(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-502777
(P2023-502777A)
(43)公表日　令和5年1月25日(2023.1.25)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*9/08 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/08	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*47/22 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/22	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ	*47/60 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/60	
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395 N	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全76頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-530229(P2022-530229)
(86)(22)出願日　令和2年11月24日(2020.11.24)
(85)翻訳文提出日　令和4年6月27日(2022.6.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/062051
(87)国際公開番号　WO2021/108427
(87)国際公開日　令和3年6月3日(2021.6.3)
(31)優先権主張番号　62/940,683
(32)優先日　令和1年11月26日(2019.11.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,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,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　519009851
コメラ ライフ サイエンシズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ０１８０１ マサチューセッツ、ウーバン、ジル ストリート １２、スウィート ４６５０
(74)代理人　100118902
弁理士　山本 修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前 徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾 淳一
(74)代理人　100122644
弁理士　寺地 拓己
(74)代理人　100220098
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　バイオポリマー製剤のための賦形剤化合物

(57)【要約】
タンパク質および賦形剤化合物を含む粘度が低減された液体製剤が本明細書に開示される。タンパク質を含む液体製剤の粘度を低減する方法、治療方法およびタンパク質処理を向上する方法がさらに開示される。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
タンパク質および賦形剤化合物を含む液体製剤であって、賦形剤化合物がピリミジンであり、賦形剤化合物が粘度低減量で添加される、液体製剤。
【請求項２】
ピリミジンがメチル置換ピリミジンである、請求項１記載の液体製剤。
【請求項３】
ピリミジンが、ピリミジン、ピリミジノン、トリアミノピリミジン、1,3-ジメチルウラシル、1-メチルウラシル、3-メチルウラシル、1,3-ジエチルウラシル、5-メチルウラシル、6-メチルウラシル、ウラシル、1,3-ジメチル-テトラヒドロピリミジノン、チミン、1-メチルチミン、O-4-メチルチミン、1,3-ジメチルチミン、ジメチルチミンダイマー、テアクリン、シトシン、5-メチルシトシンおよび3-メチルシトシンからなる群より選択される、請求項１記載の液体製剤。
【請求項４】
ピリミジンが1,3-ジメチルウラシルである、請求項３記載の液体製剤。
【請求項５】
製剤が医薬組成物であり、タンパク質が治療タンパク質であり、賦形剤化合物が薬学的に許容され得る賦形剤化合物である、請求項１記載の液体製剤。
【請求項６】
製剤が非治療製剤であり、タンパク質が非治療タンパク質である、請求項１記載の液体製剤。
【請求項７】
治療タンパク質がPEG化タンパク質である、請求項５記載の液体製剤。
【請求項８】
治療タンパク質が治療抗体である、請求項５記載の液体製剤。
【請求項９】
治療抗体が、ベバシズマブ、トラスツズマブ、アダリムマブ、インフリキシマブ、エタネルセプト、セツキシマブ、リツキシマブ、イピリムマブおよびオマリズマブからなる群より選択される、請求項８記載の液体製剤。
【請求項１０】
賦形剤化合物の粘度低減量が約250mg/mL以下である、請求項１記載の液体製剤。
【請求項１１】
賦形剤化合物の粘度低減量が約10mg/mL～約200mg/mLである、請求項１記載の液体製剤。
【請求項１２】
賦形剤化合物の粘度低減量が約10mg/mL～約120mg/mLである、請求項１１記載の液体製剤。
【請求項１３】
賦形剤化合物の粘度低減量が約20mg/mL～約120mg/mLである、請求項１２記載の液体製剤。
【請求項１４】
賦形剤化合物の粘度低減量が約1mg/mL～約100mg/mLである、請求項１記載の液体製剤。
【請求項１５】
賦形剤化合物の粘度低減量が約2mg/mL～約80mg/mLである、請求項１４記載の液体製剤。
【請求項１６】
賦形剤化合物の粘度低減量が約5mg/mL～約50mg/mLである、請求項１５記載の液体製剤。
【請求項１７】

賦形剤化合物の粘度低減量が約10mg/mL～約40mg/mLである、請求項１６記載の液体製剤。
【請求項１８】
賦形剤化合物の粘度低減量が約1mM～約400mMである、請求項１記載の液体製剤。
【請求項１９】
賦形剤化合物の粘度低減量が約2mM～約150mMである、請求項１８記載の液体製剤。
【請求項２０】
賦形剤化合物の粘度低減量が約5mM～約100mMである、請求項１９記載の液体製剤。
【請求項２１】
賦形剤化合物の粘度低減量が約10mM～約75mMである、請求項２０記載の液体製剤。
【請求項２２】
賦形剤化合物の粘度低減量が約15mM～約50mMである、請求項２１記載の液体製剤。
【請求項２３】
粘度低減量が、製剤の粘度を対照製剤の粘度未満の粘度まで低減し、対照製剤が、賦形剤化合物を含まないが、それ以外は乾燥重量規準で治療製剤と同一である、請求項１記載の液体製剤。
【請求項２４】
液体製剤の粘度が対照製剤の粘度よりも少なくとも約10%低い、請求項２３記載の液体製剤。
【請求項２５】
液体製剤の粘度が対照製剤の粘度よりも少なくとも約30%低い、請求項２４記載の液体製剤。
【請求項２６】
液体製剤の粘度が対照製剤の粘度よりも少なくとも約50%低い、請求項２５記載の液体製剤。
【請求項２７】
液体製剤の粘度が対照製剤の粘度よりも少なくとも約70%低い、請求項２６記載の液体製剤。
【請求項２８】
液体製剤の粘度が対照製剤の粘度よりも少なくとも約90%低い、請求項２７記載の液体製剤。
【請求項２９】
液体製剤の粘度が約100cP未満である、請求項２３記載の液体製剤。
【請求項３０】
液体製剤の粘度が約50cP未満である、請求項２９記載の液体製剤。
【請求項３１】
液体製剤の粘度が約20cP未満である、請求項３０記載の液体製剤。
【請求項３２】
液体製剤の粘度が約10cP未満である、請求項３１記載の液体製剤。
【請求項３３】
保存剤、界面活性剤、糖、多糖、アルギニン、プロリン、ヒアルロニダーゼ、安定化剤、可溶化剤、共溶媒、屈水性誘発物質および緩衝剤からなる群より選択されるさらなる剤をさらに含む、請求項１記載の製剤。
【請求項３４】
タンパク質、ならびに3-アミノピリジン、ジシクロミン、1-メチル-2-ピロリドン、フェニルセリン、DL-3-フェニルセリンおよびシクロセリンからなる群より選択される賦形剤化合物を含む液体製剤であって、賦形剤化合物が粘度低減量で添加される、液体製剤。
【請求項３５】
疾患または障害の治療を必要とする哺乳動物に液体治療製剤を投与する工程を含む、疾患または障害の治療を必要とする哺乳動物において疾患または障害を治療する方法であっ

て、液体治療製剤が治療有効量の治療タンパク質を含み、液体治療製剤が粘度低減量の薬学的に許容され得る賦形剤化合物をさらに含み、薬学的に許容され得る賦形剤化合物がピリミジンであり；治療製剤が疾患または障害の治療に有効である、方法。

【請求項３６】

疾患または障害の治療を必要とする哺乳動物に液体治療製剤を投与する工程を含む、疾患または障害の治療を必要とする哺乳動物において疾患または障害を治療する方法であって、液体治療製剤が治療有効量の治療タンパク質を含み、液体治療製剤が、粘度低減量の、3-アミノピリジン、ジシクロミン、1-メチル-2-ピロリドン、フェニルセリン、DL-3-フェニルセリンおよびシクロセリンからなる群より選択される薬学的に許容され得る賦形剤化合物をさらに含み、治療製剤が疾患または障害の治療に有効である、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願

