

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-502349
(P2025-502349A)

(43)公表日 令和7年1月24日(2025.1.24)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/62 (2006.01)	C 0 7 K	14/62	4 B 0 6 5	
A 6 1 K	38/30 (2006.01)	A 6 1 K	38/30	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26	4 H 0 4 5	
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全56頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-542255(P2024-542255)		(71)出願人	523140795	
(86)(22)出願日	令和5年1月18日(2023.1.18)			オーク ヒル バイオ リミテッド	
(85)翻訳文提出日	令和6年8月19日(2024.8.19)			イギリス国 ダブリュエー 1 4 2 ディー	
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/051110			ティー, チェシャー, オルトリナム, ア	
(87)国際公開番号	WO2023/139115			シュリー ロード 1, サード フロア	
(87)国際公開日	令和5年7月27日(2023.7.27)		(74)代理人	100114775	
(31)優先権主張番号	63/300,860			弁理士 高岡 亮一	
(32)優先日	令和4年1月19日(2022.1.19)		(74)代理人	100121511	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			弁理士 小田 直	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		(74)代理人	100202751	
	最終頁に続く			弁理士 岩堀 明代	
			(74)代理人	100208580	
				弁理士 三好 玲奈	
			(74)代理人	100227329	
				弁理士 延原 愛	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 I G F - 1 / I G F B P の酸化を低減するための組成物および方法

(57)【要約】

本発明は、とりわけ、低出生体重児の疾患および合併症を治療するための、インスリン様増殖因子-1 (I G F - 1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質-3 (I G F B P - 3) を含む複合体の酸化を低減させるための組成物および方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は抗酸化剤を添加することを含む。いくつかの実施形態では、抗酸化剤はメチオニンまたはチオ硫酸ナトリウムである。いくつかの態様では、提供される組成物はI G F - 1 およびI G F B P - 3 を含む安定で純粋で強力な組成物である。いくつかの態様では、製剤は凍結乾燥される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

インスリン様増殖因子 1 (IGF-1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質 3 (IGFBP-3) を、1:1 のモル比で含む単離されたタンパク質複合体を含む組成物であって、前記組成物は抗酸化剤を含み、前記酸化 IGF-1 種は約 25℃ の温度での保存で 3 ヶ月後、50% を超えて増加しない、組成物。

【請求項 2】

前記酸化 IGF-1 種は、約 25℃ の温度での保存で 3 ヶ月後、25% を超えて増加しない、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記酸化 IGF-1 種は、約 25℃ の温度での保存で 3 ヶ月後、10% を超えて増加しない、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記酸化 IGF-1 種は、約 25℃ の温度での保存で 3 ヶ月後、実質的に増加しない、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

インスリン様増殖因子 1 (IGF-1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質 3 (IGFBP-3) を、1:1 のモル比で含む単離されたタンパク質複合体を含む組成物であって、前記組成物は抗酸化剤を含み、前記酸化 IGF-1 種の % は 2-8℃ の温度での保存で 3 ヶ月後、20% を超えて増加しない、組成物。

【請求項 6】

前記酸化 IGF-1 種は、2-8℃ の温度での保存で 3 ヶ月後、10% を超えて増加しない、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記酸化 IGF-1 種は、2-8℃ の範囲 (例えば、間) の温度での保存で 3 ヶ月後、実質的に増加しない、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記抗酸化剤は、例えば、0.2 mM~50 mM、例えば 0.5 mM~5 mM、特に 0.5 mM または 5 mM の濃度のメチオニンである、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記抗酸化剤は、例えば、0.2 mM~50 mM の範囲 (例えば、間)、例えば 0.5 mM~5 mM、特に 0.5 mM または 5 mM の濃度のチオ硫酸ナトリウムである、請求項 1~8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記 IGF-1 の 1% 未満が、3 ヶ月間の保存で、前記タンパク質複合体中に酸化種として存在する、例えば、前記 IGF-1 の 0.6% 未満が、3 ヶ月間の保存で、前記タンパク質複合体中に酸化種として存在する、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

酸化種の量は RP-UPLC または SEC-HPLC により決定される、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記 IGFBP-3 は 5% 未満のトリスルフィド変異体、例えば 2% 未満のトリスルフィド変異体、例えば 1% 未満のトリスルフィド変異体、特に 0.5% 未満のトリスルフィド変異体を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

下記工程を含む、インスリン様増殖因子 1 (IGF-1) タンパク質複合体を製造するための方法：組換え IGF-1 を含む組成物を提供する工程；抗酸化剤を前記組成物に添加する工程；および前記 IGF-1 を前記組成物から精製する工程。

【請求項 14】

前記抗酸化剤は、例えば 0.2 mM ~ 10 mM、例えば 0.5 mM ~ 5 mM、特に 0.5 mM または 5 mM の濃度で添加されるメチオニンである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 15】

前記抗酸化剤は、例えば 0.2 mM ~ 10 mM、例えば 0.5 mM ~ 5 mM、特に 0.5 mM または 5 mM の濃度のチオ硫酸ナトリウムである、請求項 13 または 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記精製 IGF-1 組成物中の前記酸化 IGF-1 種は、約 25 °C の温度での保存で 3 ヶ月後、50 % を超えて増加せず、例えば、20 % を超えて増加せず、例えば、10 % を超えて増加せず、特に、約 25 °C の温度での保存で 3 ヶ月後、実質的に増加しない、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 17】

前記精製 IGF-1 組成物中の前記酸化 IGF-1 種は、2 - 8 °C の温度での保存で 3 ヶ月後、20 % を超えて増加せず、例えば 10 % を超えて増加せず、例えば 2 - 8 °C の温度での保存で 3 ヶ月後、実質的に増加しない、請求項 13 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記精製 IGF-1 タンパク質は 0.6 % 未満の酸化 IGF-1 種を有する、請求項 13 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記組換え IGF-1 タンパク質は大腸菌において発現される、請求項 13 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 20】

前記組換え IGF-1 タンパク質は封入体から精製される、請求項 13 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記方法は、インスリン様増殖因子結合タンパク質 3 (IGFBP-3) を前記 IGF-1 タンパク質に添加し、タンパク質複合体を形成させることをさらに含む、請求項 23 - 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記タンパク質複合体は IGF-1 および IGFBP-3 を 1 : 1 のモル比で含む、請求項 42 に記載の方法。

30

【請求項 23】

請求項 13 - 22 のいずれか一項に記載の方法により製造された、インスリン様増殖因子 1 (IGF-1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質 (例えば、IGFBP-3) を含む単離されたタンパク質複合体を含む組成物。

【請求項 24】

インスリン様増殖因子 1 (IGF-1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質 3 (IGFBP-3) を、例えば 1 : 1 のモル比で含む単離されたタンパク質複合体を含む組成物であって、前記組成物は増量剤、緩衝液および界面活性剤を含む、組成物。

40

【請求項 25】

前記増量剤はスクロースまたはトレハロース、特にトレハロースである、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記緩衝液はヒスチジンまたはリン酸塩である、請求項 24 または 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記緩衝液は pH 5.5 - 6.5 である、請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本開示は、1つ以上の種の酸化が、例えば2-8℃および／または25℃の保存で最小に抑えられた、メカセルミンリンファパート（rhIGF-1／rhIGFBP-3）の安定な製剤、前記製剤を製造する方法、および治療、特に乳幼児、例えば早産児の治療におけるこれの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

メカセルミンリンファパートは、低出生体重児の疾患および合併症、例えば、低出生体重児の脳室内出血、気管支肺異形成症および／または慢性肺疾患を治療するために使用される、組換えヒトインスリン様増殖因子-1（rhIGF-1）および組換えヒトインスリン様増殖因子結合タンパク質-3（rhIGFBP-3）の複合体である。

10

【0003】

例えば、約3-6ヶ月以上の間の保存中、2-8℃、25℃または40℃での治療タンパク質製品のより大きな安定性について特定の最適化された製剤が必要である。

【0004】

極めて希薄な製剤が、乳幼児、とりわけ早産児を治療するために必要とされる。メカセルミンリンファパートは典型的には持続静注により未熟児に投与される。驚いたことに、本発明者らは濃度が希薄な製剤では、複合体はより迅速に酸化することを立証した。

【発明の概要】

20

【0005】

本発明は一部、インスリン様増殖因子-1（IGF-1）およびインスリン様増殖因子結合タンパク質-3（IGFBP-3）を含むタンパク質複合体を含む製剤の酸化を低減させるための組成物および方法を提供する。いずれの特定の理論にも縛られることは望まないが、酸化種を低減させるための方法（例えば、抗酸化剤の添加、凍結乾燥、および／または使い捨てバッグ）は、より大きな効力および増加した安定性を有する改善された製剤を提供することが企図される。

【0006】

本開示は下記番号付けされたパラグラフにおいて要約される：

1. インスリン様増殖因子1（IGF-1）およびインスリン様増殖因子結合タンパク質（例えば、IGFBP-3）を、例えば1：1のモル比で含む単離されたタンパク質複合体を含む組成物であって、組成物は抗酸化剤を含み、酸化されたIGF-1種は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、50%を超えて増加しない、組成物。

30

【0007】

2. 酸化されたIGF-1種は、約25℃の温度での保存で3ヶ月後、25%を超えて増加しない、パラグラフ1の組成物。

【0008】

3. 酸化IGF-1種は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、10%を超えて増加しない、パラグラフ1または2の組成物。

【0009】

4. 酸化IGF-1種は、約25℃の温度での保存で3ヶ月後、実質的に増加しない、パラグラフ1の組成物。

40

【0010】

5. インスリン様増殖因子1（IGF-1）およびインスリン様増殖因子結合タンパク質（例えば、IGFBP-3）を、例えば1：1のモル比で含む単離されたタンパク質複合体を含む組成物であって、組成物は抗酸化剤を含み、酸化されたIGF-1種の%は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、20%を超えて増加しない、組成物。

【0011】

6. 酸化されたIGF-1種は、2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、10%を超えて増加しない、パラグラフ5の組成物。

50

【 0 0 1 2 】

7. 酸化された I G F - 1 種は、2 - 8 °C の温度での保存で 3 ヶ月後、実質的に増加しない、パラグラフ 6 の組成物。

【 0 0 1 3 】

8. 抗酸化剤はメチオニンである、前記パラグラフのいずれか一つの組成物。

【 0 0 1 4 】

9. 組成物は、メチオニンを 0 . 2 m M ~ 5 0 m M の濃度で含む、前記パラグラフのいずれか一つの組成物。

【 0 0 1 5 】

10. 組成物は、メチオニンを 0 . 5 m M の濃度で含む、パラグラフ 9 の組成物。

【 0 0 1 6 】

11. 組成物は、メチオニンを 5 m M の濃度で含む、パラグラフ 9 の組成物。

【 0 0 1 7 】

12. 抗酸化剤はチオ硫酸ナトリウムである、パラグラフ 1 - 7 のいずれか一つの組成物。

【 0 0 1 8 】

13. 組成物はチオ硫酸ナトリウムを 0 . 2 m M ~ 5 0 m M の濃度で含む、前記パラグラフのいずれか一つの組成物。

【 0 0 1 9 】

14. 組成物はチオ硫酸ナトリウムを 0 . 5 m M の濃度で含む、パラグラフ 13 の組成物。

【 0 0 2 0 】

15. 組成物はチオ硫酸ナトリウムを 5 m M の濃度で含む、パラグラフ 13 の組成物。

【 0 0 2 1 】

16. I G F - 1 の 1 % 未満が、3 ヶ月間の保存で、タンパク質複合体中に酸化種として存在する、前記パラグラフのいずれか一つの組成物。

【 0 0 2 2 】

17. I G F - 1 の 0 . 6 % 未満が、3 ヶ月間の保存で、タンパク質複合体中に酸化種として存在する、前記パラグラフのいずれか一つの組成物。

【 0 0 2 3 】

18. 酸化種の量は R P - U P L C または S E C - H P L C により決定される、前記パラグラフのいずれか一つの組成物。

【 0 0 2 4 】

19. I G F B P - 3 は 5 % 未満のトリスルフィド変異体を含む、前記パラグラフのいずれか一つの組成物。

【 0 0 2 5 】

20. I G F B P - 3 は 2 % 未満のトリスルフィド変異体を含む、パラグラフ 19 の組成物。

【 0 0 2 6 】

21. I G F B P - 3 は 1 % 未満のトリスルフィド変異体を含む、パラグラフ 19 の組成物。

【 0 0 2 7 】

22. I G F B P - 3 は 0 . 5 % 未満のトリスルフィド変異体を含む、パラグラフ 19 の組成物。

【 0 0 2 8 】

23. 下記工程を含む、インスリン様増殖因子 1 (I G F - 1) タンパク質複合体を製造するための方法：組換え I G F - 1 を含む組成物を提供する工程；抗酸化剤を組成物に添加する工程および I G F - 1 を組成物から精製する工程。

【 0 0 2 9 】

24. 抗酸化剤はメチオニンである、パラグラフ 23 の方法。

10

20

30

40

50

【0030】

25. メチオニンは0.2 mM～1.0 mMの濃度で添加される、パラグラフ23の方法。

【0031】

26. メチオニンは0.5 mMの濃度で添加される、パラグラフ23の方法。

【0032】

27. メチオニンは5 mMの濃度で添加される、パラグラフ23の方法。

【0033】

28. 抗酸化剤はチオ硫酸ナトリウムである、パラグラフ23の方法。

【0034】

29. チオ硫酸ナトリウムは0.2 mM～1.0 mMの濃度で添加される、パラグラフ28の方法。

【0035】

30. チオ硫酸ナトリウムは0.5 mMの濃度で添加される、パラグラフ28の方法。

【0036】

31. チオ硫酸ナトリウムは5 mMの濃度で添加される、パラグラフ28の方法。

【0037】

32. 精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、50%を超えて増加しない、パラグラフ23～31のいずれか一つの方法。

【0038】

33. 精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、20%を超えて増加しない、パラグラフ23～31のいずれか一つの方法。

【0039】

34. 精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、10%を超えて増加しない、パラグラフ23～31のいずれか一つの方法。

【0040】

35. 精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、実質的に増加しない、パラグラフ23～31のいずれか一つの方法。

【0041】

36. 精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種は、2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、20%を超えて増加しない、パラグラフ23～31のいずれか一つの方法。

【0042】

37. 精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種の量は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、10%を超えて増加しない、パラグラフ23～31のいずれか一つの方法。

【0043】

38. 精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種の量は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、実質的に増加しない、パラグラフ23～31のいずれか一つの方法。

【0044】

39. 精製IGF-1タンパク質は0.6%未満の酸化IGF-1種を有する、パラグラフ23～31のいずれか一つの方法。

【0045】

40. 組換えIGF-1タンパク質は大腸菌において発現される、パラグラフ23～39のいずれか一つの方法。

【0046】

41. 組換えIGF-1タンパク質は封入体から精製される、パラグラフ23～40のいずれか一つの方法。

【0047】

42. 方法は、インスリン様増殖因子結合タンパク質3 (IGFBP-3) をIGF-1タンパク質に添加し、タンパク質複合体を形成させることをさらに含む、パラグラフ23～41のいずれか一つの方法。

10

20

30

40

50

【0048】

43. タンパク質複合体は IGF-1 および IGFBP-3 を 1 : 1 のモル比で含む、パラグラフ 42 の方法。

【0049】

44. パラグラフ 23 ~ 43 のいずれか一つの方法により製造された、インスリン様増殖因子 1 (IGF-1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質 3 (IGFBP-3) を含む単離されたタンパク質複合体を含む組成物。

【0050】

45. インスリン様増殖因子 1 (IGF-1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質 3 (IGFBP-3) を含む単離されたタンパク質複合体を、例えば 1 : 1 のモル比で含む組成物であって、組成物は増量剤、緩衝液および界面活性剤を含む、組成物。

10

【0051】

46. 増量剤はスクロースまたはトレハロースである、パラグラフ 45 の組成物。

【0052】

47. 増量剤はトレハロースである、パラグラフ 46 の組成物。

【0053】

48. 緩衝液はヒスチジンまたはリン酸塩である、パラグラフ 45 の組成物。

【0054】

49. 緩衝液は pH 5.5 - 6.5 である、パラグラフ 48 の組成物。

【0055】

20

改善された安定性は、約 25 °C (例えば約 23 °C ~ 約 27 °C) での保存、または約 40 °C (例えば約 38 °C ~ 約 42 °C) での保存中、例えば、約 3 - 6 ヶ月間の保存中達成される。

【0056】

1つの実施形態では、抗酸化剤 (例えばメチオニンおよび／またはチオ硫酸ナトリウム) を含む改善された IGF-1 / IGFBP-3 製剤が本明細書で提供される。

【0057】

他の実施形態では、製剤中の酸化種は凍結乾燥により低減された。

【0058】

他の実施形態では、濃縮タンパク質が、使用前希釈のために、バイアル内で製剤化される。

30

【0059】

1つの実施形態では、本開示は、抗酸化剤 (例えばメチオニンおよび／またはチオ硫酸ナトリウム) を含む凍結乾燥製剤を提供する。

【0060】

1つの実施形態では、本開示は、抗酸化剤 (例えばメチオニンおよび／またはチオ硫酸ナトリウム) を含む高濃度製剤を提供する。

【0061】

他の実施形態では、酸化種の低減された蓄積および改善された安定性が複合体を製剤化溶液とコンパウンディングする間でのステンレス鋼以外の接触面、例えば使い捨てバッグの使用により達成され；抗酸化剤 (例えばメチオニンおよび／またはチオ硫酸ナトリウム) を含む製剤および／または高濃度製剤が含まれる。

40

【0062】

要約すると、本発明は、とりわけ、保存中、改善された安定性という利点を有する IGF-1 / IGFBP-3 の改善された製剤を提供し、低出生体重児の疾患の治療における新生児への投与のための安全で有効な製品が提供される。

【0063】

1つの態様では、インスリン様増殖因子 1 (IGF-1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質 3 (IGFBP-3) を、例えば 1 : 1 のモル比で含む単離されたタンパク質複合体を含む組成物が本明細書で提供され、組成物は抗酸化剤を含み、酸化 IGF-

50

1種の量は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、50%を超えて増加せず、例えば、45%を超えて増加せず；例えば、40%を超えて増加せず、特に、35%を超えて増加せず；より特定的には、30%を超えて増加しない。いくつかの実施形態では、約25℃の温度での保存で3ヶ月後、酸化IGF-1種の量は、下記を超えて増加しない：25%；20%；15%；10%；5%；4%；3%；2%；または1%*。

【0064】

*これらの値は各々、優先権出願に記載された個々の開示内容を表し、請求項の補正の根拠として単独で使用するすることができる。

【0065】

いくつかの実施形態では、酸化IGF-1種の量は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、実質的に増加しない。

【0066】

本開示の製剤において使用することができるIGF-1：IGFBP-3のモル比としては、1.5-0.5 IGF-1：1 IGFBP-3が挙げられる。

【0067】

1つの態様では、インスリン様増殖因子1（IGF-1）およびインスリン様増殖因子結合タンパク質3（IGFBP-3）を、1：1のモル比で含む単離されたタンパク質複合体を含む組成物が本明細書で提供され、酸化IGF-1種の量は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、20%を超えて増加しない。

【0068】

いくつかの実施形態では、酸化IGF-1種の量は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、15%を超えて増加せず、例えば10%を超えて増加せず、例えば5%を超えて増加せず、特に4%を超えて増加せず、より特定的には3%を超えて増加しない。いくつかの実施形態では、酸化IGF-1種の量は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、2%を超えて増加しない。いくつかの実施形態では、酸化IGF-1種の量は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、1%を超えて増加しない。いくつかの実施形態では、酸化IGF-1種の量は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、実質的に増加しない。

【0069】

1つの実施形態では、抗酸化剤はメチオニンである、本開示による組成物または方法が本明細書で提供される。

【0070】

1つの実施形態では、メチオニン（メチオニンなどの抗酸化剤を添加することを含む）を0.2 mM～15 mM、例えば0.2 mM～10 mMの範囲（例えば、間）の濃度で含む、本開示による組成物または方法が本明細書で提供される。1つの実施形態では、メチオニンを0.2 mM；0.3 mM；0.4 mM；0.5 mM；0.6 mM；0.7 mM；0.8 mM；0.9 mM；1 mM；2 mM；3 mM；4 mM；5 mM；6 mM；7 mM；8 mM；または9 mM*の濃度で含む組成物が本明細書で提供される。1つの実施形態では、メチオニン（メチオニンなどの抗酸化剤を添加することを含む）を10 mMの濃度で含む、本開示による組成物または方法が本明細書で提供される。

【0071】

1つの実施形態では、抗酸化剤はチオ硫酸ナトリウムである、本開示による組成物または方法が本明細書で提供される。

【0072】

1つの実施形態では、組成物がチオ硫酸ナトリウム（これを添加することを含む）を、0.2 mM～15 mM、例えば0.2 mM～10 mMの範囲（例えば、間）の濃度で含む、本開示による組成物または方法が本明細書で提供される。

【0073】

1つの実施形態では、本開示による組成物または方法はチオ硫酸ナトリウムを0.2 mM；0.3 mM；0.4 mM；0.5 mM；0.6 mM；0.7 mM；0.8 mM；0.9 mM；1 mM；2 mM；3 mM；4 mM；5 mM；6 mM；7 mM；8 mM；または9

