a s p i n デ バ イ ス を 使 用 し て、 試 薬 を 除 去 す る。 酵 素 を 含 有 す る r F S H 溶 液 を、 予 洗 さ れ た V i v a s p i n デ バ イ ス に 移 す。 デ バ イ ス を 遠 心 分 離 し、 濾 液 を 捨 て、 濃 縮 分 を、 1 m M リ ン 酸 緩 衝 液 (p H 6、 5) 中 に 0、 5 m g / m l L - メ チ オ ニ ン、 0、 0 0 5 m g / m l ポ リ ソ ル ベ ー ト 2 0 を 含 有 す る プ ラ セ ボ 溶 液 に 再 懸 濁 す る。 溶 液 を 再 度 遠 心 分 離 す る。 こ の 手 順 を 3 回 繰 り 返 し た 後、 最 終 濃 縮 分 を メ ス フ ラ ス コ に 移 し、 プ ラ セ ボ 溶 液 で 一 定 体 積 に な る ま で 希 釈 す る。 こ う し て、 1 m M リ ン 酸 緩 衝 液 (p H 6、 5) 中 に 0、 5 m g / m l L - メ チ オ ニ ン、 0、 0 0 5 m g / m l ポ リ ソ ル ベ ー ト 2 0 を 含 有 す る、 2、 8 m g / m l 脱 シ ア リ ル 化 r F S H 原 液 が 得 ら れ る。

【 0 1 2 1 】

結 果 お よ び 考 察

r F S H T_m に 対 す る D S C 走 査 速 度 の 影 響

r F S H 変 性 温 度 に 対 す る D S C 走 査 速 度 の 影 響 を 検 討 す る た め に、 異 な る 3 つ の 走 査 速 度 で T_m 測 定 を 行 う。 表 6 で わ か る よ う に、 r F S H T_m は、 測 定 時 に 使 用 さ れ る D S C 走 査 速 度 に よ っ て 変 わ る。

【 0 1 2 2 】

同 一 の 走 査 速 度 で 行 わ れ た 測 定 か ら 得 ら れ た 変 性 温 度 を 比 較 す る 限 り、 T_m が 走 査 速 度 に よ っ て 変 わ る こ と は、 デ ー タ の 解 釈 に 影 響 を 及 ぼ さ な い。 例 え ば、 表 7 を 参 照 の こ と。

【 0 1 2 3 】

【 表 6 】

表 6: 1 m M リ ン 酸 ナ ト リ ウ ム 緩 衝 液 (p H 6. 5) 中 に 2. 4 m g / m l r F S H、 0. 5 m g / m l L - メ チ オ ニ ン、 0. 0 0 5 m g / m l ポ リ ソ ル ベ ー ト 2 0 を 含 有 す る r F S H 試 料 の 走 査 速 度 に 対 す る 変 性 温 度 T_m 。

走 査 速 度	T_m	
0. 5 $^{\circ}$ C / 分	71. 9 $^{\circ}$ C	
1. 0 $^{\circ}$ C / 分	72. 9 $^{\circ}$ C	
2. 0 $^{\circ}$ C / 分*	74. 9 $^{\circ}$ C	平均 = 74. 6 $^{\circ}$ C
2. 0 $^{\circ}$ C / 分*	74. 3 $^{\circ}$ C	

* 試 料 の 調 製 お よ び 分 析 は 2 回 繰 り 返 し て 行 う

【 0 1 2 4 】

1 0 0 $^{\circ}$ C ま で の D S C 走 査 を 繰 り 返 す と、 r F S H の 変 性 は、 実 験 条 件 下 で 部 分 非 可 逆 的 で あ る こ と が 明 ら か に な っ た (図 4 を 参 照 の こ と)。 こ れ は、 リ フ ォ ール デ ィ ン グ が、 2 回 の D S C 走 査 間 の 平 衡 時 間 よ り 遅 い こ と、 ま た は ア ン フ ォ ール デ ィ ン グ が、 式 2 に 示 す よ う に 非 可 逆 的 の ス テ ッ プ を 伴 う こ と を 意 味 す る。

天 然 $\leftrightarrow$ ア ン フ ォ ール デ ィ ン グ $\rightarrow$ 非 可 逆 的 変 性 (2)

【 0 1 2 5 】

r F S H T_m に対する保存剤添加の影響

表7でわかるように、保存剤の r F S H 溶液への添加によって、変性温度 T_m は、使用した保存剤にもよるが 2～6℃低下する。これは、他の組換えタンパク質と尿由来 F S H とについて以前に報告されたデータとよく符合する。

【0126】

フェノールを含む r F S H 溶液に比べて、ベンジルアルコールを含む r F S H 溶液は、得られた T_m の低下が大きい（表7を参照のこと）。これは、実験で使用されたフェノール（5mg/ml）より、ベンジルアルコール（15mg/ml）の濃度の方が高いことから説明することができる。

【0127】

【表7】

表7: 2.4mg/ml rFSH、0.5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20、1mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)、および表に記載の添加剤を含有するrFSH試料の、保存剤が添加された場合の変性温度 T_m (保存剤あり) と添加されていない場合の変性温度 T_m (保存剤なし)。 $\Delta T_{m(\text{保存剤})} = T_{m(\text{保存剤あり})} - T_{m(\text{保存剤なし})}$

保存剤	塩	$T_{m(\text{保存剤なし})}$	$T_{m(\text{保存剤あり})}$
5mg/ml フェノール	塩なし	72.9℃*	70.2℃*
		74.9℃**	72.3℃**
15mg/ml ベンジル アルコール	塩なし	74.9℃**	70.1℃**
5mg/ml フェノール	0.1M Na_2SO_4	78.0℃	75.1℃*
15mg/ml ベンジル アルコール	0.1M Na_2SO_4	78.9℃**	73.3℃

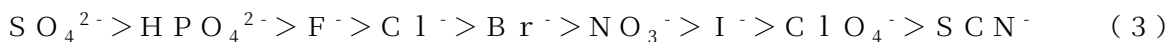
*走査速度1.0℃/分で行われたDSC測定から算出。

**走査速度2.0℃/分で行われたDSC測定から算出。

【0128】

r F S H T_m に対する種々の塩の添加の効果

タンパク質溶解性および安定性に対する一般的効果に従った塩のランク付けは、下記の式（3）の Hofmeister 系列またはリオトロピック系列（lyotropic series）と呼ばれる。左側の塩析剤、いわゆるコスモトロピックイオンは、安定化作用をタンパク質にもたらしことが知られている。一方、右側のカオトロピックイオンまたは塩溶イオンは、タンパク質を不安定化させることが知られている。



【0129】

保存剤を含まない溶液への種々の塩の添加が r F S H T_m に及ぼす効果

種々のナトリウム塩の r F S H T_m に対する効果を測定するとき、かなり驚くべきことに、上述された Hofmeister 系列に従って予想される安定化／不安定化作用は、カチオンを変更すると認められなかった。表8および表9を参照のこと。最もコスモトロピックなイオンである硫酸イオンを使用したかまたはカオトロピックなイオンである過塩素酸イオンを使用したかにかかわらず、変性温度の上昇はほぼ同じであった。実際、r F S H に対する不安定化作用が予想される過塩素酸イオンの塩の場合に、r F S H T_m の最大の上昇が得られた。 T_m の上昇は、硫酸イオン、塩化物イオンおよび過塩素酸イオンのような種々の無機アニオンとクエン酸イオン、酢酸イオンおよび酒石酸イオンのような有機アニオンとについて同じ範囲であった。

【0130】

【表 8】

表8:2.4mg/ml rFSH、0.5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20、1mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)、および0.1M 塩を含有するrFSH試料の塩アニオンおよびカチオンの組合せに対する変性温度 T_m 。

アニオン	カチオン				
	K^+	Na^+	NH_4^+	Mg^{2+}	Zn^{2+}
SO_4^{2-}	77.6°C	78.0°C	74.9°C	75.0°C	60.2°C
HPO_4^{2-}	77.9°C				
酢酸イオン		77.7°C	76.2°C		
クエン酸イオン		78.4°C			
酒石酸イオン		78.4°C			
Cl^-	77.6°C	77.7°C		74.4°C	59.9°C
I^-	78.3°C	78.7°C	76.3°C		57.5°C
ClO_4^-		80.9°C			