本願は、2019年11月26日に出願された米国仮出願第62/940,683号の利益を主張する。上記出願の全内容は、参照により本明細書に援用される。

【０００２】

出願の分野

本願は一般的に、バイオポリマーを送達するための製剤に関する。

【背景技術】

【０００３】

背景

バイオポリマーは、治療または非治療目的で使用され得る。抗体または酵素製剤などのバイオポリマー系治療薬は、疾患の治療に広く使用される。酵素、ペプチドおよび構造タンパク質などの非治療バイオポリマーは、家庭、栄養、商業および工業の用途などの非治療適用において有用性を有する。

【０００４】

治療適用に使用されるバイオポリマーは、疾患の治療のために身体へのその導入を可能にするように製剤化されなければならない。例えば、これらの製剤を静脈内(IV)注射により投与する代わりに、特定の情況下で皮下(SC)または筋内(IM)経路により抗体およびタンパク質/ペプチドバイオポリマー製剤を送達することが有利である。SCまたはIM注射ではあるがそれらについてのより良い患者コンプライアンスおよび快適さを達成するために、シリンジ中の液体体積は典型的に、2～3ccに制限され、製剤の粘度は典型的に、約20センチポアズ(cP)未満であるので、製剤は、従来の医学デバイスおよび小口径の針を使用して送達され得る。これらの送達パラメーターは、送達される製剤についての投与要件と常に良好に適合するわけではない。

【０００５】

例えば抗体は、それらの意図される治療効果を発揮するために高い用量レベルで送達される必要があり得る。高用量レベルの抗体製剤を送達するために制限された液体体積を使用することは、時々150mg/mLのレベルを超える、送達ビヒクル中の高濃度の抗体を必要とし得る。この用量レベルでは、製剤の粘度 対 濃度プロットは、それらの線形-非線形遷移(linear-nonlinear transition)より上に位置し、製剤の粘度は濃度の増加に伴って劇的に上昇する。しかしながら、高い粘度は、標準的なSCまたはIM送達系とは適合性ではない。

【０００６】

さらなる関心として、バイオポリマー系治療薬の溶液はまた、沈殿、断片化、酸化、脱アミド化、濁り、乳光、変性、液体-液体相分離、およびゲル形成、可逆的または不可逆的な凝集などの安定性問題を被りやすい。安定性問題は、溶液の貯蔵寿命を制限するかまたは特別な処理を必要とする。

【０００７】

例として、注射のためのタンパク質製剤を作製するための1つのアプローチは、治療タンパク質溶液を、再構成して、SCまたはIM送達に適した懸濁液を形成し得る粉末に変換することである。凍結乾燥は、タンパク質粉末を作製するための標準的な技術である。凍結乾燥、噴霧乾燥およびさらに超臨界流体抽出前の沈殿が、その後の再構成のためのタンパク質粉末を作製するために使用されている。粉末化された懸濁物は、(同じ全用量での溶液と比較して)再溶解の前に粘度が低いので、粒子が針を通るのに適合するほど十分に小さいと仮定すると、SCまたはIM注射に適切であり得る。しかしながら、粉末中に存在するタンパク質結晶は、免疫応答を誘発する固有のリスクを有する。再溶解後の不確実なタンパク質安定性/活性はさらなる問題を提示する。タンパク質粉末懸濁物によりもたらされる制限を回避しながら、治療目的での低粘度タンパク質製剤を作製する技術についての必要性が当該技術分野に残っている。

【０００８】

上に記載されるタンパク質の治療用途に加えて、酵素、ペプチドおよび構造タンパク質などのバイオポリマーは、非治療用途に使用され得る。これらの非治療バイオポリマーは、例えば植物供給源、動物供給源由来のいくつかの異なる経路から作製され得るかまたは細胞培養から作製され得る。

【０００９】

非治療タンパク質は、顆粒もしくは粉末化材料としてまたは通常は水中の溶液もしくは分散体として作製、輸送、保存および処理され得る。非治療用途のバイオポリマーは、球状または繊維状のタンパク質であり得、これらの材料の特定の形態は、水中の制限された溶解性を有し得るかまたは溶解の際に高い粘度を示し得る。これらの溶液特性は、非治療材料の製剤化、処理、保存、ポンプ輸送および性能に対して難題を提示し得るので、非治療タンパク質溶液の粘度を低減し、その溶解性および安定性を向上する方法のための必要性がある。

【００１０】

タンパク質は、複雑なバイオポリマーであり、それぞれは特有に折り畳まれた3D構造および表面エネルギーマップ(疎水性/親水性領域および電荷)を有する。濃縮されたタンパク質溶液において、これらの巨大分子は、それらの正確な形状および表面エネルギー分布に応じて強く相互作用し得、さらに複雑な様式で結合し得る。強い特異的な相互作用のための「ホットスポット」は、タンパク質クラスタリングをもたらし、溶液粘度を増加する。これらの問題に取り組むために、局在化された相互作用およびクラスタリングを妨げることにより、溶液粘度を低減することを目指して、いくつかの賦形剤化合物を生体治療製剤において使用する。これらの努力は個々に調節され、しばしば経験的に、時々インシリコシミュレーションにより誘導される。賦形剤化合物の組合せが提供され得るが、かかる組み合わせを最適化することは、再度経験的におよびケースバイケース基準で進行しなければならない。

【００１１】

非線形条件下の所定の濃度でタンパク質製剤の粘度を低減するための真に普遍的なアプローチについての必要性が当該技術分野に残る。タンパク質の活性を保存し、安定性問題を回避しながら、この粘度低減を達成するためのさらなる必要性が当該技術分野にある。粘度低減系を、調節可能かつ持続的な放出プロフィールを有する製剤を用いた使用およびデポー注射に適合された製剤を用いた使用に適合することがさらに望ましい。また、タンパク質および他のバイオポリマーを作製するためのプロセスを向上することが望ましい。

【発明の概要】

【００１２】

発明の概要

態様において、タンパク質、ならびにヒンダードアミン、芳香族または陰イオン性芳香族、官能基化アミノ酸、オリゴペプチド、短鎖有機酸、低分子量脂肪族多価酸、ジオンおよびスルホン、両性イオン性賦形剤ならびに水素結合要素を有するクラウディング剤(crowding agent)からなる群より選択される賦形剤化合物を含む液体製剤が本明細書に開

示され、ここで賦形剤化合物は粘度低減量で添加される。態様において、タンパク質はPEG化タンパク質であり、賦形剤は低分子量脂肪族多価酸である。態様において、賦形剤化合物はヒンダードアミン化合物である。

【００１３】

態様において、ヒンダードアミンは、塩化アンモニウム、臭化アンモニウム、フッ化アンモニウム、酢酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム、モノエタノールアミン塩酸塩、モノエタノールアミン臭化水素酸塩、モノエタノールアミンフッ化水素酸塩、モノエタノールアミン酢酸塩、モノエタノールアミンクエン酸塩、ジエタノールアミン塩酸塩、ジエタノールアミン臭化水素酸塩、ジエタノールアミンフッ化水素酸塩、ジエタノールアミン酢酸塩、ジエタノールアミンクエン酸塩、トリエタノールアミン塩酸塩、トリエタノールアミン臭化水素酸塩、トリエタノールアミンフッ化水素酸塩、トリエタノールアミン酢酸塩、トリエタノールアミンクエン酸塩、尿素塩酸塩、尿素臭化水素酸塩、尿素フッ化水素酸塩、尿素酢酸塩および尿素クエン酸塩からなる群より選択され得る。態様において、改変されたアミンは、アンモニアまたは水酸化アンモニウムの共役酸である。態様において、ヒンダードアミン化合物は、アンモニアまたは水酸化アンモニウムの共役酸である。