10

20

30

40

50

mM*の濃度で含む、組成物が本明細書で提供される。1つの実施形態では、組成物はチオ硫酸ナトリウムを10mMの濃度で含む、組成物が本明細書で提供される。

【0074】

1つの実施形態では、IGF-1の5%未満、例えば、4%未満、例えば、3%未満、特に、2%未満、特に1%未満が、3ヶ月間の保存で、タンパク質複合体中に酸化種として存在する、組成物が本明細書で提供される。

【0075】

1つの実施形態では、IGF-1の0.9%未満が、3ヶ月間の保存で、タンパク質複合体中に酸化種として存在する、例えばIGF-1の0.8%未満が酸化種として存在する、例えばIGF-1の0.7%未満が酸化種として存在する、特にIGF-1の0.6%未満が、3ヶ月間の保存で、タンパク質複合体中に酸化種として存在する、より特定のにはIGF-1の0.5%未満が酸化種として存在する、組成物が本明細書で提供される。1つの実施形態では、IGF-1の0.4%未満が、3ヶ月間の保存で、タンパク質複合体中に酸化種として存在する、組成物が本明細書で提供される。1つの実施形態では、IGF-1の0.3%未満が、3ヶ月間の保存で、タンパク質複合体中に酸化種として存在する、組成物が本明細書で提供される。1つの実施形態では、IGF-1の0.2%未満が、3ヶ月間の保存で、タンパク質複合体中に酸化種として存在する、組成物が本明細書で提供される。1つの実施形態では、IGF-1の0.1%未満が、3ヶ月間の保存で、タンパク質複合体中に酸化種として存在する、組成物が本明細書で提供される。

【0076】

1つの実施形態では、酸化種の量は逆相-超高速液体クロマトグラフィー(RP-ULC)により決定される、組成物が本明細書で提供される。

【0077】

1つの実施形態では、酸化種の量はサイズ排除クロマトグラフィー-HP LC分離モード(SEC-HP LC)により決定される、組成物が本明細書で提供される。

【0078】

1つの実施形態では、IGFBP-3は5%未満のトリスルフィド変異体、例えば4%未満のトリスルフィド変異体、例えば3%未満のトリスルフィド変異体、特に2%未満のトリスルフィド変異体、より特定のには1%未満のトリスルフィド変異体を含む、組成物が本明細書で提供される。

【0079】

1つの態様では、組換えIGF-1を含む組成物を提供する工程、抗酸化剤を組成物に添加する工程、およびIGF-1を組成物から精製する工程を含む、インスリン様増殖因子1(IGF-1)タンパク質複合体を製造するための方法が本明細書で提供される。

【0080】

1つの実施形態では、抗酸化剤を添加する工程を含み、抗酸化剤はメチオニンである方法が本明細書で提供される。

【0081】

1つの実施形態では、抗酸化剤を添加することを含み、抗酸化剤はチオ硫酸ナトリウムである方法が本明細書で提供される。

【0082】

1つの実施形態では、精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種の量は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、50%を超えて増加せず、例えば45%を超えて増加せず、例えば40%を超えて増加せず、特に35%を超えて増加せず、より特定のには30%を超えて増加しない方法が本明細書で提供される。

【0083】

1つの実施形態では、精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種の量は、約25℃の温度での保存で3ヶ月後、25%; 20%; 15%; 10%; 5%; 3%; 2%*を超えて増加しない、方法が本明細書で提供される。1つの実施形態では、精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種の量は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、1%を超えて増加し

10

20

30

40

50

ない、方法が本明細書で提供される。1つの実施形態では、精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種の量は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、実質的に増加しない、方法が本明細書で提供される。

【0084】

いくつかの実施形態では、精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種の量は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、20%；15%；10%；5%；4%；3%；2%*を超えて増加しない、方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、酸化IGF-1種の量は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、1%を超えて増加しない。いくつかの実施形態では、酸化IGF-1種の量は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、実質的に増加しない。

10

【0085】

いくつかの実施形態では、精製IGF-1タンパク質は、5%；4%；3%；2%；1%；0.9%；0.8%；0.7%；0.6%；0.5%；0.4%；0.3%；0.2%*未満の酸化IGF-1種を有する、方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、精製IGF-1タンパク質が0.1%未満の酸化IGF-1種を有する、方法が本明細書で提供される。

【0086】

いくつかの実施形態では、組換えIGF-1タンパク質は大腸菌において発現される、方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、組換えIGF-1タンパク質は封入体から精製される、方法が本明細書で提供される。

20

【0087】

いくつかの実施形態では、方法は、インスリン様増殖因子結合タンパク質（例えば、IGFBP-3）をIGF-1タンパク質に添加し、タンパク質複合体を形成させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、タンパク質複合体はIGF-1およびIGFBP-3を0.75~1.25:1または1:0.75-1.25の範囲で、例えば等モル量で含む。いくつかの実施形態では、タンパク質複合体はIGF-1およびIGFBP-3を0.75対1.25モル比で含む。いくつかの実施形態では、タンパク質複合体はIGF-1およびIGFBP-3を1:1モル比で含む。いくつかの実施形態では、タンパク質複合体はIGF-1およびIGFBP-3を1.25-0.75モル比で含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、組成物は、その方法により製造された、インスリン様増殖因子1（IGF-1）およびインスリン様増殖因子結合タンパク質3（IGFBP-3）を含む単離されたタンパク質複合体を含む。

30

【0089】

1つの実施形態では、本開示の組成物は、例えばポリソルベート（例えば、ポリソルベート80または20）またはトリトン-Xから選択される界面活性剤を、特に0.01%以下、例えば0.008%、0.0075%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%または0で含む。

【0090】

1つの実施形態では、製剤／組成物の%はw/wまたはw/vまたはv/vである。

40

【0091】

いくつかの態様では、組換えインスリン様増殖因子1（rIGF-1）および組換えインスリン様増殖因子結合タンパク質3（rIGFBP-3）を等モル量で含むタンパク質複合体、0.0025から0.0075の範囲の濃度、例えば約0.005%の濃度のポリソルベート界面活性剤、例えば80または20、特にポリソルベート20、および酢酸ナトリウム、酢酸、および／または塩化ナトリウムを含む緩衝液を含む、本開示のいずれかの態様による組成物が本明細書で提供され、組成物は約5.3-5.8のpHを有し、rIGF-1／IGFBP-3は、45~55マイクログラム/mL、約50マイクログラム/mLの濃度であり、IGF-1の0.6%未満が酸化種として存在し、例えば、組成物は、特に、本明細書における他の箇所で記載されるように、抗酸化剤、例えばメチオ

50

ニンおよび／またはチオ硫酸ナトリウムを含む。

【0092】

1つの実施形態では、特に増量剤を含む、本明細書で記載されるいずれかの開示／実施形態による組成物の凍結乾燥形態が提供される。

【0093】

1つの態様では、インスリン様増殖因子1（IGF-1）およびインスリン様増殖因子結合タンパク質（例えば、IGFBP-3）を1：1のモル比で含む単離されたタンパク質複合体、増量剤、緩衝液および界面活性剤を含む凍結乾燥製剤が本明細書で提供される。

【0094】

1つの実施形態では、増量剤はスクロースまたはトレハロースである。1つの実施形態では、増量剤はスクロースである。1つの薬剤では、増量剤はトレハロースである。

【0095】

1つの実施形態では、緩衝液はヒスチジンまたはリン酸塩である。1つの実施形態では、緩衝液はヒスチジンである。1つの実施形態では、緩衝液はリン酸塩である。1つの実施形態では、緩衝液はpH 5.5-6.5である。

【0096】

1つの実施形態では、本開示による製剤は、例えば独立して、必須アミノ酸から選択される1つ以上のアミノ酸を含む。

【0097】

1つの実施形態では、治療における本開示による組成物の使用が提供される。

【0098】

1つの実施形態では、治療のための、特に乳幼児、例えば早産児、低妊娠体重乳幼児および／または子癇前症後乳幼児の治療のための、特にBPD、ROPおよび／またはIVHについての治療または防止のための薬剤の製造における本開示による組成物の使用が提供される。

【0099】

本発明について、その好ましい特定の実施形態と共に記載してきたが、前記記載ならびに後述の実施例は、本発明を説明することを意図したものであり、本発明の範囲を制限するものではないことが理解されるべきである。発明の範囲内にある他の態様、利点および改変は発明が属する分野における当業者には明らかであろう。

【0100】

1つの実施形態では、本開示の組成物は液体である。

【0101】

1つの実施形態では、本開示の組成物は2-8℃で保存される。

【0102】

1つの実施形態は、本開示による凍結乾燥製剤の、例えば水溶液（注射用水、生理食塩水またはグルコース、等張溶液を含む）による再構成を含む。

【0103】

1つの実施形態では、本開示による製剤は患者への投与前、等張であり、というのも、例えば、それは水溶液（例えば、等張溶液）で再構成されたからであり、または、最終医薬品が等張であるからである。

【0104】

1つの実施形態では、本開示による組成物は塩化ベンザルコニウムを含まない。この賦形剤は早産児には禁忌である。1つの実施形態では、本開示の製剤は保存剤を含まない。

【0105】

1つの実施形態では、本開示による製剤／組成物は、乳幼児、例えば、早産児に毒性である材料成分を含まない。

【0106】

1つの実施形態では、安定性は化学安定性、すなわち化学分解の安定化を示す。

10

20

30

40

50

【0107】

1つの実施形態では、安定性は物理的安定性を示し、例えば、しばしば物理的安定性は、凝集、吸着および／または溶解度の変化（特に不溶性の増加）という結果になる。

【0108】

1つの実施形態では、本開示の組成物は、製造および／または投与中でのタンパク質（すなわちIGF-1および／またはIGFBP、例えばIGFBP-3）の吸着および／または損失を最小に抑える。

【0109】

実施形態では、安定性は熱安定性、例えば温度上昇および／または減少に耐える能力を示し、例えば、本開示の製剤は室温（例えば、約25～27℃）に少なくとも24時間耐えることができ、特に、投与、とりわけ継続投与のために十分な安定性を提供することができる。

10

【0110】

1つの実施形態では、本開示による組成物は、湿度により引き起こされる分解または変化に耐性がある。

【0111】

1つの実施形態では、本開示による組成物は、単位用量、例えば24時間の間の用量、特に早産児のための用量として提供される。

【0112】

1つの実施形態では、使い捨てバッグ中の本開示の組成物、例えば、液体製剤が提供され、特に、製剤は投与に好適であり／その準備ができています。これは有利であり、というのもそれは、製剤の、酸化を触媒する可能性がある表面との接触を最小に抑えるからであり、汚染、患者への感染も最小に抑えられるからである。

20

【0113】

1つの実施形態では、バイアル、特にガラスバイアル中で提供される本開示による濃縮液体製剤が提供される。

【0114】

1つの実施形態では、バイアル、例えばガラスバイアル中の本開示による凍結乾燥製剤が提供される。

【0115】

1つの実施形態では、本開示による製剤が充填されたバイアルまたは容器（バッグを含む）の中身は、不活性ガス、例えば窒素下にある。

30

【0116】

1つの実施形態では、脱アミノ分解経路は、本開示によるタンパク質複合体製剤において最小に抑えられる。

【0117】

1つの実施形態では、本開示の製剤は、適切な条件下で保存された場合、少なくとも3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、18ヶ月または24ヶ月の有効期間を有する。

【0118】

1つの実施形態では、本開示の製剤は濾過により滅菌され、例えば、この場合、タンパク質複合体の損失は本開示の製剤による濾過中、最小に抑えられる。

40

【0119】

1つの実施形態では、医薬品は湿気の侵入および／または光への曝露を最小に抑えるために外側ホイルパッケージング構成要素を有する。

【0120】

1つの実施形態では、本開示により製剤化された（例えば、液体製剤）および／または製造されたタンパク質複合体は、ストレス試験、例えば物理的ストレス試験、例えばかくはん試験、せん断試験、凝集分析、液体空気界面分析、溶解試験などでうまく機能する。

【0121】

1つの実施形態では、本明細書で開示される方法から得ることができる製剤および／ま

50

たは医薬品が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0122】

本発明は、とりわけ、インスリン様増殖因子-1 (IGF-1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質 (例えば、IGFBP-3) を含むタンパク質複合体を含む製剤の酸化を低減させるための方法および組成物を提供する。酸化種を低減させるための方法 (例えば、抗酸化剤の添加、凍結乾燥、使い捨てバッグ) は、より大きな効力および増加した安定性を有する改善された製剤を提供する。改善された安定性は、約25℃ (例えば約23℃~約27℃) での保存、または約40℃ (例えば約38℃~約42℃) での保存中、例えば、約3-6ヶ月間の保存中達成される。いくつかの実施形態では、本発明は抗酸化剤 (例えばメチオニンまたはチオ硫酸ナトリウム) を含む改善されたIGF-1 / IGF

10

【0123】

他の実施形態では、酸化種の低減された蓄積および改善された安定性は、複合体を製剤化溶液とコンパウンディングする間でのステンレス鋼以外の接触面、例えば使い捨てバッグの使用により達成された。要約すると、本発明は、とりわけ、保存中の改善された安定性という利点を有するIGF-1 / IGF

20

【0124】

いくつかの態様では、インスリン様増殖因子1 (IGF-1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質3 (IGFBP-3) を、1:1のモル比で含む単離されたタンパク質複合体を含む組成物が本明細書で提供され、組成物は抗酸化剤を含み、酸化IGF-1種の量は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、50%を超えて増加しない。

【0125】

1つの態様では、インスリン様増殖因子1 (IGF-1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質3 (IGFBP-3) を、1:1のモル比で含む単離されたタンパク質複合体を含む組成物が本明細書で提供され、酸化IGF-1種の量は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、20%を超えて増加しない。

30

【0126】

本発明は、いくつかの実施形態では、抗酸化剤はメチオニンであり、メチオニンを、例えば、0.2mM~10mMの濃度で含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、例えば、0.2mM~10mMの濃度のチオ硫酸ナトリウムである組成物が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、IGF-1の5%未満が、3ヶ月間の保存で、タンパク質複合体中に酸化種として存在する、組成物が本明細書で提供される。酸化種の量は逆相-超高速液体クロマトグラフィー (RP-UPLC) により、または、サイズ排除クロマトグラフィー-HPLC分離モード (SEC-HPLC) により決定される。いくつかの実施形態では、IGFBP-3は5%未満のトリスルフィド変異体を含む、組成物が本明細書で提供される。

40

【0127】

1つの態様では、組換えIGF-1を含む組成物を提供する工程、抗酸化剤を組成物に添加する工程、およびIGF-1を組成物から精製する工程を含む、インスリン様増殖因子1 (IGF-1) タンパク質複合体を製造するための方法が本明細書で提供される。

【0128】

抗酸化剤を添加することを含む、IGF-1 / IGF

50

【0129】

本発明は、いくつかの実施形態では、精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種の量は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、50%を超えて増加しない方法を提供する。いくつかの実施形態では、精製IGF-1組成物中の酸化IGF-1種の量は2-8℃の温度での保存で3ヶ月後、20%を超えて増加しない方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、精製IGF-1タンパク質は5%未満の酸化IGF-1種を有する方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、組換えIGF-1タンパク質は大腸菌において発現される、方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、組換えIGF-1タンパク質は封入体から精製される、方法が本明細書で提供される。

【0130】

いくつかの実施形態では、方法は、インスリン様増殖因子結合タンパク質3 (IGFBP-3) をIGF-1タンパク質に添加し、タンパク質複合体を形成させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、タンパク質複合体はIGF-1およびIGFBP-3を、0.75~1.25:1または1:0.75-1.25の範囲で、例えば等モル量で含む。いくつかの実施形態では、タンパク質複合体はIGF-1およびIGFBP-3を0.75対1.25モル比で含む。いくつかの実施形態では、タンパク質複合体はIGF-1およびIGFBP-3を1:1モル比で含む。いくつかの実施形態では、タンパク質複合体はIGF-1およびIGFBP-3を1.25-0.75モル比で含む。1つの態様では、組換えIGF-1、組換えIGFBP-3を含む組成物を提供する工程、抗酸化剤を組成物に添加する工程、およびIGF-1/IGFBP-3を精製する工程を含む、インスリン様増殖因子1 (IGF-1) /IGFBP-3タンパク質複合体を製造するための方法が本明細書で提供される。

【0131】

いくつかの実施形態では、組成物は、その方法により製造された、インスリン様増殖因子1 (IGF-1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質3 (IGFBP-3) を含む単離されたタンパク質複合体を含む。いくつかの態様では、組換えインスリン様増殖因子1 (rIGF-1) および組換えインスリン様増殖因子結合タンパク質3 (rIGFBP-3) を等モル量で含むタンパク質複合体、約0.005%の濃度のポリソルベート20界面活性剤、および酢酸ナトリウム、酢酸、および/または塩化ナトリウムを含む緩衝液を含む組成物が本明細書で提供され、組成物は約5.3-5.8のpHを有し、rIGF-1/IGFBP-3は約50マイクログラム/mLの濃度であり、IGF-1の0.6%未満が酸化種として存在する。

【0132】

1つの態様では、インスリン様増殖因子1 (IGF-1) およびインスリン様増殖因子結合タンパク質3 (IGFBP-3) を、1:1のモル比で含む単離されたタンパク質複合体、増量剤、緩衝液および界面活性剤を含む凍結乾燥製剤が本明細書で提供される。

【0133】

1つの実施形態では、増量剤はスクロースまたはトレハロースである。1つの実施形態では、増量剤はスクロースである。1つの薬剤では、増量剤はトレハロースである。

【0134】

1つの実施形態では、緩衝液はヒスチジンまたはリン酸塩である。1つの実施形態では、緩衝液はヒスチジンである。1つの実施形態では、緩衝液はリン酸塩である。1つの実施形態では、緩衝液はpH5.5-6.5である。

【0135】

発明の様々な態様は下記セクションにおいて詳細に記載される。セクションの使用は発明を制限することを意味しない。各セクションは、発明の任意の態様に当てはまる可能性がある。本出願では、「または」の使用は、別記されない限り「および/または」を意味する。

【0136】

定義

「早期」または「早産」または「低出生体重児」または「早産児」または「早生児」、または文法的等価物は、37週の妊娠期間前の、または、体重が乳幼児の在胎期間についての平均より10%少ない乳幼児の出生を示す。例えば、22-37週の間に生まれた乳幼児は早期と考えられる。

【0137】

1つの実施形態では、本明細書で採用される未熟児（または新生児）は、前に、例えば、37週以下、例えば22~37週（在胎期間）、あるいは23~34週または24~29週、特に23、24、25、26、27、28、29、30、31、33、34、35または36週の在胎期間で、生まれた乳幼児を示す。一般に、患者、例えば乳幼児、例えば未熟児はヒトである。

10

【0138】

最低体重の（必ずしも最も早産ではない）乳幼児は、本開示の治療から最も恩恵を受ける可能性がある。

【0139】

低在胎体重は、在胎期間に対する体重の最低四分位にある乳幼児を示す。

【0140】

子癇前症後に生まれた乳幼児はその単語から自明である。

【0141】

「GA」または「在胎期間」は、女性の最後の月経周期の最初の日から現在の日付までの週で測定される、妊娠の経過を記載する一般用語である。

20

【0142】

いくつかの実施形態では、早産児は、少なくとも1週、2週、3週、4週、1ヶ月、2ヶ月、または3ヶ月だけ時期尚早に生まれた乳幼児を示す。いくつかの実施形態では、早産児は、32週未満の在胎期間（GA）で生まれた乳幼児を示す。いくつかの実施形態では、早産児は28週未満の在胎期間（GA）で生まれた乳幼児を示す。「PMA」または「月経後年齢」は在胎期間+暦年齢を示す。「CA」または「補正年齢」は40週の妊娠前に生まれた週数を減らした暦年齢である。

【0143】

「IGF-I」は任意の種、例えばウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、およびヒト、好ましくはヒト由来のインスリン様増殖因子Iを示し、任意の起源からの外因性投与に言及する場合、天然、合成、または組換えに関係なく、適切な部位でIGF結合タンパク質に結合することが条件とされる。IGF-Iは、例えば、WO95/04076号に記載されるように、組換えにより生成させることができる。

30

【0144】

「IGFBP」または「IGF結合タンパク質」は、インスリン様増殖因子結合タンパク質ファミリー由来で、循環性（すなわち、血清または組織中）であるかどうかに関係なく、IGF-Iと通常関連し、または結合し、またはこれに複合体化するタンパク質またはポリペプチドを示す。そのような結合タンパク質は受容体を含まない。この定義には、IGFBP-1、IGFBP-2、IGFBP-3、IGFBP-4、IGFBP-5、IGFBP-6、Mac25（IGFBP-7）、およびプロスタサイクリン-刺激因子（PSF）または内皮細胞-特異的分子（ESM-1）、ならびにIGFBPと高い相同性を有する他のタンパク質が含まれる。Mac25は、例えば、Swiss helmet al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 4472-4476 (1995) および Oh et al. , J. Biol. Chem. , 271: 30322-30325 (1996) において記載される。PSFはYamauchi et al. , Biochemical Journal, 303: 591-598 (1994) において記載される。ESM-1はLassalle et al. , J. Biol. Chem. , 271: 20458-20464 (1996) において記載される。他の同定されたIGFBPについては、例えば、下記を参照されたい：1990年6月27日に公開されたEP375,438号；19