塩添加せず: $T_m=72.9^\circ\text{C}$ 、表のヘッダーに従って他の添加剤

0.1M スクロース: $T_m=73.3^\circ\text{C}$ 、表のヘッダーに従って他の添加剤

【0131】

【表 9】

表9:0.1M 塩を添加したとき、2.4mg/ml rFSH、0.5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20、1mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を含有するrFSH試料の塩アニオンとカチオンの組合せに対する変性温度の変化 $\Delta T_{m(\text{塩})}$ $\Delta T_{m(\text{塩})}=T_{m(\text{塩あり})}-T_{m(\text{塩なし})}$ 。

アニオン	カチオン				
	K^+	Na^+	NH_4^+	Mg^{2+}	Zn^{2+}
SO_4^{2-}	4.7°C	5.1°C	2.1°C	2.1°C	-12.7°C
HPO_4^{2-}	5.0°C				
酢酸イオン		4.8°C	3.3°C		
クエン酸イオン		5.5°C			
酒石酸イオン		5.5°C			
Cl^-	4.7°C	4.8°C		1.5°C	-13.0°C
I^-	5.5°C	5.8°C	3.4°C		-15.4°C
ClO_4^-		8.0°C			

0.1M スクロース:0.4°C、表のヘッダーに従って他の添加剤

【0132】

異なるナトリウム塩を添加したとき、ホフマイスター系列中のアニオンの位置は、rFSH T_m の上昇に影響を及ぼさないという観測された傾向は、カリウムの場合にも認められる（表8および表9を参照のこと）。同じカチオンを有すると、一般にrFSH T_m の変化に及ぼすアニオンの影響はわずかでしかなく、まったくホフマイスター系列に従ったものではない。

【0133】

かなり驚くべきことに、他方では、カチオンはrFSH T_m にまさに影響を及ぼしている。さらに具体的には、1価のカチオンを含む塩は、一般に2価イオンより高いrFSH T_m を示す（表8を参照のこと）。特に、1価のアルカリ金属イオンは、高いrFSH T_m をもたらす。言い換えれば、塩を添加したとき観測された安定化作用（すなわち、rFSH T_m の上昇）は、被検アニオンとはまったく無関係であり（表8および9を

10

20

30

40

50

参照のこと）、一方、カチオンは、安定化の程度に大きな影響を及ぼしている。カリウムおよびナトリウムの塩は、特に大きな安定化作用を示す。

【0134】

上記の被検溶液は全て、塩濃度が0.1Mである。rFSH T_m に対する塩濃度の影響を検討するために、異なる3つの塩化ナトリウム濃度をもつrFSH溶液のDSC測定値を検討した。塩をrFSH溶液に添加したときの安定化作用は、被検塩濃度の全範囲で認められる（表10を参照のこと）。

【0135】

【表10】

表10:異なる塩化ナトリウム濃度を添加したとき、2.4mg/ml rFSH、0.5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20、1mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を含有するrFSH試料の変性温度の変化 $\Delta T_{m(塩)}$ 。 $\Delta T_{m(塩)} = T_{m(塩あり)} - T_{m(塩なし)}$ 。

NaCl濃度	$\Delta T_{m(塩)}$
0.07M	4.2°C**
0.1M	4.8°C*
0.24M	5.4°C**

*走査速度1.0°C/分で行われたDSC測定から算出。

**走査速度2.0°C/分で行われたDSC測定から算出。

【0136】

FSH製剤に関する既存の特許では、FSHの安定化剤として例えばスクロースが使用されている。0.1M スクロースをrFSH溶液に添加すると、rFSH T_m の変化は微小であり（表8および表9を参照のこと）、カリウム塩またはナトリウム塩を添加したときのrFSHの安定化作用は、スクロースを添加したときに得られる作用より著しく高いことが示唆される。

【0137】

保存剤が添加された溶液への種々の塩の添加がrFSH T_m に及ぼす効果

保存剤のタンパク質溶液への添加によって、溶液状態のタンパク質の安定性が低下することは周知である。しかし、非経口使用を目的とする複数回投与水性製剤では、保存剤は必要なものである。したがって、保存剤を添加したときのタンパク質安定性の低下を、塩のような安定化剤をrFSH溶液に添加することによって代償することは非常に重要である。

【0138】

【表11】

表11:2.4mg/ml rFSH、5mg/ml フェノール、0.5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20、1mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)、および表に記載の0.1M 塩を含有するrFSH試料の変性温度 T_m ならびに変性温度の変化 $\Delta T_{m(保存剤)}$ および $\Delta T_{m(塩)}$ 。ここで、 $\Delta T_{m(保存剤)} = T_{m(保存剤あり)} - T_{m(保存剤なし)}$ および $\Delta T_{m(塩)} = T_{m(塩あり)} - T_{m(塩なし)}$ 。

	T_m	$\Delta T_{m(保存剤)}$	$\Delta T_{m(塩)}^*$
塩なし	70.2°C	-2.7°C	-
Na ₂ SO ₄	75.1°C	-2.9°C	4.9°C
NaCl	74.7°C	-2.9°C	4.6°C
NaClO ₄	78.6°C	-2.3°C	8.4°C

*5mg/ml フェノールを含有するrFSH溶液の場合

【0139】

表11でわかるように、保存剤をrFSH溶液に添加することによって、rFSH変性温度が2～3°C低下する。保存剤が添加されたrFSH溶液に塩を添加すると、rFSH変性温度が約5°C上昇する。言い換えれば、保存剤をrFSH溶液に添加したとき観測された不安定化作用は、本発明で定義される塩の添加によってよく代償される。実際は、フ

10

20

30

40

50

ェノールを含有する r F S H 溶液への塩の添加は、r F S H T_m に対する保存剤の作用を相殺するのではなく、保存剤または塩が添加されていない水溶液中の r F S H に比べて T_m を実際に上昇させている（表 1 1 を参照のこと）。

【0140】

r F S H T_m に対する pH 変更の影響

安定化塩が添加された場合と添加されていない場合の r F S H T_m に対する pH の影響を研究するために、異なる 3 つのナトリウム塩が添加された場合と添加されていない場合の r F S H 変性温度を pH 5.5、6.5 および 7.5 で決定した（表 1 2 を参照のこと）。

【0141】

【表 1 2】

表 12: 2.4mg/ml rFSH、0.5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート 20、1mM リン酸ナトリウム緩衝液、および 0.1M 塩を含有する rFSH 試料の異なる pH における変性温度 T_m 。ここで、 $\Delta T_{m(\text{塩})} = T_{m(\text{塩あり})} - T_{m(\text{塩なし})}$

	T_m			$\Delta T_{m(\text{塩})}$		
	pH5.5	pH6.5	pH7.5	pH5.5	pH6.5	pH7.5
塩なし	70.5°C	72.9°C	74.9°C	-	-	-
Na ₂ SO ₄	76.2°C	78.0°C	78.7°C	5.7°C	5.1°C	3.8°C
NaCl	75.0°C	77.7°C	78.6°C	4.5°C	4.8°C	3.7°C
NaClO ₄	78.6°C	80.9°C	81.7°C	8.1°C	8.0°C	6.7°C

【0142】

表 1 2 でわかるように、異なるナトリウム塩を添加したときの r F S H T_m の一般的な傾向は、pH 5.5 ~ 7.5 の全範囲にわたって同じである。すなわち、ホフマイスター系列に従った塩の安定化／不安定化作用からの逸脱が、全ての被検 pH において認められる。

【0143】

検討された pH 範囲において、観測された r F S H 変性温度は、塩が添加された場合と添加されていない場合との両方で溶液の pH が上昇するにつれて上昇する（表 1 2 を参照のこと）。塩を添加したときの r F S H 変性温度の実際の上昇 $\Delta T_{m(\text{塩})}$ は、pH が高くなるほど若干低くなる（表 1 2 を参照のこと）。