【００１４】

態様において、製剤は医薬組成物であり、医薬組成物は治療タンパク質を含み、ここで賦形剤化合物は薬学的に許容され得る賦形剤化合物である。態様において、製剤は非治療製剤であり、非治療製剤は非治療タンパク質を含む。態様において、治療タンパク質は、ベバシズマブ、トラスツズマブ、アダリムマブ、インフリキシマブ、エタネルセプト、ダルベポエチンアルファ、エポエチンアルファ、セツキシマブ、ペグフィルグラスチム、フィルグラスチムおよびリツキシマブからなる群より選択される。態様において、賦形剤化合物は濃縮された賦形剤溶液として製剤化される。態様において、粘度低減量は、製剤の粘度を対照製剤の粘度未満の粘度まで低減する。態様において、製剤の粘度は、対照製剤の粘度よりも少なくとも約10%低いかまたは対照製剤の粘度よりも少なくとも約30%低いかまたは対照製剤の粘度よりも少なくとも約50%低いかまたは対照製剤の粘度よりも少なくとも約70%低いかまたは対照製剤の粘度よりも少なくとも約90%低い。態様において、粘度は、約100cP未満であるかまたは約50cP未満であるかまたは約20cP未満であるかまたは約10cP未満である。態様において、賦形剤化合物は、〈5000Daまたは〈1500Daまたは〈500Daの分子量を有する。態様において、製剤は、少なくとも約1mg/mlのタンパク質または少なくとも約25mg/mLのタンパク質または少なくとも約50mg/mLのタンパク質または少なくとも約100mg/mLのタンパク質または少なくとも約200mg/mLのタンパク質を含む。態様において、製剤は、約0.001mg/mL～約60mg/mLの賦形剤化合物を含むかまたは約0.1mg/mL～約50mg/mLの賦形剤化合物を含むかまたは約1mg/mL～約40mg/mLを含むかまたは約5mg/mL～約30mg/mLの賦形剤化合物を含む。態様において、製剤は、対照製剤と比較した場合に向上された安定性を有する。向上された安定性は、可視粒子、肉眼では見えない(subvisible)粒子、凝集物、濁度、乳光またはゲルの形成の減少として表され得る。態様において、製剤は向上された安定性を有し、ここで向上された安定性は対照製剤との比較により決定され、対照製剤は賦形剤化合物を含まない。態様において、向上された安定性は、光散乱により測定される場合に粒径の増加を防ぐ。態様において、向上された安定性は、対照製剤中のパーセントモノマーよりも高いパーセントモノマーで表され、ここでパーセントモノマーは、サイズ排除クロマトグラフィーにより測定される。態様において、賦形剤化合物はヒンダードアミンであり、これはカフェインであり得る。態様において、賦形剤化合物はヒンダードアミンである。態様において、ヒンダードアミンは、カフェイン、テオフィリン、チラミン、イミダゾール、アスパルテーム、サッカリン、アセスルファムカリウム、ピリミジノン、1,3-ジメチルウラシル、トリアミノピリミジン、ピリミジンおよびテアクリンからなる群より選択される。態様において、ヒンダードアミンはカフェイン. プロカイン、リドカイン、イミダゾール、アスパルテーム、サッカリンおよびアセスルファムカリウムである。態様において、ヒンダードアミンはカフェインである。態様において、ヒンダードアミン

は注射可能な局所麻酔化合物である。ヒンダードアミンは、独立の薬理学的特性を有し得、ヒンダードアミンは、独立の薬理学的効果を有する量で製剤中に存在し得る。態様において、ヒンダードアミンは、治療有効量未満である量で製剤中に存在し得る。独立の薬理学的活性は、局所麻酔活性であり得る。態様において、独立の薬理学的活性を有するヒンダードアミンは、製剤の粘度をさらに減少する第2の賦形剤化合物と合わされる。第2の賦形剤化合物は、カフェイン、テオフィリン、チラミン、プロカイン、リドカイン、イミダゾール、アスパルテーム、サッカリンおよびアセスルファムカリウムからなる群より選択され得る。態様において、製剤は、保存剤、界面活性剤、糖、多糖、アルギニン、プロリン、ヒアルロニダーゼ、安定化剤、可溶化剤、共溶媒、屈水性誘発物質および緩衝剤からなる群より選択されるさらなる剤を含み得る。

【００１５】

疾患または障害の治療を必要とする哺乳動物に、液体治療製剤を投与する工程を含む、疾患または障害の治療を必要とする哺乳動物において疾患または障害を治療する方法が本明細書においてさらに開示され、ここで治療製剤は治療有効量の治療タンパク質を含み、製剤は、ヒンダードアミン、芳香族および陰イオン性芳香族、官能基化アミノ酸、オリゴペプチド、短鎖有機酸、低分子量脂肪族多価酸、ジオンおよびスルホン、両性イオン性賦形剤ならびに水素結合要素を有するクラウディング剤からなる群より選択される薬学的に許容され得る賦形剤化合物をさらに含み；治療製剤は、疾患または障害の治療に有効である。態様において、治療タンパク質はPEG化タンパク質であり、賦形剤は改変されたアミンである。態様において、改変されたアミンは、塩化アンモニウム、臭化アンモニウム、フッ化アンモニウム、酢酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム、モノエタノールアミン塩酸塩、モノエタノールアミン臭化水素酸塩、モノエタノールアミンフッ化水素酸塩、モノエタノールアミン酢酸塩、モノエタノールアミンクエン酸塩、ジエタノールアミン塩酸塩、ジエタノールアミン臭化水素酸塩、ジエタノールアミンフッ化水素酸塩、ジエタノールアミン酢酸塩、ジエタノールアミンクエン酸塩、トリエタノールアミン塩酸塩、トリエタノールアミン臭化水素酸塩、トリエタノールアミンフッ化水素酸塩、トリエタノールアミン酢酸塩、トリエタノールアミンクエン酸塩、尿素塩酸塩、尿素臭化水素酸塩、尿素フッ化水素酸塩、尿素酢酸塩および尿素クエン酸塩からなる群より選択され得る。態様において、改変されたアミンはアンモニアまたは水酸化アンモニウムの共役酸である。態様において、タンパク質はPEG化タンパク質であり、賦形剤化合物は低分子量脂肪族多価酸である。態様において、治療タンパク質はPEG化タンパク質であり、賦形剤化合物は芳香族化合物であり、これはフェノールまたはポリフェノールであり得、ポリフェノールはタンニン酸であり得る。態様において、賦形剤はヒンダードアミンである。態様において、製剤は、皮下注射または筋内注射または静脈内注射により投与される。態様において、賦形剤化合物は、粘度低減量で治療製剤に存在し、粘度低減量は、治療製剤の粘度を、対照製剤の粘度未満の粘度まで低減する。態様において、賦形剤化合物は濃縮された賦形剤溶液として調製される。態様において、治療製剤は、対照製剤と比較した場合、向上された安定性を有する。態様において、賦形剤化合物は本質的に純粋である。

【００１６】

態様において、治療タンパク質、ならびにヒンダードアミン、芳香族および陰イオン性芳香族、官能基化アミノ酸、オリゴペプチド、短鎖有機酸、低分子量脂肪族多価酸、ジオンおよびスルホン、両性イオン性賦形剤および水素結合要素を有するクラウディング剤からなる群より選択される賦形剤化合物を含む液体タンパク質製剤を調製する工程を含む、液体タンパク質製剤の安定性を向上する方法が本明細書に開示され、ここで液体タンパク質製剤は、対照液体タンパク質製剤と比較して、向上された安定性を示し、対照液体タンパク質製剤は賦形剤化合物を含まず、それ以外は実質的に液体タンパク質製剤と同様である。態様において、賦形剤化合物は、濃縮された賦形剤溶液として製剤化される。液体製剤の安定性は、加水分解、光分解、酸化、還元、脱アミド化、ジスルフィドスクランブリング(scrambling)、断片化および解離からなる群より選択される化学反応に対する抵抗性により表される化学安定性であり得る。液体製剤の安定性は、冷蔵条件安定性、室温安