40

50

90年5月23日に公開されたEP 369, 943号; 1989年10月5日に公開されたWO 89/09268号; Wood et al., Molecular Endocrinology, 2: 1176-1185 (1988); Brinkman et al., The EMBO J., 7: 2417-2423 (1988); Lee et al., Mol. Endocrinol., 2: 404-411 (1988); Brewer et al., BBRC, 152: 1289-1297 (1988); 1988年12月7日に公開されたEP 294, 021号; Baxter et al., BBRC, 147: 408-415 (1987); Leung et al., Nature, 330: 537-543 (1987); Martin et al., J. Biol. Chem., 261: 8754-8760 (1986); Baxter et al., Comp. Biochem. Physiol., 91B: 229-235 (1988); 1989年9月21日に公開されたWO 89/08667号; 1989年10月19日に公開されたWO 89/09792号; およびBinkert et al., EMBO J., 8: 2497-2502 (1989)。

10

20

30

40

50

【0145】

「IGFBP-3」はインスリン様増殖因子結合タンパク質3を示す。IGFBP-3はインスリン様増殖因子結合タンパク質ファミリーのメンバーである。IGFBP-3はウシ、ヒツジ、ブタおよびヒトを含む任意の種由来であってもよく、天然配列または変異体形態であり、限定はされないが、天然起源のアレル変異体が挙げられる。IGFBP-3は、天然、合成または組換えに関係なく、任意の起源由来であってもよく、ただし、IGF-Iに適切な部位で結合することが条件とされる。IGFBP-3はPCT公開WO 95/04076号に記載されるように組換えにより生成させることができる。

【0146】

IGF-1およびIGF結合タンパク質（例えば、IGFBP-3）のための製剤はWO 2022/086953号（参照により本明細書に組み込まれる）において開示される。

【0147】

「治療組成物」は本明細書では、IGF-I、その類似体、またはその結合タンパク質、IGFBP-3と組み合わせたIGF-I（IGF-I/IGFBP-3複合体）を含むと規定される。治療組成物はまた、他の物質、例えば水、ミネラル、担体、例えばタンパク質、および当業者に知られている他の賦形剤を含んでもよい。いくつかの実施形態では、治療組成物は、界面活性剤、例えばポリソルベート20（P20）またはポリソルベート80（P80）を含む。

【0148】

IGF-Iの「類似体」はヒトまたは動物においてIGF-Iと同じ治療効果を有する化合物である。これらはIGF-Iの天然起源の類似体（例えば、切断型IGF-I）、またはIGF-Iの公知の合成類似体のいずれかとすることができる。例えば、IGF-Iの類似体化合物については、米国特許第5,473,054号を参照されたい。

【0149】

「抗酸化剤」は、酸化種の形成を防止または低減させる、製剤に含まれる化合物である。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は還元剤、フリーラジカルスカベンジャー、キレート剤、連鎖停止剤、窒素、などから選択される。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、L-メチオニン、メタ重亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウムおよびグルタチオンからなる群より選択される還元剤である。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、L-ヒスチジン、L-アスコルビン酸、カタラーゼおよび白金からなる群より選択されるフリーラジカルスカベンジャーである。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、EDTA二水和物のナトリウム塩、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）およびクエン酸からなる群より選択されるキレート剤である。いくつかの実施形態では、抗酸化剤はL-メチオニン、L-システイン、チオ硫酸ナトリウムおよびBHTからなる連鎖停止剤である。

【0150】

IGF-Iの「アゴニスト」は、哺乳類において、特にヒトにおいてIGF、とりわけIGF-Iの血清および組織レベルを増加させることができるペプチドを含む化合物である。例えば、IGFアゴニスト分子についてはUS 6, 251, 865号を参照されたい。

【0151】

「凍結乾燥」は、凍結され、真空下に置かれた後、氷は液相を通過せず固体から蒸気に直接変化することができ、水が生成物から除去されるプロセスを示す。「凍結乾燥製剤」は、例えば、保存中の安定性を改善し、有効期間を増加させるために凍結乾燥され、典型的には投与前に再構成される製剤を示す。

10

【0152】

「安定性」は、医薬品が、製造時に有した特徴および特性を、その保存および使用期間中に保持する程度を示す。安定性は、その製剤、IGF-1およびIGFBP（例えば、IGFBP3）材料成分の安定性、（IGF-1／IGFBP3）複合体、容器およびクロージャーの完全性および安定性、製造および加工処理条件、パッケージング構成要素、保存および出荷条件、温度、光、および湿度、ならびに薬局有効期間および患者使用の予想される期間および条件に関する側面を含む。いくつかの実施形態では、安定性は望ましくない種、例えば酸化種の量の低減、凝集という結果になる高分子量種の低減および／または分解産物により表される低分子量種の低減を示す。いくつかの実施形態では、安定性は10%未満の望ましくない種を示す。いくつかの実施形態では、安定性は5%未満の望ましくない種を示す。いくつかの実施形態では、安定性は2%未満の望ましくない種を示す。

20

【0153】

IGF-1／IGFBP-3

IGF-1またはそのアゴニストまたは類似体は、本発明を実施するために使用することができる。IGF-Iは出生後成長および代謝のよく知られた制御因子である。Baker J, Liu J P, Robertson E J, Efstratiadis Aを参照されたい。それはおよそ7.5キロダルトン(Kd)の分子量を有する。ほとんどの循環IGFはIGF-結合タンパク質、より特定のにはIGFBP-3に結合する。IGF-Iは血清中で測定することができ、異常な成長関連状態が診断される。

30

【0154】

典型的には、例えばCLDを含む、本明細書で記載される疾患の治療に好適な治療組成物は、IGF-1およびIGF-1結合タンパク質、例えばIGF結合タンパク質(IGFBP)を含む。少なくとも6つの別個のIGF結合タンパク質(IGFBP)が様々な組織および体液中で同定されている。いくつかの実施形態では、本発明による好適な治療組成物は、IGF-1およびIGFBP-3を含む。IGF-1およびIGFBP-3はタンパク質複合体として、または別々で使用され得る。いくつかの実施形態では、IGF-1およびIGFBP（例えば、IGFBP-3）は等モル量で複合体化される。いくつかの実施形態では、治療組成物は、メカセルミンリンファパートを含む。いくつかの実施形態では、治療組成物は、メカセルミンリンファパートおよび界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、治療組成物は、メカセルミンリンファパート、界面活性剤および抗酸化剤を含む。いくつかの実施形態では、治療組成物は、メカセルミンリンファパートおよびポリソルベート20を含む。いくつかの実施形態では、治療組成物は、メカセルミンリンファパートおよびポリソルベート20および抗酸化剤を含む。いくつかの実施形態では、治療組成物は、メカセルミンリンファパート、ポリソルベート20およびメチオニンを含む。いくつかの実施形態では、治療組成物は、メカセルミンリンファパート、ポリソルベート20およびチオ硫酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、治療組成物は、メカセルミンリンファパート、ポリソルベート80および抗酸化剤を含む。いくつかの実施形態では、治療組成物は、メカセルミンリンファパート、ポリソルベート80およびメチオニンを含む。いくつかの実施形態では、治療組成物は、メカセルミンリンファパート

40

50

、ポリソルベート80およびチオ硫酸ナトリウムを含む。

【0155】

IGF-IおよびIGF-I結合タンパク質、例えばIGFBP-3は天然源から精製され、または組換え手段により生成させることができる。例えば、ヒト血清からのIGF-Iの精製は当技術分野でよく知られている(Rinderknecht et al., (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:2365-2369)。組換えプロセスによるIGF-Iの生成は、1984年12月に公開されたEP0128733号において示されている。IGFBP-3は天然源から、Baxter et al. (1986, Biochem. Biophys. Res. Comm. 139:1256-1261)により示されるものなどのプロセスを使用して精製することができる。あるいは、IGFBP-3は、Sommer et al., pp. 715-728, Modern Concepts Of Insulin-Like Growth Factors (E. M. Spencer, ed., Elsevier, N. Y., 1991)により議論されているように組換えで合成することができる。組換えIGFBP-3は1:1モル比(等モル量)でIGF-Iに結合する。

10

【0156】

医薬組成物および治療的使用

1つの態様では、インスリン様増殖因子1(IGF-1)およびインスリン様増殖因子結合タンパク質(例えば、IGFBP-3)を、例えば1:1のモル比で含む単離されたタンパク質複合体を含む組成物が本明細書で提供され、組成物は抗酸化剤を含み、酸化IGF-1種の量は約25℃の温度での保存で3ヶ月後、50%を超えて増加しない。

20

【0157】

本発明の製剤は低出生体重児の疾患および合併症、例えば、脳室内出血(IVH)、気管支肺異形成症(BPD)または慢性肺疾患(CLD)、例えば例として、低出生体重児と関連するCLDに苦しむ患者の治療において使用される。例えば、本発明は、CLDまたはCLDと関連する合併症に苦しむ早産児を治療するために使用することができる。いくつかの実施形態では、本発明は、少なくとも1週、2週、3週、4週、1ヶ月、2ヶ月、または3ヶ月だけ時期尚早に生まれた乳幼児を治療するために使用することができる。いくつかの実施形態では、本発明は、超早産児を治療するために使用することができる。

30

【0158】

発明の1つの実施形態では、IGF-Iは、IGF-Iに結合することができるIGF結合タンパク質、および界面活性剤と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、IGF-Iに結合することができるIGF結合タンパク質はIGF結合タンパク質3(IGFBP-3)である。いくつかの実施形態では、組成物は、ポリソルベート20またはポリソルベート80から選択される界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、メチオニンまたはチオ硫酸ナトリウムから選択される抗酸化剤をさらに含む。

【0159】

等モル量のIGF-IおよびIGF結合タンパク質3を含む組成物が使用され得る。いくつかの実施形態では、IGF-IおよびIGF結合タンパク質3は投与前に複合体化される。複合体は、生理的に適合可能な担体、例えば通常生理食塩水、またはリン酸緩衝生理食塩水に溶解したおよそ等モル量のIGF-IおよびIGF結合タンパク質3を混合することにより形成させることができる。いくつかの実施形態では、組換えヒトIGF-Iの濃縮溶液および組換えヒトIGF結合タンパク質3の濃縮溶液は十分な時間の間、一緒に混合され、等モル複合体が形成される。いくつかの実施形態では、組換えヒトIGF-Iおよび組換えヒトIGF結合タンパク質3は、WO96/40736号に記載されるように、精製中に合わせられ、複合体が形成される。

40

【0160】

抗酸化剤

タンパク質残基の酸化は多くの様々な原因から生じる。特定の抗酸化剤の添加を超えて

50

、酸化タンパク質ダメージの防止には、製品の製造プロセスおよび保存を通しての多くの因子、例えば、大気酸素、温度、光曝露、および化学汚染の注意深い制御が含まれる。そのため、発明は、医薬抗酸化剤の使用を企図し、制限はされないが、還元剤、酸素／フリーラジカルスカベンジャー、またはキレート剤が挙げられる。

【0161】

抗酸化剤は、酸化種の形成を防止または低減させる、製剤に含まれる化合物である。酸化反応は物質から酸化剤に電子を移動させる。このプロセス中、いくつかのフリーラジカルが生成され、これらは動物細胞にダメージを与える連鎖反応を開始させる。いずれの特定の理論にも縛られることは望まないが、抗酸化剤は、フリーラジカル中間体を除去することにより、これらの連鎖反応を減速させ、最終的にはそれ自体が酸化されることにより他の酸化反応を阻止することが企図される。抗酸化剤はしばしば、還元剤、例えば、チオールまたはポリフェノールの役割を果たす。

10

【0162】

治療タンパク質製剤中の抗酸化剤は、1つの態様では、水溶性であり、製品有効期間を通して活性なままである。還元剤および酸素／フリーラジカルスカベンジャーは、溶液中の活性酸素種を除去することにより作用する。EDTAなどのキレート剤は、フリーラジカル形成を促進する微量金属汚染物質に結合することにより有効となる。

【0163】

タンパク質酸化を防止するための様々な賦形剤の有効性に加えて、抗酸化剤自体がタンパク質に他の共有結合的または物理的变化を引き起こす可能性が懸念される。例えば、還元剤は分子内ジスルフィド結合の破壊を引き起こす可能性があり、これはジスルフィドシヤッフリングにつながる可能性がある。遷移金属イオンの存在下、アスコルビン酸およびEDTAは多くのタンパク質およびペプチドにおいてメチオニン酸化を促進することが示されている (Akers M J, and Defelippis M R. *Peptides and Proteins as Parenteral Solutions. In: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins.* Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, 編集者 *Pharmaceutical Science. Taylor and Francis, UK (1999)*); Fransson J. R., *J. Pharm. Sci.* 86 (9): 4046-1050 (1997); Yin J, et al., *Pharm Res.*, 21 (12): 2377-83 (2004)。チオ硫酸ナトリウムはrhuma b HER2における光および温度に誘導されるメチオニン-酸化のレベルを低減させることが報告されており; しかしながら、チオ硫酸-タンパク質付加物の形成もまた、報告されている (Lam X M, Yang J Y, et al., *J Pharm Sci.* 86 (11): 1250-5 (1997))。適切な抗酸化剤の選択がタンパク質の特異的なストレスおよび感受性に従い行われる。ある一定の態様で企図される抗酸化剤としては、還元剤および酸素／フリーラジカルスカベンジャー、EDTA、およびチオ硫酸ナトリウムが挙げられるが、それらに限定されない。

20

30

【0164】

いくつかの実施形態では、抗酸化剤は還元剤、フリーラジカルスカベンジャー、キレート剤、連鎖停止剤、窒素、などから選択される。メチオニンは多くの酸化ストレスに対して有効であることが観察されている (Lam X M, et al., *J Pharm Sci.*, 86 (11): 1250-5 (1997))。

40

【0165】

いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、L-メチオニン、メタ重亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウムおよびグルタチオンからなる群より選択される還元剤である。いくつかの実施形態では、抗酸化剤はL-ヒスチジン、L-アスコルビン酸、カタラーゼおよび白金からなる群より選択されるフリーラジカルスカベンジャーである。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、EDTA二水和物のナトリウム塩、ジエチレントリアミン五酢酸 (D

50

TPA) およびクエン酸からなる群より選択されるキレート剤である。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、L-メチオニン、L-システイン、チオ硫酸ナトリウムおよびBHTからなる連鎖停止剤である。いくつかの実施形態では、酸化は真空引きの繰り返しおよび窒素下での添加または動作により低減される。

【0166】

いくつかの実施形態では、組成物は、0.05mMのメチオニン、0.10mMのメチオニン、0.15mMのメチオニン、0.20mMのメチオニン、0.25mMのメチオニン、0.30mMのメチオニン、0.35mMのメチオニン、0.40mMのメチオニン、0.45mMのメチオニン、0.50mMのメチオニン、0.55mMのメチオニン、0.60mMのメチオニン、0.65mMのメチオニン、0.70mMのメチオニン、0.75mMのメチオニン、0.80mMのメチオニン、0.85mMのメチオニン、0.90mMのメチオニン、0.95mMのメチオニン、または1mMのメチオニンを含む。

10

【0167】

いくつかの実施形態では、組成物は、1mMのメチオニン、2mMのメチオニン、3mMのメチオニン、4mMのメチオニン、5mMのメチオニン、6mMのメチオニン、7mMのメチオニン、8mMのメチオニン、9mMのメチオニン、10mMのメチオニン、11mMのメチオニン、12mMのメチオニン、13mMのメチオニン、14mMのメチオニン、15mMのメチオニン、16mMのメチオニン、17mMのメチオニン、18mMのメチオニン、19mMのメチオニン、または20mMのメチオニンを含む。

20

【0168】

いくつかの実施形態では、組成物は、25mMのメチオニン、30mMのメチオニン、35mMのメチオニン、40mMのメチオニン、45mMのメチオニン、50mMのメチオニン、55mMのメチオニン、60mMのメチオニン、65mMのメチオニン、70mMのメチオニン、75mMのメチオニン、80mMのメチオニン、85mMのメチオニン、90mMのメチオニン、95mMのメチオニン、または100mMのメチオニンを含む。

【0169】

いくつかの実施形態では、組成物は、0.05mMのチオ硫酸ナトリウム、0.10mMのチオ硫酸ナトリウム、0.15mMのチオ硫酸ナトリウム、0.20mMのチオ硫酸ナトリウム、0.25mMのチオ硫酸ナトリウム、0.30mMのチオ硫酸ナトリウム、0.35mMのチオ硫酸ナトリウム、0.40mMのチオ硫酸ナトリウム、0.45mMのチオ硫酸ナトリウム、0.50mMのチオ硫酸ナトリウム、0.55mMのチオ硫酸ナトリウム、0.60mMのチオ硫酸ナトリウム、0.65mMのチオ硫酸ナトリウム、0.70mMのチオ硫酸ナトリウム、0.75mMのチオ硫酸ナトリウム、0.80mMのチオ硫酸ナトリウム、0.85mMのチオ硫酸ナトリウム、0.90mMのチオ硫酸ナトリウム、0.95mMのチオ硫酸ナトリウム、または1mMのチオ硫酸ナトリウムを含む。

30

【0170】

いくつかの実施形態では、組成物は、1mMのチオ硫酸ナトリウム、2mMのチオ硫酸ナトリウム、3mMのチオ硫酸ナトリウム、4mMのチオ硫酸ナトリウム、5mMのチオ硫酸ナトリウム、6mMのチオ硫酸ナトリウム、7mMのチオ硫酸ナトリウム、8mMのチオ硫酸ナトリウム、9mMのチオ硫酸ナトリウム、10mMのチオ硫酸ナトリウム、11mMのチオ硫酸ナトリウム、12mMのチオ硫酸ナトリウム、13mMのチオ硫酸ナトリウム、14mMのチオ硫酸ナトリウム、15mMのチオ硫酸ナトリウム、16mMのチオ硫酸ナトリウム、17mMのチオ硫酸ナトリウム、18mMのチオ硫酸ナトリウム、19mMのチオ硫酸ナトリウム、または20mMのチオ硫酸ナトリウムを含む。

40

【0171】

いくつかの実施形態では、組成物は、25mMのチオ硫酸ナトリウム、30mMのチオ硫酸ナトリウム、35mMのチオ硫酸ナトリウム、40mMのチオ硫酸ナトリウム、45

50

mMのチオ硫酸ナトリウム、50mMのチオ硫酸ナトリウム、55mMのチオ硫酸ナトリウム、60mMのチオ硫酸ナトリウム、65mMのチオ硫酸ナトリウム、70mMのチオ硫酸ナトリウム、75mMのチオ硫酸ナトリウム、80mMのチオ硫酸ナトリウム、85mMのチオ硫酸ナトリウム、90mMのチオ硫酸ナトリウム、95mMのチオ硫酸ナトリウム、または100mMのチオ硫酸ナトリウムを含む。

【0172】

いくつかの実施形態では、組成物は、酢酸ナトリウム、酢酸および／または塩化ナトリウムを含む緩衝液をさらに含む。いくつかの実施形態では、組成物は、酢酸ナトリウムまたは酢酸を含む緩衝液をさらに含む。いくつかの実施形態では、組成物は、塩化ナトリウムを含む緩衝液をさらに含む。

10

【0173】

いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムまたは酢酸は約10～100mMの濃度で存在する。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムまたは酢酸は約10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mMまたは100mMの濃度で存在する。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムまたは酢酸は約50mMの濃度で存在する。

【0174】

いくつかの実施形態では、塩化ナトリウムは約20mM～200mMの濃度で存在する。いくつかの実施形態では、塩化ナトリウムは、約20mM、約25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、約90mM、約95mM、約100mM、約105mM、約110mM、約115mM、約120mM、約125mM、約130mM、約135mM、約140mM、約145mM、約150mM、約155mM、約160mM、約165mM、約170mM、約175mM、約180mM、約185mM、約190mM、約195mM、または約200mMの濃度で存在する。いくつかの実施形態では、塩化ナトリウムは約105mMの濃度で存在する。

20

【0175】

いくつかの実施形態では、組成物はpH約5.0～6.0である。いくつかの実施形態では、pHは約5.0、約5.2、約5.4、約5.6、約5.8、約6.0、約6.2、約6.4、約6.6、約6.8または約7.0である。いくつかの実施形態では、組成物は約5.1、約5.3、約5.5、約5.7、約5.9、約6.1、約6.3、約6.5、約6.7、または約6.9のpHである。いくつかの実施形態では、組成物は約5.5のpHである。

30

【0176】

凍結乾燥

1つの態様では、IGF-1／IGFBP（例えば、IGFBP-3）を含む製剤は投与前に凍結乾燥される。凍結乾燥サイクルは、1つの態様では、3つの工程から構成される：冷凍、一次乾燥、および二次乾燥。冷凍工程では、溶液は冷却され、氷形成が開始される。さらに、この工程は増量剤の結晶化を誘導する。氷は一次乾燥段階で昇華し、これは、チャンバ圧力を氷の蒸気圧未満に低減させ、真空を使用し、熱を導入して昇華を促進することにより実施される。最後に、吸着または結合水は二次乾燥段階で低減されたチャンバ圧力下にて、上昇した棚温度で除去される。プロセスにより凍結乾燥ケーキとして知られている材料が生成する。その後、ケーキは注射用の滅菌水または好適な希釈剤のいずれかで再構成させることができる。