【0144】

r F S H T_m に対する r F S H シアリル化の影響

上記から明らかなように、塩の r F S H 溶液への添加の影響は、上記のホフマイスター系列に全く従わず、過塩素酸イオンの塩は、タンパク質を不安定化するものと予想され（タンパク質 T_m の低下をもたらす）、硫酸イオンは、タンパク質を安定化するものと予想される（タンパク質 T_m の上昇をもたらす）。

【0145】

r F S H は、糖部分に結合している多数のシアル酸残基、したがってかなり高い正味負電荷を有するグリコシル化されたタンパク質であるので、塩の予想外の安定化挙動に対するシアル酸の影響を検討した。

【0146】

異なる塩を添加したときの r F S H T_m に対するシアル酸の影響を研究するために、シアル酸の酵素的除去を行った。次いで、塩が添加された場合と添加されていない場合の脱シアリル化 r F S H を D S C によって分析した。

【0147】

シアル酸残基の除去が成功したことを検証するために、シアル酸の酵素的除去の前後の r F S H 試料を、MALDI-TOF MS によって分析した。

【0148】

MALDI-TOF MS の酸試料条件下で、 α サブユニットと β サブユニットを解離

10

20

30

40

50

させ、したがって別々に測定する。シアリダーゼ処理前の α サブユニットの平均分子量は15000Daである。シアリダーゼで処理した後、平均分子量は14000Daである。シアリダーゼ処理前の β サブユニットの平均分子量は18000Daであり、シアリダーゼ処理後は17000Daである。両サブユニットの質量のシフトは、シアル酸除去の結果であり、質量低減になる。実際に、シアル酸残基は全て、脱シアリル化中にrFSHから除去された。

【0149】

硫酸ナトリウムまたは過塩素酸ナトリウムを添加したときのrFSH T_m の上昇は、無修飾rFSHおよび脱シアリル化rFSHで同じ傾向に従う。すなわち、観測された安定化作用（rFSH T_m の上昇）は、上記のホフマイスター系列に従わない。一般に、観測された T_m は、無修飾rFSHより脱シアリル化rFSHの方が2～6℃低い（表13を参照のこと）。塩を添加したときに観測された安定化作用も、無修飾rFSHより脱シアリル化rFSHの方が低い（表13を参照のこと）。

【0150】

rFSHの糖部分にシアル酸が存在していることが、rFSH安定性を向上させると考えられるので、得られる T_m は、無修飾rFSHより脱シアリル化rFSHの方が低いと予想される。

【0151】

無修飾rFSHも脱シアリル化rFSHも、種々の塩を添加したとき同じ傾向に従う（ホフマイスター系列に従う安定化／不安定化作用から逸脱する）という事実から、この作用を引き起こすのは、rFSHそれ自体におけるシアル酸の存在ではないことがわかる。

【0152】

【表13】

表13:2.4mg/ml rFSHまたは2.4mg/ml 脱シアリル化rFSH、0.5mg/ml Lメチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20m、1mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)、および0.1M 塩を含有するrFSH試料および脱シアリル化rFSH試料の変性温度 T_m 。ここで、 $\Delta T_m(\text{塩}) = T_m(\text{塩あり}) - T_m(\text{塩なし})$ 。

	T_m		$\Delta T_m(\text{塩})$	
	rFSH	脱シアリル化rFSH	rFSH	脱シアリル化rFSH
塩なし	72.9℃	70.7℃	-	-
Na ₂ SO ₄	78.0℃	72.1℃	5.1℃	1.5℃
NaClO ₄	80.9℃	75.0℃	8.0℃	4.4℃

【0153】

結論

保存剤を添加したときのrFSHで観測された不安定化作用（rFSH T_m の低下）は、この分野における技術水準の認識とよく符合する。

【0154】

しかし、異なるアニオンの塩を添加したときのrFSH変性温度で観測されたホフマイスター系列からの逸脱は、予想外である。ホフマイスター系列に従って、（タンパク質溶解性および安定性に対する一般的効果に従って、塩をランク付けする）、硫酸イオンのようなコスモトロピックアニオンは、通常タンパク質を安定化し（ T_m の上昇）、一方、過塩素酸イオンのようなカオトロピックアニオンはタンパク質を不安定化する（ T_m の低下）。この研究では、同じカチオンを有する被検アニオンは全て、rFSH変性温度の同様な上昇を示す。ホフマイスター系列からの予測と全く正反対に、過塩素酸イオンの塩は、rFSH変性温度の最大の上昇を示す。

【0155】

言い換えれば、塩を添加したときに観測された安定化作用（すなわち、rFSH T_m の上昇）は、被検アニオンとはまったく無関係である。ナトリウムおよびカリウムの塩は、特に大きな安定化作用を示す。特に、過塩素酸ナトリウムのrFSH溶液への添加によって、rFSH変性温度の大きな上昇が生じる。しかし、過塩素酸塩は、通常反応性が高く、酸化剤であり、したがって医薬製剤の不活性成分として認可されない。

【0156】

塩の添加時に r F S H について得られた予想外の安定化作用は、r F S H の糖部分にシアル酸が存在していることでは説明できない。脱シアル化 r F S H についての r F S H 変性温度の決定は、無修飾 r F S H としての塩の添加時の r F S H の安定化作用において同じ傾向を示す。

【0157】

(実施例3) r F S H 溶液についてのリアルタイム安定性
研究の目的

この研究の目的は、種々の製剤中の r F S H のリアルタイム安定性が、実施例2で説明されたように、液体 D S C による r F S H 変性温度の測定、また実施例1で説明されたように、C D 分光法で測定された加熱時の r F S H の2次構造の変化で見られるのと同じ傾向に従うかどうかを確立することである。この研究では、いかに r F S H がその単量体に解離しやすいかについて測定して、r F S H の貯蔵中の構造安定性を決定する。

10

【0158】

r F S H 600 IU/ml の製剤の、異なる2つの貯蔵温度で貯蔵した後の安定性を、長期にわたる $5 \pm 3^\circ\text{C}$ / 周囲 RH および促進 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ / $65 \pm 5\%$ RH 条件で6~12カ月研究した。全てのバイアルを倒立させて貯蔵した。対応する製剤を含有するが、r F S H を添加しないプラセボ対照を、活性 r F S H について説明したのと同じ条件下で貯蔵した。

【0159】

研究対象の製品

バッチ情報

r F S H 原薬 (バッチ番号 08800060 およびバッチ番号 09800020) は、Bio-Technology General (BTG)、Israel で製造されたものである。

上記 r F S H バッチの生物活性の決定は、ヨーロッパ薬局方に従って行った。

20

【0160】

材料

添加剤

この研究で使用される添加剤のリストを、表14に記載する。

30

【0161】

【表14】

表14: 添加剤のリスト

名称	供給業者
リン酸水素二ナトリウム二水和物、ヨーロッパ薬局方	Merck
リン酸85%、ヨーロッパ薬局方	Merck
スクロース、ヨーロッパ薬局方	Merck
ポリソルベート(ポリソルベート)20 ヨーロッパ薬局方	Merck
フェノール、ヨーロッパ薬局方	Merck
レメチオニン、ヨーロッパ薬局方	Sigma
塩化ナトリウム、ヨーロッパ薬局方	Merck
硫酸二ナトリウム×10 H ₂ O、ヨーロッパ薬局方	Merck
ミリQ水	Millipore

40

【0162】

容器および施栓系

使用する主要なパッキング材料を、表15に記載する。

【0163】

【表 15】

表15:容器/施栓系

項目	説明	供給業者
容器	タイプ1 ヨーロッパ薬局方 無色ホ ウケイ酸ガラスバイアル、2R	ISO-GmbH
ゴム	13 mm クロロブチル栓 4432/50 B 2-40 被覆、FluoroTec	West Pharmaceutical Servi ces
蓋	アルミニウムキャップおよびプラ スチックキャップ(フリップオフ)	West Pharmaceutical Servi ces

10

【0164】

r F S H原液および異なる製剤（r F S Hおよびプラセボ）の組成を、表 16、表 17、および表 18 に記載する。いずれの安定化剤／等張化剤も含有しない製剤を除いて、安定化剤／等張化剤の濃度を調整して、等張液を生じる。