定性または高温安定性であり得る。液体タンパク質製剤の向上された安定性は、対照製剤におけるパーセントモノマーよりも高いパーセントモノマーにより表され得、ここでパーセントモノマーは、サイズ排除クロマトグラフィーにより表される。液体製剤の安定性は機械的安定性であり得、これは撹拌、ポンプ輸送、濾過、充填および気体の泡の接触からなる群より選択されるストレス条件についての向上された許容性により表され得る。

【００１７】

態様において、タンパク質、ならびにヒンダードアミン、芳香族および陰イオン性芳香族、官能基化アミノ酸、オリゴペプチド、短鎖有機酸、低分子量脂肪族多価酸、ジオンおよびスルホン、両性イオン性賦形剤および水素結合要素を有するクラウディング剤からなる群より選択される賦形剤化合物を含む液体製剤も本明細書に開示され、ここで製剤中の賦形剤化合物の存在は、より安定なタンパク質-タンパク質相互作用または向上されたタンパク質-タンパク質相互作用特性を生じ、これは、タンパク質拡散相互作用パラメーターkDまたは第2のビリアル係数B22により測定され得る。態様において、製剤は治療製剤であり、治療タンパク質を含む。態様において、製剤は非治療製剤であり、非治療タンパク質を含む。

【００１８】

本発明はまた、タンパク質および賦形剤化合物を含む液体製剤を包含し、ここで賦形剤化合物はピリミジンであり、賦形剤化合物は粘度低減量で添加される。ある局面において、ピリミジンはメチル置換ピリミジンである。ピリミジンの非限定的な例は、ピリミジン、ピリミジノン、トリアミノピリミジン、1,3-ジメチルウラシル、1-メチルウラシル、3-メチルウラシル、1,3-ジエチルウラシル、5-メチルウラシル、6-メチルウラシル、ウラシル、1,3-ジメチル-テトラヒドロピリミジノン、チミン、1-メチルチミン、O-4-メチルチミン、1,3-ジメチルチミン、ジメチルチミンダイマー、テアクリン、シトシン、5-メチルシトシンおよび3-メチルシトシンである。ある特定の局面において、ピリミジンは1,3-ジメチルウラシルである。さらなる局面において、本発明は、タンパク質、ならびに3-アミノピリジン、ジシクロミン、1-メチル-2-ピロリドン、フェニルセリン、DL-3-フェニルセリンおよびシクロセリンからなる群より選択される賦形剤化合物を含む液体製剤に関し、ここで賦形剤化合物は粘度低減量で添加される。液体製剤は医薬組成物であり得、ここでタンパク質は治療タンパク質であり、賦形剤は薬学的に許容され得る賦形剤である。治療タンパク質の例としては、限定されないが、治療抗体(例えばベバシズマブ、トラスツズマブ、アダリムマブ、インフリキシマブ、エタネルセプト、セツキシマブ、リツキシマブ、イピリムマブおよびオマリズマブ)およびPEG化タンパク質が挙げられる。代替的に、液体製剤は非治療製剤であり得、ここでタンパク質は非治療タンパク質である。本明細書に開示される液体製剤中の賦形剤の粘度低減量は、約250mg/ml以下；約10mg/mL～約200mg/mL；約10mg/mL～約120mg/mL；約20mg/mL～約120mg/mL；約1mg/mL～約100mg/mL；約2mg/mL～約80mg/mL；約5mg/mL～約50mg/mL；約10mg/mL～約40mg/mL；約1mM～約400mM；約2mM～約150mM；約5mM～約100mMまたは約15mM～約50mMであり得る。さらなる局面において、賦形剤化合物の粘度低減量は、製剤の粘度を、対照製剤の粘度未満の粘度まで低減し、ここで対照製剤は賦形剤を含まないが、それ以外は乾燥重量基準で治療製剤と同一であり；例えば液体製剤の粘度は、対照製剤の粘度よりも少なくとも約10%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約70%または少なくとも約90%低くあり得る。さらなる局面において、液体製剤は、約100cP未満、約50cP未満、約20cP未満または約10cP未満の粘度を有する。なおさらなる局面において、液体製剤は、保存剤、界面活性剤、糖、多糖、アルギニン、プロリン、ヒアルロニダーゼ、安定化剤、可溶化剤、共溶媒、屈水性誘発物質および緩衝剤からなる群より選択されるさらなる剤を含む。

【００１９】

本発明はさらに、液体製剤に、本明細書に記載される粘度低減量のピリミジンを添加する工程を含む、タンパク質、例えば治療タンパク質または非治療タンパク質を含む液体製剤の粘度を低減する方法を包含する。

【００２０】
なおさらなる局面において、本発明は、液体製剤に、3-アミノピリジン、ジシクロミン、1-メチル-2-ピロリドン、フェニルセリン、DL-3-フェニルセリンおよびシクロセリンからなる群より選択される賦形剤の粘度低減量を添加する工程を含む、タンパク質、例えば治療タンパク質または非治療タンパク質を含む液体製剤の粘度を低減する方法に関する。
【００２１】
本発明はさらに、疾患または障害の治療を必要とする哺乳動物に液体治療製剤を投与する工程を含む、疾患または障害の治療を必要とする哺乳動物において疾患または障害を治療する方法を包含し、ここで液体治療製剤は、治療有効量の治療タンパク質を含み、液体治療製剤はさらに、粘度低減量の薬学的に許容され得る賦形剤化合物を含み、賦形剤化合物はピリミジンであり；治療製剤は、疾患または障害の治療に有効である。
【００２２】
さらなる局面において、本発明は、疾患または障害の治療を必要とする哺乳動物に液体治療製剤を投与する工程を含む、疾患または障害の治療を必要とする哺乳動物において疾患または障害を治療する方法を含み、ここで液体治療製剤は治療有効量の治療タンパク質を含み、液体治療製剤はさらに3-アミノピリジン、ジシクロミン、1-メチル-2-ピロリドン、フェニルセリン、DL-3-フェニルセリンおよびシクロセリンからなる群より選択される薬学的に許容され得る賦形剤化合物の粘度低減量を含み、治療製剤は、疾患または障害の治療に有効である。
【００２３】
態様において、本明細書に記載される液体製剤を提供する工程およびこれを処理方法に使用する工程を含む、タンパク質関連プロセスを向上する方法が本明細書にさらに開示される。態様において、処理方法は、濾過、ポンプ輸送、混合、遠心分離、精製、膜分離、凍結乾燥またはクロマトグラフィーを含む。
【図面の簡単な説明】
【００２４】
図面の簡単な説明
【図１】図1は、動的光散乱(Dynamic Light Scattering)により評価した場合のストレスをかけた条件およびストレスをかけない条件下でのモノクローナル抗体の溶液についての粒径分布のグラフを示す。図1におけるデータ曲線は、比較を可能にするベースラインオフセットを有する：Y軸において、試料1-Aについての曲線は、100強度単位だけずれ(offset)、試料1-FTについての曲線は、200強度単位だけずれる。
【図２】図2は、動的光散乱により評価した場合のいくつかの分子集団についての試料の直径 対 多モードサイズ分布を測定するグラフを示す。図2におけるデータ曲線は、比較を可能にするベースラインオフセットを有する：Y軸において、試料2-Aについての曲線は、100強度単位だけずれ、試料2-FTについての曲線は、200強度単位だけずれる。
【図３】図3は、8～10分の保持時間で主要なモノマーピークを有するモノクローナル抗体溶液のサイズ排除クロマトグラムを示す。図3におけるデータ曲線は、比較を可能にするベースラインオフセットを有する：Y軸方向において、試料2-C、2-Aおよび2-FTについての曲線はずれる。
【発明を実施するための形態】
【００２５】
詳細な説明
製剤およびそれらの製造方法および濃縮されたタンパク質溶液の送達を可能にする使用が本明細書に開示される。態様において、本明細書に開示されるアプローチは、低粘度液体製剤または従来のタンパク質溶液と比較してより高濃度の液体製剤中の治療もしくは非治療タンパク質を生じ得る。態様において、本明細書に開示されるアプローチは、従来のタンパク質溶液と比較した場合に向上された安定性を有する液体製剤を生じ得る。安定な製剤は、その中に含まれるタンパク質が、冷蔵条件、室温条件または高温保存条件のいず