40

【0177】

凍結乾燥サイクルは賦形剤の最終物理的状态を決定するだけでなく、再構成時間、外観、安定性および最終含水量などの他のパラメータにも影響する。凍結状態の組成物構造は特定の温度で起こるいくつかの転移（例えば、ガラス転移、湿潤化、および結晶化）を通して進行し、その構造は凍結乾燥プロセスを理解し、最適化するために使用され得る。ガ

50

ラス転移温度 (T_g および / または T_g') は溶質の物理的状態についての情報を提供することができ、示差走査熱量測定 (DSC) により決定することができる。 T_g および T_g' は凍結乾燥サイクルを設計する場合に考慮しなければならない重要なパラメータである。例えば、 T_g' は一次乾燥に重要である。さらに、乾燥状態では、ガラス転移温度は最終生成物の保存温度についての情報を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、凍結乾燥実行は、 -25°C の一次乾燥温度および 25°C の二次乾燥温度からなる凍結乾燥サイクル下で、LyoStar 凍結乾燥器を使用して実施される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥実行は、 -20°C の一次乾燥温度および 25°C の二次乾燥温度からなる凍結乾燥サイクル下で、LyoStar 凍結乾燥器を使用して実施される。

【0178】

10

製剤および賦形剤

賦形剤は、医薬品 (例えば、IGF-1 / IGF-BP (例えば、IGF-BP-3) タンパク質複合体) の安定性および送達を付与または増強する添加物である。賦形剤は製剤の必須成分であり、そのため、安全で、患者が良好な耐容性を示す必要がある。タンパク質薬物にとっては、賦形剤の選択は特に重要であり、というのも、それらは薬物の有効性および免疫原性の両方に影響を与える可能性があるからである。よって、タンパク質製剤は、好適な安定性、安全性、および市場性を提供する賦形剤を適切に選択して開発される必要がある。

【0179】

いくつかの実施形態では、本明細書で記載される組成物および 1 つ以上の好適な医薬賦形剤を含む医薬組成物が提供される。

20

【0180】

いくつかの実施形態では、組成物は、ポリソルベート 20 を含む。いくつかの実施形態では、ポリソルベート 20 界面活性剤は約 0.001% ~ $2.4\% \text{ v/v}$ の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ポリソルベート 20 界面活性剤は約 0.2% ~ $0.4\% \text{ v/v}$ の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ポリソルベート 20 界面活性剤は約 0.001% 、 0.005% 、 0.01% 、 0.02% 、 0.03% 、 0.05% 、 0.10% 、 0.15% 、 0.2% 、 0.5% 、 0.7% 、 1.0% 、 1.2% 、 1.5% 、 1.8% 、 2.0% 、 2.2% または $2.4\% \text{ v/v}$ の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ポリソルベート 20 界面活性剤は約 0.0025% 、約 0.005% 、または約 $0.0075\% \text{ v/v}$ の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ポリソルベート 20 は 0.005% の濃度で存在する。

30

【0181】

いくつかの実施形態では、組成物は、ポリソルベート 80 を含む。いくつかの実施形態では、ポリソルベート 80 界面活性剤は約 0.001% ~ $2.4\% \text{ v/v}$ の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ポリソルベート 80 界面活性剤は約 0.2% ~ $0.4\% \text{ v/v}$ の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ポリソルベート 80 界面活性剤は約 0.001% 、 0.005% 、 0.01% 、 0.02% 、 0.03% 、 0.05% 、 0.10% 、 0.15% 、 0.2% 、 0.5% 、 0.7% 、 1.0% 、 1.2% 、 1.5% 、 1.8% 、 2.0% 、 2.2% または $2.4\% \text{ v/v}$ の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ポリソルベート 80 界面活性剤は約 0.0025% 、約 0.005% 、または約 $0.0075\% \text{ v/v}$ の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ポリソルベート 80 は 0.005% の濃度で存在する。

40

【0182】

凍結乾燥製剤は、1 つの態様では、少なくとも、緩衝液、増量剤、安定剤、および界面活性剤の 1 つ以上で構成される。適切な緩衝剤が含まれ、製剤は凍結乾燥中、安定なゾーンの pH 内で維持される。

【0183】

タンパク質のためのタンパク質製剤の開発における課題は、製造、出荷および保存のストレスに対して製品を安定化することである。製剤賦形剤の役割は、これらのストレスに

50

対して安定化を提供することである。賦形剤はまた、それらの送達を可能にし、患者の利便性を増強させるために、高濃度タンパク質製剤の粘度を低減するように使用される。一般に、賦形剤は、様々な化学および物理ストレスに対してタンパク質を安定化するメカニズムに基づいて分類することができる。いくつかの賦形剤は、特定のストレスの効果を軽減させる、または、特定のタンパク質の特定の感受性を制御するために使用される。他の賦形剤はタンパク質の物理的および共有結合的安定性により一般的な効果を有する。本明細書で記載される賦形剤は、製剤におけるそれらの化学的タイプまたはそれらの機能的役割のいずれかにより組織化される。安定化のモードについての簡単な説明が、各賦形剤のタイプについて議論する際に提供される。発明の生物製剤に含まれる塩の量およびタイプは最終溶液の所望の浸透圧（すなわち、等張、低張または高張）ならびに製剤に含まれる他の成分の量および浸透圧に基づいて選択される。

10

【0184】

例として、約5%のソルビトールを含めると、等張性を達成することができ、一方、等張性を達成するには約9%のスクロース賦形剤が必要である。発明の生物製剤内に含めることができる1つ以上の賦形剤の量または濃度範囲の選択は、塩、ポリオールおよび糖を参照することにより、以上で例示されている。しかしながら、当業者であれば、本明細書で記載され、特定の賦形剤を参照にすることによりさらに例示される考慮事項は、賦形剤、例えば、塩、アミノ酸、他の等張化剤、界面活性剤、安定剤、増量剤、凍結保護剤、凍結防止剤、抗酸化剤、金属イオン、キレート剤および／または保存剤の全てのタイプおよび組み合わせに等しく適用可能であることを理解するであろう。

20

【0185】

さらに、特定の賦形剤がモル濃度で報告される場合、当業者であれば、溶液の等価パーセント(%) w/v （例えば、(溶液試料中の物質のグラム/溶液のmL) $\times 100\%$ ）も企図されることを認識するであろう。

【0186】

いくつかの実施形態では、例えば、高タンパク質濃度である場合、または、例えば、高安定化剤濃度である場合、増量剤の濃度は低下させることができる。いくつかの実施形態では、増量剤が存在しない特定の製剤の等張性を維持するために、安定化剤の濃度がそれに応じて調整されるであろう（すなわち、「浸透圧調整」量の安定剤が使用されるであろう）。

30

【0187】

液体および凍結乾燥タンパク質製剤のために企図される賦形剤成分の比較が表Aで提供される。

40

50

【表 1】

表 A：凍結乾燥タンパク質製剤の賦形剤成分

賦形剤成分	凍結乾燥製剤中での機能
緩衝液	凍結乾燥中および再構成での製剤の pH の維持
等張化剤/安定剤	安定剤には、凍結保護剤および凍結防止剤、例えばポリオール、糖、ポリマーが含まれる。凍結保護剤はタンパク質を冷凍ストレスから保護し;凍結防止剤はフリーズドライ状態のタンパク質を安定化する。
増量剤	製品を強化するため;凍結ケーキに構造的強度を提供する、例えばマンニトールおよびグリシン
界面活性剤	凍結プロセス中の凝集を最小に抑えるのを助ける;再構成時間を低減させる、例えばポリソルベート 20 および 80
抗酸化剤	凍結ケーキにおける分子反応が著しく妨害され、そのため、これらが液体製剤に添加されている間、凍結製剤中では必要ない。
金属イオン/キレート剤	特定の金属イオンは補助因子として含めることができ、または、金属がプロテアーゼ活性に必要である場合。キレート剤は凍結製剤では必要とされない
保存剤	複数回投与製剤のためのみ。 微生物増殖に対する保護を提供する 再構成希釈剤中に含まれる

【0188】

緩衝液および緩衝剤

薬理学的に活性なタンパク質製剤の安定性は、狭い pH 範囲において最大となることが通常観察される。最適安定性のこの pH 範囲は予備処方研究中早期に同定される必要がある。いくつかのアプローチ、例えば加速安定性研究および熱量測定スクリーニング研究がこの試みにおいて有用である。処方が終了するとすぐに、タンパク質が製造され、その有効期間を通して維持されなければならない。よって、緩衝剤はほとんどの場合、製剤における pH を制御するために使用される。

【0189】

緩衝種の緩衝能は、pKa に等しい pH で最大となり、pH が、この値から離れて増加する、または減少するにつれ減少する。90 パーセントの緩衝能力が、その pKa の 1 pH 単位内に存在する。緩衝能はまた、緩衝液濃度の増加と共に比例的に増加する。

【0190】

緩衝液を選択する場合、緩衝液種およびその濃度はその pKa および所望の製剤 pH に基づいて規定される必要がある。緩衝液がタンパク質および他の製剤賦形剤と適合可能であり、いずれの分解反応も触媒しないことを保証することもまた重要である。考慮すべき別の側面は、緩衝液が投与時に誘発する可能性のあるチクチクする感覚および刺激作用である。例えば、クエン酸塩は、注射時にチクチク感を引き起こすことが知られており、とりわけ、皮下（SC）または筋肉内（IM）経路で投与された場合、薬物溶液がその部位に、IV 経路で投与された場合（製剤が投与で血液中に急速に希釈される）よりも比較的長い期間留まる場合そうである。直接 IV 注入により投与される製剤では、緩衝液（および任意の他の製剤成分）の総量はモニタする必要があり、リン酸カリウム緩衝液の形態で投与されるカリウムイオンは心血管効果のためにモニタされなければならない。

【0191】

凍結乾燥製剤のための緩衝液は追加の配慮を必要とする。リン酸ナトリウムのようない

くつかの緩衝液は、冷凍中タンパク質アモルファス相から結晶化する可能性があり、pHシフトという結果になる。他の一般的な緩衝液、例えば酢酸塩およびイミダゾールは凍結乾燥プロセス中に昇華または蒸発する可能性があり、よって、凍結乾燥中または再構成後に製剤のpHがシフトする。

【0192】

組成物中に存在する緩衝液系は、生理的に適合可能であり、医薬製剤の所望のpHを維持するように選択される。1つの実施形態では、溶液のpHはpH2.0～pH12.0である。例えば、溶液のpHは2.0、2.3、2.5、2.7、3.0、3.3、3.5、3.7、4.0、4.3、4.5、4.7、5.0、5.3、5.5、5.7、6.0、6.3、6.5、6.7、7.0、7.3、7.5、7.7、8.0、8.3、8.5、8.7、9.0、9.3、9.5、9.7、10.0、10.3、10.5、10.7、11.0、11.3、11.5、11.7、または12.0であってもよい。

10

【0193】

pH緩衝化合物は、製剤のpHをあらかじめ決められたレベルで維持するために任意の好適な量で存在してもよい。1つの実施形態では、pH緩衝濃度は、0.1mM～500mM（1M）である。例えば、pH緩衝剤は少なくとも0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200、または500mMであることが企図される。

20

【0194】

本明細書で設定される製剤を緩衝するために使用される例示的なpH緩衝剤としては下記が挙げられるが、それらに限定されない：有機酸、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸塩、コハク酸塩、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、Tris、HEPES、およびアミノ酸またはアミノ酸の混合物、例えば、限定はされないが、アスパラギン酸、ヒスチジン、およびグリシン。本発明の1つの実施形態では、緩衝剤はクエン酸塩である。

【0195】

安定剤および増量剤

1つの態様では、安定剤（または安定剤の組み合わせ）は保存により誘発される凝集および化学分解を防止または低減させるために添加される。再構成時に霞んだまたは濁った溶液はタンパク質が沈殿した、または、少なくとも凝集したことを示す。「安定剤」という用語は、凝集または物理的分解、例えば、水性状態での化学分解（例えば、自己消化、脱アミド、酸化、など）を防止することができる賦形剤を示す。企図される安定剤としては下記が挙げられるが、それらに限定されない：スクロース、トレハロース、マンノース、マルトース、ラクトース、グルコース、ラフィノース、セロビオース、ゲンチオビオース、イソマルトース、アラビノース、グルコサミン、フルクトース、マンニトール、ソルビトール、グリシン、アルギニンHCl、ポリヒドロキシ化合物、例えば、多糖、例えばデキストラン、デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、シクロデキストリン、N-メチルピロリデン（pyrrolidene）、セルロースおよびヒアルロン酸、塩化ナトリウム。本製剤では、安定剤は約0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、700、900、または1000mMの濃度で組み込まれる。1つの実施形態では、マンニトールおよびトレハロースは安定化剤として使用される。

30

40

【0196】

さらなる実施形態では、製剤はまた、適切な量の増量剤およびモル浸透圧濃度調整剤を含む。増量剤としては、例えば、マンニトール、グリシン、スクロース、ポリマー、例えばデキストラン、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、ラクトース、ソルビトール、トレハロース、またはキシリトールが挙げられる。1つの実施形態では、増量剤はマンニトールである。増量剤は約0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0

50

、1.2、1.5、1.7、2.3、4.5、6.7、8.9、10.11、12.13、14.15、16.17、18.19、20.30、40.50、60.70、80.90、100.200、500.700、900、または1000mMの濃度で組み込まれる。

【0197】

界面活性剤

タンパク質は、表面と相互作用し、それらを空気-液体、バイアル-液体、および液体-液体（シリコン油）界面で吸着および変性を受けやすくする、高い傾向を有する。この分解経路はタンパク質濃度に逆相関することが観察されており、可溶性および不溶性タンパク質凝集体の形成または表面への吸着による溶液からのタンパク質の損失という結果になる。容器表面吸着に加えて、表面による分解は物理的かくはんにより悪化し、それは製品の出荷および取扱い中に経験されるであろう。

10

【0198】

界面活性剤はタンパク質製剤において一般的に使用され、表面による分解が防止される。界面活性剤は界面位置についてタンパク質を打ち負かす能力を有する両親媒性分子である。界面活性剤分子の疎水性部分が界面位置（例えば、空気/液体）を占め、一方、分子の親水性部分は、バルク溶媒に向かって配向したままである。十分な濃度で（典型的には、およそ洗浄剤の臨界ミセル濃度）、界面活性剤分子の表面層は、タンパク質分子が界面で吸着するのを防止するように機能する。よって、表面による分解は最小に抑えられる。本明細書で企図される界面活性剤としては、下記が挙げられるが、それらに限定されない：ソルビタンポリエトキシレートの脂肪酸エステル、すなわちポリソルベート20およびポリソルベート80。2つは、分子に疎水性を付与する脂肪族鎖の長さのみ、それぞれ、C-12およびC-18、が異なる。したがって、ポリソルベート80はより表面-活性であり、ポリソルベート20より低い臨界ミセル濃度を有する。

20

【0199】

洗浄剤はタンパク質の熱力学な立体構造安定性に影響する。洗浄剤分子の疎水性尾部は、部分的または完全に折り畳まれていないタンパク質状態との特異的結合に関与する可能性がある。これらの型の相互作用により、より拡大されたタンパク質状態への立体構造平衡のシフトが引き起こされるであろう（すなわち、補体中のタンパク質分子の疎水性部分の結合ポリソルベートへの曝露が増加する）。あるいは、タンパク質天然状態がいくらかの疎水性表面を示す場合、天然状態に結合する洗浄剤は、その立体構造を安定化することができる。

30

【0200】

ポリソルベートの別の側面は、それらは本質的に酸化的分解を受けやすいことである。しばしば、原料として、それらは、十分な量の、過酸化物を含み、タンパク質残基側鎖、とりわけメチオニンの酸化を引き起こす。安定剤の添加から生じる酸化的ダメージの可能性は、最低有効濃度の賦形剤が製剤において使用されるべきであるという点を強調する。界面活性剤については、所定のタンパク質についての有効濃度は、安定化のメカニズムに依存する。

【0201】

界面活性剤はまた、冷凍および乾燥中の表面に関連する凝集現象を防止する適切な量で添加される。よって、例示的な界面活性剤としては、下記が挙げられるが、それらに限定されない：アニオン性、カチオン性、非イオン性、双性イオン性、および両性界面活性剤、例えば、天然アミノ酸に由来する界面活性剤。アニオン性界面活性剤としては下記が挙げられるが、それらに限定されない：ラウリル硫酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウムおよびスルホン酸ジオクチルナトリウム、ケノデオキシコール酸、N-ラウロイルサルコシンナトリウム塩、ドデシル硫酸リチウム、1-オクタンスルホン酸ナトリウム塩、コール酸ナトリウム水和物、デオキシコール酸ナトリウム、およびグリコデオキシコール酸ナトリウム塩。カチオン性界面活性剤としては下記が挙げられるが、それらに限定されない：塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウ

40

50

ムー水和物、および臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム。双性イオン性界面活性剤としては、CHAPS、CHAPSO、SB3-10、およびSB3-12が挙げられるが、それらに限定されない。非イオン性界面活性剤としては、ジギトニン、トリトンX-100、トリトンX-114、TWEEN（登録商標）-20、およびTWEEN（登録商標）-80が挙げられるが、それらに限定されない。界面活性剤としてはまた、下記が挙げられるが、それらに限定されない：ラウロマクロゴール400、ステアリン酸ポリオキシル40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油10、40、50および60、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート40、60、65および80、大豆レシチンおよび他のリン脂質、例えばジオレイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（DMPG）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMP C）、および（ジオレイルホスファチジルグリセロール）DOPG；スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロース。よって、これらの界面活性剤を、個々に、または、異なる比率の混合物として含む組成物がさらに提供される。本発明の1つの実施形態では、界面活性剤はTWEEN（登録商標）-80である。本製剤では、界面活性剤は約0.01～約0.5 g/Lの濃度で組み込まれる。提供される製剤のいくつかの実施形態では、界面活性剤濃度は0.005、0.01、0.02、0.03、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9または1.0 g/Lである。いくつかの実施形態では、界面活性剤はポリソルベート20である。いくつかの実施形態では、界面活性剤はポリソルベート80である。いくつかの実施形態では、界面活性剤は0.005 %ポリソルベート20である。いくつかの実施形態では、界面活性剤は0.005 %ポリソルベート80である。

10

20

30

40

50

【0202】

塩

塩がしばしば、製剤のイオン強度を増加させるために添加され、それは、タンパク質溶解度、物理的安定性、および等張性にとって重要となり得る。塩はタンパク質の物理的安定性に様々な点で影響する可能性がある。イオンはタンパク質の表面上の荷電残基に結合することにより、タンパク質の天然状態を安定化することができる。あるいは、塩はタンパク質骨格（-CONH-）に沿ったペプチド基に結合することにより変性状態を安定化することができる。塩はまた、タンパク質分子内の残基間の反発静電相互作用を遮蔽することにより、タンパク質の天然高次構造を安定化することができる。タンパク質製剤中の塩はまた、タンパク質凝集および不溶性につながる可能性のあるタンパク質分子間の引力的静電相互作用を遮蔽することができる。提供される製剤では、塩濃度は0.1、1、10、20、30、40、50、80、100、120、150、200、300～500 mMである。

【0203】

他の一般的な賦形剤成分

アミノ酸

アミノ酸は、タンパク質製剤において、緩衝液、増量剤、安定剤および抗酸化剤として、多用途利用を見出している。よって、1つの態様では、ヒスチジンおよびグルタミン酸はタンパク質製剤をそれぞれ、5.5-6.5および4.0-5.5のpH範囲で緩衝するために使用される。ヒスチジンのイミダゾール基は $pK_a = 6.0$ を有し、グルタミン酸側鎖のカルボキシル基は4.3の pK_a を有し、これにより、これらのアミノ酸は、それらの個々のpH範囲において緩衝するのに好適になる。グルタミン酸はそのような場合、特に有用である。ヒスチジンは市販のタンパク質製剤において普通に見出され、このアミノ酸はクエン酸塩、注射時にチクチクすることが知られている緩衝液の代替品を提供する。興味深いことに、ヒスチジンはまた、液体および凍結乾燥提示の両方において高濃度で使用されると、凝集に関して安定化効果を有し、高タンパク質濃度製剤の粘度を低減させる。

【0204】

様々な態様では、アミノ酸、グリシン、プロリン、セリン、アルギニンおよびアラニンの1つ以上（タンパク質を優先排除のメカニズムにより安定化することが示されている）を含む製剤が提供される。グリシンはまた、凍結乾燥製剤において一般的に使用される増量剤である。アルギニンは凝集を阻止する際に有効な薬剤となることが示されており、液体および凍結乾燥製剤の両方において使用されている。いくつかの実施形態では、アミノ酸濃度は0.1、1、10、20、30、40、50、80、100、120、150、200、300～500mMである。