【0165】

【表 16】

表16:rFSH原液の組成

バッチ	rFSH 濃度	ビヒクル
08800060	16235IU/mg 0.7mg/ml	0.5mg/ml L-メチオニン、 1mM リン酸水素二ナトリウム(pH6.7~6.8)中に0. 5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベ ート20
09800020	13223IU/mg 0.7mg/ml	0.5mg/ml L-メチオニン、 1mM リン酸水素二ナトリウム(pH6.7~6.8)中に0. 5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベ ート20

20

30

【0166】

【表 17】

表17:rFSH製剤の組成

rFSH	緩衝液	界面活性剤	保存剤	酸化防止剤	安定化剤/等張化 剤
600IU/ml	20mM ホス フェート p H6.5*	0.005mg/ml ポ リソルベート2 0	-	0.5mg/ml L-メ チオニン	15mg/ml Na ₂ SO ₄
600IU/ml	1mM ホス フェート p H6.5*	0.005mg/ml ポ リソルベート2 0	5mg/ml フェ ノール	1mg/ml L-メ チオニン	14mg/ml Na ₂ SO ₄
600IU/ml	1mM ホス フェート p H6.5*	0.005mg/ml ポ リソルベート2 0	5mg/ml フェ ノール	1mg/ml L-メ チオニン	7mg/ml NaCl
600IU/ml	1mM ホス フェート p H6.5*	0.005mg/ml ポ リソルベート2 0	5mg/ml フェ ノール	1mg/ml L-メ チオニン	75mg/ml スクロ ース
600IU/ml	1mM ホス フェート p H6.5*	0.005mg/ml ポ リソルベート2 0	5mg/ml フェ ノール	1mg/ml L-メ チオニン	-

40

* pHは、最終溶液のpHを指す。

50

【0167】

【表18】

表18: プラセボ製剤の組成

緩衝液	界面活性剤	保存剤	酸化防止剤	安定化剤/等張化剤
20mM ホスフェート pH6.5*	0.005mg/ml ポリソルベート20	-	0.5mg/ml L-メチオニン	15mg/ml Na ₂ SO ₄
1mM ホスフェート pH6.5*	0.005mg/ml ポリソルベート20	5mg/ml フェノール	1mg/ml L-メチオニン	14mg/ml Na ₂ SO ₄
1mM ホスフェート pH6.5*	0.005mg/ml ポリソルベート20	5mg/ml フェノール	1mg/ml L-メチオニン	7mg/ml NaCl
1mM ホスフェート pH6.5*	0.005mg/ml ポリソルベート20	5mg/ml フェノール	1mg/ml L-メチオニン	75mg/ml スクロース
1mM ホスフェート pH6.5*	0.005mg/ml ポリソルベート20	5mg/ml フェノール	1mg/ml L-メチオニン	-

*pHは、最終溶液のpHを指す。

10

【0168】

製造手順

全ての溶液（表17および表18）は、Ferring Pharmaceuticals A/S（Copenhagen, Denmark）にて実験室スケールで製造する。製造手順を以下にまとめる。

20

【0169】

rFSHおよびプラセボ製剤の調製

全ての添加剤の原液を、ミリQ水中で調製する。

【0170】

プラセボ製剤の調製には、各添加剤の原液を混合して、表18に記載の濃度を得る。一定体積になるまで希釈する前に、各製剤のpHを必要なときには調整する。

【0171】

rFSH製剤の調製には、希釈溶液を各添加剤の原液から調製する。希釈溶液のpHを調整する。希釈溶液をrFSH原液（表16を参照のこと）と混合して、表17に記載の最終濃度を得る。

30

【0172】

無菌濾過および無菌充填

最終製剤は、0.22 μmのPVDFフィルター（Millipore）を使用して無菌濾過される。オートクレーブ処理したガラス瓶に、Stericupフィルターを使用して、プラセボ製剤を無菌濾過する。オートクレーブ処理したガラスびくーに、Sterivex-GVフィルターおよび20 mlの無菌ルアーロック注射器（Braun）を使用して、rFSH製剤を無菌濾過する。オートクレーブ処理したバイアルおよびゴム栓を使用して、バイアルの無菌濾過、充填および密封をLAFベンチ中で行う。充填する前後に、0.20 μmのMillex-FG PTFEフィルター（Millipore）に通した窒素ガスで、バイアルを少なくとも6秒間パージする。バイアルに、バイアル1本あたり試料1.5 mlを充填する。全てのバイアルに無菌充填し、直ちにゴム栓およびアルミノフリップオフキャップで閉じる。

40

【0173】

保存条件

rFSH 600 IU/mlを含有する試料およびプラセボを、5 ± 3 °C / 周囲RHで6 ~ 18カ月貯蔵する。さらに、試料を30 ± 2 °C / 65 ± 5 % RHの促進条件で6 ~ 18カ月貯蔵する。各貯蔵温度において、バイアルを倒立させて貯蔵する。全てのバイアルを光から保護する。

【0174】

安定性プログラム

50

r F S H 600 IU/ml およびプラセボの安定性プログラムを、以下の表19に示す。

【0175】

【表19】

表19:倒立させて貯蔵したrFSH液体製剤600IU/mlおよびプラセボの安定性プログラム

保存条件	蓄積時間(月)					
	0	1	3	6	12*	18*
5±3℃/周囲RH	X	-	-	X	X	X
30±2℃/65±5% RH	X	X	X	X	X	X

-安定性プログラムに従って計画された試験はない

*一部の製剤にしか試験されていない

10

【0176】

分析方法

この研究で使用される分析方法を、以下に説明する。各試験の際に、r F S Hのバイアル2本および対応するプラセボのバイアル1本を、各製剤について分析する。

【0177】

低分子量(LMW)形態

r F S HのLMW形態は、サイズ排除(SEC)カラムで定組成溶離を利用するLC-UVによって決まる。分析は、シリカベースのカラムを使用し、トリス緩衝液を移動相として、UV検出で行う。r F S HのLMW形態は、r F S Hの主ピークの分子量より(後に)低い分子量で溶離するピークである。LMW形態は、全ピーク面積のピーク面積百分率として決定される。

20

【0178】

保存剤を含有する試料の場合、保存剤は、サイズ排除カラムに入る前に試料溶液から除去される。

【0179】

結果および考察

r F S Hの貯蔵中の解離

r F S Hは、非共有結合で結合している単量体が解離したとき、その生物活性を喪失するので、単量体解離によるr F S H活性の喪失を追跡する簡単明瞭な方式は、溶液状態でr F S H LMW形態の量を測定することである。この情報は、SECクロマトグラフィーから回収することができ、r F S Hの主ピーク後に溶離するLMW形態ピークは、解離したr F S Hから生じることが知られている。

30

【0180】

【表20】

表20:30±2℃/65±5% RHで貯蔵後、SECで決定したLMW形態のrFSH相対量(%). 全ての製剤の全説明を表17に示す。

安定化剤	保存剤	蓄積時間(月)					
		0	1	3	6	12	18
15mg/ml Na ₂ SO ₄	-	1.5	2.5	1.7	2.4	3.0	2.7
14mg/ml Na ₂ SO ₄	5mg/ml フェノール	1.7	3.5	3.1	3.9	6.5	6.0
7mg/ml NaCl	5mg/ml フェノール	1.8	1.7	3.1	3.1	4.4	N.P.
75mg/ml スクロース	5mg/ml フェノール	1.9	6.2	7.3	10.1	N.P.	N.P.
-	5mg/ml フェノール	2.0	7.7	16.9	23.4	32.2	N.P.

N.P. 実施せず

40

50

【0181】

【表21】

表21: $5 \pm 3^\circ\text{C}$ /周囲RHで貯蔵後、SECで決定したLMW形態のrFSH相対量(%)。全ての製剤の全説明を表17に示す。

安定化剤	保存剤	蓄積時間(月)			
		0	6	12	18
15mg/ml Na_2SO_4	-	1.5	1.5	1.0	0.8
14mg/ml Na_2SO_4	5mg/ml フェノール	1.7	2.0	1.6	1.3
7mg/ml NaCl	5mg/ml フェノール	1.8	1.1	1.3	N.P.
75mg/ml スクロース	5mg/ml フェノール	1.9	1.9	N.P.	N.P.
-	5mg/ml フェノール	2.0	1.1	1.7	N.P.