れにせよ、保存条件下での保存の際にその物理的および化学的な安定性ならびにその治療的または非治療的効力を実質的に保持するものである。有利なことに、安定な製剤は、その中に溶解されるタンパク質の凝集または沈殿に対する保護も提供し得る。例えば、冷蔵条件は、冷蔵庫または冷凍庫内での保存を含み得る。いくつかの例において、冷蔵条件は、10℃以下の温度での保存を含み得る。さらなる例において、冷蔵条件は、約2°～約10℃の温度での保存を含む。他の例において、冷蔵条件は、約4℃の温度での保存を含む。さらなる例において、冷蔵条件は、約-20℃以下などの凍結温度での保存を含む。別の例において、冷蔵条件は、約-20℃～約0℃の温度での保存を含む。室温保存条件は、周囲温度、例えば約10℃～約30℃での保存を含み得る。高い保存条件は、約30℃より高い温度での保存を含み得る。例えば約30℃～約50℃の温度での高温安定性は、典型的な周囲(10～30℃)条件での長期保存を予想するための加速された経年変化試験の一部として使用され得る。

【００２６】

溶液中のタンパク質は、もつれを形成する傾向があり、これはもつれた鎖の並進移動性を制限し得、タンパク質の治療的または非治療的効力を妨げ得ることがポリマー科学および工学の当業者に周知である。態様において、本明細書に開示される賦形剤化合物は、溶液中の賦形剤化合物と標的タンパク質の間の特異的な相互作用のためにタンパク質クラスタリングを抑制し得る。本明細書に開示される賦形剤化合物は、天然または合成であり得、望ましくはFDAが安全であると一般的に認識する(generally recognizes as safe)(「GRAS」)物質である。

【００２７】

1. 定義

本開示の目的で、用語「タンパク質」は、典型的に1～3000kDaの分子量を有する、別個の三次構造を生じるのに十分に長い鎖の長さを有するアミノ酸の配列をいう。いくつかの態様において、タンパク質の分子量は約50～200kDaであり；他の態様において、タンパク質の分子量は約20～1000kDaまたは約20～2000kDaである。用語「タンパク質」とは対照的に、用語「ペプチド」は、別個の三次構造を有さないアミノ酸の配列をいう。広範囲のバイオポリマーが、用語「タンパク質」の範囲に含まれる。例えば、用語「タンパク質」は、抗体、アプタマー、融合タンパク質、PEG化タンパク質、合成ポリペプチド、タンパク質断片、リポ蛋白、酵素、構造ペプチド等の治療または非治療タンパク質をいい得る。

【００２８】

a. 治療バイオポリマー定義

治療効果を有するこれらのバイオポリマーは、「治療バイオポリマー」と称され得る。治療効果を有するこれらのタンパク質は「治療タンパク質」と称され得る。治療製剤に含まれる治療タンパク質もその「タンパク質有効成分」と称され得る。

【００２９】

非限定的な例として、治療タンパク質としては、哺乳動物タンパク質、例えばホルモンおよびプロホルモン(例えばインスリンおよびプロインスリン、グルカゴン、カルシトニン、甲状腺ホルモン(T3またはT4または甲状腺刺激ホルモン)、副甲状腺ホルモン、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、成長ホルモン、成長ホルモン放出要素等)；凝固および抗凝固要素(例えば組織要素、ヴォン・ヴィレブラント要素、第VIIIC要素、第IX要素、プロテインC、プラスミノーゲンアクチベーター(ウロキナーゼ、組織型プラスミノーゲンアクチベーター)、トロンビン)；サイトカイン、ケモカインおよび炎症メディエーター；インターフェロン；コロニー刺激要素；インターロイキン(例えばIL-1からIL-10)：成長要素(例えば血管内皮成長要素、線維芽細胞成長要素、血小板由来成長要素、トランスホーミング成長要素、神経栄養成長要素、インスリン様成長要素等)；アルブミン；コラーゲンおよびエラスチン；フィブリン密封剤；造血要素(例えばエリスロポイエチン、トロンボポイエチン等)；骨誘導(osteoinductive)要素(例えば骨形成性タンパク質)；受容体(例えばインテグリン、カドヘリン等)；表面膜タンパク質；輸送タンパク質；制

御タンパク質；抗原性タンパク質(例えば抗原として働くウイルス性構成成分)；ならびに抗体が挙げられ得る。用語「抗体」は、その最も広い意味において本明細書で使用され、非限定的な例として、モノクローナル抗体(例えば免疫グロブリンFc領域を有する全長抗体など)、単鎖分子、二重特異性および多重特異性抗体、ダイアボディ、抗体-薬物コンジュゲート、多エピトープ特異性を有する抗体組成物、ポリクローナル抗体(例えば免疫が傷ついた患者のための治療として使用されるポリクローナル免疫グロブリン)、および抗体の断片(例えばFc、Fab、FvおよびF(ab')2など)が挙げられる。抗体は「免疫グロブリン」とも称され得る。抗体は、生物学的に重要な材料である特定のタンパク質または非タンパク質「抗原」に対して方向づけられることが理解され；患者への治療有効量の抗体の投与は、抗原と複合体化して、それによりその生物学的特性を変化させ得るので、該患者は治療効果を経験する。

【００３０】

態様において、タンパク質はPEG化され、それらがポリ(エチレングリコール)(「PEG」)および/またはポリ(プロピレングリコール)(「PPG」)単位を含むことが意味される。PEG化タンパク質またはPEG-タンパク質コンジュゲートは、溶解性、薬物動力学、薬力学、免疫原性、腎臓クリアランスおよび安定性などのそれらの有益な特性のために治療用途において有用性を見出した。PEG化タンパク質の非限定的な例は、サイトカイン、ホルモン、ホルモン受容体、細胞シグナル伝達要素、凝固要素、抗体、抗体断片、ペプチド、アプタマーおよび酵素のPEG化バージョンである。態様において、PEG化タンパク質は、インターフェロン(PEG-IFN)、PEG化抗血管内皮成長要素(VEGF)、PEG化ヒト成長ホルモン(HGH)、PEG化ムテインアンタゴニスト、PEGタンパク質コンジュゲート薬物、Adagen、PEG-アデノシンデアミナーゼ、PEG-ウリカーゼ、ペグアスパルガーゼ、PEG化顆粒球コロニー刺激要素(GCSF)、ペグフィルグラスチム、ペグロチカーゼ、ペグビソマント、ペガプタニブ、ペギネサチド、PEG化赤血球生成刺激剤、PEG化エポエチンα、PEG化エポエチンβ、メトキシポリエチレングリコールエポエチンβ、PEG化抗血友病第VIII要素、PEG化抗血友病第IX要素およびセルトリズマブペゴールであり得る。

