

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6932710号
(P6932710)

(45) 発行日 令和3年9月8日(2021.9.8)

(24) 登録日 令和3年8月20日(2021.8.20)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K 38/22	(2006.01)	A 6 1 K	38/22
A 6 1 K 38/24	(2006.01)	A 6 1 K	38/24
A 6 1 P 15/08	(2006.01)	A 6 1 P	15/08
A 6 1 P 5/24	(2006.01)	A 6 1 P	5/24
A 6 1 K 9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08

請求項の数 21 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-544561 (P2018-544561)	(73) 特許権者	517191312 フェリング・ペー・フェー
(86) (22) 出願日	平成29年2月24日(2017.2.24)		オランダ・2132・イエー・イクス・ホーフトドルプ・ポラリス・アヴェニュー・144
(65) 公表番号	特表2019-507153 (P2019-507153A)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(43) 公表日	平成31年3月14日(2019.3.14)	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/054325	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(87) 国際公開番号	W02017/144659	(72) 発明者	ヘレン・ウルリカ・シェーグレン スウェーデン・22647・ルンド・カラーエクロケン・40
(87) 国際公開日	平成29年8月31日(2017.8.31)		
審査請求日	令和2年2月3日(2020.2.3)		
(31) 優先権主張番号	1603280.7		
(32) 優先日	平成28年2月24日(2016.2.24)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定な液状ゴナドトロピン製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ゴナドトロピン、50～160mMの量のアルギニン、及び0.05～1.5mg/mlの量のメチオニンを含む液状医薬ゴナドトロピン製剤であって、前記製剤が、追加的バッファーを含まず、前記製剤のpHが、6.0と7.5の間である、液状医薬ゴナドトロピン製剤。

【請求項2】

前記ゴナドトロピンが、hCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)、並びに任意選択でFSH及び/又はLHを含む、請求項1に記載の医薬製剤。

【請求項3】

前記ゴナドトロピンが、hMG(ヒト閉経期ゴナドトロピン)を含む、請求項1又は2に記載の医薬製剤。

【請求項4】

前記ゴナドトロピンが、ヒト起源、尿由来FSH、LH及び/又はhCGを含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項5】

前記ゴナドトロピンが、組換えFSH、LH及び/又はhCGを含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項6】

防腐剤を追加的に含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項7】

10

20

前記防腐剤が、フェノールである、請求項6に記載の医薬製剤。

【請求項 8】

前記防腐剤が、4～6mg/mlの量で含まれる、請求項6又は7に記載の医薬製剤。

【請求項 9】

前記防腐剤が、5mg/mlの量で含まれる、請求項8に記載の医薬製剤。

【請求項 10】

界面活性剤を追加的に含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 11】

前記界面活性剤が、ポリソルベートである、請求項10に記載の医薬製剤。

【請求項 12】

前記界面活性剤が、ポリソルベート20である、請求項11に記載の医薬製剤。

10

【請求項 13】

前記界面活性剤が、0.001～0.05mg/mlの量で含まれる、請求項10から12のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 14】

前記界面活性剤が、0.005mg/mlの量で含まれる、請求項13に記載の医薬製剤。

【請求項 15】

前記アルギニンが、L-アルギニンHClである、請求項1から14のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 16】

前記hMGが、300～900IU/mlの量で含まれる、請求項3から15のいずれか一項に記載の医薬製剤。

20

【請求項 17】

前記hMGが、500～700IU/mlの量で含まれる、請求項16に記載の医薬製剤。

【請求項 18】

- 625IU/mlのhMG
 - 0.15mg/mlのメチオニン
 - 150mMのアルギニン
 - 5mg/mlのフェノール
 - 0.005mg/mlのポリソルベート20
 - 注射用水(WFI)からなり、
 - 前記製剤が、6.8+/-0.3のpHを有する、請求項1から17のいずれか一項に記載の医薬製剤。

30

【請求項 19】

不妊症の治療の方法における使用のための、請求項1から18のいずれか一項に記載の液状医薬製剤。

【請求項 20】

前記治療が、排卵誘発(OI)、生殖補助医療(ART)、及び/又は男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の治療である、請求項19に記載の使用のための医薬製剤。

【請求項 21】

hMGを含む液状医薬製剤の安定化のための方法であって、
 - ヒト女性由来の尿試料を提供する工程、
 - 前記試料からhMGを抽出する工程、
 - 請求項1から20のいずれか一項に規定の量で、アルギニン及びメチオニンを用いて前記抽出物を調合する工程、
 - 任意選択で、請求項1から20のいずれか一項に規定の量のフェノール及びポリソルベートを更に加える工程、
 - 前記製剤のpHを6.0と7.5の間に調節する工程
 を含み、
 - 追加的バッファーは加えられない、方法。

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般的に、ゴナドトロピン製剤、特にゴナドトロピンの液状製剤の安定化の分野に関する。安定化は、賦形剤、好ましくはアルギニンとメチオニンの特定の組合せによって実現される。好ましい実施形態では、製剤はバッファーを含まない。

【背景技術】

【0002】

ゴナドトロピンは、女性と男性の受精サイクルに本質的且つ主導的に関与するホルモンのファミリーである。ゴナドトロピンは研究目的と治療目的の両方で尿から誘導することができるが、例えばhCG、LH及びFSHのような幾つかのゴナドトロピンは組換えによって生成することもできる。

10

【0003】

特に、ゴナドトロピンは不妊症の治療において利用することができる。

【0004】

4つの主要なゴナドトロピンは、いずれも同じ糖タンパク質ファミリーに属する。これら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)及び(ヒト)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いずれもヘテロ二量体であり、及びサブユニットからなり、サブユニットは全てに共通し、即ち前述の4つ全てのゴナドトロピンに関して同じであり、一方サブユニットはそれぞれ異なる。FSHの作用は別個のFSH受容体によって媒介される。LHとHCGの鎖は82%のタンパク質配列相同性を共有しており、同じLH受容体を介してそれらの作用を果たす。

20

【0005】

FSHは下垂体前葉により自然に分泌され、卵胞発達及び排卵をサポートするよう働く。FSHは、他の糖タンパク質ホルモン、例えばLH及びhCGにも共通な92アミノ酸のサブユニット、及びホルモンの生物学的特異性をもたらすFSHに特有な111アミノ酸のサブユニットを含む(Pierce and Parsons, 1981, Glycoprotein hormones: structure and function, Ann Rev Biochem., 50:465 ~ 495頁)。hCGの成熟サブユニットは145のアミノ酸で構成される。FSH及びhCG中の各サブユニットは複合炭水化物残基の付加によって翻訳後修飾される。FSHに関して、両サブユニットは、N末端結合型グリカン結合用の2部位、アミノ酸52と78にサブユニット、及びアミノ酸残基7と24にサブユニットを有する(Rathnam and Saxena, (1975) Primary amino acid sequence of follicle stimulating hormone from human pituitary glands. I. alpha subunit, J Biol Chem. 250(17):6735 ~ 6746頁; Saxena and Rathnam, (1976) Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands, J Biol Chem. 251(4):993 ~ 1005頁)。このようにFSHは約30質量%までグリコシル化される(Dias and Van Roey, (2001) Structural biology of human follitropin and its receptor Arch Med Res. 32(6):510 ~ 519頁; Fox et al. (2001) Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. Mol Endocrinol. 15(3), 379 ~ 89頁)。hCGのサブユニットはN-グリコシル化とO-グリコシル化の両方を含有する(N-13、N-30、O-121、O-127、O-132及びO-138)。hCGのサブユニットにおける過剰なグリコシル化によってFSHのそれより親水性となる。サブユニットは受容体相互作用の特異性をもたらす。

30

40

【0006】

尿由来ゴナドトロピンは40年にわたり臨床上使用されており、それらの安全性は充分立証されている。第一世代と比較した新世代の高度精製(HP)尿由来ゴナドトロピンが経時的に導入されている。FSH及び/又はLH生体活性を損ねずに尿中タンパク質を除去するための、陰イオン交換及び疎水性相互作用クロマトグラフィー工程等の追加的精製工程を加えることによって高い純度が得られる。新世代ゴナドトロピン調製物の有意に高い純度によって、組成に関する追加的情報を与える更に包括的な特徴付け試験が容易になる。

【0007】

50

精製尿FSH及びヒト閉経期メノトロピン(hMG)は、いずれも閉経後の女性の尿から単離されたものであり、これらが、生殖補助医療(ART)前に調節卵巣刺激(COS)を施す患者における、(単一の)排卵を誘発するため又は多数の卵胞を刺激するためのいずれかで不妊症治療において長年使用されている。2つの組換え型FSH、Gonal-F(登録商標)(フォリトロピン、Merck Serono社)及びPuregon(登録商標)/Follistim(登録商標)(フォリトロピン、Merck社)が1990年代中期に利用可能となった。両方の製品がチャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株において発現される(Howles, C.M.(1996)、genetic engineering of human FSH(Gonal-f)、Hum Reprod.Update、2:172~191頁)。

【0008】

CHO細胞は医薬品組換えタンパク質の生成のため一般に使用される。構造分析によって、2,3-結合によってシアル酸が独占的に結合していることを確認した。多くのヒト糖タンパク質は、シアル酸残基に関する2,3-結合と2,6-結合両方の混合物を含有する。したがって、CHO系を使用して発現される組換えタンパク質は、その末端シアル酸結合のタイプがそれらの天然相当物と異なる。

10

【0009】

不妊症

本発明の文脈では、「不妊症」は、妊娠し子孫をもうける能力が低い又はそれができないことと定義される。妊娠は可能であるが繰り返し流産する女性も不妊症と言える。具体的に言えば、不妊症は、避妊なしの一年間の定期的性交後に妊娠できないこととしても定義される。不妊症は多くの原因によるものであり得る。幾つかの試験は、不妊症の症例の半数を少し超える症例が女性の状態が原因であることを示している。残りの症例は精子障害によって、及び不明な要因によって引き起こされる。現在、不妊症を治療するための幾つかの可能性が存在する。

20

【0010】

これらの可能性は、一定間隔の性交、生殖補助医療(ART)の使用、子宮内膜症、排卵誘発(OI)、フィブroid及び女性機能障害(FSD)のメディカルマネジメント、及び不具合を是正するための手術である。

【0011】

生殖補助医療及びOIでは、排卵を刺激するための薬物が使用される。卵巣刺激を主に担うFSHに次いで、ゴナドトロピン調製物はLH及び/又はhCGを含有し得る。

30

【0012】

1:1の比のFSHとLH生体活性を含有するHMG(ヒト閉経期ゴナドトロピン)調製物(例えばメノトロピンに関するモノグラフ、USPバージョン35を参照)、及びFSH生体活性のみを含有する調製物等の、妊婦又は閉経後女性の尿由来のゴナドトロピンホルモンを含有する幾つかの異なる薬物製品が、不妊症を治療するための臨床業務において現在使用されている。1995年以降、組換えDNA技術によって製造されたゴナドトロピン製品が利用可能となっている。

【0013】

したがって、単独又は混合物中のいずれかで、このようなゴナドトロピン化合物の安定化製剤を提供することが重要である。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】W02009/127826

【特許文献2】W02012/013742

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Pierce and Parsons、1981、Glycoprotein hormones:structure and function、Ann Rev Biochem.、50:465~495頁

【非特許文献2】Rathnam and Saxena、(1975) Primary amino acid sequence of follic

50

le stimulating hormone from human pituitary glands. I.alpha subunit, J Biol Chem. 250(17):6735 ~ 6746頁

【非特許文献 3】Saxena and Rathnam、(1976) Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands, J Biol Chem.251(4):993 ~ 1005頁

【非特許文献 4】Dias and Van Roey、(2001) Structural biology of human follitropin and its receptor Arch Med Res.32(6):510 ~ 519頁

【非特許文献 5】Fox et al.(2001) Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone.Mol Endocrinol.15(3)、379 ~ 89頁

【非特許文献 6】Howles、C.M.(1996)、genetic engineering of human FSH(Gonal-f)、Hum Reprod.Update、2:172 ~ 191頁

10

【非特許文献 7】Fiddes、J.C.and Goodman、H.M.The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones J.Mol.Appl.Genet.1(1)、3 ~ 18頁(1981)

【非特許文献 8】Saxena、B.B.and Rathnam、P.Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands J.Biol.Chem.251(4)、993 ~ 1005頁(1976)

【非特許文献 9】Fiddes、JC、Goodman HM.The cDNA for the beta-subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region Nature.1980 Aug 14;286(5774):684 ~ 7頁

20

【非特許文献 10】Sairam、M.R.and Li、C.H.Human pituitary lutropin.Isolation, properties, and the complete amino acid sequence of beta-subunit Biochim.Biophys.Acta 412(1)、70 ~ 81頁(1975)

【非特許文献 11】John P.Griffin and John O'Gradyにより編集されたThe textbook of Pharmaceutical Medicine、第5版

【非特許文献 12】REMINGTON;THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY、上記、780 ~ 820頁

【非特許文献 13】the American Society for Reproductive Medicine(ASRM) classification system for various stages of endometriosis、Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis:1996、Fertil Steril 1997;67、817 ~ 821頁

30

【非特許文献 14】Remington's Pharmaceutical Sciences第15版(Matt Publishing Company、1975)、1405 ~ 1412頁及び1461 ~ 87頁

【非特許文献 15】USP-NF、The National Formulary XIV第14版(American Pharmaceutical Association、1975)