【0205】

金属イオン

一般に、遷移金属イオンはタンパク質製剤において望ましくなく、というのも、それらは、タンパク質において物理的および化学的分解反応を触媒する可能性があるからである。しかしながら、特定の金属イオンは、タンパク質の補助因子であり、タンパク質の懸濁製剤中に存在する場合製剤に含められ、この場合、それらは配位化合物を形成する（例えば、インスリンの亜鉛懸濁液）。さらに、マグネシウムイオン（10–120mM）は、アスパラギン酸のイソアスパラギン酸への異性化を阻止することが提案されている。

【0206】

金属イオンがタンパク質において安定性または増加した活性を付与する2つの例は、ヒトデオキシリボヌクレアーゼ（rhDNase、Pulmozyme（登録商標））、および第VII因子である。rhDNaseの場合、Ca²⁺イオン（最大100mMまで）は特異的結合部位を介して酵素の安定性を増加させた。実のところ、EGTAを用いたカルシウムイオンの溶液からの除去は脱アミドおよび凝集の増加を引き起こした。しかしながら、この効果はCa²⁺イオンでのみ観察され；他の二価カチオンMg²⁺、Mn²⁺およびZn²⁺はrhDNaseを不安定化することが観察された。同様の効果が第VII因子において観察された。Ca²⁺およびSr²⁺イオンはタンパク質を安定化したが、Mg²⁺、Mn²⁺およびZn²⁺、Cu²⁺およびFe²⁺のような他のイオンは、酵素を不安定化した（Fatouros, A., et al., Int. J. Pharm., 155, 121–131（1997））。第VII因子を用いた別の研究では、凝集速度における著しい増加がAl³⁺イオンの存在下で観察された（Derrick TS, et al., J. Pharm. Sci., 93（10）：2549–57（2004））。緩衝塩のような他の賦形剤はしばしばAl³⁺イオンで汚染され、これは、処方製品において適切な品質の賦形剤を使用する必要があることを示している。

【0207】

保存剤

保存剤は、同じ容器から1回を超える抽出を必要とする多用途非経口製剤を開発する場合に必要とされる。それらの主要機能は微生物増殖を阻止し、医薬品の有効期間または使用を通して製品無菌を確保することである。一般的に使用される保存剤としては、ベンジルアルコール、フェノールおよびm-クレゾールが挙げられるが、それらに限定されない。保存剤は長い使用歴を有しているが、保存剤を含むタンパク質製剤の開発は困難となる可能性がある。保存剤はほとんどの場合、タンパク質に対し不安定化効果（凝集）を有し、これが、複数回投与タンパク質製剤におけるそれらの使用を制限する主要要因となっている（Roy S, et al., J Pharm Sci., 94（2）：382–96（2005））。今日まで、ほとんどのタンパク質薬物は使い捨て用のためだけに製剤化されてきた。複数回投与製剤が可能である場合、それらは患者の利便性、および市場性の増加を可能にするという追加の利点を有する。ヒト成長ホルモン（hGH）の場合、保存剤の開発により、より利便性の高い、多用途注射ペンの商品化につながり、例えば、Norditropin（登録商標）（液体、Novo Nordisk）、Nutropin AQ（登録商標）（液体、Genentech）およびGenotropin（凍結乾燥デュアルチャンバカートリッジ、Pharmacia & Upjohn）はフェノールを含み、一方、Somatropin（登録商標）（Eli Lilly）はm

ークレゾールを用いて製剤化される。

【0208】

いくつかの側面を保存剤形の製剤開発中に考慮する必要がある。医薬品中の有効な保存剤濃度は最適化されなければならない。これには、タンパク質安定性を損なわないで抗菌有効性を付与する濃度範囲で、剤形中の所定の保存剤を試験する必要がある。例えば、示差走査熱量測定（DSC）を使用して、インターロイキン-1受容体（Type I）のための液体製剤の開発において、3つの保存剤をうまくスクリーニングした。保存剤は市販の製品において一般的に使用される濃度での安定性に対するそれらの影響に基づきランク付けされた。

【0209】

保存剤を含む液体製剤の開発は凍結乾燥製剤よりも困難である。フリーズドライ製品は保存剤なしで凍結乾燥させ、使用時に保存剤含有希釈剤で再構成させることができる。これにより、保存剤がタンパク質と接触する時間が著しく短くなり、関連する安定性リスクが最小に抑えられる。液体製剤では、保存剤有効性および安定性は全製品有効期間（約18-24ヶ月）にわたって維持されなければならない。注意すべき重要な点は、保存剤有効性が、活性薬物および全ての賦形剤成分を含む最終製剤において証明されなければならないことである。

【0210】

いくつかの保存剤は、注射部位反応を引き起こす可能性があり、それは保存剤を選択する時に考慮する必要がある別の因子である。Norditropinにおける保存剤および緩衝液の評価に焦点をあてた臨床試験では、痛覚はm-クレゾールを含む製剤と比べて、フェノールおよびベンジルアルコールを含む製剤において、より低くなることが観察された（Kappelgaard A. M., Horm Res. 62 Suppl 3: 98-103 (2004)）。興味深いことに、一般的に使用される保存剤の中で、ベンジルアルコールは麻酔特性を有する（Minogue S C, and Sund A., Anesth Analg., 100 (3): 683-6 (2005)）。様々な態様では、保存剤の使用はいずれの副作用にもまさる利点を提供する。

【0211】

調製の方法

本発明はさらに、医薬製剤を調製するための方法を企図する。本方法は、下記工程の1つ以上をさらに含む：本明細書で記載される安定化剤を前記混合物に凍結乾燥前に添加する工程、増量剤、モル浸透圧濃度調整剤、および界面活性剤（その各々は本明細書で記載される）から選択される少なくとも1つの作用物質を前記混合物に凍結乾燥前に添加する工程。

【0212】

凍結乾燥材料に対する標準再構成の実行は、ある体積の純水または無菌注射用水（WFI）を添加することである（典型的には、凍結乾燥中に除去した体積に等しい）が、抗菌剤の希薄溶液が時として非経口投与用の医薬品の生成において使用される〔Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18: 1311-1354 (1992)〕。

【0213】

凍結乾燥材料は、水溶液として再構成され得る。様々な水性担体、例えば、無菌注射用水、複数回投与用途用の保存剤を有する水、または適切な量の界面活性剤を有する水（例えば、水性懸濁液の製造に好適な賦形剤と混合された活性化合物を含む水性懸濁液）。様々な態様では、そのような賦形剤は懸濁剤、例えば、限定はされないが、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガントガムおよびアカシアゴムであり；分散剤または湿潤剤は天然ホスファチド、例えば、限定はされないが、レシチン、またはアルキレンオキシドの脂肪酸との縮合生成物、例えば、限定はされないが、ステアリン酸ポリオキシエチレン、またはエチレンオキシドの長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物

10

20

30

40

50

、例えば、限定はされないが、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、またはエチレンオキシドの脂肪酸およびヘキシトールから誘導される部分エステルとの縮合生成物、例えばポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート、またはエチレンオキシドの脂肪酸およびヘキシトール無水物から誘導される部分エステルとの縮合生成物、例えば、限定はされないが、ポリエチレンソルビタンモノオレエートである。様々な態様では、水性懸濁液はまた、1つ以上の保存剤、例えば、限定はされないが、エチル、またはn-プロピル、p-ヒドロキシ安息香酸塩を含む。

【0214】

本発明の医薬組成物には、経口、経鼻、局所（頬側および舌下を含む）、または非経口（皮下、筋肉内、静脈内および皮内を含む）投与に好適なものが含まれる。製剤は、便宜上、単位剤形、例えば、単一用量を含む使い捨てバッグ（例えば、24時間のための用量）、錠剤および徐放カプセル、およびリポソーム中で提供することができ、薬学の当技術分野でよく知られた任意の方法により調製することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa.（第17版、1985）を参照されたい。いくつかの実施形態では、組成物は静脈内投与される。

【0215】

そのような調製方法は、1つ以上の副成分を構成する担体などの材料成分を投与される分子と関連させる工程を含む。一般に、組成物は、均一に、かつ、密接に、活性材料成分を液体担体、リポソームまたは微細化固体担体または両方と関連させることにより調製され、次いで、必要に応じて製品が成形される。

【0216】

経口投与に好適な本発明の組成物は別々の単位、例えば、各々があらかじめ決められた量の活性材料成分を含むカプセル、カシエ剤または錠剤として；粉末または顆粒として；水性液体または非水液体における溶液または懸濁液として；または、水中油液体エマルジョンまたは油中水液体エマルジョンとして、またはリポソームに充填されて、およびボーラスとして、などで提供することができる。

【0217】

非経口投与に好適な組成物には、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬および製剤を意図されたレシピエントの血液と等張にする溶質を含むことができる水性および非水滅菌注射溶液；ならびに、懸濁剤および増粘剤を含むことができる水性および非水無菌懸濁液が含まれる。製剤は単回投与または複数回投与容器、例えば、密閉アンプルおよびバイアル中で提供することができ、使用直前に無菌液体担体、例えば注射用水の添加のみが必要となるフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存することができる。即時注射溶液および懸濁液は無菌粉末、顆粒および錠剤から調製することができる。

【0218】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法は、界面活性剤、例えば、0.005%のポリソルベート20またはポリソルベート80および抗酸化剤、例えばチオ硫酸ナトリウムおよびメチオニンの存在下、IGF結合タンパク質（例えば、IGFBP-3）と複合体化されたIGF-Iの、そのような治療を必要とする乳幼児への非経口投与を提供する。非経口投与としては、静脈内（IV）、筋肉内（IM）、皮下（SC）、腹腔内（IP）、鼻腔内、および吸入経路が挙げられるが、それらに限定されない。いくつかの実施形態では、IGF-I/IGFBP-3組成物は静脈内投与される。IV、IM、SC、およびIP投与はボーラスまたは注入によってもよく、また、緩徐放出埋め込み装置によってもよく、ポンプ、緩徐放出製剤、および機械装置が挙げられるが、それらに限定されない。製剤、投与経路および方法、ならびに投与量は治療される障害および患者の病歴に依存する。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法は、界面活性剤、例えば、0.005%のポリソルベート20またはポリソルベート80の存在下、IGF結合タンパク質（例えば、IGFBP-3）と複合体化されたIGF-Iのそのような治療を必要とする乳幼児への静脈内投与を提供する。いくつかの実施形態では

、本明細書で開示される方法は、界面活性剤、例えば、0.005%のポリソルベート20またはポリソルベート80、および抗酸化剤、例えばメチオニンまたはチオ硫酸ナトリウムの存在下、IGF結合タンパク質3と複合体化されたIGF-Iのそのような治療を必要とする乳幼児への皮下投与を提供する。

【0219】

いくつかの実施形態では、rIGF-1/IGFBP-3を含む組成物は約10マイクログラム/mL-100マイクログラム/mLの濃度で存在する。例えば、いくつかの実施形態では、rIGF-1/IGFBP-3を含む組成物は約45-55マイクログラム/mLの濃度で存在する。いくつかの実施形態では、rIGF-1/IGFBP-3を含む組成物は約50マイクログラム/mLの濃度である。いくつかの実施形態では、rIGF-1/IGFBP-3を約10-100マイクログラム/mLの濃度で含む組成物が静脈内投与に好適である。いくつかの実施形態では、rIGF-1/IGFBP-3を約45-55マイクログラム/mLの濃度で含む組成物が静脈内投与に好適である。いくつかの実施形態では、rIGF-1/IGFBP-3を約50マイクログラム/mLの濃度で含む組成物が静脈内投与に好適である。

10

【0220】

いくつかの実施形態では、rIGF-1/IGFBP-3を含む組成物は約1000マイクログラム/mL-5000マイクログラム/mLの濃度で存在する。例えば、いくつかの実施形態では、rIGF-1/IGFBP-3を含む組成物は2000マイクログラム/mL-3000マイクログラム/mLの濃度で存在する。いくつかの実施形態では、rIGF-1/IGFBP-3を含む組成物は約2500マイクログラム/mLの濃度で存在する。いくつかの実施形態では、rIGF-1/IGFBP-3を約1000-5000マイクログラム/mLの濃度で含む組成物が静脈内投与に好適である。いくつかの実施形態では、rIGF-1/IGFBP-3を約2000マイクログラム/mL-3000マイクログラム/mLの濃度で含む組成物が静脈内投与に好適である。いくつかの実施形態では、rIGF-1/IGFBP-3を約2500マイクログラム/mLの濃度で含む組成物が静脈内投与に好適である。

20

【0221】

本発明による医薬組成物は様々な用量で投与され得る。例えば、好適な投与量は約100-1000マイクログラム/kg/24時間の範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、好適な投与量は約100マイクログラム/kg/24時間、150マイクログラム/kg/24時間、200マイクログラム/kg/24時間、250マイクログラム/kg/24時間、300マイクログラム/kg/24時間、350マイクログラム/kg/24時間、400マイクログラム/kg/24時間、450マイクログラム/kg/24時間、500マイクログラム/kg/24時間、550マイクログラム/kg/24時間、600マイクログラム/kg/24時間、650マイクログラム/kg/24時間、700マイクログラム/kg/24時間、750マイクログラム/kg/24時間、800マイクログラム/kg/24時間、850マイクログラム/kg/24時間、900マイクログラム/kg/24時間、950マイクログラム/kg/24時間または1000マイクログラム/kg/24時間以上であってもよい。いくつかの実施形態では、好適な投与量は約250マイクログラム/kg/24時間である。いくつかの実施形態では、好適な投与量は約400マイクログラム/kg/24時間である。いくつかの実施形態では、好適な投与量は約750マイクログラム/kg/24時間である。いくつかの実施形態では、好適な投与量は約1000マイクログラム/kg/24時間である。いくつかの実施形態では、本発明による医薬組成物は出生時から最大約23-34週の月経後年齢(PMA)まで、最大約28-32週のPMAまで、最大約29週+6日のPMAまで投与される。

30

40

【0222】

非経口または経口投与では、複合体の組成物は半固体または液体調製物、例えば液体、懸濁液、などであってもよい。生理的に適合可能な担体は、使用する投与量および濃度で

50

レシピエントに無毒性であるものであり、製剤の他の材料成分と適合可能である。例えば、製剤は好ましくは、酸化剤およびポリペプチドにとって有害であることが知られている他の化合物を含まない。よって、生理的に適合可能な担体としては、通常生理食塩水、血清アルブミン、5%デキストロース、血漿製剤、および他のタンパク質含有溶液が挙げられるが、それらに限定されない。任意で、担体はまた、洗浄剤または界面活性剤を含むことができる。

【0223】

いくつかの実施形態では、乾燥した凍結乾燥粉末が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、無菌医薬品グレード水、生理食塩水または緩衝水中で再構成させることができる。

【0224】

いくつかの実施形態では、本明細書で記載される方法を実施するためのキットが提供される。ある一定の実施形態では、キットは、rIGF-1、rIGFBP-3、ポリソルベート界面活性剤、例えばポリソルベート20またはポリソルベート80および抗酸化剤、例えばメチオニンまたはチオ硫酸ナトリウムを含む組成物を含む。いくつかの実施形態では、キットは、ガラスまたは他の好適な材料のバイアル中の本明細書で記載される組成物を含む。

【0225】

いくつかの実施形態では、パッケージング材料およびパッケージング材料内に含まれる医薬品を含む製造品が提供される。パッケージング材料は、医薬は、早産と関連する合併症を治療および／または防止するために、十分な期間有効な用量で投与され得ることを示すラベルを含む。医薬品はIGF-I、そのアゴニストまたは類似体を薬学的に許容される担体と一緒に含む。

【0226】

実施例（複数可）における値および／または特徴は特許請求の範囲に対する補正の根拠として使用することができ、値および／または特徴は、実施例において使用される他の要素に関係なく採用され、すなわち、値は単独で使用するすることができる。

【0227】

本明細書で「組成物」に言及する実施形態は本明細書における他のタイプ、例えば方法および用途の開示に等しく適用され、別記されない限り、逆の場合も同じである。

【0228】

本明細書で採用される「である」は、含む、を意味する。

【0229】

この明細書との関連で「含む」は「包含する」として解釈されるべきである。

【0230】

ある一定の特徴／要素を含む発明の実施形態はまた、関連要素／特徴から「構成される」または「本質的に構成される」他の実施形態に及ぶことが意図される。

【0231】

技術的に適切である場合、発明の実施形態は組合わせることができる。

【0232】

特許および出願などの技術参考文献は参照により本明細書に組み込まれる。

【0233】

本明細書で特定の、かつ、明確に記載されるいずれの実施形態も、単独でまたは1つ以上のさらなる実施形態と組み合わせられて、否認の基礎を形成することができる。

【0234】

背景セクションは補正のための根拠として使用され得る技術的に関連する細部を含む。

【0235】

実施例における個々の数値は一般に、発明についての態様および実施形態に関連し、そのため、特許請求の範囲に対する補正の根拠として使用することができる。

【0236】

10

20

30

40

50

発明は、発明の例示となることが意図された下記実施例によりさらに特徴付けられる。

【0237】

図面は説明のみのためのものであり、制限するためのものではない。

【図面の簡単な説明】

【0238】

【図1】逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）を用いて測定した、パーセント面積で表される酸化rhIGF-1の量を示すグラフである。

【図2】RP-HPLCを用いて測定した、パーセント面積で表されるrhIGFBP-3の量を示すグラフである。

【図3】RP-HPLCを用いて測定した、パーセント面積で表されるrhIGF-1の量を示すグラフである。 10

【図4A】抗酸化剤なし、0.5mMまたは5mMのメチオニンまたは0.5mMまたは5mMのチオ硫酸ナトリウムのいずれかの存在下での、3ヶ月の保存後の、SEC-HPLC評価による、0.15mg/mLタンパク質の製剤中の酸化rhIGF-1の変化を示すグラフである。

【図4B】抗酸化剤なし、0.5mMまたは5mMのメチオニン、または0.5mMまたは5mMのチオ硫酸ナトリウムのいずれかの存在下での、3ヶ月の保存後の、SEC-HPLC評価による、0.05mg/mLタンパク質の製剤中の酸化rhIGF-1の変化を示すグラフである。

【図5A】抗酸化剤なし、0.5mMまたは5mMのメチオニンまたは0.5mMまたは5mMのチオ硫酸ナトリウムのいずれかの存在下での、3ヶ月の保存後の、SEC-HPLC評価による、0.15mg/mLタンパク質の製剤中のrhIGF-1の量の変化を示すグラフである。 20

【図5B】抗酸化剤なし、0.5mMまたは5mMのメチオニン、または0.5mMまたは5mMのチオ硫酸ナトリウムのいずれかの存在下での、3ヶ月の保存後の、SEC-HPLC評価による、0.05mg/mLタンパク質の製剤中のrhIGF-1の量の変化を示すグラフである。

【図6A】抗酸化剤なし、0.5mMまたは5mMのメチオニンまたは0.5mMまたは5mMのチオ硫酸ナトリウムのいずれかの存在下での、3ヶ月の保存後の、SEC-HPLC評価による、0.15mg/mLタンパク質の製剤中のrhIGFBP-3の量の変化を示すグラフである。 30

【図6B】抗酸化剤なし、0.5mMまたは5mMのメチオニン、または0.5mMまたは5mMのチオ硫酸ナトリウムのいずれかの存在下での、3ヶ月の保存後の、SEC-HPLC評価による、0.05mg/mLタンパク質の製剤中のrhIGFBP-3の量の変化を示すグラフである。

【図7A】SDS-PAGEゲルであり、抗酸化剤なし、メチオニンまたはチオ硫酸ナトリウムの存在下で、2-8℃での3ヶ月の保存後の、150μg/mLのIGF-1/IGFBP-3タンパク質の安定性を示す。

【図7B】SDS-PAGEゲルであり、抗酸化剤なし、メチオニンまたはチオ硫酸ナトリウムの存在下で、2-8℃での3ヶ月の保存後の、50μg/mLのIGF-1/IGFBP-3タンパク質の安定性を示す。 40

【図7C】SDS-PAGEゲルであり、抗酸化剤なし、メチオニンまたはチオ硫酸ナトリウムの存在下で、2-8℃での3ヶ月の保存後の、150μg/mLのIGF-1/IGFBP-3タンパク質の安定性を示す。

【図7D】SDS-PAGEゲルであり、抗酸化剤なし、メチオニンまたはチオ硫酸ナトリウムの存在下で、2-8℃での3ヶ月の保存後の、50μg/mLのIGF-1/IGFBP-3タンパク質の安定性を示す。

【図8A】予め決められた設定点に到達した凍結乾燥実行の温度プロファイルを示す。

【図8B】凍結乾燥実行中の圧力プロファイルを示す。ピラニ圧力プロファイルにより、昇華は、34時間の一次乾燥後、ピラニ圧力が、キャパシタンスマノメータにより測定す 50

ると100mTorrの設定点に到達した時に、終了したことが示された。二次乾燥は水のさらなる脱着につながり、ピラニ圧力は二次乾燥中に再び設定点に到達した。

【図9A】凍結乾燥実行からの医薬品バイアルのベースライン状態を示す。

【図9B】60℃での2週間の保存後のバイアルを示す。

【図9C】60℃での4週間の保存後のバイアルを示す。

【図10A】液体製剤と比較した、SE-UPLCによるベースライン、2週間および4週間の保存後での、rhIGF-1 / rhIGFBP-3タンパク質複合体の量を示す。