【００３１】

PEG化タンパク質は、タンパク質と、1つ以上の反応性官能基を有するPEG試薬との反応などの種々の方法により合成され得る。PEG試薬上の反応性官能基は、リジン、ヒスチジン、システインおよびN末端などの標的化タンパク質部位でタンパク質との連結を形成し得る。典型的なPEG化試薬は、タンパク質上の標的化アミノ酸残基と特異的な反応性を有するアルデヒド、マレイミドまたはスクシンイミド基などの反応性官能基を有する。PEG化試薬は、約1～約1000PEGのPEG鎖長および/またはPPG反復単位を有し得る。PEG化の他の方法としては、タンパク質が最初にグリコシル化され、次いでグリコシル化された残基が第2の工程においてPEG化されるグリコ-PEG化が挙げられる。特定のPEG化プロセスは、シアリルトランスフェラーゼおよびトランスグルタミナーゼ等の酵素により補助される。

【００３２】

PEG化タンパク質は天然の非PEG化タンパク質を超える治療的利点を提供し得るが、これらの材料は、それらを精製、溶解、濾過、濃縮および投与するのに困難にする物理的または化学的な特性を有し得る。タンパク質のPEG化は、天然のタンパク質と比較してより高い溶液粘度をもたらし得、これは一般的に低濃度でのPEG化タンパク質溶液の製剤化を必要とする。

【００３３】

タンパク質治療薬を、安定で低粘度の溶液中で製剤化することが望ましいので、それらは最小注射体積で患者に投与され得る。例えば、薬物の皮下(SC)または筋内(IM)注射は一般的に、小さな注射体積、好ましくは2mL未満を必要とする。SCおよびIM注射経路は自己投与管理に良好に適合され、これは、直接の医学的監視下のみで行われる静脈内(IV)注射と比較して、コストが低く、よりアクセス可能な形態の治療である。SCまたはIM注射のための製剤化は、低い溶液粘度、一般的に30cP未満、好ましくは20cP未満を必

要とし、最小注射力を用いて狭いゲージの針を通る治療溶液の容易なフローを可能にする。小注射体積および低粘度要件の組合せは、SCまたはIM注射経路においてPEG化タンパク質治療薬の使用に難題を提示する。

【００３４】

「治療(treatment)」は、障害を治療する(cure)、治癒する、緩和する、向上する、治療する(remedy)またはそうでなければ症状の開始を予防もしくは遅延するおよび/または障害の症状を緩和もしくは改善することなどの障害に有益に影響することを意図する任意の手段を含む。治療の必要があるこれらの患者は、既に特定の障害を有する患者、および障害の予防が望ましい患者の両方を含む。障害は、哺乳動物の恒常的な幸福を変化させる任意の状態、例えば急性もしくは慢性の疾患、または哺乳動物を急性もしくは慢性の疾患にかかりやすくする病理学的状態である。障害の非限定的な例としては、癌、代謝障害(例えば糖病病)、アレルギー性障害(例えば喘息)、皮膚科学的障害、心臓血管障害、呼吸器障害、血液学的障害、筋骨格障害、炎症性もしくはリウマチ学的障害、自己免疫障害、胃腸障害、泌尿器学的障害、性的および生殖障害、神経学的障害等が挙げられる。治療の目的で、用語「哺乳動物」は、哺乳動物、例えばヒト、家庭動物、ペット動物、農場動物、スポーツ動物、作業動物等に分類される任意の動物をいい得る。そのため、「治療」は、獣医学的およびヒト治療の両方を含み得る。便利さのために、かかる「治療」を受けている哺乳動物を「患者」といい得る。ある態様において、患者は、子宮内の胎児動物を含む任意の齢のものであり得る。

【００３５】

治療有効量で治療タンパク質を含む製剤は、「治療製剤」と称され得る。態様において、治療は、治療製剤の必要のある哺乳動物に治療有効量の治療製剤を提供することを含む。「治療有効量」は、既存の障害の治療または予想される障害の予防(かかる治療またはかかる予防のいずれも「治療的介入」である)に影響を及ぼす、治療タンパク質の必要のある哺乳動物に投与される治療タンパク質の少なくとも最少濃度である。治療製剤中に有効成分として含まれ得る治療有効量の種々の治療タンパク質は、当該技術分野で良く知られ得るか；または発見されるかもしくはその後の治療的介入に適用される治療タンパク質について、治療有効量は、常套的以下の実験を使用して、当業者に実行される標準的な技術により決定され得る。態様において、治療製剤は、他の任意の構成成分ありまたはなしで、治療有効量のタンパク質有効成分および賦形剤を含む。

【００３６】

b. 非治療バイオポリマー定義

非治療目的(すなわち治療を含まない目的)、例えば家庭、栄養、商業および工業的な用途に使用されるこれらのバイオポリマーは、「非治療バイオポリマー」と称され得る。非治療目的に使用されるこれらのタンパク質は、「非治療タンパク質」と称され得る。非治療タンパク質を含む製剤は「非治療製剤」と称され得る。非治療タンパク質は、植物供給源、動物供給源に由来し得るかまたは細胞培養物から作製され得；それらは酵素または構造タンパク質でもあり得る。非治療タンパク質は、触媒、ヒトおよび動物栄養、処理補助物、洗剤および排泄物処理などの家庭、栄養、商業および工業的な用途に使用され得る。

【００３７】

非治療タンパク質の重要なカテゴリーは、酵素のカテゴリーである。酵素は、例えば触媒、ヒトおよび動物栄養成分、処理補助、洗剤および排泄物処理剤などのいくつかの非治療用途を有する。酵素触媒は、種々の化学反応を促進するために使用される。非治療用途のための酵素触媒の例としては、カタラーゼ、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼおよびリガーゼが挙げられる。酵素のヒトおよび動物の栄養的使用としては、機能性食品、タンパク質の栄養供給源、微量栄養物のキレート化または制御送達、消化補助および栄養補助食品が挙げられ；これらは、アミラーゼ、プロテアーゼ、トリプシン、ラクターゼ等に由来し得る。酵素的処理補助物は、ベーキング、醸造、発酵、ジュース加工およびワイン醸造などの作業における食品および飲料生成物の製造を向上するために使用される。これらの食品および飲料品処理補助物の例と

しては、アミラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、グルカナーゼ、リパーゼおよびラクターゼが挙げられる。酵素は、バイオ燃料の製造にも使用され得る。例えば、バイオ燃料のためのエタノールは、セルロース性およびリグノセルロース性材料などのバイオマス供給原料の酵素分解により補助され得る。セルラーゼおよびリグニナーゼによるかかる供給原料材料の処理は、バイオマスを、燃料へと発酵される基質へと変換する。他の商業的な用途において、酵素は、洗濯、食器洗い、表面洗浄および器具洗浄の用途のための界面活性剤、洗剤およびシミ取り(stain lifting)補助剤として使用される。この目的の典型的な酵素としては、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼおよびリパーゼが挙げられる。また、非治療酵素は、セルラーゼによる繊物軟化、皮革加工、排泄物処理、汚染された沈殿物処理、水処理、パルプ漂白ならびにパルプ軟化および接着剤落とし(debonding)などの種々の商業的および工業的処理に使用される。これらの目的の典型的な酵素はアミラーゼ、キシラナーゼ、セルラーゼおよびリグニナーゼである。