【非特許文献 16】Skoog West and Holler、Fundamentals of Analytical Chemistry、第5版

【非特許文献 17】Wolfenson C.et al.2005、Batch-to-batch consistency of human-derived gonadotropin preparations compared with recombinant preparations.Reproductive BioMedicine.Vol 10 No.4:442 ~ 454頁

40

【非特許文献 18】Shen、S.T.、Cheng、Y.S.、Shen、T.Y.、and Yu、J.Y.2006、Molecular cloning of follicle-stimulating hormone(FSH)-beta subunit cDNA from duck pituitary.Gen.Comp Endocrinol.148:388 ~ 394頁

【非特許文献 19】Fox、K.M.、Dias、J.A.、and Van、R.P.2001、Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone.Mol.Endocrinol.15:378 ~ 389頁

【非特許文献 20】Burova、T.、Lecompte、F.、Galet、C.、Monsallier、F.、Delpech、S.、Haertle、T.、and Combarous、Y.2001、Conformational stability and in vitro bioactivity of porcine lutenizing hormone.Mol.Cell Endocrinol.176:129 ~ 134頁

【非特許文献 21】Alevizaki、M.and Huhtaniemi、I.2002、Structure-function relationships of glycoprotein hormones;lessons from mutations and polymorphisms of the

50

thyrotrophin and gonadotropin subunit genes. Hormones. (Athens.) 1:224 ~ 232頁

【非特許文献22】Meyer, B.K., Ni, A., Hu, B., and Shi, L. 2007, Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present. J. Pharm. Sci. 96:3155 ~ 3167頁

【非特許文献23】Chang, B.S. and Hershenson, S. Practical Approaches to Protein Formulation Development. In Rational Design of Stable Protein Formulations. J.F. Carpenter and M.C. Manning, editors. 2002, Plenum Publ., New York. 1 ~ 25頁

【非特許文献24】Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. 2000, CRC Press, Boca Raton

【非特許文献25】Handbook of Pharmaceutical Excipients. 2015, Pharmaceutical Press, ロンドン 10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

したがって本発明の目的は、安定である、1つ又は複数のゴナドトロピン、特に任意選択でFSHと組み合わせてhCGを含む組成物の製剤、特に液状製剤を提供することである。本発明の更なる目的は、このような製剤の安定化のための方法を提供することである。別の目的は、保存状態で、即ち室温で、12カ月、好ましくは24カ月、更により好ましくは24カ月に加えて1カ月の「使用期間」にわたり安定であるような製剤を提供することである。

【課題を解決するための手段】

20

【0017】

本発明は、安定な液状ゴナドトロピン製剤に関する。好ましい実施形態では、これらの製剤はhCGを含む。更なる好ましい実施形態では、この製剤はFSHとhCGの両方を含む。本発明の製剤中のゴナドトロピンは尿由来又は血漿由来であることが好ましいが、代替実施形態では組換えによって生成することができる。

【0018】

以下において、用語「hMG」は「尿由来ゴナドトロピン」と同義的に使用されるものとする。主として、尿由来ゴナドトロピンはヒトの尿に由来する。

【0019】

ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)は、現在承認されている医薬品表示を担うLH(黄体形成ホルモン)活性に貢献する。これは周知の事実であり、本発明で特許請求するのと同じ表示を許可された、Menopur(登録商標)製品のようなhMG調製物のSmPCの一部として記載されている。これらのSmPCにおけるMenopur(登録商標)はFSH及びLH活性を含むが、hCGがLH活性の少なくとも一部を担うことが追加的に確認されている。したがって、本発明の文脈におけるhCGに対する任意の言及は、hCGに起因するLH活性を含む製剤を包含する。

30

【0020】

好ましい実施形態は以下の実施形態である：

【0021】

1. ゴナドトロピン、50 ~ 160mMの量のアルギニン、及び0.05 ~ 1.5mg/mlの量のメチオニンを含み、追加的バッファーを含まない液状医薬ゴナドトロピン製剤であって、製剤のpHが6.0と7.5の間である、液状医薬ゴナドトロピン製剤。

40

【0022】

2. ゴナドトロピンがhCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)、及び任意選択でFSH及び/又はLHを含む、項目1に記載の医薬製剤。

【0023】

3. ゴナドトロピンがhMG(ヒト閉経期ゴナドトロピン)を含む、項目1又は2に記載の医薬製剤。

【0024】

4. ゴナドトロピン(FSH、LH及び/又はhCG等)がヒト起源及び尿由来である、項目1から3のいずれか一項目に記載の医薬製剤。

50

【 0 0 2 5 】

5. ゴナドトロピン(FSH、LH及び/又はhCG等)が組換え型である、項目1から3のいずれか一項目に記載の医薬製剤。

【 0 0 2 6 】

6. 防腐剤、好ましくはフェノールを追加的に含む、項目1から5のいずれか一項目に記載の医薬製剤。

【 0 0 2 7 】

7. 界面活性剤、好ましくはポリソルベート、更により好ましくはポリソルベート20を追加的に含む、項目1から6のいずれか一項目に記載の医薬製剤。

【 0 0 2 8 】

8. 防腐剤、好ましくはフェノールが4~6mg/mlの量、好ましくは5mg/mlの量で存在する、項目6又は7に記載の医薬製剤。

10

【 0 0 2 9 】

9. 界面活性剤、好ましくはポリソルベート20が0.001~0.05mg/mlの量、好ましくは0.005mg/mlの量で存在する、項目7又は8に記載の医薬製剤。

【 0 0 3 0 】

10. アルギニンが好ましくはL-アルギニンHClである、項目1から9のいずれか一項目に記載の医薬製剤。

【 0 0 3 1 】

11. hMGが300~900、より好ましくは500~700、更により好ましくは600~650、非常に好ましくは625IU/mlの量で存在する、項目1から10のいずれか一項目に記載の医薬製剤。

20

【 0 0 3 2 】

12. - 625IU/mlのhMG
 - 0.15mg/mlのメチオニン
 - 150mMのアルギニン
 - 5mg/mlのフェノール
 - 0.005mg/mlのポリソルベート20
 - 注射用水(WFI)からなり、
 - 6.8+/-0.3のpHを有する、項目1から11のいずれか一項目に記載の医薬製剤。

【 0 0 3 3 】

13. 不妊症の治療法において使用するための、項目1から12のいずれか一項目に記載の液状医薬製剤。

30

【 0 0 3 4 】

14. 治療が排卵誘発(OI)、生殖補助医療(ART)、及び/又は男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の治療である、項目13に記載の使用のための医薬製剤。

【 0 0 3 5 】

15. hMGを含む液状医薬製剤の安定化のための方法であって、
 - ヒト女性由来の尿試料を提供する工程、
 - hMGを抽出する工程、
 - 項目1から14のいずれか一項目に規定の量で、アルギニン及びメチオニンを用いて前記抽出物を調合する工程、
 - 任意選択で、項目1から14のいずれか一項目に規定の量のフェノール及びポリソルベートを更に加える工程、
 - pHを調節して6.0と7.5の間のpHを有する製剤を得る工程
 を含み、
 - 追加的バッファーを加えない、方法。

40

【 0 0 3 6 】

前に記載したように、ゴナドトロピン、例えばFSH及びhCG並びにLHは不妊症の治療に適している。その点において、これらゴナドトロピンの液状製剤が不安定であり得ることが明らかになっている;これは一回使用向きであるこれらのゴナドトロピンにさえも当ては

50

まる。液状製剤が、例えば全多用量製剤用に処方された防腐剤を含む場合、不安定性はより一層顕著であり得る。

【0037】

本発明の製剤は、それぞれ一回使用向き又は多用量での使用向きであってよい。

【0038】

本発明の製剤中に製剤化されたFSHは、尿由来若しくは血漿由来又は組換えFSH(rFSH)であり得る。好ましい実施形態では、FSHは尿由来又はrFSHであり、尿由来FSHであることが特に好ましい。

【0039】

前述のように、FSH、LH又はhCGのようなゴナドトロピンを組換えによって生成することが現在可能である。したがって、他に指定しない限り、一般的にここでのゴナドトロピンに対する言及は、尿由来又は血漿由来、及び組換え(r)ゴナドトロピンを常に含む。したがって、例えば「FSH」に対する言及はrFSHも包含する。FSH、hCG及びLHの生成及びアミノ酸配列並びに核酸配列は、当業者周知である。

10

【0040】

本発明の文脈において使用することができる配列は以下の通りである：

【0041】

FSH、LH及びhCG サブユニット(配列番号1)

(Fiddes、J.C.and Goodman、H.M.The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones J.Mol.Appl.Genet.1(1)、3~18頁(1981)も参照)

20

【0042】

【化1】

MDYYRKYAAIFLVTLSVFLHVLHSAPDVQDCPECTLQENPFSSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNV
TSESTCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS

【0043】

(下線を引いた部分はリーダーペプチドである)(116)

【0044】

FSH サブユニット(配列番号2)

(Saxena、B.B.and Rathnam、P.Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands J.Biol.Chem.251(4)、993~1005頁(1976)も参照)

30

【0045】

【化2】

MKTLOQFFFLFCCWKAICCNSELTNITIAIEKEECRFCSINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKELVYETVR
VPGCAHHADSLYTYPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEMKE

【0046】

(下線を引いた部分はリーダーペプチドである)(129)

【0047】

hCG サブユニット(配列番号3)

(Fiddes、JC、Goodman HM.The cDNA for the beta-subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region Nature.1980 Aug 14;286(5774):684~7頁も参照)

40

【0048】

【化3】

MEMFOGLLLLLLLSMGGTWASKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT MTRVLQGVLP
ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV SYAVALSCQC ALCRRSTTDC GGPKDHPLTC DDPFRQDSSS
SKAPPPSLPS PSRLPGSDT PILPQ

【0049】

(下線を引いた部分はリーダーペプチドである)(165)

【0050】

LH サブユニット(配列番号4)

(Sairam, M.R. and Li, C.H. Human pituitary lutropin. Isolation, properties, and the complete amino acid sequence of beta-subunit Biochim. Biophys. Acta 412(1), 70 ~ 81頁(1975)も参照)

【0051】

【化4】

MEMLOGLLLLLLLSMGGAWASREPLRPWCH PINAILAVEKEGCPVCITVN
TTICAGYCPTMMRVLQAVLPPLPQVVCTYRDVRFESIRLP GCPRGVDPVVSFPVALSCRCGPCRSTSDC
GGPKDHPLTC DHPQLSGLLFL

【0052】

(下線を引いた部分はリーダーペプチドである)(141)

20

【0053】

代替実施形態では、全実施形態のrFSH又はrHCGがそれぞれ長期作用型rFSH又はrhCGである。例えば、このような長期作用型FSH製剤は、一般的に当業者公知のように、例えばFSH分子の修飾によって、又は製剤の修飾によって得ることができる。

【0054】

したがって本明細書で使用する「FSH」は、全ての考えられる尿由来又は組換え型の前述のFSH、及び全ての考えられるFSH型の組合せを包含する。一回使用の製剤、及び多用量での使用の(同じ又は異なるゴナドトロピンの)1つ又は複数の更なる製剤も包含される。

【0055】

1つの考えられる製品は、いずれも異なる容器中に存在する、FSHを含む(好ましい実施形態では、hCG、及び/又は任意選択でLH、LH活性等も含む)製剤であり得る。LH活性は、存在する場合、LH又はhCGに由来し得る。LHは当量のhCGに置き換えることができ逆も然りである;その文脈での「当量」は当技術分野で周知のように計算することができる。

30

【0056】

特に好ましいゴナドトロピンの組合せは、好ましくは1容器内、ただし例えば任意選択で更に、例えばバイアル又はカートリッジのような異なる容器内のhMG製剤としての、FSHとhCGの組合せである。

【0057】

異なる容器内に与えることもできる、考えられる組合せは、(u)FSHとuhCG又はuFSHとuLH、更に(rhCG又はrLH又はrFSH)と(uhCG又はuLH又はrhCG又はrLH)、これら全ての考えられる並べ替えも含む。非常に好ましい実施形態では、本発明の製剤はFSH及びhCGを含む。別の同様に好ましい実施形態では、本発明の製剤はhCGを含む。

40

【0058】

本発明のゴナドトロピン製剤は液状製剤である。製剤は注射用であることが好ましい。別々又は一緒に投与するための、FSH又はFSH/hCG、及び/又はLHを含む1つ、2つ又はそれより多くの医薬組成物を有する製品として、製剤を供給することができる。別々に投与する場合、投与は逐次的であってよい。製品は任意の適切なパッケージに供給することができる。例えば製品は、FSH(FSH組成物)、又は追加的にhCG(hCG組成物)をそれぞれが含む幾つかのプレフィルドシリンジを含有することができ、例えばシリンジをプリスターパッケージ又は他の手段中にパッケージ化して、滅菌状態を維持することができる。製品は、ゴ

50

ナドトロピン製剤の使用に関する説明書を任意選択で含有することができる。

【0059】

更なる態様によれば、多用量投与調製物として本発明のゴナドトロピン製剤を提供する。しかしながら本発明は、一回使用向きの製剤も明らかに対象とする。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、一日用量の1つ又は複数のゴナドトロピン、例えばFSHを含む少なくとも1つの容器、又は例えばそれぞれがhCGのような異なるゴナドトロピンを含む2つの容器(例えばバイアル)、及び例えば更なる(例えば投与に関する)説明書、及び例えば注射のための更なる手段を含む。好ましい実施形態では、多用量注射用の注射ペンを使用し、ゴナドトロピン溶液をそれぞれのカートリッジ中に充填する。活性成分は異なるカートリッジ中に存在し得るが、当業者周知のように、当然ながら同時に、又は連続的に注射することができる。更に、2つ以上の活性成分が1つの同じカートリッジ内に存在し得る。