N.P. 実施せず

【0182】

表20でわかるように、保存剤が添加された場合と添加されていない場合の、異なる安定化剤を含有する新たに調製されたrFSH溶液は、同様の相対量の解離rFSH(LMW形態)を示す。SEC方法の定量下限値は3%であるので、この下限値未満では、製剤間の明確な区別を行うことができない。これは、初期の時点で観測されたLMW形態の差が、方法に起因する変動の限界の範囲内であるという意味である。

【0183】

スクロースとともにまたは安定化剤なしでフェノールを含有する試料では、 $30 \pm 2^\circ\text{C} / 65 \pm 5\%$ RHで1カ月貯蔵した後すでに、解離rFSHの相対量が増加したが、硫酸ナトリウムまたは塩化ナトリウムを含有する試料では、解離rFSHの著しい増加が全く示されなかった(表20を参照のこと)。

【0184】

フェノールを含有するが、安定化剤が添加されていないrFSH試料には、 $30 \pm 2^\circ\text{C} / 65 \pm 5\%$ RHで6カ月貯蔵した後、20%を超える解離rFSH(LMW形態)が含まれる。フェノールを含有し、スクロースを安定化剤として含むrFSH試料も、解離rFSHの著しい増加を示す(10%を超える解離rFSH)が、フェノールを含有し、塩化ナトリウムまたは硫酸ナトリウムで安定化されている試料は、解離rFSHの微小の増加しか示さない(表20を参照のこと)。保存剤を全く含有しない試料は、貯蔵中の解離に対して最も安定である。しかし、非経口使用を目的とする複数回投与水性製剤には、保存剤の添加が必要とされ、したがってこの製剤は、単に比較として加えられているに過ぎない。

【0185】

$5 \pm 3^\circ\text{C}$ /周囲RHで6カ月貯蔵した後、被検rFSH製剤はどれも、解離rFSHの相対量の増加を示さない(表21を参照のこと)。しかし、市販のrFSH製品として成功するには、 5°C で少なくとも24カ月貯蔵し、これに付随して室温で1カ月、好ましくは3~4カ月貯蔵することが、必要とされる。

【0186】

rFSH変性温度、2次構造の変化、および解離度

この実施例の目的は、リアルタイム安定性研究データと、DSCによるrFSH変性温度決定と、CD分光法で決定されたrFSH2次構造データとの相関関係を決定することであったので、DSCデータの一部(実施例2を参照のこと)およびCDデータの一部(実施例1を参照のこと)を以下に示す。示したDSC結果に関する詳細は全て、実施例2に記載され、CDデータに関する詳細は、実施例1に記載されている。

【0187】

【表22】

表22: $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\%$ RHで6カ月貯蔵した後、SECで決定したLMW形態のrFSH相対量(%), およびDSCで決定したrFSH変性温度 T_m 。DSC研究において、全ての被検溶液について、安定化剤の濃度を、表に記載のリアルタイム安定性研究で使用される量に比べて、0.1Mに維持する。

安定化剤	保存剤	SEC、LMW、 $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\%$ RHで6カ月	DSC T_m
15mg/ml Na_2SO_4	-	2.3	78.0°C
14mg/ml Na_2SO_4	5mg/ml フェノール	3.9	75.1°C
7mg/ml NaCl	5mg/ml フェノール	3.1	74.7°C
75mg/ml スクロース	5mg/ml フェノール	10.1	-
-	5mg/ml フェノール	23.4	70.2°C

10

【0188】

表22でわかるように、DSCで得られたrFSH変性温度は、 $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\%$ RHで6カ月貯蔵した後のリアルタイム安定性データとよく相関し、SECで分析されたDSCとリアルタイム安定性の同様の相関関係が、組換え抗体および組換え糖タンパク質について以前に示された（例えば、Burtonら、（2007年）、Pharm. Dev. Technol.、12巻：265～273頁およびRemmelleら、（1998年）、Pharm. Res.、15巻：200～208頁を参照のこと）。保存剤が添加されることなく、硫酸ナトリウムで安定化されたrFSH溶液は、6カ月貯蔵した後に低いrFSH解離度しか示さず、保存剤を含有する溶液より著しく高い変性温度も示す。保存剤（フェノール）を含有する溶液では、塩化ナトリウムまたは硫酸ナトリウムの塩が添加されることによって、6カ月貯蔵した後に、スクロースを含有するまたは安定化剤を含有しない溶液より著しく低いrFSH解離度が得られることがさらにわかり得る。安定化剤が添加されていないrFSHの変性温度も、塩を含有する溶液のrFSH T_m より著しく低い。しかし、表23からわかるように、フェノールが添加されるとともに、スクロースを含有する溶液のrFSH変性温度は決定されなかったが、保存剤が添加されていない溶液のrFSH T_m の測定は、 $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\%$ RHで6カ月貯蔵した後、リアルタイム安定性データと同じ傾向を示す（表22を参照のこと）。結論として、NaClおよび Na_2SO_4 は、構造劣化に対して、スクロースより著しく良好な安定化剤である。これは、 T_m 測定（表23を参照のこと）とリアルタイム安定性データ（表22を参照のこと）の両方によって明らかである。

20

30

【0189】

【表23】

表23: 保存剤が添加されていない溶液の、DSCで決定されたrFSH変性温度 T_m ; さらに詳細については、実施例2を参照のこと。

安定化剤	DSC、 T_m
0.1M Na_2SO_4	78.0°C
0.1M NaCl	77.7°C
0.1M スクロース	73.3°C

40

【0190】

50

【表 2 4】

表24;2.4mg/ml rFSH、0.5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20、1mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を含有するrFSH試料の、表に記載する保存剤または塩が添加されたときの変性温度の変化 ΔT_m 。走査速度2℃/分。 $\Delta T_m = T_{m(\text{保存剤/塩あり})} - T_{m(\text{添加せず})}$

保存剤	塩	ΔT_m
15mg/ml ベンジルアルコール	塩なし	-4.7℃
15mg/ml ベンジルアルコール	0.1M Na ₂ SO ₄	-1.6℃
保存剤なし	0.1M Na ₂ SO ₄	+4.1℃
保存剤なし	塩なし	0℃

10

【0191】

ベンジルアルコールを保存剤として含有する溶液のリアルタイム安定性データは、決定されなかった。しかし、DSCで決定したrFSH変性温度およびCD分光法で決定した、加熱したときのrFSH 2次構造の変化を比較すると、同じ傾向が認められる（表24を参照のこと）。異なるタンパク質試料のrFSHの2次構造を決定した。24℃で決定した2次構造を天然構造とみなすことができる。ここで、ベンジルアルコール（0.17mg/ml）または硫酸ナトリウムを添加したとき、rFSH溶液についてrFSH 2次構造の差を観測することはできない。しかし、溶液を76.5℃に加熱すると、rFSH 2次構造の観測された喪失は、添加された添加剤によって変わる。保存剤（ベンジルアルコール）を添加すると、いずれの保存剤も含有しないrFSH溶液の場合より、rFSH 2次構造の喪失が大きくなるが、塩（硫酸ナトリウム）を添加すると、塩が添加されていないrFSH溶液の場合より、rFSH 2次構造の喪失が小さくなる。rFSHの規則正しい2次構造の喪失は、タンパク質の部分変性または完全変性として解釈することができる。

20

【0192】

（実施例4） hCGの示差走査熱量測定（DSC）データ

ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）は、hCG、卵胞刺激ホルモン（FSH）、黄体形成ホルモン（LH）、および甲状腺刺激ホルモン（TSH）に共通している、92個のアミノ酸 α サブユニットと、hCGに特異的な145個のアミノ酸 β サブユニットの2種類のグリコシル化単量体からなるヘテロ二量体タンパク質である。FSHおよびhCGを含む糖タンパク質ホルモンは全て、非共有結合で結合している単量体が解離したとき、ホルモンの生物活性を緩める。安定性分析の結果から、組換えFSH（rFSH）の不安定性は、主に二量体解離（4次構造の分解と、これに付随して免疫結合反応の低下）に基づくことが示唆された。