【図10B】液体製剤と比較した、SE-UPLCによりベースライン、2週間および4週間の保存後に測定した、高分子量種の量を示す。

【図11A】液体製剤と比較した、SE-UPLCによりベースライン、2週間の保存後、4週間の保存後に測定した、rhIGFBP-3の量を示す。

【図11B】液体製剤と比較した、SE-UPLCによりベースライン、2週間の保存後、4週間の保存後に測定した、rhIGF-1の量を示す。

【図11C】液体製剤と比較した、SE-UPLCによりベースライン、2週間の保存後、4週間の保存後に測定した、酸化rhIGF-1の量を示す。

【図12A】ベースラインでの代表的な凍結乾燥実行を示す。

【図12B】60℃での4週間の保存後の代表的な製剤を示す。

【図12C】60℃での4週間の保存後の代表的な製剤を示す。

【図13A】ベースラインでの代表的な凍結乾燥実行を示す。

【図13B】60℃での4週間の保存後の代表的な製剤を示す。

【図13C】60℃での4週間の保存後の代表的な製剤を示す。

【図13D】60℃での4週間の保存後の代表的な製剤を示す。

【図14A】ベースラインでの代表的な凍結乾燥製剤のSDS PAGEゲルを示す。

【図14B】40℃での4週間の保存後の代表的な凍結乾燥製剤のSDS PAGEゲルを示す。

【図15A】例示的な凍結乾燥実行の温度プロファイルを示す。

【図15B】例示的な凍結乾燥実行の圧力プロファイルを示す。

【図16A】例示的な凍結乾燥実行からのパーセントrhIGF-1 / rhIGFBP-3タンパク質複合体の量のグラフを示す。

【図16B】例示的な凍結乾燥実行からの高分子量種の量のグラフを示す。

【図17A】液体製剤と比較した、ベースライン、2週間の保存後、および4週間の保存後での、RP-UPLCにより測定したrhIGFBP-3の量のグラフを示す。

【図17B】液体製剤と比較した、ベースライン、2週間の保存後、4週間の保存後での、RP-UPLCにより測定したrhIGF-1の量のグラフを示す。

【図17C】液体製剤と比較した、ベースライン、2週間の保存後、4週間の保存後での、RP-UPLCにより測定した酸化rhIGF-1の量のグラフを示す。

【図18A】ベースラインでの代表的な凍結乾燥製剤のグラフを示す。

【図18B】40℃での4週間の保存後の代表的な製剤のグラフを示す。

【図18C】40℃での4週間の保存後の代表的な製剤のグラフを示す。

【図18D】40℃での4週間の保存後の代表的な製剤のグラフを示す。

【図18E】40℃での4週間の保存後の代表的な製剤のグラフを示す。

【図18F】室温での48時間の液体保存後の代表的な製剤のグラフを示す。

【図19A】ベースラインでの代表的な製剤のグラフを示す。

【図19B】40℃での4週間の保存後の代表的な製剤のグラフを示す。

【図19C】室温での48時間の液体保存後の代表的な製剤のグラフを示す。

【図20A】ベースラインでの、代表的な凍結乾燥タンパク質製剤のSDS PAGEゲルを示す。

【図20B】40℃での4週間の保存後の代表的な凍結乾燥タンパク質製剤のSDS PAGEゲルを示す。

【0239】

10

20

30

40

50

実施例

本明細書で記載されるある一定の化合物、組成物および方法について、ある一定の実施形態にしたがい具体的に記載してきたが、下記実施例は発明の化合物を例示するためだけのものであり、これを制限することを意図しない。

【0240】

実施例 1

IGF-1 / IGFBP-3 液体製剤への抗酸化剤の添加後の、RP-UPLCによる酸化rhIGF-1の測定

この実施例は、インスリン様増殖因子-1 / インスリン様増殖因子結合タンパク質-3 (rhIGF-1 / rhIGFBP-3) 複合体を含み、抗酸化剤が添加された、または添加されていない製剤中の酸化種の量を示す。

10

【0241】

この実施例では、L-メチオニンおよびチオ硫酸ナトリウムは例示的な抗酸化剤として5 mMおよび50 mM濃度で使用される。メカセルミンリンファバート (IGF-1 / rhIGFBP-3) が0.15 mg/mLおよび0.50 mg/mLのタンパク質濃度で使用される。安定性を2-8℃および25℃での3ヶ月の保存後に測定した。パーセント酸化種 (ox rhIGF-1、図1)、rhIGF-1 (図2) およびrhIGFBP-3 (図3) をRP-UPLCにより、2-8℃ (例えば5℃) および25℃で3ヶ月後に測定した。

20

【表 2】

表 1. 3ヶ月後のRP-UPLCによるOx rhIGF-1 (%面積) の測定

RP-UPLC	ベースライン	3ヶ月@ 2-8℃	3ヶ月@ 25℃	% 増加 25℃
0.15 mg/mL + AntiOx なし	0.57	0.72	1.21	112.3%
0.15 mg/mL + 0.5 mM MET	0.53	0.53	0.53	0.0%
0.15 mg/mL + 5 mM MET	0.53	0.52	0.51	-3.8%
0.15mg/mL + 0.5 mM Na-Thio	0.54	0.55	0.56	3.7%
0.15mg/mL + 5 mM Na-Thio	0.51	0.53	0.53	-7.0%
0.05 mg/mL + AntiOx なし	0.55	0.77	1.76	220.0%
0.05 mg/mL + 0.5 mM MET	0.51	0.56	0.54	5.9%
0.05 mg/mL + 5 mM MET	0.48	0.52	0.50	4.2%
0.05mg/mL + 0.5 mM Na-Thio	0.55	0.56	0.63	10.5%
0.05mg/mL + 5 mM Na-Thio	0.48	0.55	0.58	20.8%

30

【0242】

結果により、より高い濃度 (0.15 mg/mL) のタンパク質は酸化的分解を受けにくかったこと、メチオニンおよびチオ硫酸ナトリウムはどちらも全ての濃度で、酸化rhIGF-1種の増加を低下させるのに有効であったことが示された。より低いタンパク質濃度では、L-メチオニンは抗酸化剤としてより高い有効性を示した。

40

【表 3】

表 2. 3 ヶ月後の RP-UPLC による rhIGF-1 (%面積) の測定

RP-UPLC	ベースライン	3 ヶ月@ 2-8 °C	3 ヶ月@ 25 °C
0.15 mg/mL + 抗酸化剤なし	21.00	20.51	19.66
0.15 mg/mL + 0.5 mM MET	21.27	20.82	20.52
0.15 mg/mL + 5 mM MET	21.10	20.84	20.48
0.15 mg/mL + 0.5 mM Na-thio	21.06	20.83	20.44
0.15 mg/mL + 5 mM Na-thio	21.02	20.79	20.66
0.05 mg/mL + 抗酸化剤なし	21.24	20.73	19.06
0.05 mg/mL + 0.5 mM MET	21.41	20.94	20.63
0.05 mg/mL + 5 mM MET	21.57	21.02	20.78
0.05 mg/mL + 0.5 mM Na-thio	21.36	21.00	20.65
0.05 mg/mL + 5 mM Na-thio	21.57	21.02	20.31

10

【表 4】

表 3. 3 ヶ月後の RP-UPLC による rhIGF-BP3 (%面積) の測定

RP-UPLC	ベースライン	3 ヶ月@ 2-8 °C	3 ヶ月@ 25 °C
0.15 mg/mL + 抗酸化剤なし	77.94	78.07	75.87
0.15 mg/mL + 0.5 mM MET	77.86	78.05	76.43
0.15 mg/mL + 5 mM MET	77.93	77.98	76.4
0.15 mg/mL + 0.5 mM Na-thio	78.00	78.01	76.68
0.15 mg/mL + 5 mM Na-thio	78.10	78.16	76.97
0.05 mg/mL + 抗酸化剤なし	77.90	77.85	76.04
0.05 mg/mL + 0.5 mM MET	77.62	77.88	76.69
0.05 mg/mL + 5 mM MET	77.69	77.8	76.61
0.05 mg/mL + 0.5 mM Na-thio	77.60	77.9	77.15
0.05 mg/mL + 5 mM Na-thio	77.94	77.96	77.26

20

30

【0243】

実施例 2

IGF-1 / IGF-BP-3 製剤への抗酸化剤の添加後の SEC-HPLC による酸化 rIGF-1 の測定

この実施例は、インスリン様増殖因子-1 / インスリン様増殖因子結合タンパク質-3 (rhIGF-1 / rhIGF-BP-3) 複合体を含み、抗酸化剤が添加された、または添加されていない製剤中の酸化種の量を示す。

【0244】

この実施例では、L-メチオニンおよびチオ硫酸ナトリウムは例示的な抗酸化剤として 5 mM および 50 mM 濃度で使用される。メカセルミンリンファバート (IGF-1 / rhIGF-BP-3) が 0.15 mg/mL および 0.05 mg/mL のタンパク質濃度で使用される。安定性を 2-8 °C および 25 °C での 3 ヶ月の保存後に測定した。パーセント酸化種 (ox rhIGF-1)、rhIGF-1 および rhIGF-BP-3 を SEC-HPLC によりベースラインで、および、2-8 °C (例えば 5 °C) および 25 °C で 3 ヶ月後に測定する。ベースラインおよび 3 ヶ月後での SEC 評価による酸化 rhIGF-1 の変化が、0.15 mg/mL (図 4 A) および 0.05 mg/mL (図 4 B) のタンパク質濃度で示される。ベースラインおよび 3 ヶ月後での SEC 評価による rhIGF-1 の変化が、0.15 mg/mL (図 5 A) および 0.05 mg/mL (図 5 B) のタンパク

40

50

質濃度で示される。ベースラインおよび3ヶ月後でのSEC評価による酸化rhIGFBP-3の変化が、0.15 mg/mL (図6A) および0.05 mg/mL (図6B) のタンパク質濃度で示される。

【表5】

表4. 3ヶ月後のSEC-HPLCによるOx rhIGF-1 (%面積) の測定

SEC-HPLC	ベースライン	3ヶ月@2-8℃	3ヶ月@25℃	%増加25℃
0.15 mg/mL + AntiOx なし	1.02	1.26	1.91	87%
0.15 mg/mL + 0.5 mM MET	1.18	1.06	1.98	68%
0.15 mg/mL + 5 mM MET	1.31	1.03	2.06	57%
0.15mg/mL + 0.5 mM Na-Thio	0.87	1.13	1.58	82%
0.15mg/mL + 5 mM Na-Thio	1.08	0.99	1.63	51%
0.05 mg/mL + AntiOx なし	0.66	0.72	2.01	205.0%
0.05 mg/mL + 0.5 mM MET	0.69	0.80	1.31	90%
0.05 mg/mL + 5 mM MET	0.61	0.43	1.31	115%
0.05 mg/mL + 0.5 mM Na-Thio	0.72	0.44	0.74	3%
0.05 mg/mL + 5 mM Na-Thio	0.87	0.51	0.93	7%

10

【0245】

20

結果により、製剤は0.05 mg/mLと比べて0.15 mg/mLのより高いタンパク質濃度で分解を受けにくいことが示された。結果により、メチオニンおよびチオ硫酸ナトリウムの両方が全ての濃度で有効であったことも示された。

【0246】

さらに、SEC分析により、結果から、より低いタンパク質濃度で、チオ硫酸ナトリウムはメチオニンと比べて抗酸化剤として幾分より有効であることが示された。

【表6】

表5. 3ヶ月後のSEC-HPLCによるrhIGF-1 (%面積) の測定

SEC-HPLC	ベースライン	3ヶ月@2-8℃	3ヶ月@25℃	%増加25℃
0.15 mg/mL + AntiOx なし	0.27	0.42	0.45	67%
0.15 mg/mL + 0.5 mM MET	0.32	0.39	0.45	41%
0.15 mg/mL + 5 mM MET	0.27	0.36	0.49	81%
0.15mg/mL + 0.5 mM Na-Thio	0.22	0.24	0.36	64%
0.15mg/mL + 5 mM Na-Thio	0.23	0.22	0.25	9%
0.05 mg/mL + AntiOx なし	0.22	0.43	0.37	68%
0.05 mg/mL + 0.5 mM MET	0.33	0.52	0.34	3%
0.05 mg/mL + 5 mM MET	0.27	0.45	0.28	4%
0.05 mg/mL + 0.5 mM Na-Thio	0.25	0.14	0.28	12%
0.05 mg/mL + 5 mM Na-Thio	0.23	0.08	0.22	-4%

30

40

【表 7】

表 6. 3 ヶ月後の SEC-HPLC による rhIGFBP-3 (%面積) の測定

SEC-HPLC	ベース ライン	3 ヶ月 @ 2- 8 °C	3 ヶ月 @ 25 °C	% 減少 25 °C
0.15 mg/mL + AntiOx なし	98.76	98.32	97.64	1%
0.15 mg/mL + 0.5 mM MET	98.51	98.55	97.57	1%
0.15 mg/mL + 5 mM MET	98.42	98.61	97.45	1%
0.15 mg/mL + 0.5 mM Na-thio	98.91	98.63	98.07	1%
0.15 mg/mL + 5 mM Na-thio	98.69	98.79	98.12	1%
0.05 mg/mL + AntiOx なし	99.06	98.86	97.64	1%
0.05 mg/mL + 0.5 mM MET	98.98	98.68	97.57	1%
0.05 mg/mL + 5 mM MET	99.11	99.12	97.45	1%
0.05 mg/mL + 5 mM Na-thio	99.02	99.41	98.07	0%
0.05 mg/mL + 0.5 mM Na-thio	98.91	99.41	98.86	0%

10

【0247】

データにより、L-メチオニンおよびチオ硫酸ナトリウムの両方ともが、抗酸化剤として作用することができることが示された。

20

【0248】

SDS-PAGE により、2-8 °C で、150 μg (図 7A) および 50 μg タンパク質濃度 (図 7B) で、または 25 °C で 150 μg (図 7C) および 50 μg (図 7D) で 3 ヶ月後、有意のタンパク質分解は観察されなかった。

【0249】

実施例 3. IGF-1 / IGFBP-3 製剤への抗酸化剤の添加後、-65 °C 未満および 2-8 °C で 3 ヶ月間の保存後の酸化 rIGF-1 の比較

この実施例は、IGF-1 / IGFBP-3 製剤への抗酸化剤の添加後、-65 °C 未満および 2-8 °C で 3 ヶ月の保存後の酸化 rIGF-1 の量を測定する。

30

【表 8】

表 7. 3 ヶ月後の RP-UPLC による Ox rIGF-1 (%面積) の測定

RP-UPLC	ベース ライン	3 ヶ月 @ 2- 8 °C	-65 °C 未満で 3 ヶ月
0.15mg/mL + AntiOx なし	0.57	0.72	NT
0.15mg/mL + AntiOx なし (1mL/2 mL チューブ)	0.57	0.60	0.54
0.05mg/mL + AntiOx なし	0.54	0.56	NT
0.05mg/mL + AntiOx なし (1mL/2 mL チューブ)	0.54	0.64	0.56

40

【0250】

この実施例におけるデータにより、-65 °C 未満 (冷凍) での保存が、2-8 °C での保存よりも好ましいことが示された。

50

【表 9】

表 8. 3 ヶ月後の SEC-UPLC による Ox r h I G F - 1 (% 面積) の測定

SEC-UPLC	ベース ライン	2-8 °C で 3 ヶ月	-65 °C 未満で 3 ヶ月
0.15mg/mL + AntiOx なし	1.02	1.26	NT
0.15mg/mL + AntiOx なし (1mL/2 mL チューブ)	1.02	1.41	1.29
0.05mg/mL + AntiOx なし	0.66	0.72	NT
0.05mg/mL + AntiOx なし (1mL/2 mL チューブ)	0.66	0.99	0.88

10

【0251】

実施例 4. メカセルミンリンファパート (I G F - 1 / I G F B P - 3) の凍結乾燥

この実施例は、I G F - 1 / I G F B P - 3 のパーセント酸化および安定性についての凍結乾燥の効果を示す。

【0252】

この実施例では、様々な緩衝賦形剤および増量剤を使用したメカセルミンリンファパート医薬品製剤を凍結乾燥させ、物理的性質および分解を評価した。

【0253】

この実施例では、I G F - 1 / I G F B P - 3 複合体のタンパク質濃度を 0.15 mg / mL (150 μ g / mL) とし、ポリソルベートを 0.015 % で添加した。3 つの製剤緩衝液、例えばヒスチジクロライド、リン酸ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム緩衝液および 2 つの増量剤、スクロースおよびトレハロースを比較した (表 9) 。

20

【0254】

結果から、ヒスチジン緩衝液では、最小量の高分子量 (H M W) 種形成が得られたことが示された。

【表 10】

表 9. メカセルミンリンファパートにおける緩衝液および増量剤

	緩衝液	増量剤
1.	10 mM クエン酸塩、pH 6.0	6% スクロース
2.	10 mM クエン酸塩、pH 6.0	6% トレハロース
3.	10 mM ヒスチジン、pH 6.0	6% スクロース
4.	10 mM ヒスチジン、pH 6.0	6% トレハロース
5.	10 mM リン酸塩、pH 6.0	6% スクロース
6.	10 mM リン酸塩、pH 6.0	6% トレハロース

30

40

【0255】

凍結乾燥を - 25 °C の一次乾燥温度および 25 °C の二次乾燥温度からなる凍結乾燥サイクル下で実施した (表 10) 。実行中の温度プロファイルが図 8 A に示され、圧力プロファイルが図 8 B に示される。

50

【表 1 1】

表 1 0 . メカセルミンリンファパート中の緩衝液および増量剤

	緩衝液	温度	傾斜率	圧力	時間
1.	冷却	5 ℃	1.0 ℃/分	大気	0.5 時間
2.	冷凍	-50 ℃	0.5 ℃/分	大気	1 時間
3.	一次乾燥	-25 ℃	0.5 ℃/分	100 mTorr	35 時間
4.	二次乾燥	25 ℃	0.5 ℃/分	100 mTorr	6 時間

【0 2 5 6】

凍結乾燥実行により全てのバイアルについて均質白色ケーキが得られた（表 1 1、図 9 A、図 9 B および図 9 C）。凍結乾燥したバイアルを 6 . 2 mL の通常生理食塩水で再構成し、製品品質をタンパク質濃度により、S o l o V P E、p H、S E - U P L C、R P - U P L C および還元 S D S - P A G E を用いて評価した。ケーキ外観および再構成時間もまた、製剤化した液体医薬品に対するベースラインで評価した浸透圧に加えて、凍結乾燥製剤について評価した。

【表 1 2】

表 1 1 . 6 0 ℃での 2 週間の保存後のケーキ外観

No.	ベースライン	2 週、60 ℃	4 週、60 ℃
1	堅い、白色、40% 収縮、詰まり	溶融	溶融
2	堅い、白色、20% 収縮、緩い	不変	不変
3	堅い、白色、10% 収縮、詰まり	溶融	溶融
4	堅い、白色、10% 収縮、緩い	砕けた ケーキ	不変
5	堅い、白色、50% 収縮、詰まり	溶融	溶融
6	堅い、白色、10% 収縮、詰まり	不変	不変

【0 2 5 7】

表 1 1 の結果からわかるように、6 0 ℃での 2 週間の保存後、スクロースを含むケーキは溶融したが、トレハロースを含むケーキは不変であった。

【表 1 3】

表 1 2 : 再構成時間および浸透圧

試料	ベースライン		2wk、60℃	4wk、60℃
番号	浸透圧 (凍結乾燥前)	再構成時間		
1	212	<15 sec	60 sec	90 sec
2	198	<15 sec	<20 sec	<20 sec
3	199	<15 sec	40 sec	30 sec
4	183	<15 sec	<20 sec	<20 sec
5	205	<15 sec	60 sec	60 sec
6	190	<15 sec	<20 sec	<20 sec

【0 2 5 8】

スクロースを含むケーキは再構成時間の増加を必要としたが、再構成時間はトレハロースを含むケーキについては実際には不変であった（表 1 2）。

【0 2 5 9】

S E - U P L C は、高分子量凝集体ピークから主ピークを分離する（図 1 0 A）。S E - U P L C による分析により、増量剤としてのトレハロースの使用により、スクロースの使用より良好なタンパク質安定性が得られたことが示された。6 0 ℃での 4 週間の保存後のスクロース製剤についての H M W ピークパーセンテージは製剤 # 3 の 7 . 9 % から製剤

5 の 2 0 . 2 % の 範 囲 と な っ た (図 1 0 B) 。 凝 集 の 増 加 に よ り 、 ト レ ハ ロ ー ス は ス ク ロ ー ス よ り も 良 好 な 凍 結 保 護 剤 で あ り 、 ま た は 、 そ の 結 果 、 ス ク ロ ー ス を 含 む 凍 結 乾 燥 ケ ー キ は 、 例 え ば 、 ケ ー キ 内 に 残 っ た 水 分 の た め に 崩 壊 す る こ と が 示 さ れ る 。 ク エ ン 酸 ナ ト リ ウ ム 、 ヒ ス チ ジ ン ク ロ ラ イ ド 、 お よ び リ ン 酸 ナ ト リ ウ ム 緩 衝 液 に つ い て の 結 果 の 比 較 に よ り 、 ヒ ス チ ジ ン 緩 衝 液 中 で 製 剤 化 さ れ た 医 薬 品 で は 、 最 小 量 の H M W 種 形 成 が 得 ら れ た こ と が 示 さ れ た 。