10

【0060】

非常に好ましい実施形態では、本発明の製剤は非経口的に使用するためのものであり、皮下注射用であることが更により好ましい。

【0061】

好ましい実施形態では、製剤中、典型的には多用量製剤中に、hMGが35~850IU/ml、好ましくは50~800IU/ml、更により好ましくは100~700IU/ml、最も好ましくは625IU/mlの量で存在する。

【0062】

前述のようにhMGを含む、及び/又は本発明において以下に言及するようにhMG、及び/又はhCG、及び/又は他の全てのゴナドトロピンを含む、多用量製剤に特に好ましい賦形剤製剤は、以下の組成を有する：

20

50~160mMのアルギニンHCl、好ましくは150mMのアルギニンHCl

0.05~1.5mg/ml、好ましくは0.15mg/mlのL-メチオニン

0.001~0.05mg/ml、好ましくは0.005mg/mlのポリソルベート20

4.0~6.0mg/ml、好ましくは5.0mg/mlのフェノール

pH6.0~7.5、好ましくはpH6.8+/-0.3、(このpHは溶液全体のpHを指す)

WFI。

【0063】

組換えhCG及び/又はFSHを含む製剤に関する活性成分の典型的濃度は以下の通りであるが、活性成分の濃度は本発明の性能に如何なる影響も与えない：

rFSHに関して：30~150 µg/ml

rhCGに関して：5~200 µg/ml

30

【0064】

このような組換え製剤に好ましい賦形剤は、多用量hMG製剤に関して前に記載したものと同じである。典型的な一回用量製剤も本発明中に包含され、それらがフェノールのような防腐剤を含まないこと以外、前に記載したものと同じである。

【0065】

注射用デポ剤形を、生分解性ポリマー中にゴナドトロピン(及び存在する場合、他の作用物質)のマイクロカプセル化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。ポリマーベースのデポ剤形/徐放系は、それらの化学的性質に応じて、例えばマイクロ又はナノ粒子、ヒドロゲル、ミセル、エマルジョン又はインプラントであってよい。ゴナドトロピンとポリマーの比及び利用する個々のポリマーの性質に応じて、ゴナドトロピン放出率を制御することができる。生分解性ポリマーの例には、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(NaHA)又はその他の塩、ゼラチン、キトサン等がある。全ての前述のポリマーは誘導体化又は修飾して、タンパク質薬物送達又はその安定性を最適化することができる。デポ注射用製剤は、身体組織と適合性がある脂質系、又はミセルとしてのポリマー脂質混合物、リポソーム

40

50

又はマイクロエマルジョン中へのゴナドトロピンの捕捉によっても調製される。

【0066】

注射用製剤は、例えば細菌捕捉フィルターを介した濾過によって、及び/又は滅菌剤の取り込みによって滅菌することができる。使用の直前に滅菌水又は他の滅菌注射用媒体中に溶解又は分散し得る、滅菌固形組成物を形成することができる。注射用製剤は、前に記載したように、任意の適切な容器、例えばバイアル、プレフィルドシリンジ、注射カートリッジ等の中に供給することができる。

【0067】

本明細書に記載する医薬組成物として使用するための製剤の、様々な成分のpH及び正確な濃度は、主に当技術分野の慣例的な実施に従い調節され、例えば、John P.Griffin and John O'Gradyにより編集されたThe textbook of Pharmaceutical Medicine、第5版を参照されたい。好ましい実施形態では、本発明の組成物は非経口投与用組成物として供給される。非経口製剤の調製に関する一般的な方法は当技術分野で公知であり、REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY、上記、780~820頁に記載される。非経口投与組成物は液状製剤中に、又は投与直前に滅菌注射用媒体と混合される固体として供給することができる。とりわけ好ましい実施形態では、非経口投与組成物は、投与しやすく用量が均一な単位剤形で供給される。

10

【0068】

本発明に従い製剤化することができるFSH、hCG及び/若しくはLHは、当技術分野で周知のように、従来の手段により尿から誘導することができ、又は組換えによって生成することができる。考えられる生成法に関しては、例えば更にWO2009/127826を参照されたい。

20

【0069】

本発明の好ましい一実施形態は、本明細書に記載するhCGを含む製剤である。

【0070】

当技術分野で公知の任意の手段によりhCGを得ることができる。本明細書で使用するhCGは、尿由来hCG及び組換えhCGを含む。尿由来hCGを含む製剤が特に好ましい。hCGに少なくとも一部は由来するLH活性を有する製剤も包含される(言い換えると:hCGはこのLH活性を担う分子である)。ヒト由来hCGは、当技術分野で公知の任意の方法によって、任意の適切な供給源(例えば、尿及び/又は胎盤)から精製することができる。組換えhCGの発現法及び精製法は当技術分野で周知である。

30

【0071】

当技術分野で公知の任意の手段によりLHを得ることができる。本明細書で使用するLHは、ヒト由来LH及び組換えLHを含む。ヒト由来LHは、当技術分野で公知の任意の方法によって、任意の適切な供給源(例えば尿)から精製することができる。組換えLHの発現法及び精製法は当技術分野で公知である。

【0072】

用語「医薬組成物」は、本明細書中「医薬製剤」と同義的に使用される。

【0073】

本発明の安定な医薬組成物は、不妊症の治療に使用することができる。本発明の文脈における「不妊症の治療」は、調節卵巢(過剰)刺激(COS)又は調節卵巢刺激の一工程若しくは段階を含む方法、例えば子宮内精子注入(IUI)、in vitro受精(IVF)、又は卵細胞質内精子注入(ICSI)による不妊症の治療を含む。この用語は、排卵誘発(OI)又は排卵誘発の一工程若しくは段階を含む方法も含む。この用語は、(the American Society for Reproductive Medicine(ASRM) classification system for various stages of endometriosis、Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996、Fertil Steril 1997;67、817~821頁によって定義された)エンドメトリオーシス、例えばステージI又はステージIIのエンドメトリオーシスがある対象、及び/又は男性要因不妊のパートナーを有する対象における不妊症の治療を含めた、卵管又は原因不明の不妊症がある対象における不妊症の治療も含む。この用語は、例えば生殖補助医療(ART)、排卵誘発(OI)又は子宮内精子注入(IUI)における使用を含むことが好ましい。医薬組成物は

40

50

、例えば医学的徴候において使用することができ、この場合周知のFSH調製物又はFSHとhCGの調製物が使用される。典型的実施形態では、以下のように欧州でMenopur(登録商標)に認められたそれらの徴候と同じ医学的徴候に、典型的症例において本発明の製剤を使用する。

【0074】

女性及び男性不妊症の治療:

- 無排卵状態の女性: MENOPURを使用して無月経患者における卵胞発達を刺激することができる。クロミフェン(又はステロイドフィードバック機構に影響を与える同様の排卵誘発剤)が、無排卵サイクル及び正常プロラクチンを伴う黄体期の機能不全を含めた様々な月経周期障害がある女性、及び更に正常プロラクチンと正常ゴナドトロピンレベルではなく内在性エストロゲン産生の痕跡がある無月経患者にも好ましい治療剤である。したがってノンレスポnderをメノトロピン治療に選択することができる。

- 医療受精補助プログラム内で過剰排卵を経る女性: MENOPURを使用して、in vitro受精(IVF)等の生殖補助医療を施す患者において多嚢胞発達を誘導することができる。

- 男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症: 精子形成を刺激するため、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(例えばコラゴン)と組み合わせてMENOPURを与えることができる。

【0075】

又は、以下のように、米国でMenopur(登録商標)に認められたような徴候:

【0076】

生殖補助医療(ART)サイクルの一部としての排卵期女性における多嚢胞発達及び妊娠。

【0077】

或いは、Menopur(登録商標)を用いた治療オプションは、以下のように記載することができる:

【0078】

MENOPURは、以下の臨床状況における不妊症の治療のために示される:

クエン酸クロミフェンを用いた治療に応答していない女性における多嚢胞性卵巢疾患(PCOD)を含めた無排卵状態。

【0079】

生殖補助医療(ART)の多嚢胞発達を誘導するための調節卵巣過剰刺激(例えば、in vitro受精/胚移植(IVF/ET)、配偶子卵管内移植(GIFT)及び卵細胞質内精子注入(ICSI))。

【0080】

低ゴナドトロピン性性腺機能低下症がある女性における卵胞発達の刺激。

【0081】

本発明は、不妊症治療用の医薬品を製造するための、又はその製造における、本明細書に記載する(本発明の態様による)安定化ゴナドトロピン製剤の使用も提供する。

【0082】

好ましい実施形態では、本発明の製剤を、排卵誘発、生殖補助医療(ART)及び/又は男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症に使用する。

【0083】

医薬組成物は、任意の経路の薬物投与、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、槽内、腔内、腹腔内、局所(粉末、軟膏又はドロップ)、又は口腔若しくは鼻腔スプレーとして、周知の組成物に更に製剤化することができる。Remington's Pharmaceutical Sciences第15版(Matt Publishing Company、1975)、1405~1412頁及び1461~87頁、及びUSP-NF、The National Formulary XIV第14版(American Pharmaceutical Association、1975)に記載されたように、典型的組成物は、水溶液等の薬学的に許容される担体、塩及び防腐剤、バッファー等を含めた非毒性賦形剤を含む。本発明は、幾つかの実施形態では、高い安定性を示すことと、許容されない着色がないこと、許容されない濁度がないこと、注射時の痛みの低減又は無痛、及び注射時の皮膚炎症の低減又は無炎症のような更なる利点の両方を驚くことに示す製剤の具体的提供を対象とする。これは、特定成分が本明細書に記載する液状ゴナドトロピン製剤の有利な性能及び高い安

10

20

30

40

50

定性を可能にするという、本発明の発見によってのみ可能となっている。

【0084】

ゴナドトロピン製剤は現在数十年にわたって市販されているが、製剤科学者は、これらのタンパク質の製剤は幾つかの難点を伴うことを充分認識している。これらの難点は、以下のような多くの要因に基づいて存在し非常に多様である。

- タンパク質が製剤化されるという事実(このようにタンパク質は如何なる場合も製剤化するのが困難である)

- タンパク質が特異的にグリコシル化されるという事実(グリコシル化は製造及び賦形剤の具体的選択によって影響を受ける可能性がある)

- 製剤化される特定のタンパク質(製剤化学は実際のタンパク質に応じて著しく変化する:例えば、FSHとhCGのような密接に関連したタンパク質でさえ同じ製剤において異なる挙動を示すことが示されている。例えばWO2012/013742を参照)

- タンパク質が天然、例えば尿から得られたかどうか、又は組換えによって生成されたかどうか

- 防腐剤が必要とされるかどうか(幾つかの防腐剤は微生物増殖に対してそれらの意図する保護目的を果たすが、最終製剤の安定性に悪影響を与える。これは、現在ゴナドトロピンとの使用に認められた唯一の防腐剤である、m-クレゾール、フェノール及びベンジルアルコール(塩化ベンザルコニウムを含むか又は含まない)の全てに当てはまり、更に防腐剤は、製剤中に含まれる更なる賦形剤及び活性成分に応じて、着色に悪影響を与える可能性がある)

- 使用する具体的な界面活性剤(これらは幾つかの場合、ここでも各製剤中に含まれる更なる賦形剤に応じて、濁りをもたらす可能性がある)

- 使用する具体的なバッファー(例えば、クエン酸バッファーは注射時に痛み及び皮膚炎症をもたらすことが多い)

- 安定化のために使用する具体的な賦形剤、これらは予測不能な形式で異なる組成物を安定させる。

- 予測不能な形式で異なる組成物を安定させる安定化に使用する賦形剤に対する依存。

【0085】

したがって製剤科学者は、一方で優れた安定性を有する製剤の提供及び他方で無着色又は濁り又は注射時の痛みに関する複雑な問題をもたらす、一方で一連の複数の問題及び他方で一連の複数の考えられる賦形剤に直面する。

【0086】

したがって、バッファーの添加がない本発明のアルギニンとメチオニンの組合せが、本発明のpH範囲内で、これらの特定の問題を解決したことは非常に驚くべきことであった。

【0087】

この点において、「(バッファーの添加なし/追加的バッファー含まず)」と「バッファーを含まない」は本出願中では同じ意味で使用される。この表現は、追加的化合物が、緩衝能を有すると考えられる製剤中に加えられない/存在しないことを意味するものとする。

そのイオンの活性を変えると予想される物質の添加時にイオンの活性の変化の影響を受けにくい場合、溶液はバッファーであると言える。バッファーは、溶液にこの耐性を与える物質又は物質の組合せである。緩衝溶液は、イオンを除去又は放出することができる物質とイオンが平衡状態にある系である。それは、イオン活性の著しい変化を引き起こさずに溶液に加えることができる材料の量を指す。それは、加える酸又は塩基(グラム当量/L単位)とpH単位の変化の比として定義される。緩衝溶液の能力は、通常はバッファー物質の濃度の調節によって使用条件に調節する(USPNF)。緩衝能は、(好ましくは1気圧及び21

で)問題の1リットル溶液がpHの1単位変化を引き起こす強酸(例えばHCl)又は塩基(例えばNaOH)の当量数(Eq)として一般に表される(Skoog West and Holler, Fundamentals of Analytical Chemistry, 第5版)。1当量のHClは1モルのHClに等しく、1当量のNaOHは1モルのNaOHに等しい。本発明中、緩衝能は、問題の1リットル溶液がpHの1単位変化を引き起こ