【００３８】

非治療バイオポリマーの他の例としては、ケラチン、コラーゲン、ゼラチン、エラスチン、フィブロイン、アクチン、チューブリンまたはそれらの加水分解、分解もしくは誘導体化形態などの繊維状または構造タンパク質が挙げられる。これらの材料は、ゼラチン、アイスクリーム、ヨーグルトおよび菓子などの食品成分の調製および製剤化に使用され；それらは、濃化剤、レオロジー改変剤、食感改善剤として、および栄養タンパク質の供給源としても食品に添加される。化粧用および容姿ケア工業において、コラーゲン、エラスチン、ケラチンおよび加水分解ケラチンは、皮膚ケアおよび頭髪ケア製剤における成分として広く使用される。非治療バイオポリマーのさらに他の例は、βラクトグロブリン、αラクトアルブミンおよび血清アルブミンなどのホエータンパク質である。これらのホエータンパク質は、酪農作業からの副生成物として大規模に作製され、種々の非治療用途に使用されている。

【００３９】

2. 測定

態様において、本明細書に記載されるタンパク質含有製剤は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析により測定される場合にモノマー消失に抵抗性である。本明細書で使用されるようなSEC分析において、主要分析物ピークは一般的に、製剤に含まれる標的タンパク質に関連付けられ、タンパク質のこの主要ピークは、モノマーピークと称される。モノマーピークは、凝集した(ダイマー、トリマー、オリゴマー等)または断片化された状態とは反対に、モノマー状態の標的タンパク質、例えばタンパク質有効成分の量を表す。モノマーピーク面積は、標的タンパク質に関連付けられたモノマー、凝集物および断片のピークの総面積と比較され得る。したがって、タンパク質含有製剤の安定性は、経過時間後のモノマーの相対量により観察され得；そのため本発明のタンパク質含有製剤の安定性の向上は、賦形剤を含まない対照製剤におけるパーセントモノマーと比較して、特定の経過時間後のより高いパーセントモノマーとして測定され得る。

【００４０】

態様において、理想的な安定性結果は、SEC分析により決定される場合に98～100%モノマーピークを有することである。態様において、本発明のタンパク質含有製剤の安定性における向上は、ストレス条件への暴露後に、賦形剤を含まない対照製剤におけるパーセントモノマーと比較して、かかる対照製剤を同じストレス条件に暴露した場合に、より高いパーセントモノマーとして測定され得る。態様において、ストレス条件は、低温保存、高温保存、空気への暴露、気体の泡への暴露、せん断条件への暴露または凍結/融解サイクルへの暴露であり得る。

【００４１】

態様において、本明細書に記載されるタンパク質含有製剤は、動的光散乱(DLS)分析により測定される場合にタンパク質粒径の増加に抵抗性である。DLS分析において、本明細書で使用する場合、タンパク質含有製剤中のタンパク質の粒径は、メジアン粒子径として観察され得る。粒子径は、凝集した(ダイマー、トリマー、オリゴマー等)または断片化

された状態とは反対に、モノマー状態の活性な構成成分を表すので、理想的に、標的タンパク質のメジアン粒子径は、DLS分析に供される場合に相対的に不変であるべきである。メジアン粒子径の増加は、凝集したタンパク質を表し得た。したがって、タンパク質含有製剤の安定性は、経過時間後のメジアン粒子径の相対変化により観察され得る。

【００４２】

態様において、本明細書に記載されるタンパク質含有製剤は、動的光散乱(DLS)分析により測定される場合に、多分散粒径分布の形成に抵抗性である。態様において、タンパク質含有製剤は、コロイド状タンパク質粒子の単分散粒径分布を含み得る。態様において、理想的な安定性結果は、製剤の初期のメジアン粒子径と比較して、メジアン粒子径の10%未満の変化を有することである。態様において、本発明のタンパク質含有製剤の安定性の向上は、賦形剤を含まない対照製剤中のメジアン粒子径と比較して、特定の経過時間後のメジアン粒子径のより低いパーセント変化として測定され得る。態様において、本発明のタンパク質含有製剤の安定性の向上は、ストレス条件への暴露後に、賦形剤を含まない対照製剤のメジアン粒子径のパーセント変化と比較して、かかる対照製剤を同じストレス条件に暴露した場合に、メジアン粒子径のより低いパーセント変化として測定され得る。態様において、ストレス条件は、低温保存、高温保存、空気への暴露、気体の泡への暴露、せん断条件への暴露または凍結/融解サイクルへの暴露であり得る。態様において、本発明のタンパク質含有製剤治療製剤の安定性の向上は、DLSにより測定された場合に、賦形剤を含まない対照製剤の粒径分布の多分散性と比較して、かかる対照製剤を同じストレス条件に暴露した場合に、より低い多分散粒径分布として測定され得る。

【００４３】

態様において、本発明のタンパク質含有製剤は、濁度、光散乱および/または粒子計数分析により測定される場合、沈殿に対して抵抗性である。濁度、光散乱または粒子計数分析において、より低い値は一般的に、製剤中のより少ない懸濁した粒子数を表す。濁度、光散乱または粒子計数の増加は、標的タンパク質の溶液が安定でないことを示し得る。したがって、タンパク質含有製剤の安定性は、経過時間後の濁度、光散乱または粒子計数の相対量により観察され得る。態様において、理想的な安定性結果は、低く、比較的安定な濁度、光散乱または粒子計数の値を有することである。態様において、本発明のタンパク質含有製剤の安定性の向上は、賦形剤を含まない対照製剤の濁度、光散乱または粒子計数の値と比較して、特定の経過時間後のより低い濁度、より低い光散乱またはより低い粒子計数として測定され得る。態様において、本明細書に記載されるタンパク質含有製剤の安定性の向上は、ストレス条件への暴露後に、賦形剤を含まない対照製剤の濁度、光散乱または粒子計数と比較して、かかる対照製剤を同じストレス条件に暴露した場合に、より低い濁度、より低い光散乱またはより低い粒子計数として測定され得る。態様において、ストレス条件は、低温保存、高温保存、空気への暴露、気体の泡への暴露、せん断条件への暴露または凍結/融解サイクルへの暴露であり得る。

【００４４】

3. 治療製剤

一局面において、本明細書に開示される製剤および方法は、治療有効量の治療タンパク質および賦形剤化合物を含む、向上または低減された粘度の安定な液体製剤を提供する。態様において、製剤は、許容され得る濃度の有効成分および許容され得る粘度を提供しながら、安定性を向上し得る。態様において、製剤は、対照製剤と比較した場合に、安定性の向上を提供し；本開示の目的で、対照製剤は、賦形剤化合物を欠く以外は全ての様式で、乾燥重量基準で治療製剤と実質的に同様または同一である、タンパク質有効成分を含む製剤である。態様において、製剤は、長期保存、25～45℃などの高温、凍結/融解条件、せん断または混合、注射(syringing)、希釈、気体の泡の暴露、酸素暴露、光暴露および凍結乾燥のストレス条件下で安定性の向上を提供する。態様において、タンパク質含有製剤の向上された安定性は、対照製剤と比較して、より低いパーセンテージの可溶性凝集物、粒状物、肉眼では見えない粒子またはゲル形成の形態である。態様において、タンパク質含有製剤の向上された安定性は、対照製剤と比較してより高い生物学的活性の形態

である。態様において、タンパク質含有製剤の向上された安定性は、加水分解、光分解、酸化、還元、脱アミド化、ジスルフィドスクランブリング、断片化または解離などの化学反応に対する抵抗性などの向上した化学安定性の形態である。態様において、タンパク質含有製剤の向上された安定性は、可視粒子、肉眼では見えない粒子、凝集物、濁度、乳光またはゲルの形成の減少により表わされる。