30

【0193】

この実施例の目的は、以前に観測された、DSCで決定され、上記の実施例1～3に説明されているrFSH変性温度への種々の糖および塩の依存が、非常に類似したタンパク質hCGの場合にも観測されているかどうかを確立することである。さらに、この研究で決定されたhCGのDSC変性温度を、以前に公開されたリアルタイム安定性データと比較する（Samaritani, F., 1995年、hCG液体製剤。EP 0 814, 841）。

40

【0194】

hCGの変性温度を、0.5mg/ml L-メチオニンおよび0.005mg/ml ポリソルベート20を含有する1mM リン酸緩衝液中、0.1Mの種々のナトリウム塩またはスクロースの存在下および非存在下で検討した。スクロース、硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム、および過塩素酸ナトリウムという異なる4種類の糖および塩を検討する。

【0195】

ヒト尿由来絨毛性ゴナドトロピン（hCG）

Massone S. A. (Argentina) のヒト尿から精製されたhCG原薬

50

(バッチ番号 2823287510) (7059IU/mg) を使用した。材料を、2～8℃で冷蔵して貯蔵した。

【0196】

上記 hCG バッチの生物活性の決定は、ヨーロッパ薬局方に従って行った。

【0197】

rFSH および別の材料を、実施例 2～3 で記載されたように使用した。

【0198】

【表 25】

表25:添加剤のリスト

名称	供給業者
リン酸水素二ナトリウム二水和物、ヨーロッパ薬局方	Merck
リン酸85%、ヨーロッパ薬局方	Merck
L-メチオニン、ヨーロッパ薬局方	Sigma
ポリソルベート(Tween)20 ヨーロッパ薬局方	Merck
スクロース、ヨーロッパ薬局方	Merck
硫酸ナトリウム×10H ₂ O、ヨーロッパ薬局方	Merck
塩化ナトリウム、ヨーロッパ薬局方	Merck
過塩素酸ナトリウム×H ₂ O、p.a.	Merck
ミリQ水	Millipore

10

20

【0199】

異なる hCG 製剤の組成を表 26 に記載する。

【0200】

【表 26】

表26:hCG製剤の組成

hCG	緩衝液	界面活性剤	酸化防止剤	糖/塩
5mg/ml*	1mM ホスフエート pH6.5	0.005mg/ml ポリソルベート20	0.5mg/ml L-メチオニン	0.1M Na ₂ SO ₄
5mg/ml*	1mM ホスフエート pH6.5	0.005mg/ml ポリソルベート20	0.5mg/ml L-メチオニン	0.1M NaCl
5mg/ml*	1mM ホスフエート pH6.5	0.005mg/ml ポリソルベート20	0.5mg/ml L-メチオニン	0.1M NaClO ₄
5mg/ml*	1mM ホスフエート pH6.5	0.005mg/ml ポリソルベート20	0.5mg/ml L-メチオニン	0.1M スクロース
5mg/ml*	1mM ホスフエート pH6.5	0.005mg/ml ポリソルベート20	0.5mg/ml L-メチオニン	-

30

*このバッチの場合、35300IU/mlに相当する。

【0201】

製造手順

全ての溶液(表26)は、Ferring Pharmaceuticals A/S, (Copenhagen, Denmark) にて実験室スケールで製造する。

【0202】

hCG 製剤の調製

全ての添加剤の原液を、ミリQ水中で調製する。種々の添加剤を含むプラセボ溶液を原液から調製する。hCG原薬をプラセボ溶液に溶解して、表26に記載の濃度を得る。これらの製剤の安定性データは入手できなかったので、DSC分析を、新たに調製された試料について常に行う；試料調製から1時間以内。

【0203】

40

50

図4および表27でわかるように、hCGの変性温度 T_m はrFSHの T_m より低い。さらに、変性過程のエンタルピー（すなわち、変性ピークのサイズ）は、rFSHよりhCGの方が著しく小さい。rFSH試料を100℃に加熱した後の変性過程がほぼ完全に非可逆的であるrFSHの場合と違って、hCGを100℃に加熱した後の変性過程は、より大部分が可逆的である（2）。

天然 ←→ アンフォールディングした → 非可逆的変性 (2)

【0204】

hCG変性過程は、DSC測定の間隔の中で大部分が可逆的であるが、これはrFSHには当てはまらず、hCG中の2種類のサブユニットが、rFSH中より解離しにくい場合に当てはまることができる。サブユニットがhCG試料を加熱している間に解離しない場合、天然構造は、室温に冷却したとき、より容易に再び再形成することができる。100℃に加熱したときの転移の ΔH の大きさは、rFSHがhCGより著しく大きく、付随する走査（すなわち、試料を100℃に加熱し、25℃に冷却し、第2の走査を100℃まで行う）における転移の ΔH の大きさは、rFSHとhCGとで同じサイズ範囲にある。

【0205】

hCGおよびrFSH T_m に対する糖または塩の添加の効果

タンパク質水溶液への塩の添加は、溶液状態のタンパク質の安定性に影響を及ぼし、したがってタンパク質変性温度に影響を与えるものと予想される。

【0206】

種々のナトリウム塩の、hCGおよびrFSH T_m に対する効果を測定するとき、かなり驚くべきことに、ホフマイスター系列に従って予想される安定化／不安定化作用が、アニオンを変更すると観測されない。図5、図6、および表27を参照のこと。hCGの場合、硫酸ナトリウムと塩化ナトリウムの両方が、実際にタンパク質を不安定化し、rFSHの場合、これらの塩はタンパク質を安定化する。hCGとrFSHの両方の場合、不安定化作用をタンパク質にもたらすと予想される過塩素酸ナトリウムは、全ての被検糖および塩の中で、実際に最も T_m を上昇させた。

【0207】

【表27】

表27: 5mg/ml hCG、0.5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20、1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を含有するhCG試料に0.1M 糖または塩を添加したときの変性温度 T_m および変性温度の変化 ΔT_m (糖/塩)、ならびに2.4mg/ml rFSH、0.5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20、1mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を含有するrFSH試料に0.1M糖または塩を添加したときの、変性温度 T_m および変性温度の変化 ΔT_m (糖/塩)。 ΔT_m (糖/塩) = T_m (糖あり/塩あり) - T_m (糖なし/塩なし)。

糖/塩	hCG		rFSH	
	T_m	ΔT_m	T_m	ΔT_m
糖も塩もなし	72.1℃	-	72.9℃	-
Na ₂ SO ₄	69.8℃	-2.3℃	78.0℃	5.1℃
NaCl	69.3℃	-2.7℃	77.7℃	4.8℃
NaClO ₄	75.0℃	2.9℃	80.9℃	8.0℃
スクロース	72.4℃	0.3℃	73.3℃	0.4℃

【0208】

HCGおよびRFSH純度に対する糖または塩の添加の効果

貯蔵中のrFSHサブユニットの解離、rFSH純度

rFSHは、非共有結合で結合している単量体が解離したとき、その生物活性を失うので、単量体解離によるrFSH活性の喪失を追跡する簡単明瞭な方式は、溶液状態でrFSH LMW形態の量を測定することである。この情報は、SECクロマトグラフィーから回収することができ、rFSHの主ピーク後に溶離するLMW形態は、解離したrFSH

Hから生じることが知られている。

【0209】

検討された製剤において、rFSH凝集塊など他のタンパク質に関連した化合物が認められる。したがって、rFSHタンパク質純度を下記のように算出することができる。

$$\text{純度 (\%)} = 100\% - \text{LMW形態 (\%)} \quad (4)$$

【0210】

【表28】

表28:30±2℃/65±5% RHで貯蔵した後、SECで決定したrFSH純度(%)。

糖/塩	保存剤	蓄積時間(月)				
		0	1	3	6	12
15mg/ml Na ₂ SO ₄	-	98.5%	97.5%	98.3%	97.7%	97.0%
14mg/ml Na ₂ SO ₄	5mg/ml フェノール	98.3%	96.5%	96.9%	96.1%	93.5%
7mg/ml NaCl	5mg/ml フェノール	98.2%	98.3%	96.9%	96.9%	95.6%
75mg/ml スクロース	5mg/ml フェノール	98.1%	93.8%	92.7%	89.9%	-
-	5mg/ml フェノール	98.0%	92.3%	83.1%	76.6%	67.8%