10

20

30

40

50

す強酸(例えばHCl)又は塩基(例えばNaOH)の当量数(Eq)として表される。したがって本発明によれば、製剤は、本発明の製剤に関して開示するpH範囲内(好ましくは1気圧及び21で) 0.5mEq/(リットル×pH)に貢献する追加的バッファーを含まないものとする。

【0088】

緩衝能を測定し計算するための方法

緩衝能は以下のように測定し計算することができる。

【0089】

試験しようとする一定体積の溶液を、酸、例えばHCl又は塩基、例えばNaOHで滴定する。適切な濃度の酸及び塩基、例えば0.2Nを使用して充分正確な滴定を行わなければならない。

10

【0090】

滴定は、少量のHCl又はNaOHを試験溶液に加えることによって実施する。それぞれの添加に関して、加えた体積と対応するpHを記録する。

【0091】

酸と塩基の累積体積を測定したpHに対してプロットする、例えば図1を参照されたい。最小二乗法線形回帰分析を関連pH領域に実施し、 R^2 を計算し適合直線の妥当性を確認する。

【0092】

mEq/(リットル×pH単位)で表す緩衝能は線形回帰によって計算する。

等式1

20

【0093】

【数1】

$$Y = ax + b \Leftrightarrow x = \frac{Y - b}{a}$$

【0094】

式中、

x=緩衝能[pHを1pH単位変化させるための0.2N HCl/NaOHの μ L]

Y-b=1pH単位

a=勾配

及び

等式2

30

【0095】

【数2】

$$x = \frac{(Y - b) \times C}{a \times V \times 10^6}$$

【0096】

式中、mEqは、200mEq/LHCl/NaOHに等しく0.2当量/LHCl/NaOHに等しい濃度、例えば0.2N HCl/NaOHから与えられる酸又は塩基のミリ当量である。

x=緩衝能[mEq/リットル×pH単位]

Y-b=1pH単位

C=酸又は塩基の、例えばHCl/NaOHに関する濃度

40

【0097】

【数3】

$$\left[\frac{\text{mmol}}{\text{L}} = \frac{\text{mEq}}{\text{L}} \right]$$

【0098】

V=問題の溶液の体積

10^6 μL からリットルの補正係数

Table 9(表9)からの等式2及びバッチC-01_{pH範囲 6.564 ~ 6.947}を使用した計算の例:

【0099】

10

【数4】

$$x = \frac{1 \times 200}{0.001507 \times 0.1 \times 1000000} = 1.32 \text{ mEq}/(\text{リットル} \times \text{pH単位})$$

【0100】

ある成分が $0.5\text{mEq}/(\text{リットル} \times \text{pH単位})$ で緩衝能に貢献するかどうか測定するため、その成分を含む溶液及びその成分を含まない同じ溶液に関して、前に記載したように緩衝能を測定する。2つの溶液に関して測定した緩衝能の差は緩衝能に対する所与の成分の貢献を示す。

20

【0101】

用語「(バッファの添加なし/追加的バッファ含まず)」と「バッファを含まない」は、本発明の製剤が、(pH6.0~7.5の範囲内で非経口的使用に関してFDAに承認されたバッファである)以下のバッファのいずれも含まないことも意味する:

ヒスチジン

ホスフェート

シトレート

トロメタミン(Tris)

ヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)

カルボネート

30

【0102】

更にこの用語は、非経口的使用に関してFDAに承認された更なるバッファ、特に

アセテート

アジピン酸

硫酸アンモニウム

スクシネート

アスパラギン

アスパラギン酸

グルタメート(グルタミン酸)

グリシン

40

ラクテート

リシン

マレエート(マレイン酸)

フマレート(フマル酸)

マレート

メグルミン

プロピオネート

アラニン

フェニルアラニン

システイン

50

イソロイシン
ロイシン
プロリン
セリン
タートレート
スレオニン
トリプトファン
チロシン
バリン

のいずれも含まれないことも意味する。

10

【0103】

バッファの無添加状態では、最終溶液のpHは所望範囲内で容易に維持できず(調節中に具体的標的pHに到達するのは困難である)と通常想定されるが(本発明中、pHは6.0と7.5の間、より好ましくは6.5と7.4の間、好ましくは6.8又は約6.8でなければならない)、pHは激しく変動し得る。

【0104】

医薬品に適したpHを維持することは非常に重要である。pHは、安定性、活性及び貯蔵寿命のようなパラメーターを定義する。その理由で、医薬製剤は通常バッファを用いて製剤化する。様々な緩衝剤が利用可能であり、それらは所望のpHで有効であるように選択される。あらゆる既存のゴナドトロピン製剤で実際に通常使用される例示的バッファは、リン酸バッファ、及びクエン酸バッファである。バッファは、製剤化中、及び特にその保存中に製剤が曝され得る条件範囲内にわたり、pHが維持された製剤を提供する必要がある。このような適切なバッファを見つけるのは非常に困難であることが多く、したがって幾つかの場合、有効なバッファは、クエン酸バッファに関して注射時の痛みのような望ましくない副作用を有する製剤を提供する。全てのバッファには、それらが製剤中の追加的成分であるという固有の欠点があり、それによって製剤化プロセスが複雑になり、他の成分、安定性、貯蔵寿命、及びエンドユーザーの容認性に悪影響を与えるリスクを有する。

20

【0105】

本発明者らは、しかしながら驚くことに、バッファが存在せず一方で製剤が如何なる許容不能なpH変動も被らない製剤を提供している。製剤は安定剤化合物としてアルギニンを含む。アルギニンは、2.17、12.5及び9.04であるそのpKa付近で ± 1 pH単位の予想緩衝能を有し得る。したがって、本発明の好ましいpH範囲(例えば6.0と7.5の間、より好ましくは6.5と7.4の間、好ましくは6.8又は約6.8)で緩衝能は予想されなかった。それにもかかわらず、アルギニンが本明細書に記載する特定の製剤におけるpHに対して強い安定化影響を有することが、驚くことに発見された。アルギニンのこのような影響は従来技術中のどこにも記載されていない。

30

【0106】

有利なことに、本明細書で定義するバッファを含まないこの製剤の提供によって、注射時の痛みの低減又は無痛、及び注射時の皮膚炎症の低減又は無炎症がある製剤を更に提供する。これは、例えば注射時の皮膚炎症及び痛みをもたらすことが示されているクエン酸バッファを使用する製剤とは逆である。

40

【0107】

本発明のアルギニンはアルギニンであってよく、又はアルギニンHCl、又は更により好ましくはL-アルギニン(HCl)であってよい。アルギニンの量は、好ましくは50mMと160mMの間、より好ましくは80~160mMの範囲、更により好ましくはおよそ150mMである。

【0108】

以下の実施例から見るように、アルギニンはFSH及びhCGの酸化に対して顕著な影響がある。しかしながら、本発明者らは特に高い安定化作用を示した。非常に驚くべきことに、本発明者らは、ゴナドトロピンを高安定量のアルギニン(例えば150mM)と組

50

み合わせた場合、安定であり最小の酸化のみを示した(許容可能レベル、以下の実施例セクション参照)液状ゴナドトロピン製剤を次いで提供することができた。

【0109】

これは特に驚くべきことであり、この作用はアルギニンのpKa値から非常に離れたpH範囲、即ちpH6.0~7.5のpH範囲内で得られたためである。これは本発明に好ましいpH範囲である。特に好ましい実施形態では、pHは6.5~7.4の範囲内である。更により好ましいのは6.5と7.2の間のpH範囲である。最も好ましいのは6.8+/-0.3のpHである。

【0110】

驚くことに、わずかな抗酸化量のメチオニン、好ましくはL-メチオニンが望ましくない酸化事象を予防することができた。この少量は0.05mg/mlほど少ない可能性はあるが、最大2.5mg/mlになる可能性がある。好ましい実施形態では、メチオニンの量は0.1mg/mlと1.5mg/mlの間である。更により好ましい実施形態では、メチオニンの量は0.1mg/mlと1mg/mlの間である。更により好ましい実施形態では、メチオニンの量は0.1mg/mlと0.5mg/mlの間である。最も好ましい実施形態は、0.15mg/mlのメチオニンである。高酸化力のアルギニンが、このような少量のメチオニンによって打ち消され打ち負がされ得ることは全く予想することができなかった。

【0111】

更に一層驚いたのは、他の公知の安定化剤、例えばかなり頻繁に添加され非常によく確立された安定剤であるスクロースより、はるかに一層顕著な安定化作用をアルギニンが有していたという発見であった。

【0112】

製剤は適切な水性及び非水性医薬担体、希釈剤、溶媒及び/又は賦形薬を含むことができる。適切な水性及び非水性医薬担体、希釈剤、溶媒又は賦形薬の例には、水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)、カルボキシメチルセルロース及びその適切な混合物、植物油(オリーブ油等)、並びにオレイン酸エチル等の注射用有機エステルがある。

【0113】

特に多用量製剤に関して、本発明において更に好ましいのは、防腐剤の添加である。非常に好ましいこの防腐剤はフェノールである。更に好ましい実施形態では、4.0~6.0mg/ml、好ましくは5.0mg/mlフェノールの濃度でフェノールを加える。驚くことにフェノールは、実施例セクション中に示したように、長時間の間にわたってさえ、この防腐剤の存在にもかかわらず着色をもたらさず非常に安定している点で、他の周知の防腐剤と比較して本発明の特定の製剤の状況でも有利である。

【0114】

本発明において更に好ましいのは、界面活性剤の添加である。非常に好ましいこの界面活性剤はポリソルベート、更により好ましくはポリソルベート20である。更なる好ましい実施形態では、ポリソルベート20を0.001~0.05mg/ml、好ましくは0.005mg/mlポリソルベート20の濃度で加える。有利なことに、ポリソルベート20と調合した本発明の製剤は、実施例セクション中に示したように、長時間の間にわたってさえ、この防腐剤の存在にもかかわらず濁りをもたらさず非常に安定している。

【0115】

組成物は、これらに限らないが、(更なる)防腐剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤等の、前に既に列挙したもの以外の更なる添加剤も含有し得る。抗菌剤及び抗真菌剤を、微生物の増殖を予防するために含めることが可能であり、これらは例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等を含む。更に、等張化剤を含むことが望ましい場合がある。しかしながら、本発明の製剤は追加のバッファーを含まない。

【0116】

幾つかの場合、持続性作用を実施するため、皮下又は筋肉内注射からの、FSH等のゴナドトロピン(及び存在する場合は他の活性成分)の吸収を遅らせることが望ましい。水溶性が低い結晶又は非結晶材料の液体懸濁液の使用によって、これを行うことができる。した

10

20

30

40

50

がって吸収率は溶解率に依存し、それはしたがって結晶の大きさと結晶の形態に依存し得る。或いは、非経口投与FSHの組合せ型の遅延型吸収は、油系賦形薬におけるFSHの組合せの溶解又は懸濁によって行われる。

【0117】

本発明によれば、液状ゴナドトロピン製剤の安定性に対する特定の化合物の影響を調べるための努力が、本発明者らによって尽くされ、ここでは、幾つかの化合物の安定化及び不安定化作用を調べた。更に本発明者らは、生成した製剤をその透明性、着色度、及び注射時の痛みに関して改善しようと努めた。

【0118】

用語「安定性」は、アミノ酸配列における共有結合修飾に関する化学的安定性を指すことができるが、タンパク質の安定性の文脈では、それは、共有結合切断を含まないタンパク質フォールディング状態(即ち天然状態)の変化に関する物理的安定性も指すことができる。本発明では用語「安定性」は、ゴナドトロピンの製剤、特にFSH及びhCGの生体安定性を指す。タンパク質製剤の物理的不安定性は、タンパク質分子が凝集して高次凝集体を形成することによって、モノマーへのヘテロ二量体の解離によって、又は本発明中に含まれる例えばFSHタンパク質(及び存在する場合は他の活性成分)の少なくとも1つの生体活性を低減する任意の他の立体配座変化によって、引き起こされる可能性がある。

【0119】

「安定な」溶液又は製剤は、内部タンパク質の凝集、解離、立体配座修飾、生体活性の消失等の程度が許容範囲内で制御され、時間と共に許容不能なほど増大しない溶液又は製剤である。試料の光散乱の測定、透明性及び/若しくは着色の目視検査、吸光度、又は光学濃度、(例えば、サイズ排除クロマトグラフィー又はフィールドフローフラクショネーション(field flow fractionation)による)分子量測定、in vitro又はin vivo生体活性測定及び/又は示差走査熱量測定(DSC)を含めた、当技術分野で周知の方法によって安定性を評価することができる。

【0120】

本発明の製剤は、保存状態で12カ月、好ましくは保存状態で16カ月、更により好ましくは24カ月、更により好ましくは保存状態で24カ月に加えて1カ月の「使用期間」、即ち室温で安定である。「保存状態」における安定性は、冷却環境、例えば5 ± 3 °Cでの製剤の保存を指す。本発明の文脈における「室温」は30 °C以下、好ましくは15 ~ 25 °C、好ましくは18 ~ 25 °C、最も好ましくは25 ± 2 °Cを指すことを意味する。

【0121】

本発明の製剤の文脈における安定性を測定するため、周知のFSH及びhCG用の(イムノ)アッセイを使用し、これらは当業者周知であり、したがって本明細書には以下の一般的用語のみを記載した:

【0122】

酸化用のRP-HPLC

タンパク質の酸化をRP-HPLCによって、C4カラムでの勾配溶出及び210nmにおけるUV検出によって測定した。

【0123】

酵素結合蛍光アッセイ(ELFA)