【 0 2 6 0 】

増量剤としてスクロースまたはトレハロースのいずれかを使用したメカセルミンリンファバート製剤の凍結乾燥により、白色の均一ケーキが得られた。いくつかのケーキ収縮が観察された（トレハロース含有製剤については約 1 0 % - 2 0 % 視 覚 的 収 縮 お よ び ス ク ロ ー ス 含 有 製 剤 に つ い て は 約 1 0 - 5 0 % ）。 6 0 ° C で 4 週 間 の 熱 ス ト レ ス 保 存 を 使 用 し て 、 凍 結 乾 燥 医 薬 品 の 分 解 を 評 価 し た 。 分 解 は ト レ ハ ロ ー ス を 含 む 製 剤 で 最 も 少 な か っ た 。

10

【 0 2 6 1 】

この実施例からのデータにより、トレハロースが、凍結乾燥提示についてはスクロースよりも良好に増量剤として能力を発揮すること、ならびに、ヒスチジンおよびリン酸緩衝液はクエン酸緩衝液と比べると好ましい緩衝液であることが示された。データはまた、凍結乾燥前の液体形態の製剤は 4 8 時間冷蔵状態で安定であることを示した。

【 0 2 6 2 】

実施例 5 . メカセルミンリンファバート (I G F - 1 / I G F B P - 3) の 凍 結 乾 燥

この実施例は、ヒスチジン緩衝液中での I G F - 1 / I G F B P - 3 の 凍 結 乾 燥 に つ い て の p H の 効 果 を 証 明 す る 。

20

【 0 2 6 3 】

ヒスチジン緩衝液中、5 . 5 、 6 . 0 、 お よ び 6 . 5 の 3 つ の p H 値 で の メ カ セ ル ミ ン リ ン フ ァ バ ー ト (I G F - 1 / I G F B P - 3) を 比 較 し た (表 1 3) 。 凍 結 乾 燥 前 の タ ン パ ク 質 濃 度 は 0 . 1 5 m g / m L で あ り 、 ポ リ ソ ル ベ ー ト を 0 . 0 1 5 % で 添 加 し た 。 ト レ ハ ロ ー ス を 増 量 剤 と し て 使 用 し た 。 ト レ ハ ロ ー ス の 濃 度 を 4 % ま で 低 減 さ せ 、 全 体 の 浸 透 圧 を 低 減 さ せ た 。 表 5 の 製 剤 # 4 は 酸 化 レ ベ ル へ の メ チ オ ニ ン の 影 響 を 評 価 す る た め に 1 m M の メ チ オ ニ ン を 含 ん だ 。

【 表 1 4 】

表 1 3 . 医 薬 品 製 剤 (タ ン パ ク 質 1 5 0 μ g / m L 全 試 料)

30

試料	緩衝液 10mM ヒスチジン	界面活性剤	増量剤	メチオニン
1.	pH5.5	0.015% P20	4% トレハロース	--
2.	pH 6.0	0.015% P20	4% トレハロース	--
3.	pH 6.5	0.015% P20	4% トレハロース	--
4.	pH 6.0	0.015% P20	4% トレハロース	1 mM
5.	Ph 6.0	0.015% P20	4% トレハロース	1 mM

【 0 2 6 4 】

凍結乾燥実行を - 2 0 ° C の 一 次 乾 燥 温 度 お よ び 2 5 ° C の 二 次 乾 燥 温 度 か ら な る 凍 結 乾 燥 サ イ ク ル 下 で 、 l y o s t a r 凍 結 乾 燥 器 を 使 用 し て 実 施 し た (表 1 4) 。

40

【 表 1 5 】

表 1 4 . メカセルミンリンファバート中の緩衝液および増量剤

	緩衝液	温度	傾斜率	圧力	時間
1.	冷却	5 ° C	1.0 ° C / 分	大気	0.5 時間
2.	冷凍	-50 ° C	0.5 ° C / 分	大気	1 時間
3.	一次乾燥	-25 ° C	0.5 ° C / 分	100 mTorr	35 時間
4.	二次乾燥	25 ° C	0.5 ° C / 分	100 mTorr	6 時間

50

【0265】

凍結乾燥した医薬品バイアルを40℃で2週間および4週間ならびに60℃で2週間の熱ストレス条件に置いた。各製剤の1つのバイアルを48時間室温で、凍結乾燥なしの液体対照として保持した。凍結乾燥実行により均質な堅い白色ケーキが得られ、視覚的評価により収縮が見られた（ベースラインで20%、熱ストレス保存後20-30%）。凍結乾燥バイアルを6.2mLの通常生理食塩水で再構成した。再構成時間は全ての製剤についてベースラインで20秒未満であった。

【0266】

SE-UPLC分析により、rhIGF-1とrhIGFBP-3の複合体の%ピーク面積はpH値6.0および6.5で最高となり、高分子量種はpH6.0、続いてpH6.5での4週間の熱保存後最低となったことが示された（図11A）。メチオニンの添加は、48時間室温で保持された液体試料について、少量の高分子量種を示した（図11A）。

10

【0267】

ベースラインでの代表的な凍結乾燥実行が図12Aで示される。60℃での4週間の保存後の2つの代表的な製剤（図12Bおよび図12C）。図13A、図13B、図13Cのベースラインでの代表的な凍結乾燥実行は60℃での4週間の保存後の代表的な製剤を示す。

【0268】

ベースラインでの代表的な凍結乾燥製剤のSDS PAGEゲルが図14Aで示され、40℃での4週間の保存後の代表的な凍結乾燥製剤のSDS PAGEゲルと比較される（図14B）。図15Aは例示的な凍結乾燥実行の温度プロファイルを示す。図15Bは例示的な凍結乾燥実行の圧力プロファイルを示す。図16Aは例示的な凍結乾燥実行からのパーセントrhIGF-1/rhIGFBP-3タンパク質複合体の量のグラフを示す。図16Bは例示的な凍結乾燥実行からの高分子量種の量のグラフを示す。

20

【0269】

タンパク質を含む4つ全ての製剤のRP-UPLCデータは同様であった（図17A）。酸化の低減が1mMのメチオニンを含む試料で観察された（図17A）。図17Bは、液体製剤と比較した、RP-UPLCにより測定した、ベースライン、2週間の保存後、4週間の保存後でのrhIGF-1の量のグラフを示す。図17Cは、液体製剤と比較した、RP-UPLCにより測定した、ベースライン、2週間の保存後、4週間の保存後での、酸化rhIGF-1の量のグラフを示す。pH5.5、6.0および6.5間で著しい差は観察されなかった。図18Aはベースラインでの代表的な凍結乾燥製剤のグラフを示す。40℃での4週間の保存後の代表的な製剤のグラフが図18B、図18C、図18Dおよび図18Eにおいて示される。図18Fは室温での48時間の液体保存後の代表的な製剤のグラフを示す。

30

【0270】

ベースラインでの代表的な製剤のグラフが図19Aに示され、40℃での4週間の保存後の代表的な製剤のグラフと比較される（図19B）。図19Cは、室温での48時間の液体保存後の、代表的な製剤のグラフを示す。SDS-PAGEによる分析（Coomassie）は、分解を示さなかった（図20Aおよび図20B）。測定したpH値は、ストレス保存後に予測される値から±0.1単位の範囲内にあった（表12）。

40

【0271】

全体として、この実施例におけるデータにより、5.5~6.5pH範囲が製剤に好適であり、少量のメチオニンの添加（1mM）により、凍結乾燥提示および液体対照についての酸化傾向が低下したことが示された。

【0272】

本明細書で記載されるある一定の化合物、組成物および方法について、ある一定の実施形態にしたがい具体的に記載してきたが、下記実施例は発明の化合物を例示するためだけのものであり、これを制限することを意図しない。

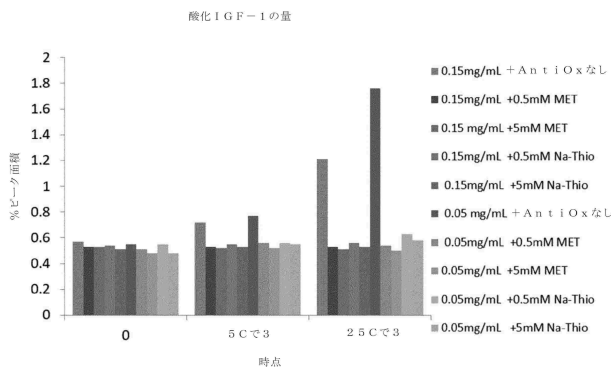
50

【0273】

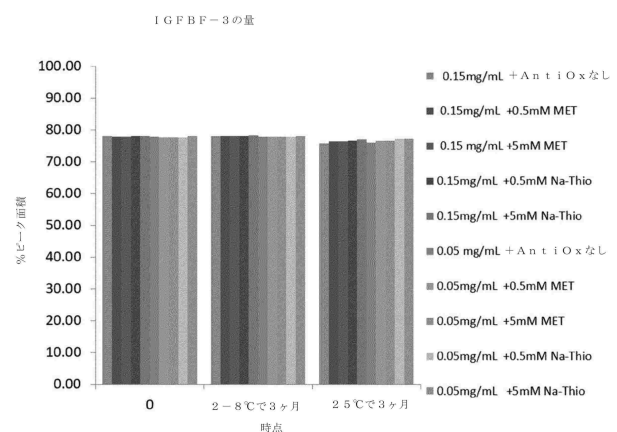
ここで使用される冠詞「1つの(a、an)」は明細書および特許請求の範囲では、明確に反対のことが指示されない限り、複数の指示対象を含むと理解されるべきである。ある群の1つ以上のメンバー間に「または」を含む特許請求の範囲または説明は、反対のことが示されない限り、または、文脈から明らかでない限り、その群のメンバーの1つ、それ以上、またはすべてが所定の製品またはプロセスに存在する、これにおいて使用される、または別様に関連すると、満たされると考えられる。発明は、その群のたった1つのメンバーが所定の製品またはプロセスに存在する、これにおいて使用される、または別様に関連する実施形態を含む。発明はまた、1を超える、またはグループメンバー全体が、所定の製品またはプロセスに存在する、これにおいて使用される、または別様に関連する実施形態を含む。さらに、発明は、列挙された請求項の1つ以上から、1つ以上の限定、要素、節、記述用語、などが、別記されない限り、または、矛盾または不一致が生じるであろうことが当業者に明らかでない限り、同じ基本請求項に従属する他の請求項（または、関連する、任意の他の請求項）に導入される全ての变形、組み合わせ、および順序を包含することが理解されるべきである。要素がリストとして提示される場合（例えば、マーカッシュ群または同様のフォーマット）、要素の各サブグループもまた開示されており、任意の要素（複数可）は群より除去できることが理解されるべきである。一般に、発明、または発明の態様は特定の要素、特徴、などを含むと言われる場合、発明のある一定の実施形態または発明の態様は、そのような要素、特徴、などから構成される、または、これから本質的に構成されることが理解されるべきである。簡単にするため、それらの実施形態は、全ての場合において、本明細書ではっきりと具体的に明記されていない。発明のいずれの実施形態または態様も、具体的な排除が明細書に列挙されているかどうかにかかわらず、請求項から明確に排除することができることもまた理解されるべきである。発明の背景を記載するために、および、その実施に関する追加の詳細を提供するために、本明細書で言及される刊行物、ウェブサイトおよび他の関連材料はこれにより、参照により組み込まれる。

【図面】

【図1】



【図2】



10

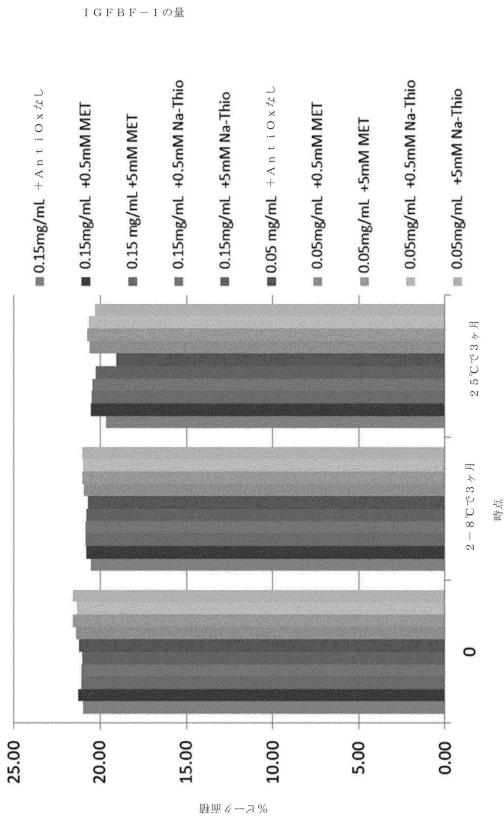
20

30

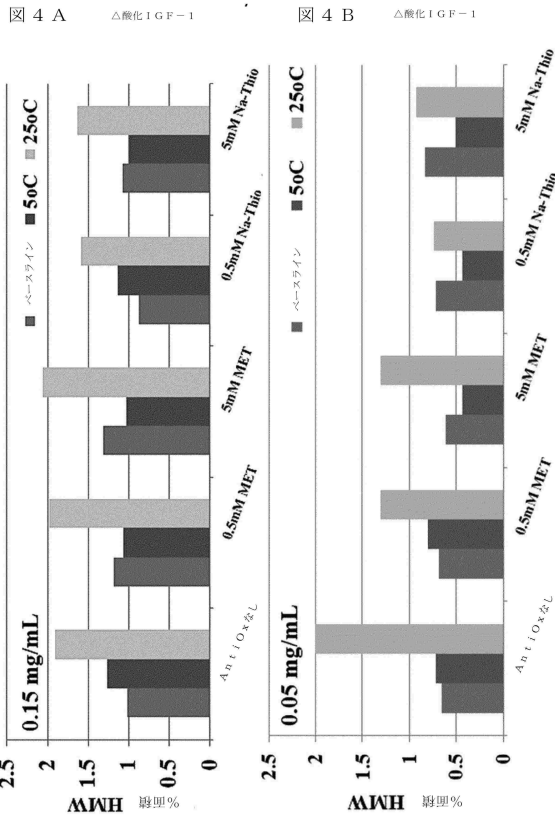
40

50

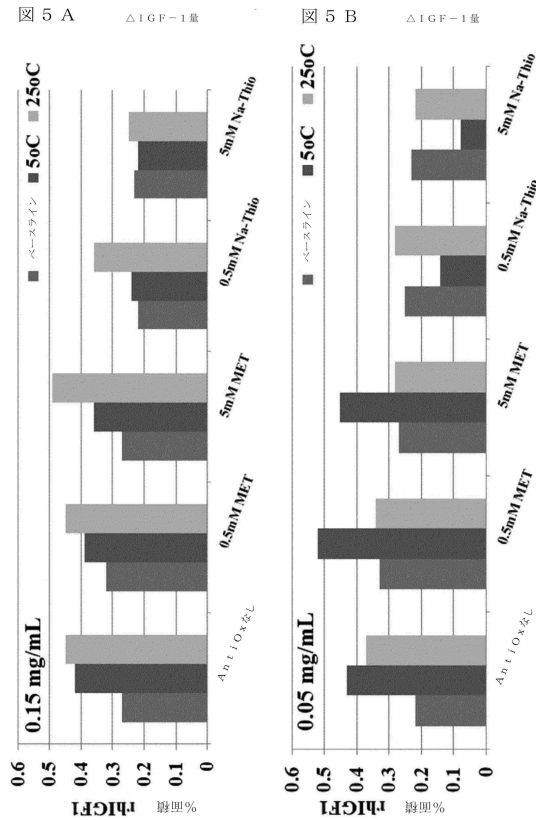
【図 3】



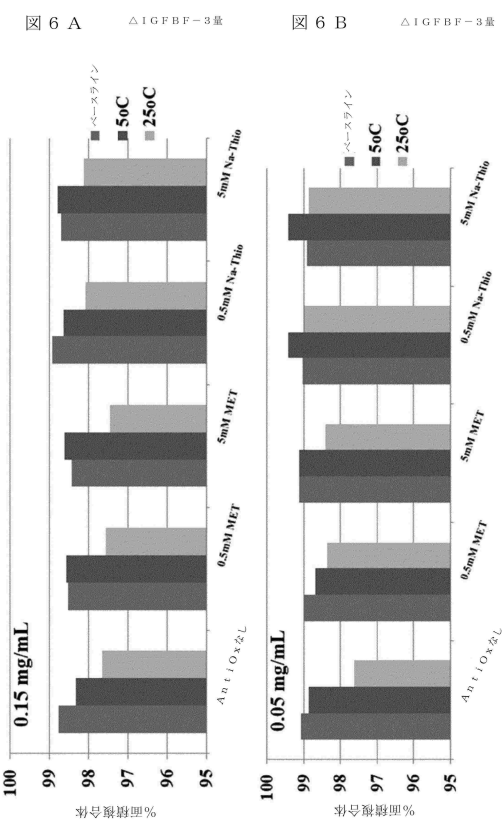
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

20

30

40

50

【図 10】

図 10 A 凍結乾燥実行 1 のための SE-UPL

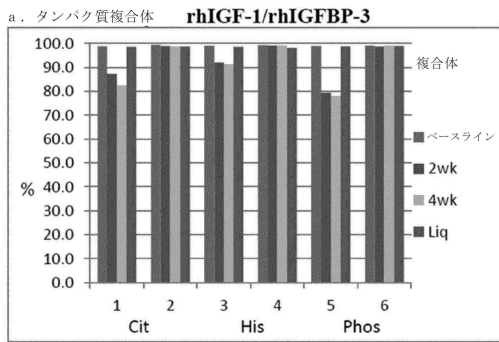
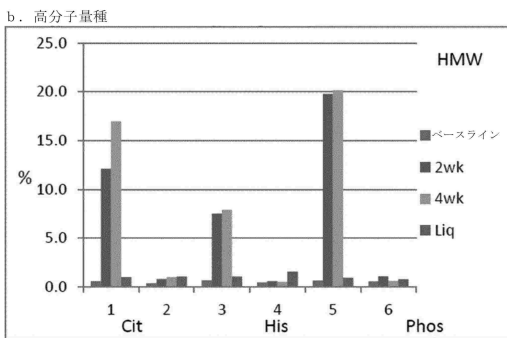
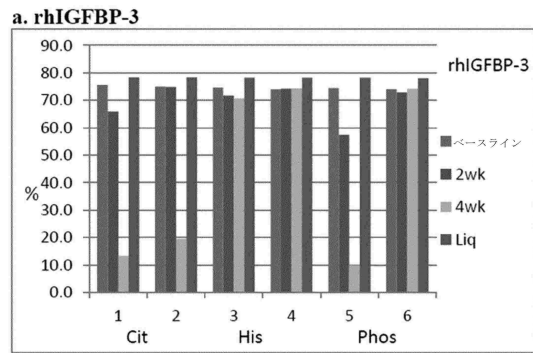


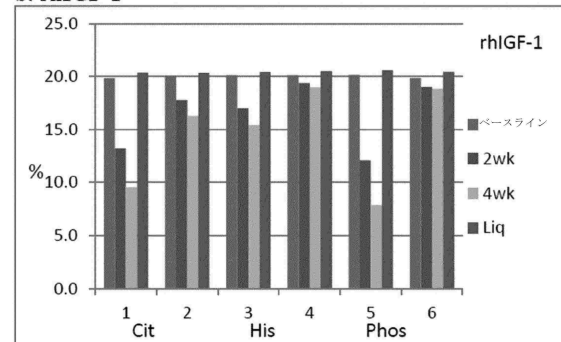
図 10 B



【図 11-1】

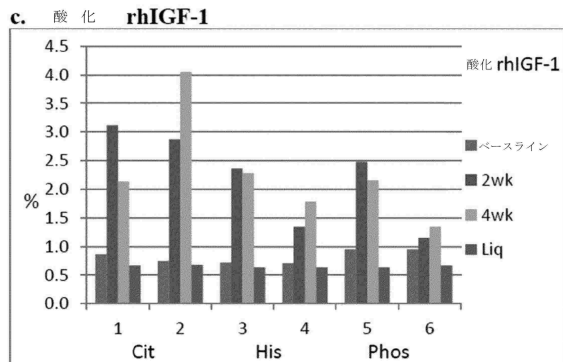


b. rhIGF-1



【図 11-2】

図 11 続き



【図 12】

図 12 A

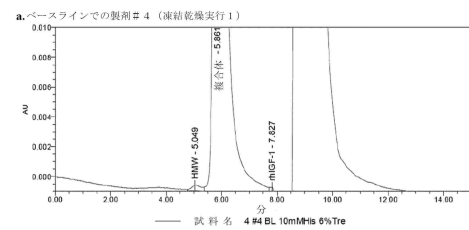


図 12 B

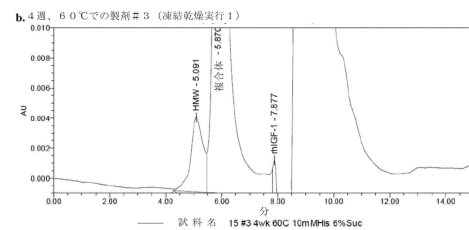
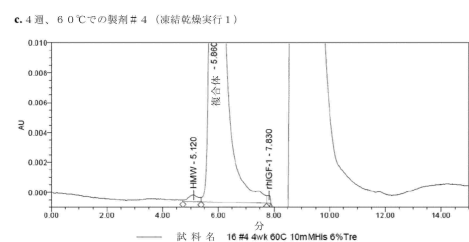