10

20

【0211】

表28でわかるように、保存剤が添加された場合と添加されていない場合の、異なる糖または塩を含有する新たに調製されたrFSH溶液は、同様の純度、すなわち同様の相対量の解離rFSH(LMW形態)を示す。

【0212】

スクロースとともにまたは糖も塩もなしでフェノールを含有する試料では、30℃で1カ月貯蔵した後すでに、rFSH純度が低下するが、フェノールおよび硫酸ナトリウムまたは塩化ナトリウムを含有する試料ならびにフェノールが添加されていない試料では、rFSH純度の著しい低下は全く認められなかった(表28を参照のこと)。30℃で6カ月貯蔵した後、フェノールを含有するが、糖も塩も添加されていないrFSH試料では、rFSH純度が80%未満である。フェノールを含有し、スクロースを安定化剤として含むrFSH試料も、rFSH純度の著しい低下を示すが、フェノールを含有し、塩化ナトリウムまたは硫酸ナトリウムで安定化されている試料は、rFSH純度の微小の低下しか示さない(表28を参照のこと)。保存剤を全く含有していない試料は、貯蔵中の解離に対して最も安定である。すなわち、これらは、最高の純度を示す。しかし、非経口使用のための複数回投与水性製剤には、保存剤の添加が必要である。

30

【0213】

貯蔵中のhCG純度

貯蔵時のhCG純度の変化に関する以前に公表されたデータを使用して、上記に示されたrFSH安定性データと比較する(Samaritani、前掲)。50℃で1カ月貯蔵した後すでに、hCG純度は著しく低下する。これについては、塩化ナトリウムを含有する試料が、スクロースを含有する試料より著しく低下している(表29を参照のこと)。50℃で6カ月貯蔵した後、塩化ナトリウムを含有する試料のhCG純度は、スクロースを含有する試料のhCG純度より10%を超えるほど低い。

40

【0214】

【表 29】

表29:50℃で貯蔵した後、SECで決定したhCG純度(%)。製剤の全説明は、欧州特許第0814841号、11頁に記載されている。

糖/塩	保存剤	蓄積時間(週)			
		0	1	2	6
7mg/ml NaCl	5mg/ml フェノール	100%	89.7%	85.6%	71.7%
75mg/ml スクロース	5mg/ml フェノール	100%	94.1%	90.3%	83.0%

10

【0215】

hCGおよびrFSHの T_m および純度の比較

表30でわかるように、DSCで得られたrFSHおよびhCGの変性温度は、リアルタイム安定性データから得られたrFSHおよびhCGの純度とよく相関する。DSCと、SECで分析されたリアルタイム安定性との同様の相関関係は、組換え抗体および組換え糖タンパク質について以前に示された。

【0216】

rFSHのリアルタイム安定性データを30℃で決定する。rFSH製品は、長期冷蔵貯蔵のためのものなので、促進安定性研究には、25～30℃が好適な範囲である。hCGのリアルタイム安定性データは、50℃で最高12週間まで貯蔵、25℃および40℃で11週間貯蔵、ならびに50℃、5で6週間貯蔵しか利用できない。40℃以下の温度では、スクロースおよび塩化ナトリウムを含む両製剤について、hCG純度の低下が貯蔵中6%未満であり、したがって11～12週間貯蔵後にすでに、種々の糖および塩の効果間で区別することは困難である。50℃より低い温度で観測された傾向は、50℃の場合と同じであるが、50℃においてのみ、様々な製剤を明確に区別することができる。

20

【0217】

【表 30】

表30:hCGおよびrFSHのSECで決定した純度およびDSCで決定した変性温度。hCGの純度は、50℃で6週間貯蔵した後に決定し、rFSHの純度は、30℃で6カ月貯蔵した後に決定する。

30

糖/塩	hCG		rFSH	
	純度*	ΔT_m^{**}	純度 [#]	$\Delta T_m^{##}$
Na ₂ SO ₄	-	-2.3℃	96.1%	5.1℃
NaCl	71.7%	-2.7℃	96.9%	4.8℃
スクロース	83.0%	0.3℃	89.9%	0.4℃

*10000IU/ml hCG、154mM NaClまたは300mM スクロース、10mM リン酸緩衝液(pH 7)を含有する試料。

**5mg/ml(35300IU/ml)hCG、0.1M 糖または塩、0.5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20、1mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を含有する試料。

[#]600IU/ml rFSH、43mM Na₂SO₄または120mM NaClまたは219mM スクロース、1.0mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20、5mg/ml フェノール、1mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を含有する試料。

40

^{##}2.4mg/ml(36300IU/ml)rFSH、0.1M 糖または塩、0.5mg/ml L-メチオニン、0.005mg/ml ポリソルベート20、1mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を含有する試料。

【0218】

結論

高温で貯蔵した後のhCGおよびrFSHの変性温度ならびにhCGおよびrFSHの純度による種々の溶液中におけるhCGおよびrFSHの安定性の研究から、溶液状態でのhCGおよびrFSH安定性に及ぼす異なる糖および塩の影響についての明確な証拠が得られる。使用される2つの技法は液体DSCおよびSECクロマトグラフィーであり、

50

両者は一致した結果を示す。これらの結果は、本リアルタイム安定性データで明らかに確認された。

【0219】

r F S H 2 次構造の変化 (C D 分光法—実施例 1)、r F S H 変性温度 (D S C による 3 次および 4 次構造の変化—実施例 2)、または $30 \pm 2^{\circ}\text{C} / 65 \pm 5\%$ R H で貯蔵した後に形成された解離 r F S H の相対量 (S E C による 4 次構造の変化—実施例 3) による種々の溶液中における r F S H 安定性の研究から、溶液状態での r F S H の安定性に及ぼす保存剤および安定化剤の影響についての明確な証拠が得られる。使用される 3 つの技法は、C D、D S C および S E C クロマトグラフィーであり、それらは全て一致した結果を示す。

10

【0220】

実施例 1 ~ 3 の全ての結果の結論としては、保存剤、フェノールまたはベンジルアルコールの添加は、溶液状態での r F S H の安定性を低下させることが明らかにわかる。m-クレゾールおよびクロロクレゾールのような他のフェノール系保存剤は、同様な不安定化作用をもたらすと予想される。保存剤を添加したときの r F S H で観測された不安定化作用は、この分野における技術水準の認識とよく符合する。

【0221】

薬剂的に許容されるアルカリ金属 Na^+ 塩または K^+ 塩を r F S H 溶液に添加すると、r F S H に対する保存剤の不安定化作用が相殺され、最も有利なことには、保存剤も塩も含有していない r F S H 溶液に比べて、溶液状態での r F S H の安定性が向上する。全ての被検ナトリウム塩およびカリウム塩は、使用するアニオンとは無関係に r F S H の安定性を向上させる。例えば、硫酸イオン、塩化物イオンおよび過塩素酸イオンのような無機アニオン、ならびにまたクエン酸イオン、酢酸イオンおよび酒石酸イオンのような有機アニオン。塩のカチオンを変更すると、r F S H の安定化度に大きな影響をもたらされる。1 価のカチオン、特にナトリウムまたはカリウムのカチオンとの塩は、r F S H に対して著しい安定化作用をもたらす。過塩素酸ナトリウムを r F S H 溶液に添加すると、最も安定な r F S H 溶液が生成する。しかし、過塩素酸塩は、通常反応性が高く、酸化剤であり、したがって医薬製剤の不活性成分として認可されない。したがって、硫酸ナトリウムもしくは硫酸カリウムおよび塩化ナトリウムまたは塩化カリウムが、最も好ましい安定化剤である。