FSH及びhCGの免疫活性を、それぞれFSH及びhCGに対応するオートマチックアナライザーVIDAS(登録商標)装置(BioMerieux社、フランス)及びVIDAS(登録商標)キットを使用して実施した、サンドイッチイムノアッセイで測定した。

【0124】

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)

rFSHの純度を、タンパク質範囲3 ~ 70kDaでのSECカラム及び210nmにおけるUV検出でサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって測定した。

【0125】

疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)

10

20

30

40

50

rhCGの純度を、カラムでのアルキルアミド基の勾配溶出及び220nmにおけるUV検出によって、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)を用いて測定した。

【0126】

FSH及びLHのバイオアッセイ

FSH及びLHの効能を、生物学的in vivoアッセイ、それぞれSteelman-Pohley(FSH)及び精嚢重量増加アッセイ(LH)を使用して測定した。

【0127】

安定性を評価するための他の方法は当技術分野で周知であり、本発明に従い使用することもできる。

【0128】

FSH及びLH活性のアッセイは、世界保健機構のthe Expert Committee on Biological Standardization(WHOのECBS)によるthe Fourth International Standard for Urinary FSH and Urinary LH、2000年11月を使用して標準化されており、当業者周知である。

【0129】

幾つかの防腐剤は、ゴナドトロピン製剤に対して顕著な不安定化作用があることが公知であり、ここで驚くことに、特にアルギニンとメチオニンを含みバッファーを含まない記載される本発明の製剤は、長期にわたる場合でも、更にフェノールの存在下でも、特に安定していたことが発見された。

【0130】

本明細書で特許請求するアルギニンとメチオニンの組合せは、例えばスクロースのような既知の安定剤の安定化作用より更に一層顕著な有利且つ驚くべき様式で、液状hMG製剤に対して安定化作用がある。スクロースのような既知の安定剤と比較して改善された安定化作用は、特に驚くべきことである。更に、非常に予想外ではあるが、本発明の組合せの安定化作用はバッファーの非存在にもかかわらず顕著であった。

【0131】

医薬FSH製剤中に存在するFSHの分解があることが従来技術から公知であり、これはW02012/013742中に提供された実施例によって確認されている。FSHは時間の関数として、及び温度の関数としての両方で分解する。

【0132】

加熱によって生じる三次及び二次FSH構造の立体配座アンフォールディングは2つの状態の転移である(このときタンパク質凝集は限られる)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(四次構造の変化)と無関係の可能性がある。

【0133】

更に、従来技術では、ベンジルアルコール又はフェノールのような防腐剤を含有するFSHは、このような防腐剤が例えば液状FSH製剤における抗菌剤として必要とされるとき、FSH多用量製剤の安定性に明らかに負の様式で影響を与えることが明らかとなった。ここで、FSHの長期安定性は低減し、FSHの変性温度は低下し、既に変性した形態は防腐剤を含有しないFSH製剤より低レベルの二次構造を有する。

【0134】

本発明は更に、液状ゴナドトロピン製剤の安定化のための方法に関するものであり、この方法はバッファーを含まない前記製剤にアルギニンとメチオニンを加える工程を含む。

【図面の簡単な説明】

【0135】

【図1】 滴定曲線の図である。曲線の勾配は緩衝能を示し、例えば急勾配は低い緩衝能を示す。

【図2】 25の結果に基づくレスポンスオプティマイザー(response optimizer)の図である。垂線はL-アルギニンとL-メチオニンのレベルを示し、FSH及びhCGイムノアッセイにおける応答はY(IU/ml単位)として示す。 $R^2_{\text{HCG}}:92.15\%$ 及び $R^2_{\text{FSH}}:67.31\%$ 。

【発明を実施するための形態】

【0136】

10

20

30

40

50

全ての試験は追加的に実施したリアルタイムデータによって確認した。

【実施例】

【0137】

(実施例1)

1 背景及び導入部分

閉経後女性又は妊婦の尿由来のゴナドトロピンホルモンを含有する幾つかの異なる薬物製品、hMG(ヒト閉経期ゴナドトロピン)調製物等を不妊症の治療において使用する。hMGは卵胞刺激ホルモン(FSH)活性と黄体形成ホルモン(LH)活性を1対1の比で有する。

【0138】

FSH、LH及びヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)は複合糖タンパク質ホルモンのゴナドトロピンファミリーに属する。これらは α -サブユニットと β -サブユニットで構成されるヘテロ二量体である。92アミノ酸の α -サブユニットはこれら3つのゴナドトロピンに共通であり、 β -サブユニットは特有であり、それらにその異なる生物学的特徴を与える(Wolfenson C.et al.2005、Batch-to-batch consistency of human-derived gonadotropin preparations compared with recombinant preparations.Reproductive BioMedicine.Vol 10 No. 4:442~454頁;Shen、S.T.、Cheng、Y.S.、Shen、T.Y.、and Yu、J.Y.2006、Molecular cloning of follicle-stimulating hormone(FSH)-beta subunit cDNA from duck pituitary. Gen.Comp Endocrinol.148:388~394頁;Fox、K.M.、Dias、J.A.、and Van、R.P.2001、Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone.Mol.Endocrinol.15:378~389頁;Burova、T.、Lecompte、F.、Galet、C.、Monsallier、F.、Delpech、S.、Haertle、T.、and Combarnous、Y.2001、Conformational stability and in vitro bioactivity of porcine lutenizing hormone.Mol.Cell Endocrinol.176:129~134頁)。非共有結合性結合サブユニットの解離によって、糖タンパク質ホルモンは全てそれらの生体活性を失う(Alevizaki、M.and Huhtaniemi、I.2002、Structure-function relationships of glycoprotein hormones;lessons from mutations and polymorphisms of the thyrotrophin and gonadotropin subunit genes.Hormones.(Athens.)1:224~232頁)。

【0139】

LHとhCGは同じ受容体に結合し、したがって両方ともLH活性を有する。hMGにおいて、LH活性は大部分がhCGに由来している。

【0140】

本発明の目的は、皮下注射用の、液状製剤としてのゴナドトロピン製剤を開発することである。多用量注射用に、防腐剤の添加が典型的に必要なとされる(Meyer、B.K.、Ni、A.、Hu、B.、and Shi、L.2007、Antimicrobial preservative use in parenteral products:past and present.J.Pharm.Sci.96:3155~3167頁;Chang、B.S.and Hershenson、S.Practical Approaches to Protein Formulation Development.In Rational Design of Stable Protein Formulations.J.F.Carpenter and M.C.Manning、editors.2002、Plenum Publ.、New York.1~25頁;Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins.2000、CRC Press、Boca Raton)。

【0141】

一般に、タンパク質の天然(生体活性)構造は、その周辺、例えば製剤の組成、容器/閉鎖系、pH及び温度に対して非常に敏感なので、ゴナドトロピン用の適切な液状製剤を確認することは難題であり、異なる賦形剤をスクリーニングした。本発明の実験では、様々なhMG製剤の緩衝能及びリアルタイム安定性を、以下で詳細に記載するように、FSHイムノアッセイ、hCGイムノアッセイ、バイオアッセイ、酸化タンパク質の測定用RP-HPLC、滴定及びpHを使用して調べる。

【0142】

2 試験しようとする製品

2.1 材料

2.1.1 薬物物質(DS)

hMG-HP薬物物質(DS)はIstituto Massone S.A社によって製造された。アルゼンチンhMG

10

20

30

40

50

-HPDSは、Ferring Pharmaceuticals A/S社、コペンハーゲン、デンマークによる粉末として受領する。

【 0 1 4 3 】

薬物物質におけるFSH及びLHの生物学的活性の測定を、英国薬局方(BP)の最新版に従い実施した。望む場合、USP35バージョンに従いこの測定を実施することもできる。hMGにおけるFSH:LH生体活性は1:1であり、したがってFSHとLHの平均測定生体活性を薬物製品との調合に使用する。したがってhMGの濃度が例えば625IU/mlとして与えられるとき、それは625IU/mlのFSHと625IU/mlのLHの生体活性に等しい。

【 0 1 4 4 】

2.1.2 賦形剤

この実験中で使用した賦形剤の一覧をTable 1(表1)に記載する。

【 0 1 4 5 】

【表 1】

Table 1 賦形剤の一覧

名称	品質	製造業者
水酸化ナトリウムペレット	欧州薬局方、英国薬局方、日本薬局方、国民医薬品集	Merck
塩酸、燻蒸37%	欧州薬局方、英国薬局方、日本薬局方、国民医薬品集	Merck
クエン酸一水和物	欧州薬局方、英国薬局方、JPE、米国薬局方	Merck
オルト-リン酸85%	欧州薬局方、英国薬局方、JPE、国民医薬品集	Merck
クエン酸三ナトリウム二水和物	欧州薬局方、英国薬局方、JPE、米国薬局方	Merck
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	欧州薬局方、英国薬局方、JPE、米国薬局方	Merck
L-ヒスチジン	実験用EMPROVE(登録商標) 欧州薬局方、米国薬局方	Merck
L-メチオニン	米国薬局方、要項多数	J.T. Baker
L-アルギニン	欧州薬局方、米国薬局方	Merck
L-アルギニン一塩酸塩	Pharma等級、EP、日本薬局方、米国薬局方	Sigma-Aldrich
スクロース	実験用EMPROVE(登録商標) 欧州薬局方、英国薬局方、JPE、国民医薬品集	Merck
D-(+)無水トレハロース	≥99%, cGMP	Sigma-Aldrich
マンニトール	EMPROVE(登録商標) 欧州薬局方、英国薬局方、米国薬局方、JPE	Merck
ラクトース一水和物	欧州薬局方、英国薬局方、国民医薬品集、日本薬局方	Merck
グリシン	EMPROVE(登録商標) 欧州薬局方、英国薬局方、JPE、米国薬局方	Merck
塩化ナトリウム	EMPROVE、欧州薬局方、英国薬局方、米国薬局方	Merck
ポリソルベート20	欧州薬局方、国民医薬品集、JPE	J.T. Baker
ポロキサマー188	bio.Pharm.Production社、欧州薬局方、国民医薬品集に適合	Merck
フェノール	欧州薬局方、日本薬局方、米国薬局方	Merck
メタ-クレゾール	欧州薬局方、米国薬局方 非経口等級	Hedinger
Milli-Q水	-	Millipore

【 0 1 4 6 】

2.1.3 容器閉鎖系

安定性試験に関して、主なパッキング材料は、ラバーストッパー及びアルミニウム/ブ

10

20

30

40

50

ラスチックキャップを有するガラス製バイアル、又はラバープランジャー及びクリンピキャップを有するガラス製カートリッジであった。

【0147】

3 製造手順

3.1 調合

全ての製剤は実験室スケールで製造する。

【0148】

薬物製品溶液(DP)の調合のため、各賦形剤と薬物物質(DS)のストック溶液を連続的に混合する。hMGの添加及び最終体積への希釈の前に、必要な場合は各製剤のpHを調節する。全ての賦形剤とhMGのストック溶液はMilli-Q水中で調製する。

10

【0149】

3.2 滅菌濾過及び無菌充填

安定性に関する製剤をMillipore PVDF 0.22 µmフィルターで滅菌濾過する。滅菌濾過は、オートクレーブ材料を使用しLAFベンチにおいて実施する。

【0150】

充填は濾過後に実施する。容器に試料溶液を充填する。全てのバイアル及びカートリッジには、LAFベンチにおいて無菌様条件下で充填し、ラバーストッパー及びクリンピキャップでただちに密閉する。LAFベンチ外では、アルミニウム製フリップオフ(flip-off)キャップで充填バイアルを密閉する。

20

【0151】

4 保存条件

4.1 保存条件

薬物製品製剤を含有する容器を、 30 ± 2 / $65 \pm 5\%$ 相対湿度で最大3カ月、及び/又は 25 ± 2 / $60 \pm 5\%$ 相対湿度で最低限6カ月まで加速的条件で保存する。各保存温度で、容器は垂直位置で保存する。カートリッジは水平に保存する。全ての容器は光から保護する。

【0152】

5 分析法

試験中で使用した分析法を以下に記載する。

【0153】

5.1 滴定手順

前に記載したUSP-NFによれば、そのイオンの活性を変えると予想される物質の添加時にイオンの活性の変化の影響を受けにくい場合、溶液は緩衝溶液であると言える。バッファは、溶液にこの耐性を与える物質又は物質の組合せである。緩衝溶液は、イオンを除去又は放出することができる物質とイオンが平衡状態にある系である。緩衝能は、イオン活性の著しい変化を引き起こさずに溶液に加えることができる材料の量を指す。それは、加える酸又は塩基(グラム当量/L単位)とpH単位の変化の比として定義される。緩衝溶液の能力は、通常はバッファ物質の濃度の調節によって使用条件に調節する。緩衝能は、問題の1リットル溶液がpHの1単位変化を引き起こす強酸又は塩基の当量数(Eq)として一般に表され、本発明中で緩衝能の測定に使用した単位mEq/(リットル×pH)を与える。これは、1リットルバッファ溶液のpHを1単位変えるのに必要とされる H^+/OH^- のモル数(当量)として、緩衝能が定義されることを意味する。

30

40

【0154】

緩衝能は、開始地点として標的pHに調節したプラセボ製剤を使用して測定した(プラセボはここでは活性成分を含まない製剤を指す)。0.2N NaOH/HClを使用してpHを上下に滴定した。pHは0.2N NaOH/HClの各添加後に測定し、0.2N NaOH/HClの体積を記録した。0.2N NaOH/HClの量はX軸の値としてプロットし、pHはY軸の値としてプロットした。適合線形回帰分析を、hMGプラセボに関してはpH6.8付近(標的pH)及び参照プラセボに関してはpH6.5付近(標的pH)で実施した。緩衝能は、前の定義中に記載したように、pHを0.01pH単位/LDP移動させるための μL 0.2N HCl/NaOHとして、及びミリ当量(mEq)酸又は塩基/(リットル×pH単位)として計算することができる。