図 12 C



10

20

30

40

50

【图 13-1】

図 13 A

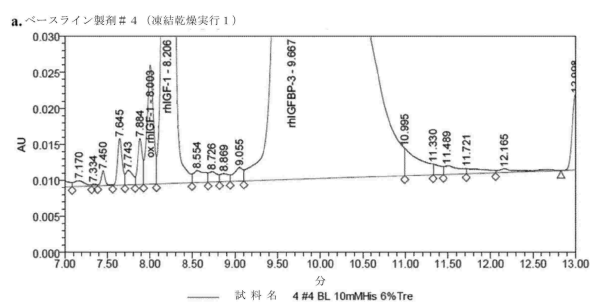
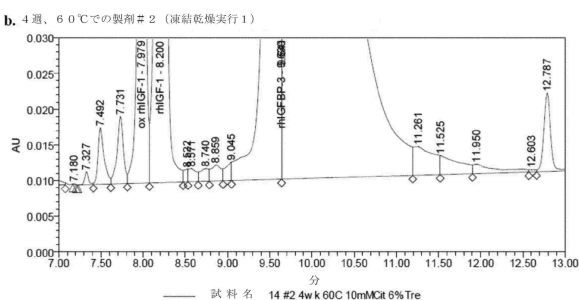


図 1 3 B



【図 14】

图 14 A

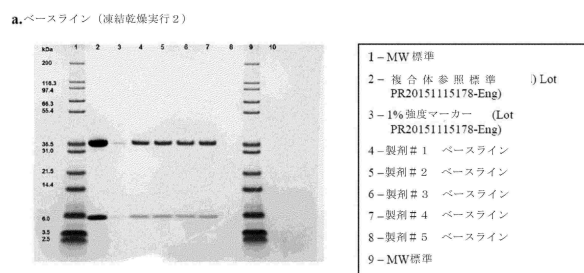
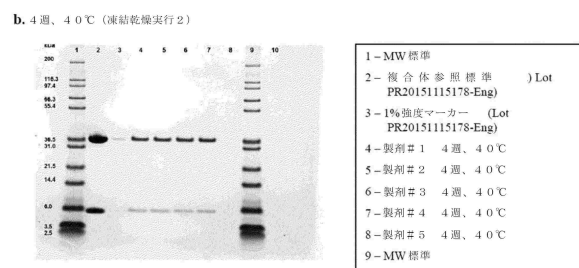
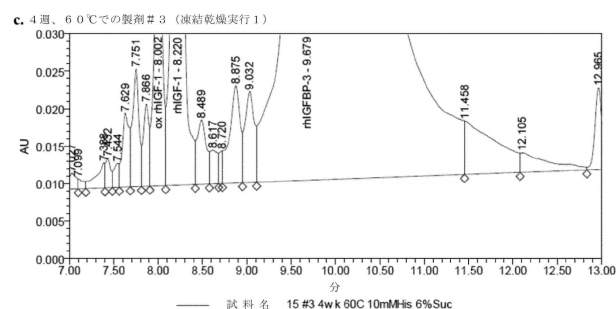


图 1 4 B

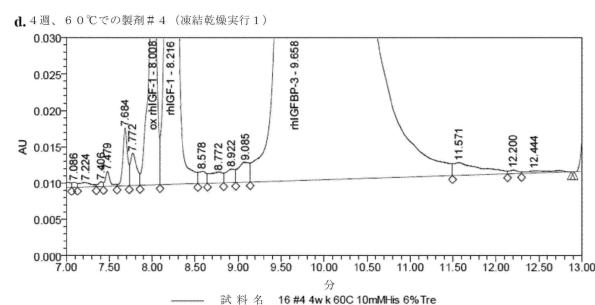


【图 13-2】

图 13 C



☒ 1 3 D



【図 15】

图 15 A

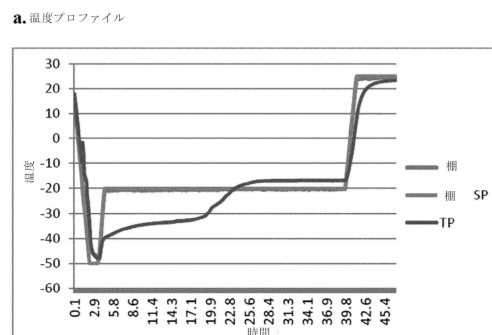
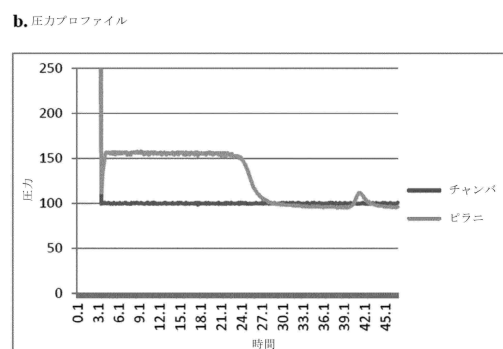


图 1 5 B



【図 1 6】

図 1 6 A 凍結乾燥実行 2 のための SE-UPLC

a. タンパク質複合体 rhIGF-1/rhIGFBP-3

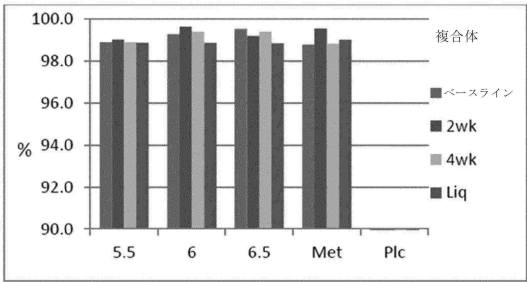
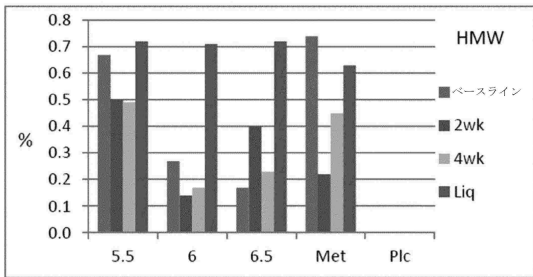


図 1 6 B

b. 高分子量種



【図 1 7 - 1】

図 1 7 A 凍結乾燥実行 2 のための RU-UPLC

a. rhIGFBP-3

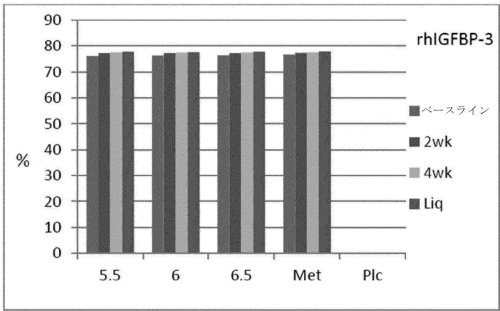
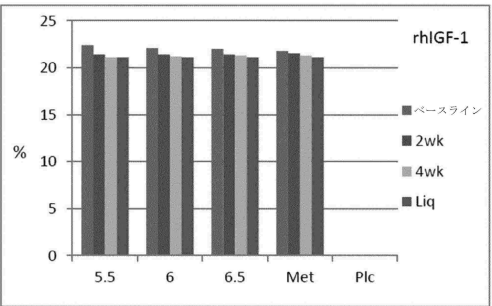


図 1 7 B

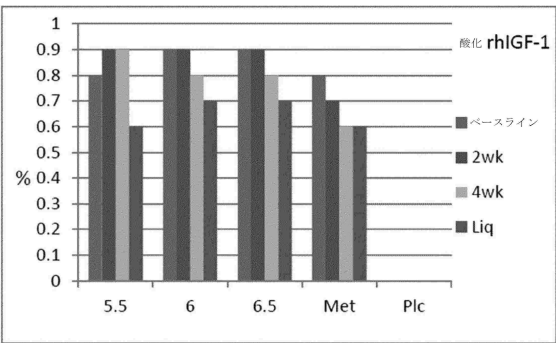
b. rhIGF-1



【図 1 7 - 2】

図 1 7 C

c. 酸化 rhIGF-1



【図 1 8 - 1】

図 1 8 A

a. ベースラインでの製剤 # 2 (凍結乾燥実行 2)

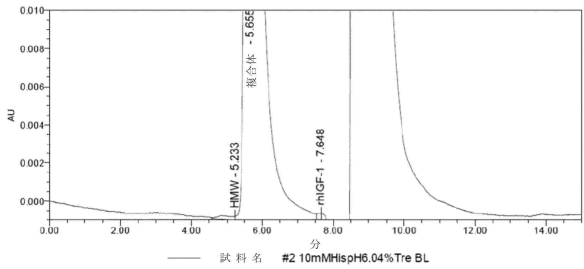
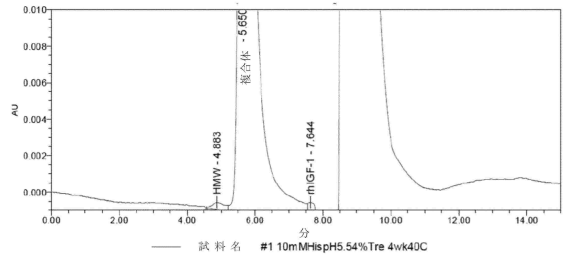


図 1 8 B

b. 4 週、4 0℃での製剤 # 1 (凍結乾燥実行 2)



10

20

30

40

50

【図 18 - 2】

図 18 C

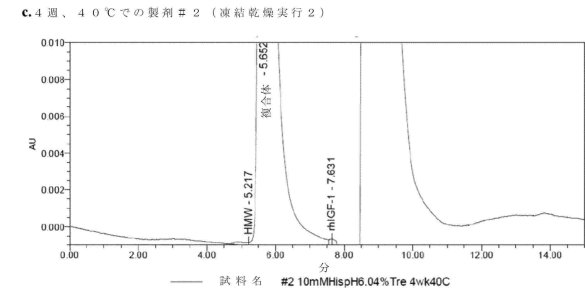
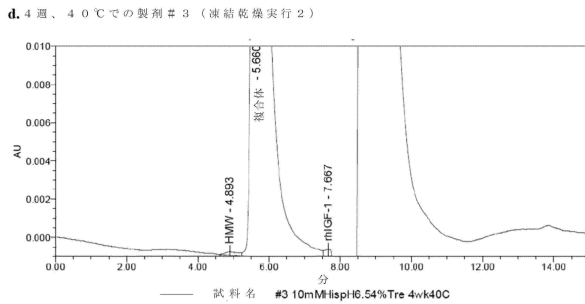


図 18 D



【図 19 - 1】

図 19 A 選択した製剤の R U - U P L C プロファイル

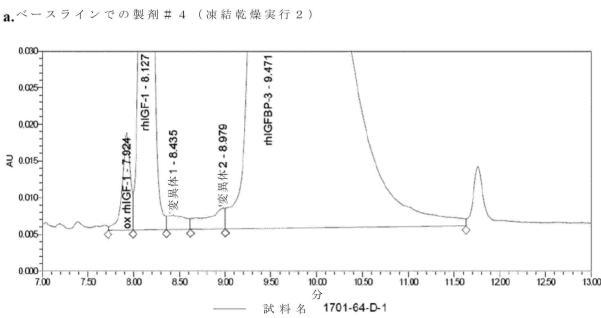
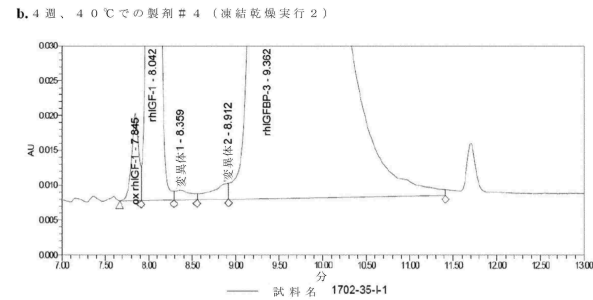


図 19 B



【図 18 - 3】

図 18 E

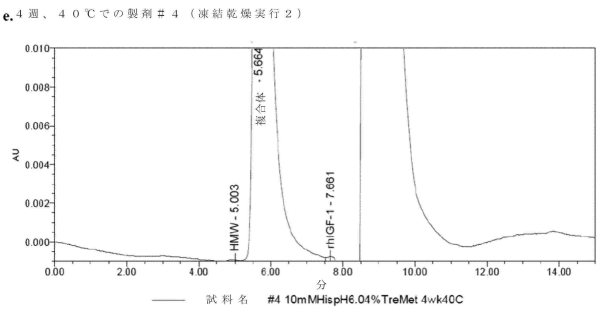
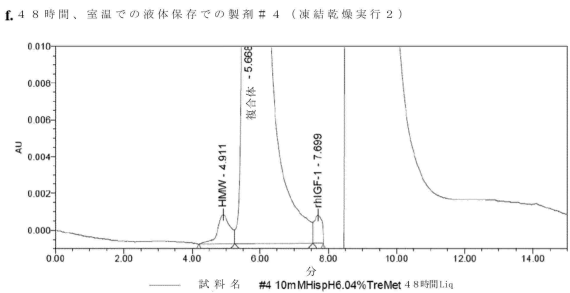
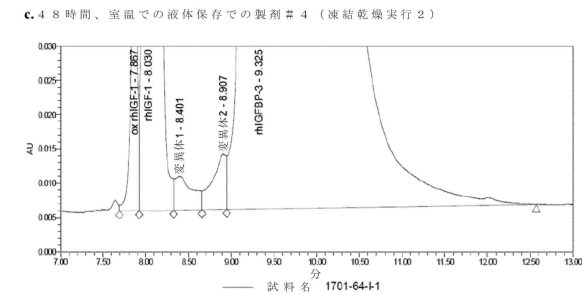


図 18 F



【図 19 - 2】

図 19 C



10

20

30

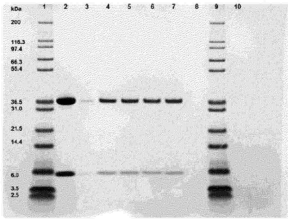
40

50

【図 20】

図 20 A

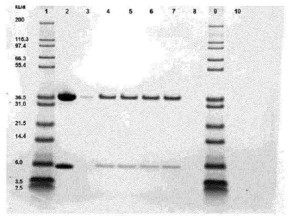
a. ベースライン 4 (凍結乾燥実行 2)



- 1-MW標準
- 2-複合体参照標準 (Lot PR20151115178-Eng)
- 3-1%強度マーカー (Lot PR20151115178-Eng)
- 4-製剤 # 1 ベースライン
- 5-製剤 # 2 ベースライン
- 6-製剤 # 3 ベースライン
- 7-製剤 # 4 ベースライン
- 8-製剤 # 5 ベースライン
- 9-MW標準

図 20 B

b. 4 週、40℃ (凍結乾燥実行 2)



- 1-MW標準
- 2-複合体参照標準 (Lot PR20151115178-Eng)
- 3-1%強度マーカー (Lot PR20151115178-Eng)
- 4-製剤 # 1 4 週、40℃
- 5-製剤 # 2 4 週、40℃
- 6-製剤 # 3 4 週、40℃
- 7-製剤 # 4 4 週、40℃
- 8-製剤 # 5 4 週、40℃
- 9-MW標準

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和6年9月13日(2024.9.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

インスリン様増殖因子1 (IGF-1) タンパク質複合体を製造する方法であって、
大腸菌から発現された組換えIGF-1を含む組成物を提供する工程；

10

抗酸化剤を前記組成物に添加する工程；および

前記組換えIGF-1タンパク質を封入体から精製する工程；
を含み、前記抗酸化剤が窒素である、
方法。

【請求項2】

真空引きの繰り返しにより酸化が低減される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記方法は、インスリン様増殖因子結合タンパク質3 (IGFBP-3) を前記IGF-1
タンパク質に添加し、タンパク質複合体を形成させることをさらに含む、請求項1ま
たは2に記載の方法。

20

【請求項4】

前記タンパク質複合体はIGF-1およびIGFBP-3を1：1のモル比で含む、請
求項3に記載の方法。

【請求項5】

酸化種の低減された蓄積および改善された安定性が、ステンレス鋼以外の接触面の使用に
より達成される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

使い捨てバッグが、複合体を製剤化溶液とコンパウンディングする間に使用される、請求
項3～5のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項7】

前記組成物が液体製剤である、製造方法。

【請求項8】

製剤が等張である、請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】

製剤が、早産児に毒性である材料成分を含まない、請求項6～8のいずれか一項に記載の
方法。

【請求項10】

製剤が保存剤を含まない、請求項6～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

40

前記組成物は、ポリソルベート20またはポリソルベート80から選択される界面活性
剤を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記ポリソルベート20が0.005%で存在する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記ポリソルベート80が0.005%で存在する、請求項11に記載の方法。

【請求項14】

前記組成物が、約5.0～6.0のpHである、請求項1～12のいずれか一項に記載の
方法。

【請求項15】

50

製剤が、

- a. 等モル量である $r\text{IGF}-1 / r\text{IGFBP}-3$ 、
 - b. 約 0.005% の濃度のポリソルベート 20 界面活性剤、および
 - c. 酢酸ナトリウム、酢酸、および／または塩化ナトリウムを含む緩衝液
- を含み、

前記組成物が約 5.3 - 5.8 の pH を有し、

前記 $r\text{IGF}-1 / \text{IGFBP}-3$ が約 50 マイクログラム / mL の濃度であり、

$\text{IGF}-1$ の 0.6% 未満が酸化種として存在する、

請求項 6 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記液体製剤がバイアル中に含まれる、請求項 7 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記バイアルがガラスである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記バイアルが窒素下にある、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】

パッケージング材料および医薬品の前記製剤を含む製造物が提供される、請求項 6 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/051110

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/47 A61K38/30 C07K14/65 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/076702 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; MAHLER HANNS-CHRISTIAN [CH] ET AL.)	13-20
Y	30 June 2011 (2011-06-30) page 7, line 19 - line 22 page 18; example 5 claims 1,2,5,7,12,13 ----- -/--	1-12, 21-27
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 April 2023		Date of mailing of the international search report 03/05/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Niebuhr-Ebel, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/051110

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GERMERSHAUS OLIVER ET AL: "Insulin-like growth factor-I aerosol formulations for pulmonary delivery", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 85, no. 1, 16 August 2013 (2013-08-16), pages 61-68, XP028692963, ISSN: 0939-6411, DOI: 10.1016/J.EJPB.2013.03.011	13-20
Y	abstract page 63, right-hand column, paragraph 2 - page 64, left-hand column, paragraph 1 page 67, left-hand column, paragraph 1 - paragraph 2	1-12, 21-27
X	SCHULTZ ISABEL ET AL: "Drug delivery of Insulin-like growth factor I", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 97, 1 May 2015 (2015-05-01), pages 329-337, XP029320447, ISSN: 0939-6411, DOI: 10.1016/J.EJPB.2015.04.026	13-20
Y	page 331, right-hand column, last paragraph - page 332, left-hand column, line 3 page 333, left-hand column, paragraph 2	1-12, 21-27
X	KEMP S.F.: "Mecasermin rinfabate", DRUGS OF TODAY, vol. 43, no. 3, 1 March 2007 (2007-03-01), page 149, XP093038807, ES ISSN: 1699-3993, DOI: 10.1358/dot.2007.43.3.1079876 Retrieved from the Internet: URL: http://dx.doi.org/10.1358/dot.2007.43.3.1079876	23-27
Y	page 150, right-hand column, paragraph 2 - page 151, left-hand column, paragraph 1 page 153, left-hand column, last paragraph	1-12, 21, 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/051110

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011076702 A1	30-06-2011	BR 112012017349 A2	13-06-2017
		CA 2780080 A1	30-06-2011
		CN 102665682 A	12-09-2012
		EP 2515868 A1	31-10-2012
		JP 2013514340 A	25-04-2013
		KR 20120106854 A	26-09-2012
		RU 2012130606 A	27-01-2014
		US 2011152188 A1	23-06-2011
		WO 2011076702 A1	30-06-2011

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
C 0 7 K	14/46 (2006.01)	C 0 7 K	14/46	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	15/17 (2006.01)	C 1 2 N	15/17	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 サラマッターミラー, ナシラ
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 2 1, レキシントン, 3 0 0 シェア ウェイ
- (72)発明者 ロウ, クリス
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 2 1, レキシントン, 3 0 0 シェア ウェイ
- (72)発明者 ハーン, マイケル
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 2 1, レキシントン, 3 0 0 シェア ウェイ
- (72)発明者 テイラー, キャサリン
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 2 1, レキシントン, 3 0 0 シェア ウェイ

F ターム (参考) 4B065 AA26X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA43 CA44
4C076 AA12 BB11 CC14 CC15 DD09 DD23D DD41Z EE41 FF14 FF15
FF61
4C084 AA02 AA03 BA44 CA53 DB58 MA02 MA17 MA66 NA05 NA14
ZA53 ZA59 ZC51 ZC75
4H045 AA10 AA20 AA30 BA63 CA40 DA38 EA20 FA74