20

30

【0222】

スクロースを h C G または r F S H 溶液に添加すると、h C G と r F S H の両方で、タンパク質安定性がわずかに向上するが、塩化ナトリウムを添加すると、h C G には不安定化作用が、r F S H には安定化作用をもたらさせる (実施例 4 を参照のこと)。過塩素酸ナトリウムを h C G および r F S H 溶液に添加すると、h C G と r F S H の両方に安定化作用をもたらされる (実施例 4)。r F S H 溶液に対するこれらの塩の安定化作用は、驚くべきことに、スクロースで観測される安定化作用より明らかに良好である。

【0223】

これらの結果の結論は、以下である：

1) 研究条件下で、h C G および r F S H 安定性に対する塩の効果は、ホフマイスター系列に従わない；

40

2) h C G および F S H は構造的に非常に類似している (すなわち、これらは、同じクラスのタンパク質に属し、両方ともグリコシル化されており、ともに 2 種類のサブユニットから、その α サブユニットは、2 つのタンパク質において同一である) というにもかかわらず、スクロースおよび塩化ナトリウムのような種々の糖および塩の、タンパク質安定性に対する効果は、h C G と r F S H とで異なる。非常に驚くべきことに、h C G および r F S H のような非常に類似したタンパク質について、塩は同じ安定化作用を示さない。

3) Na^+ 塩および K^+ 塩は、F S H 溶液に対する安定化作用を、使用するアニオンとは無関係に示す。

50

4) FSH溶液に対する Na^+ 塩および K^+ 塩の安定化作用は、保存剤の不安定化作用を弱めることができる。

【0224】

略語および定義

本文および実施例全体を通して、以下の略語および定義を使用する。

ΔT_m 保存剤または塩を添加したときの変性温度の変化、さらに T_m を参照のこと

ARTs 生殖補助医療 (assisted reproductive technologies)

BA ベンジルアルコール

BTG Bio-Technology General

10

CD 円偏光二色性

CHO チャイニーズハムスター卵巣

CoA 分析証明書

DNA デオキシリボ核酸

DSC 示差走査熱量測定

FSD 女性性機能不全

FSH 卵胞刺激ホルモン

hCG ヒト絨毛性ゴナドトロピン

IU 国際単位

ヨーロッパ薬局方および米国薬局方に準拠した Steelman-Pohley

20

Bioassayで決定したrFSHバイオ活性の尺度

IUI 子宮腔内授精

LC-UV 紫外検出を用いた液体クロマトグラフィー

LH 黄体形成ホルモン

LMW 主にまたは単独に解離単量体タンパク質からなる低分子量の形態

OI 排卵誘発

p. a. Pro Analysis

Ph. Eur. ヨーロッパ薬局方

RH 相対湿度

rFSH 組換えヒト卵胞刺激ホルモン

30

SEC サイズ排除クロマトグラフィー

SRCD シンクロトロン放射光円偏光二色性

T_m 熱転移の midpoint または転移 midpoint または変性温度

タンパク質分子の半分がフォールディングし、タンパク質分子の半分がアンフォールディングしているときの温度。

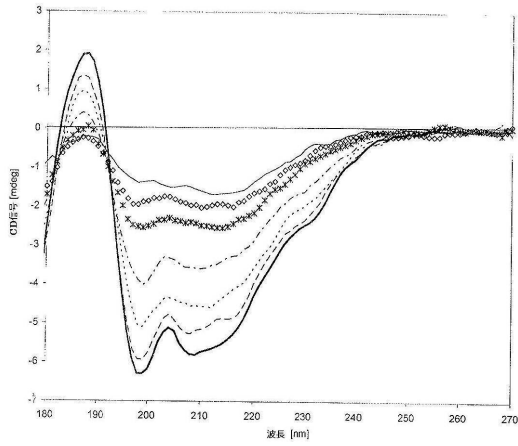
TRIS 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-プロパン-1, 3-ジオール

TSH 甲状腺刺激ホルモン

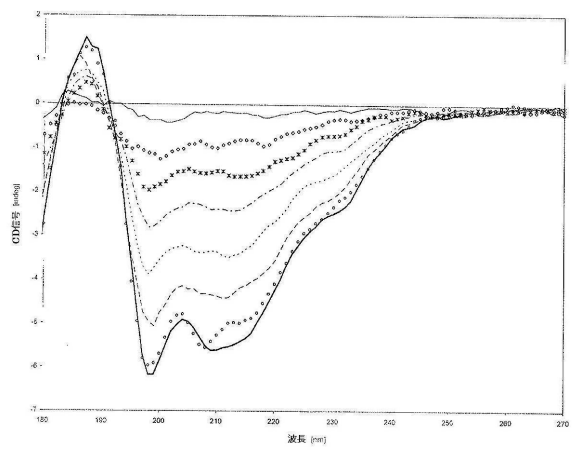
USP 米国薬局方

UV 紫外線

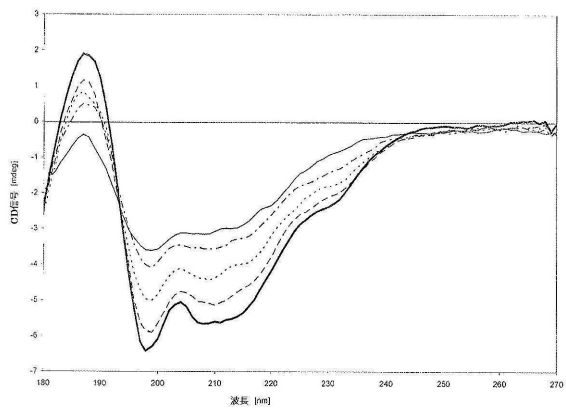
【図 1】



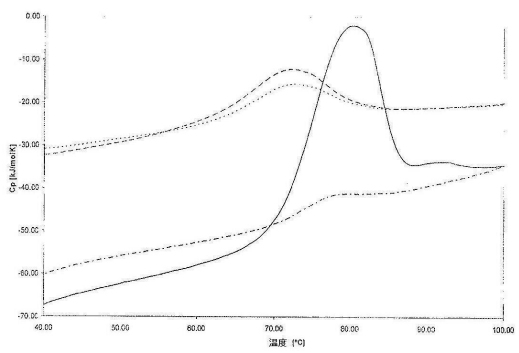
【図 3】



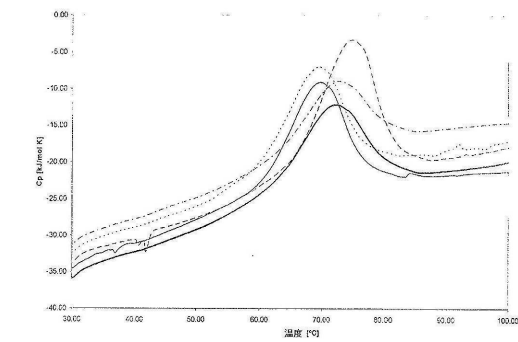
【図 2】



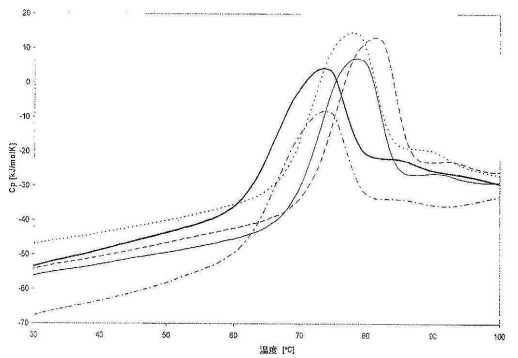
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 47/10 (2006.01) A 6 1 K 47/10
A 6 1 P 15/00 (2006.01) A 6 1 P 15/00

(72)発明者 バッガー, ハイジ ルイーゼ
デンマーク王国 デーカー 2 3 0 0 コペンハーゲン エス, アマゲルブロガーデ 2 8, 4

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表2002-521342 (JP, A)
特開平10-203997 (JP, A)
特許第5860047 (JP, B2)
特表2007-532515 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 3 8 / 0 0
A 6 1 K 9 / 0 0
A 6 1 K 4 7 / 0 0
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)