50

【 0 1 5 5 】

5.2 FSH及びhCGのイムノアッセイ

FSH及びhCGのイムノアッセイはサンドイッチELFAにより測定した。

【 0 1 5 6 】

5.3 酸化タンパク質

タンパク質の酸化はRP-HPLCにより測定した。

【 0 1 5 7 】

5.4 pH

pHは欧州薬局方に従い測定した。

【 0 1 5 8 】

6 結果

安定性試験の結果、緩衝能試験における緩衝剤の評価、及び実験設計(DoE)試験からの安定性の結果を以下に表す。

【 0 1 5 9 】

【表 2】

Table 2 液状hMG(600IU/ml)製剤の組成

バッチ 番号	バッファー	界面活性剤	防腐剤	安定剤/等張化剤
E-01	10mMリン酸バッファー ¹ pH6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	3.0mg/ml M-クレゾール	41.3mg/mlマンニトール
E-02	10mMリン酸バッファー ¹ pH6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	3.0mg/ml M-クレゾール	85.9mg/mlトレハロース
E-03	10mMリン酸バッファー ¹ pH6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	3.0mg/ml M-クレゾール	74.3mg/mlスクロース
E-04	10mMリン酸バッファー ¹ pH6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	3.0mg/ml M-クレゾール	18.8mg/mlグリシン
E-05	10mMリン酸バッファー ¹ pH6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	67.7mg/mlスクロース
E-06	10mMリン酸バッファー ¹ pH6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	6.8mg/ml NaCl
E-07	10mMリン酸バッファー ¹ pH6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	5.0mg/ml フェノール	37.6mg/mlマンニトール
E-08	10mMクエン酸バッファー ² pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	3.0mg/ml M-クレゾール	71.1mg/mlスクロース
E-09	10mMクエン酸バッファー ² pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	3.0mg/ml M-クレゾール	29.3mg/ml L-アルギニンHCl
E-10	10mMクエン酸バッファー ² pH 6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	3.0mg/ml M-クレゾール	39.5mg/mlマンニトール
E-11	10mMクエン酸バッファー ² pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	74.7mg/mlトレハロース
E-12	10mMクエン酸バッファー ² pH 6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	5.0mg/ml フェノール	64.5mg/mlスクロース
E-13	10mMクエン酸バッファー ² pH 6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	5.0mg/ml フェノール	6.5mg/ml NaCl
E-14	10mMヒスチジンバッファ ー pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	3.0mg/ml M-クレゾール	77.5mg/mlスクロース
E-15	10mMヒスチジンバッファ ー pH 6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	3.0mg/ml M-クレゾール	19.6mg/mlグリシン

¹ 10mMのリン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸でpH調節

² 10mMのクエン酸三ナトリウム二水和物、クエン酸でpH調節

【 0 1 6 0 】

6.1 液状hMG製剤の安定性/3カ月

タンパク質分子は、賦形剤、例えば塩、炭水化物又はアミノ酸を溶液に加えることによって安定にすることができるが、異なる炭水化物、塩及びアミノ酸の添加による安定化の程度は異なる製剤間で大きく変化する。ここでは、初期安定性試験を実施して、hMGの液

10

20

30

40

50

状製剤において防腐剤とバッファーを組み合わせる様々な安定剤をスクリーニングした。驚くことに、結果は、hCGイムノアッセイに関してTable 3(表3)と6及びFSHイムノアッセイに関してTable 4(表4)と7に示すように、L-アルギニンの優れた安定化作用を示す。製剤E-09は、他の全ての製剤と比較して優れた安定性を示す。製剤E-09はL-アルギニンを含む唯一の製剤である(Table 2(表2)参照)。製剤K-01、K-03及びK-04、並びにK-09は他の全ての製剤と比較して優れた安定性を示す(Table 6(表6)参照)。これらの製剤はここでもL-アルギニンを含む(Table 5(表5)参照)。Table 4(表4)中、FSHイムノアッセイに関しても製剤E-09は他の全ての製剤と比較して最良安定性が優り、Table 7(表7)によって、他の全ての製剤と比較して製剤K-09が最高のFSHイムノアッセイ結果を示すことを確認する。

10

【 0 1 6 1 】

【表 3】

Table 3 30±2°C/65±5%相対湿度における1カ月の保存中のhCGイムノアッセイ。製剤E-09は他の全ての製剤と比較して優れた安定性を示す。製剤E-09はL-アルギニンを含む、Table 2(表2)参照。

製剤	hCG [初期の%]		
	初期	30°C±2°C/65±5%相対湿度	
		0.5カ月	1カ月
E-01	100	91	85
E-02	100	88	87
E-03	100	87	80
E-04	-	-	-
E-05	100	83	81
E-06	100	101	100
E-07	100	89	87
E-08	100	89	81
E-09 (L-アルギニンHCl)	100	113	106
E-10	100	95	91
E-11	100	99	89
E-12	100	94	87
E-13	100	99	86
E-14	-	-	-
E-15	-	-	-

20

30

(製剤E-04、E-14及びE-15は変色のため試験から除外した)

【 0 1 6 2 】

【表4】

Table 4 30±2°C/65±5%相対湿度における3カ月の保存後のFSHイムノアッセイ。製剤E-09は他の全ての製剤と比較して最良の安定性を示す。製剤E-09はL-アルギニンを含む、Table 2(表2)参照。

FSH [初期の%] 製剤	30°C± 2°C/65±5%相対湿度	
	初期	3か月
E-01	100	83
E-02	100	77
E-03	100	83
E-04	-	-
E-05	100	84
E-06	100	86
E-07	100	86
E-08	100	84
E-09 (L-アルギニン)	100	95
E-10	100	83
E-11	100	83
E-12	100	89
E-13	100	85
E-14	-	-
E-15	-	-

10

20

(製剤E-04、E-14及びE-15は変色のため試験から除外した)

【0163】

6.2 液状hMG製剤の安定性-3か月

初期スクリーニングから、アルギニンを含む追加的製剤をスクリーニングした。

【0164】

【表5】

Table 5 液状hMG600IU/mlに関する組成物安定性試験-製剤の概要

バッチ 番号	バッファー	界面活性剤	防腐剤	抗酸化剤	安定剤/等張化剤
K-01 ¹	10mMクエン酸バ ッファー ⁵ pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	3.0mg/ml M-クレゾール	1.5mg/ml L-メチオニン	28.0mg/ml L-アルギニ ンHCl
K-02	1mMリン酸バッ ファー ⁴ pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	3.0mg/ml M-クレゾール	1.0mg/ml L-メチオニン	21.0mg/ml ラクトー ス 7.0mg/ml NaCl
K-03	10mMクエン酸バ ッファー ⁵ pH 6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	5.0mg/ml フェノール	1.5mg/ml L-メチオニン	25.3mg/ml L-アルギニ ンHCl
K-04	10mMリン酸バッ ファー ⁴ pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	3.0mg/ml M-クレゾール	1.5mg/ml L-メチオニン	29.3mg/ml L-アルギニ ンHCl
K-05 ²	10mMクエン酸バ ッファー ⁵ pH 6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	5.0mg/ml フェノール	1.0mg/ml L-メチオニン	67.4mg/ml スクロー ス
K-06	10mMクエン酸バ ッファー ⁵ pH 6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	3.0mg/ml M-クレゾール	1.0mg/ml L-メチオニン	74.6mg/ml スクロー ス
K-07 ³	10mMクエン酸バ ッファー ⁵ pH 6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	3.0mg/ml M-クレゾール	1.0mg/ml L-メチオニン	38.3mg/ml マンニト ール
K-08	10mMクエン酸バ ッファー ⁵ pH 6.8	0.1 mg/ml ポロキサマー188	5.0 mg/ml フェノール	1.0mg/ml L-メチオニン	34.7mg/ml マンニト ール
K-09 ⁶	10mMクエン酸バ ッファー ⁵ pH 6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	3.0mg/ml M-クレゾール	1.5mg/ml L-メチオニン	20mg/ml L-アルギニン HCl 22.1mg/ml スクロー ス

10

20

¹ Table 2(表2)中の製剤E-09と同じ² Table 2(表2)中の製剤E-12と同じ³ Table 2(表2)中の製剤E-10と同じ⁴ 10mMのリン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸でpH調節⁵ 10mMのクエン酸三ナトリウム二水和物、クエン酸でpH調節⁶ 強度は530IU/mlである

【 0 1 6 5 】

30

【表6】

Table 6 25±2°C/60±5%相対湿度における3カ月の保存中のhCGイムノアッセイ。製剤K-01、K-03、K-04、及びK-09は他の全ての製剤と比較して優れた安定性を示す。製剤K-01、K-03、K-04、及びK-09はL-アルギニンを含有する、Table 5(表5)参照。

hCG [初期の%]		25°C±2°C/65±5%相対湿度		
製剤	初期	1カ月	2カ月	3カ月
K-01 (L-アルギニン)	100	110	105	105
K-02	100	100	68	57
K-03 (L-アルギニン)	100	110	106	104
K-04 (L-アルギニン)	100	109	106	113
K-05	100	94	82	71
K-06	100	98	76	80
K-07	100	85	74	67
K-08	100	93	79	71
K-09 (L-アルギニン)	100	99	101	100

10

20

【0166】

L-アルギニンを含む製剤が、異なる安定化剤を含む製剤よりはるかに一層安定していることは非常に明らかである。3カ月後に、例えば製剤K-02とK-03を比較する。

【0167】

【表7】

Table 7 25±2°C/60±5%相対湿度における3カ月の保存中のFSHイムノアッセイ。製剤K-09は他の全ての製剤と比較して最高のFSHイムノアッセイ結果を示す。製剤K-09はL-アルギニンを含有する、Table 5(表5)参照。

FSH [初期の%]		25°C±2°C/60±5%相対湿度		
製剤	初期	1カ月	2カ月	3カ月
K-01 (L-アルギニン)	100	112	112	111
K-02	100	104	106	87
K-03 (L-アルギニン)	100	108	120	107
K-04 (L-アルギニン)	100	108	112	112
K-05	100	107	116	111
K-06	100	109	117	115
K-07	100	101	112	104
K-08	100	107	107	109
K-09 (L-アルギニン)	100	112	120	119

30

40

【0168】

hCGに関する結果をFSHに関しても確認する-3カ月後に、例えば製剤K-02とK-03を比較す

50

る。

【 0 1 6 9 】

6.3 緩衝能試験

緩衝剤、例えばリン酸ナトリウムとクエン酸ナトリウムは生理学的に許容されるバッファーであり、所望の範囲にpHを維持するため非常に一般的に加えられる。クエン酸三ナトリウム二水和物及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物を、緩衝能によって緩衝剤として評価する。緩衝能は、所定の工程でpHを動かすのに必要な酸又は塩基の量、即ち前に説明したようにmEq酸又は塩基/(リットル×pH単位)として計算した、pHを1pH単位/LDP動かすのに必要な $\mu\text{L}0.2\text{N HCl/NaOH}$ の量として計算する。

【 0 1 7 0 】

【表 8】

Table 8 組成物の緩衝能試験-製剤の概要

バッチ番号	バッファー	界面活性剤	防腐剤	抗酸化剤	安定剤/等張化剤
C-01	バッファー含まず pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	1.5mg/ml L- メチオニン	120mM L-アルギニン HCl ⁴
C-02	5mM クエン酸バッファー ¹ pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	1.5mg/ml L- メチオニン	120mM L-アルギニン HCl ⁴
C-03	10mM クエン酸バッファー ¹ pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	1.5mg/ml L- メチオニン	120mM L-アルギニン HCl ⁴
C-04 ³	1mM ² リン酸バッファー pH 6.5	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	1.0mg/ml L- メチオニン	31.76mg/ml Na ₂ SO ₄ ×10H ₂ O (14mg/mlの硫酸ナトリ ウム)

1 クエン酸三ナトリウム二水和物

2 0.8mMのNa₂HPO₄×12H₂O及びおよそ0.2mMのH₃PO₄、pH6.5

3 参照プラセボ

4 25.3mg/mlのL-アルギニンHClに等しい

【 0 1 7 1 】

緩衝能を測定するため実施した滴定の結果を図1に示す。曲線の勾配は緩衝能を示し、例えば急勾配は低い緩衝能を表す。図1から、バッチC-04(参照製剤)が最も低い緩衝能を有することを観察することができる。hMGに関する関連pH領域 6.8 ± 0.3 において、全てのhMG製剤C-01(バッファー含まず)、C-02(5mMのクエン酸三ナトリウム二水和物)及びC-03(10mMのクエン酸三ナトリウム二水和物)は類似した緩衝能を有し、1mMのリン酸水素二ナトリウム十二水和物を含有する参照製剤より高い緩衝能を有する。参照製剤の標的pHは6.5である。製剤C-01、C-02及びC-03を、安定したpHを有することがわかっている参照と比較する。如何なるpH変動も観察されない参照製剤C-04の多数の安定性試験が実施されている。

【 0 1 7 2 】

以下のTable 9(表9)は緩衝能試験の結果を示す:

【 0 1 7 3 】

10

20

30

40

【表9】

Table 9 緩衝能試験。hMGに関する製剤関連pH領域6.8において、全てのhMG製剤は参照プラセボ製剤より高い緩衝能を有する。

バッチ	バッファー	標的pH周辺の緩衝能	pH範囲	a (勾配)	mEq酸又は塩基/(リットル×pH単位)として表した緩衝能
C-01	バッファー含まず	6.8	6.564-6.947	0.001507	1.32
C-01	バッファー含まず	7.0	6.786-7.193	0.000822	2.44
C-02	5mM クエン酸三ナトリウム二水和物	6.8	6.599-6.951	0.000672	2.96
C-03	10mM クエン酸三ナトリウム二水和物	6.8	6.572-6.946	0.000750	2.66
C-04 (参照)	1mM リン酸水素二ナトリウム十二水和物	6.5	6.199-6.752	0.002700	0.74
C-04 (参照)	1mM リン酸水素二ナトリウム十二水和物	6.8	6.582-6.982	0.002091	0.96

(緩衝能は2つのそれぞれ異なるpH値付近のpH範囲で計算したため、C-01とC-04は2回言及する)

【0174】

驚くことに、バッファーを含まないhMG製剤(C-01)の緩衝能は参照製剤C-04より高い。hMG製剤における主な賦形剤成分は120mMの濃度のL-アルギニンである。L-アルギニンに関するpKa値は $pK_{a1}=2.17$ 、 $pK_{a2}=9.04$ 及び $pK_{a3}=12.5$ である(Handbook of Pharmaceutical Excipients.2015、Pharmaceutical Press、ロンドン)。アルギニンがpKa値からかけ離れた十分な緩衝挙動を示すことは非常に予想外である。

【0175】

6.4 酸化試験

30 ± 2 / $65 \pm 5\%$ 相対湿度における3カ月の保存後、L-アルギニンを含有する製剤E-09(Table 5(表5)参照)は初期値の241%酸化タンパク質のレベルが増大した(以下のTable 10(表10)参照)。これは非常に多量であり、このような多量の酸化は望ましくない場合がある。

【0176】

したがって、更なる試験を行い、この問題が克服可能かどうか調べた。

【0177】

タンパク質製剤において使用することができる抗酸化剤の幾つかの選択肢が存在する。メチオニンを加えて、タンパク質中のメチオニン残基の酸化との競合に関して示された機構により、酸化を防止することができる。アルギニンを含有する製剤にメチオニンを加えた結果をTable 10(表10)に示す。製剤K-01、K-03、K-04及びK-09はアルギニンとメチオニンを含有し、酸化タンパク質のレベルは明らかに有利に低減する。(メチオニンを含む)製剤K-01は(メチオニンを含まない)製剤E-09と同じ製剤である。これら2つのバッチを比較すると、酸化タンパク質のレベルがメチオニンにより大幅に低減するのを見ることができる。

【0178】

10

20

30

40

【表 1 0】

Table 10 30±2°C/65±5%相対湿度における3カ月の保存中の酸化タンパク質の増大%。
製剤E-09はアルギニン含有しメチオニンは含有しない。製剤K-01、K-03、K-04、及びK-09はアルギニン及びメチオニンを含有する、Table 5(表5)参照。

酸化タンパク質 [初期からの増大%] 製剤	30°C±2°C/65±5%相対湿度 3か月
E-01	44
E-02	39
E-03	47
E-04	-
E-05	37
E-06	43
E-07	36
E-08	51
E-09 (アルギニン含有しメチオニンは含有しない)	241
E-10	55
E-11	47
E-12	53
E-13	46
E-14	-
E-15	-
K-01 (アルギニン及びメチオニンを含有する)	24
K-03 (アルギニン及びメチオニンを含有する)	12
K-04 (アルギニン及びメチオニンを含有する)	8
K-09 (アルギニン及びメチオニンを含有する)	13

(製剤E-04、E-14及びE-15は変色のため除外した)

【 0 1 7 9】

結論として、これらの2つの試験は、ゴナドトロピンの製剤中の少量のメチオニンでさえ、アルギニンの非常に高い安定化作用及び抗酸化作用を実証する。

【 0 1 8 0】

6.5 DoE安定性試験

前述の試験からの結果と緩衝能試験からの結果を組み合わせ、DoE試験を実施しアルギニンとメチオニンの間の相互作用を調べ、これら2つの賦形剤の最適濃度を測定した。

【 0 1 8 1】

10

20

30

40

【表 1 1】

Table 11 液状hMG600IU/mlに関するDoE安定性試験のための組成-製剤の概要

バッチ 番号	バッファー ²	界面活性剤	防腐剤	抗酸化剤	安定剤/等張化剤
D-01	バッファー含まず pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	1.5mg/ml L-メチ オニン	80 mM L-アルギニンHCl
D-02	バッファー含まず pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	1.5mg/ml L-メチ オニン	160 mM L-アルギニンHCl
D-03	バッファー含まず pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	0.8mg/ml L-メチ オニン	120 mM L-アルギニンHCl
D-04	バッファー含まず pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	0.8mg/ml L-メチ オニン	120 mM L-アルギニン HCl-
D-05	バッファー含まず pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	0.1mg/ml L-メチ オニン	160 mM L-アルギニンHCl
D-06	バッファー含まず pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート20	5.0mg/ml フェノール	0.1mg/ml L-メチ オニン	80 mM L-アルギニンHCl
D-07 ³	バッファー含まず pH 6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	5.0mg/ml フェノール	1.5mg/L-メチオ ニン	120 mM L-アルギニンHCl
D-08 ³	10mM クエン酸 バッファー ¹ pH 6.8	0.1mg/ml ポロキサマー188	5.0mg/ml フェノール	1.5mg/L-メチオ ニン	120 mM L-アルギニンHCl

¹ クエン酸三ナトリウム二水和物

² バッファーを含まない製剤に関して0.2N HCl/NaOH、及びクエン酸三ナトリウム二水和物バッファーを含む製剤に関して0.2N NaOH/0.5Mクエン酸一水和物でpHを調節する

³ 参照製剤として含めた

【 0 1 8 2 】

6.5.1 FSHイムノアッセイ

25±2 /60±5%相対湿度における3カ月の保存中の、FSHイムノアッセイの安定性の結果をTable 12(表12)に列記する。

【 0 1 8 3 】

【表 1 2】

Table 12 25±2°C/60±5%相対湿度での保存中のFSHイムノアッセイの結果。全製剤の完全な記載はTable 11(表11)に列記する。

製剤	FSH [IU/ml]	25°C±2°C/60±5%相対湿度		
	初期	1カ月	2カ月	3カ月
D-01	516	501	468	462
D-02	521	492	503	478
D-03	511	503	513	474
D-04	515	505	490	477
D-05	532	521	513	473
D-06	518	488	458	493
D-07	518	528	482	490
D-08	514	499	472	481

【 0 1 8 4 】

統計的計算をFSH活性[IU/ml]に関して実施して、アルギニンとメチオニンの影響及び相互作用を評価した。統計的評価の結果によって、L-アルギニンはFSHイムノアッセイの安定性の結果に対して統計学的に有意な影響があることを確認する。メチオニンは、FSHイムノアッセイの安定性の結果に対して統計学的に有意な影響はない。この応答パラメータ

ーに関してアルギニンとメチオニン間に統計学的に有意な相互作用はない。

【 0 1 8 5 】

6.5.2 hCGイムノアッセイ

25±2 /60±5%相対湿度における3カ月の保存中の、hCGイムノアッセイの安定性の結果をTable 13(表13)中に列記する。

【 0 1 8 6 】

【表 1 3】

Table 13 25±2°C/60±5%相対湿度での保存中のhCGイムノアッセイの結果。全製剤の完全な記載はTable 11(表11)に列記する。

10

hCG [IU/ml]		25°C±2°C/60±5%相対湿度		
製剤	初期	1カ月	2カ月	3カ月
D-01	83	82	75	56
D-02	87	83	93	76
D-03	93	93	88	70
D-04	86	91	87	70
D-05	90	98	92	85
D-06	87	85	72	61
D-07	93	92	88	71
D-08	91	96	94	81

20

【 0 1 8 7 】

統計的計算をhCG活性[IU/ml]に関して実施して、アルギニンとメチオニンの影響及び相互作用を評価した。統計的評価の結果によって、アルギニンはhCGイムノアッセイの安定性の結果に対して統計学的に有意な影響があることを確認する。メチオニン含有量は、25においてhCGイムノアッセイの安定性の結果に対してわずかな影響がある。低濃度(0.1mg/ml)のメチオニンでは、1.5mg/mlまでの濃度の増大によってさえ更なる安定性の増大は検出できないことが明らかとなる。この応答パラメーターに関してアルギニンとメチオニン間に統計学的に有意な相互作用はない。

【 0 1 8 8 】

30

6.5.3 酸化タンパク質

前述の安定性試験では、驚くことに、アルギニンの存在には非常に高い安定化作用があることを観察した。しかしながら、アルギニンの添加は増大したレベルの酸化タンパク質をもたらした。メチオニンを加えてこの酸化を防止することができ、この試験によって、安定剤としてのアルギニンと抗酸化剤としてのメチオニンの間の濃度バランスを調べる。

【 0 1 8 9 】

アルギニンとメチオニンを(濃度範囲0.1~1.5mg/mlで)含む製剤に関する、25±2 /60±5%相対湿度で6カ月及び30±2 /65±5%相対湿度で3カ月の保存中の、安定性試験の酸化タンパク質の量の結果[初期からの増大%]を以下に列記する。比較用に、アルギニンを含みメチオニンを含まない製剤E-09もTable 14(表14)に含める。

40

【 0 1 9 0 】

【表 1 4】

Table 14 25±2°C/60±5%相対湿度及び30±2°C/65±5%相対湿度での保存中の酸化タンパク質の結果。全製剤の完全な記載をTable 11(表11)に示す。

酸化タンパク質 [初期からの増大%]	30°C±2°C/65±5%相対湿度			25°C±2°C/60±5%相対湿度			
	1カ月	2カ月	3カ月	1カ月	2カ月	3カ月	6カ月
製剤							
D-01	5.5	4.1	8.3	10.1	4.1	9.6	6.9
D-02	9.9	8.5	10.3	11.7	11.7	6.6	8.5
D-03	10.9	10.0	11.4	12.3	13.3	11.8	12.8
D-04	8.9	8.4	8.9	8.9	11.2	9.8	8.9
D-05	12.9	13.8	13.8	13.3	20.5	11.0	15.2
D-06	7.0	9.8	11.6	10.7	7.9	9.3	11.2
D-07	14.0	10.1	11.1	14.5	13.5	15.0	10.1
D-08	7.6	9.5	7.6	13.3	9.0	11.8	7.6
E-09 (L-メチオニン含まず)	-	-	241	-	-	-	-

10

【 0 1 9 1】

Table 14(表14)から、驚くことに、少量のメチオニンでさえ、全濃度範囲のアルギニンで酸化を防止するのに充分であることが分かる。

20

【 0 1 9 2】

6.5.4 DoEの要約

DoEの結果を結論付けし要約するため、Minitabのレスポンスオプティマイザーを適用した、図2参照。Minitabのレスポンスオプティマイザーツールは、どのようにして様々な実験要素設定、例えばアルギニン及びメチオニン濃度が、要素設計に関する予想応答、例えばFSHイムノアッセイ[IU/ml]及びhCGイムノアッセイ[IU/ml]に影響を与えるかを示す。最適化プロットは、応答(横列)に対する各要因(縦列)の影響を示す。グラフ上の太い垂線は本発明の要因設定を表す。縦列の上部に示した数字は本発明の要因レベル設定を示す(四角形の括弧内)。水平方向の破線及び対応する数字は本発明の要因レベルに関する応答を表す。レスポンスオプティマイザーは25 における結果に基づく。レスポンスオプティマイザーを適用した結果を図2に示す。最良の安定性(複合的な望ましさ)を、高濃度のアルギニン及び低濃度のメチオニンで得る。

30

【 0 1 9 3】

6.6 pH試験

緩衝能試験において、所望のpH範囲内でpHを安定させるためアルギニンのみを使用することにより、緩衝剤が必ずしもhMG製剤中に存在しなかったことが示された。

【 0 1 9 4】

pHが保存中に維持されることを確認するため、25±2 /60±5%相対湿度で6カ月及び30±2 /65±5%相対湿度で3カ月の保存中にpHを測定した。結果をTable 15(表15)に列記する。

40

【 0 1 9 5】

全ての製剤に関する標的pHはpH6.8であり、全ての製剤のpHは初期タイムポイントにおいて6.8であった。pHは非常に安定していたが2カ月後に約6.9までわずかに増大し、6カ月の保存まで6.9付近でpHは維持された。6カ月の保存までの結果によって、試験濃度範囲のアルギニンにおけるpHの安定性を確認する。

【 0 1 9 6】

【表 15】

Table 15 pH試験の結果

製剤	pH		30°C±2°C/65±5%相対湿度		25°C±2°C/60±5%相対湿度		
	初期		2カ月	3カ月	2カ月	3カ月	6カ月
D-01	6.8		6.9	6.9	6.9	6.9	6.9
D-02	6.8		6.9	6.9	6.9	6.9	6.8
D-03	6.8		6.9	6.9	6.9	6.9	6.8
D-04	6.8		6.9	6.9	6.9	6.9	6.8
D-05	6.8		6.9	6.9	6.9	6.9	6.8
D-06	6.8		6.9	6.9	6.9	6.9	6.8
D-07	6.8		6.9	6.9	6.9	6.9	6.8
D-08	6.8		6.9	6.9	6.9	6.9	6.9

10

【0197】

7 結論

非常に驚くべきことに、バッファーを含まないhMG製剤の緩衝能は、1mMのリン酸水素二ナトリウム十二水和物を含む参照より高い。hMG製剤における主な賦形剤成分はアルギニンである。アルギニンに関するpKa値は $pK_{a1}=2.17$ 、 $pK_{a2}=9.04$ 及び $pK_{a3}=12.5$ である。アルギニンがそのpKa値からかけ離れた充分な緩衝挙動を示すことは予想外である。しかしながら、これらの結果は、本発明のpH範囲ではhMG製剤中に追加的緩衝剤は必要とされないことを明らかに示す。アルギニン単独で、所望のpH範囲内にpHを維持するのに充分である。pHの安定性は、 25 ± 2 / $60 \pm 5\%$ 相対湿度で6カ月の保存及び 30 ± 2 / $65 \pm 5\%$ 相対湿度で3カ月の保存中、所定濃度範囲のアルギニンを試験したDoE試験において確認し、これによって緩衝能試験における観察結果を確認した。

20

【0198】

本発明の液状hMG製剤にアルギニンを加えることは、液状hMG製剤に対して非常に安定化作用があることが示された。しかしながら、アルギニンは高レベルの酸化タンパク質をもたらすことも分かった。メチオニンの添加は、メチオニンを含まない製剤と比較して酸化を防止することが示された。

30

【0199】

25 ± 2 / $60 \pm 5\%$ 相対湿度で6カ月の保存及び 30 ± 2 / $65 \pm 5\%$ 相対湿度で3カ月の保存中、わずかな濃度のメチオニンでさえ酸化を防止することが示された。

【0200】

これらの試験からの結果を結論付けると、アルギニンの添加は所望のpHレベルでpHを維持するのに充分であることが明らかに分かる。アルギニンの添加によって液状製剤における試験ゴナドトロピン製剤が非常に安定化する。試験したアミノ酸、糖又は塩の他は同様の安定化作用を示さなかった。酸化タンパク質のレベルはアルギニンの添加によって有意に増大したが、しかしながら少量のメチオニンの添加でさえタンパク質の酸化を防止する。驚くことに、アルギニンの濃度とは無関係に、少量のメチオニンでさえ酸化を防止するのに充分である。

40

【0201】

(実施例2)

本発明者らは、本発明の有利な製剤は、それぞれの組換えゴナドトロピン製剤を安定化するのもにも適している可能性があることを更に確認した。

【0202】

その効用のため、(それらの配列をそれぞれ前に記載した)組換えFSH及び組換えhCGを、周知の方法に従い調製した。

【0203】

以下に記載したように、それぞれrhCG又はrFSHを含む2つの製剤に関して加速的安定性

50

試験を実施した。

【0204】

観察したアルギニンの驚くべき安定化作用は組換えタンパク質においても確認された。rFSHとrhCGの両方を5mg/mlのフェノール、0.15mg/mlのL-メチオニン、150mMのアルギニンHCl、0.005mg/mlのポリソルベート20、pH6.8で製剤化した。タンパク質安定性の分析を簡潔にするため、rFSHとrhCGは異なる容器中で製剤化した。

【0205】

【表16】

Table 16:

	免疫活性(IU/ml)				
	初期	1カ月、30°C	2カ月、30°C	4カ月、30°C	16カ月、5°C
FSH [33.3µg/ml]	464	444	456	469	435
rhCG [50µg/ml]	711	680	656	600	685

	SEC (rFSHの純度、%)				
	初期	1カ月、30°C	2カ月、30°C	4カ月、30°C	16カ月、5°C
FSH [33.3µg/ml]	98.9	98.6	98.3	97.9	96.9

	HIC (rhCGの純度、%)				
	初期	1カ月、30°C	2カ月、30°C	4カ月、30°C	14カ月、5°C
rhCG [50µg/ml]	98.8	96.8	93.3	89.4	99.9

【0206】

これによって、アルギニンを含むが、追加的バッファーは含まず、少量のメチオニンを含む本発明の製剤は、組換えゴナドトロピンを安定化するのにも適していることを完全に確認する。

【0207】

(実施例3)

更なる試験を実施し、以下の組成を評価した：

【0208】

【表17】

Table 17 液状hMG625IU/ml製剤に関する組成

バッチ番号	バッファー ¹	界面活性剤	防腐剤	抗酸化剤	安定剤/等張化剤
J-01	バッファー含まず pH 6.8	0.005mg/ml ポリソルベート 20	5.0mg/ml フェノール	0.15mg/ml L-メチオニン	150mM L-アルギニンHCl

¹ 0.2N HCl/NaOHでpHを調節する

【0209】

標的製剤の安定性

前述の結果を全て組み合わせ、以下のように、前述の製剤に関して優れた安定性を確認した：

【0210】

10

20

30

40

【表 18】

Table 18 FSHイムノアッセイ

25±2°C/60±5%相対湿度(RH)で3カ月及び5±3°Cで12カ月の保存中のFSHイムノアッセイの安定性の結果:

25±2°C/60±5%相対湿度、及び5±3°Cで12カ月の保存中のFSHイムノアッセイの結果。

FSH [初期の%]		25°C±2°C/60±5%相対湿度			5°C±3°C	
製剤	初期	1カ月	2カ月	3カ月	3カ月	12カ月
J-01	100	95.2	95.9	98.8	96.8	100.5

10

【0211】

これらの結果によって、FSHイムノアッセイにより測定した安定性を確認する。

【0212】

【表 19】

Table 19 hCGイムノアッセイ

25±2°C/60±5%相対湿度で1カ月及び5±3°Cで12カ月の保存中のhCGイムノアッセイの安定性の結果を、Table 19(表19)に列記する。

25±2°C/60±5%相対湿度及び5±3°Cで12カ月の保存中のhCGイムノアッセイの結果。

hCG [初期の%]		25°C±2°C/60±5%相対湿度		5°C±3°C	
製剤	初期	1カ月		3カ月	12カ月
J-01	100	88.3		94.1	89.5

20

【0213】

これらの結果によって、hCGイムノアッセイにより測定した安定性を確認する。

【0214】

【表 20】

Table 20 酸化タンパク質

25±2°C/60±5%相対湿度で3カ月及び5±3°Cで12カ月の保存中の酸化タンパク質の量[初期からの増大%]の安定性の結果。

25±2°C/60±5%相対湿度及び5±3°Cで12カ月の保存中の酸化タンパク質の結果。

酸化タンパク質 [初期からの増大%]	25°C±2°C/60±5%相対湿度			5°C±3°C	
	1カ月	2カ月	3カ月	3カ月	12カ月
J-01	1.8	5.7	7.9	2.6	11

30

40

【0215】

pH

50

25 ± 2 / 60 ± 5%相対湿度で3カ月及び5 ± 3 で12カ月の保存中の、pHの安定性の結果は安定したpHを示す。

【 0 2 1 6 】

【表 2 1 】

Table 21 25±2°C/60±5%相対湿度及び5±3°Cで12カ月の保存中のpHの結果。

pH		25°C±2°C/60±5%相対湿度			5°C±3°C	
製剤	初期	1カ月	2カ月	3カ月	3カ月	12カ月
J-01	6.9	6.7	6.8	6.7	6.7	6.8

10

【 0 2 1 7 】

(実施例4)

前述の事項以外に、本発明者らはバイオアッセイ試験(DoEバッチに関して25 で6カ月保存)も実施した。

【 0 2 1 8 】

FSHバイオアッセイ(Steelman-Pohley)

25 ± 2 / 60 ± 5%相対湿度で6カ月の保存中のFSHバイオアッセイの安定性の結果をTable 22(表22)に列記する。

20

【 0 2 1 9 】

【表 2 2 】

Table 22 25±2°C/60±5%相対湿度での保存中のFSHバイオアッセイの結果。全製剤の完全な記載をTable 11(表11)に示す。

FSH [示された効能の% (600 IU/ml)]	25°C±2°C/60±5%相対湿度
製剤	6カ月
D-01	98.8
D-02	100.7
D-03	102.0
D-04	104.7
D-05	103.4
D-06	101.0
D-07	102.6
D-08	104.9

30

【 0 2 2 0 】

これらの結果によって、FSHバイオアッセイにより測定した安定性を確認する。

【 0 2 2 1 】

LHバイオアッセイ(精嚢重量増加)

25 ± 2 / 60 ± 5%相対湿度で6カ月の保存中のLHバイオアッセイの安定性の結果をTable 23(表23)に列記する。

40

【 0 2 2 2 】

【表 2 3】

Table 23 25±2°C/60±5%相対湿度での保存中のLHバイオアッセイの結果。全製剤の完全な記載をTable 11(表11)に示す。

LH [示された効能の% (600 IU/ml)]	25°C±2°C/60±5%相対湿度	
	6カ月	
D-01	87.8	
D-02	101.3	
D-03	90.9	
D-04	95.6	
D-05	97.5	
D-06	95.0	
D-07	97.3	
D-08	100.1	

10

【0 2 2 3】

これらの結果によって、LHバイオアッセイにより測定した安定性を確認する。

【0 2 2 4】

更に、実施例3の組成物をFSH及びLHバイオアッセイにおいても試験し、以下の結果を得た：

【0 2 2 5】

25±2 /60±5%相対湿度で3カ月及び5±3 で12カ月の保存中のFSHバイオアッセイの安定性の結果をTable 24(表24)に列記する：

【0 2 2 6】

【表 2 4】

20

30

Table 24: 25±2°C/60±5%相対湿度及び5±3°Cで12カ月の保存中のFSHバイオアッセイの結果。

FSH [示された効能の% (625 IU/ml)]		25°C±2°C/60±5%相対湿度			5°C±3°C	
製剤	初期	1カ月	2カ月	3カ月	3カ月	12カ月
J-01	94.7	93.6	94.5	97.6	95.8	96.1

【0 2 2 7】

これらの結果によって、FSHバイオアッセイにより測定した安定性を確認する。

【0 2 2 8】

25±2 /60±5%相対湿度で3カ月及び5±3 で12カ月の保存中のLHバイオアッセイの安定性の結果をTable 25(表25)に列記する。

【0 2 2 9】

40

【表 25】

Table 25 25±2°C/60±5%相対湿度及び5±3°Cで12カ月の保存中のLHバイオアッセイの結果。

LH [示された効能の% (625 IU/ml)]		25°C±2°C/60±5%相対湿度			5°C±3°C	
製剤	初期	1カ月	2カ月	3カ月	3カ月	12カ月
J-01	102.1	102.2	99.0	100.0	101.5	100.0

10

【0230】

これらの結果によって、LHバイオアッセイにより測定した安定性を確認する。

【0231】

8 略語及び定義

BP 英国薬局方

DoE 実験設計

DS 薬物物質

FSH 卵胞刺激ホルモン

hCG ヒト絨毛性ゴナドトロピン

hMG ヒト閉経期ゴナドトロピン

hMG-HP ヒト閉経期ゴナドトロピン-高度精製

JP 日本薬局方

LH 黄体形成ホルモン

MD 多用量

NF 国民医薬品集

Ph Eur 欧州薬局方

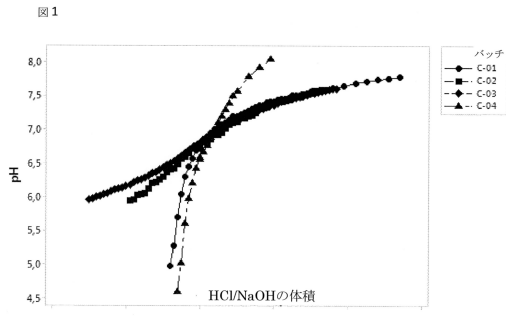
PS20 ポリソルベート20

USP 米国薬局方

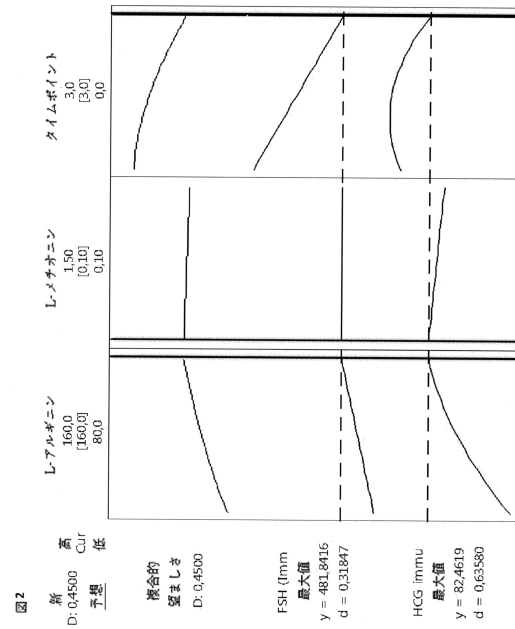
WFI 注射用水

20

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配列表 】

0006932710000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 47/18	(2006.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K 47/20	(2006.01)	A 6 1 K	47/20
A 6 1 K 47/10	(2006.01)	A 6 1 K	47/10
A 6 1 K 47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26
C 0 7 K 14/575	(2006.01)	C 0 7 K	14/575 Z N A
C 0 7 K 14/59	(2006.01)	C 0 7 K	14/59

(72)発明者 シャーロット・ホイヤ - ペデルセン
デンマーク・4 1 3 0 ・ヴィビ・シェランド・カスタニエペフ・7

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 特表2011-502968(JP,A)
特表2013-532677(JP,A)
特表2002-521342(JP,A)
特表2016-534061(JP,A)
特表2009-509953(JP,A)
Protein Science, The Protein Society, 2005年 4
月, 14, 4, 929-935

(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
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)