【００４５】

液体タンパク質製剤の粘度は、限定されないが：タンパク質自体(例えば酵素、抗体、受容体、融合タンパク質等)の性質；そのサイズ、三次元構造、化学的組成および分子量；製剤中のその濃度；タンパク質以外の製剤の成分；所望のpH範囲；製剤の保存条件；および製剤を患者に投与する方法などの種々の要因により影響を受け得ることが理解される。本明細書に記載される賦形剤化合物を用いた使用に最も適切な治療タンパク質は、好ましくは本質的に純粋であり、すなわち汚染タンパク質を含まない。態様において、「本質的に純粋」な治療タンパク質は、全て組成物中の治療タンパク質および汚染タンパク質の総重量に基づいて、少なくとも90重量％の治療タンパク質または好ましくは少なくとも95重量％の治療タンパク質またはより好ましくは少なくとも99重量％の治療タンパク質を含むタンパク質組成物である。明確さの目的で、賦形剤として添加されるタンパク質は、この定義に含まれることを意図しない。本明細書に記載される治療製剤は、医薬等級製剤としての使用が意図され、すなわち製剤は、タンパク質有効成分の所望の治療効力が達成され得、製剤が投与される哺乳動物に毒性である構成成分を含まないような形態の哺乳動物の治療における使用が意図される。

【００４６】

態様において、治療製剤は、少なくとも1mg/mLのタンパク質有効成分を含む。他の態様において、治療製剤は、少なくとも10mg/mLのタンパク質有効成分を含む。他の態様において、治療製剤は、少なくとも25mg/mLのタンパク質有効成分を含む。他の態様において、治療製剤は、少なくとも25mg/mLのタンパク質有効成分を含む。他の態様において、治療製剤は、少なくとも100mg/mLのタンパク質有効成分を含む。他の態様において、治療製剤は、少なくとも200mg/mLのタンパク質有効成分を含む。さらに他の態様において、治療製剤溶液は、少なくとも300mg/mLのタンパク質有効成分を含む。一般的に、本明細書に開示される賦形剤化合物は、約0.001～約60mg/mLの量で治療製剤に添加される。態様において、賦形剤化合物は、約0.1～約50mg/mLの量で添加され得る。態様において、賦形剤化合物は、約1～約40mg/mLの量で添加され得る。態様において、賦形剤は、約5～約30mg/mLの量で添加され得る。

【００４７】

ある態様において、治療製剤溶液は、少なくとも300mg/mLのタンパク質有効成分を含む。ある局面において、本明細書に開示される賦形剤化合物は、約1～約300mg/mLの量または約5～約300mg/mLの量で治療製剤に添加される。態様において、賦形剤化合物は、約10～約200mg/mLの量で添加され得る。態様において、賦形剤化合物は、約5～約100mg/mLまたは約20～約100mg/mLの量で添加され得る。態様において、賦形剤化合物は、約10～約75mg/mLまたは約20～約75mg/mLの量で添加され得る。態様において、賦形剤は、約15～約50mg/mLの量で添加され得る。

【００４８】

製剤中のタンパク質有効成分と合わせた場合、特定の有利な特性のために、種々の分子量の賦形剤化合物が選択される。賦形剤化合物を含む治療製剤の例を以下に提供する。態様において、賦形剤化合物は、〈5000Daの分子量を有する。態様において、賦形剤化合物は、〈1000Daの分子量を有する。態様において、賦形剤化合物は、〈500Daの分子量を有する。

【００４９】

態様において、本明細書に開示される賦形剤化合物は、粘度低減量で治療製剤に添加される。態様において、粘度低減量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の粘度を少なくとも10％低減する賦形剤化合物の量であり；本開示の目的で、対照製剤は、賦形剤化合物

を欠く以外は全ての様式で治療製剤と乾燥重量基準で実質的に同様または同一であるタンパク質有効成分を含む製剤である。態様において、粘度低減量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の粘度を少なくとも30%低減する賦形剤化合物の量である。態様において、粘度低減量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の粘度を少なくとも50%低減する賦形剤化合物の量である。態様において、粘度低減量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の粘度を少なくとも70%低減する賦形剤化合物の量である。態様において、粘度低減量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の粘度を少なくとも90%低減する賦形剤化合物の量である。

【００５０】

態様において、粘度低減量は、100cP未満の粘度を有する治療製剤を生じる。他の態様において、治療製剤は、50cP未満の粘度を有する。他の態様において、治療製剤は、20cP未満の粘度を有する。さらに他の態様において、治療製剤は、10cP未満の粘度を有する。用語「粘度」は、本明細書で使用する場合、本明細書に開示される方法で測定した場合の動的粘度値をいう。

【００５１】

態様において、治療製剤は、高濃度の治療タンパク質で患者に投与される。本明細書に記載される賦形剤化合物を用いて製剤化された治療タンパク質の高濃度溶液は、シリンジまたはプレフィルドシリンジを使用して患者に投与され得る。態様において、治療製剤は、治療賦形剤を欠く同様の製剤により経験されるよりも小さい注射体積でおよび/またはより低い不快さを伴って、患者に投与される。態様において、治療製剤は、治療賦形剤を欠く同様の製剤により必要とされるよりも狭いゲージの針またはより低いシリンジ力を使用して、患者に投与される。態様において、治療製剤は、デポー注射として投与される。態様において、治療製剤は、身体における治療タンパク質の半減期を延長する。本明細書に開示される治療製剤のこれらの特徴は、臨床情況、すなわち筋内注射の患者の受け入れが、IM/SC目的に典型的な小口径の針の使用および許容され得る(例えば2～3cc)注射体積の使用を含む、ならびにこれらの条件が単一の注射部位での単回注射において有効量の製剤の投与を生じる状況において、筋内または皮下注射によるかかる製剤の投与を可能にする。対照的に、従来の製剤化技術を使用した治療タンパク質の同等の投与量の注射は、従来の製剤のより高い粘度により制限されるので、従来の製剤のSC/IM注射は、臨床情況に適切でない。

【００５２】

本開示による治療製剤は、向上された安定性と一致した特定の有利な特性を有し得る。態様において、治療製剤は、せん断分解、相分離、クラウディングアウト(clouding out)、沈殿、酸化、脱アミド化、凝集および/または変性に対して抵抗性である。態様において、治療製剤は、対照製剤と比較してより効率的に処理、精製、保存、注射、投与、濾過および/または遠心分離される。

【００５３】

態様において、本明細書に開示される治療製剤は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析により測定される場合にモノマー損失(loss)に対して抵抗性である。SEC分析において、主要分析ピークは一般的に、治療タンパク質などの製剤の活性構成成分と関連付けられ、活性構成成分のこの主要ピークは、モノマーピークと称される。モノマーピークは、凝集(ダイマー、トリマー、オリゴマー等)したタンパク質とは反対に、モノマー状態の活性構成成分の量を表す。したがって、治療製剤の安定性は、経過時間後のモノマーの相対量により観察され得る。態様において、本明細書に開示される治療製剤の安定性の向上は、賦形剤を含まない対照製剤のパーセントモノマーと比較して、特定の経過時間後のより高いパーセントモノマーとして測定され得る。態様において、本明細書に開示される治療製剤の安定性の向上は、ストレス条件への暴露後の賦形剤を含まない対照製剤のパーセントモノマーと比較して、ストレス条件への暴露後のより高いパーセントモノマーとして測定され得る。態様において、本発明の治療製剤は、動的光散乱(DLS)分析により測定される場合に、タンパク質粒径の増加に対して抵抗性である。DLS分析において、治療

タンパク質の粒径は、メジアン粒子径として観察され得る。理想的に、治療タンパク質のメジアン粒子径は、相対的に不変であるべきである。そのため、メジアン粒子径の増加は、凝集したタンパク質を表し得る。したがって、治療製剤の安定性は、経過時間後のメジアン粒子径の相対的変化により観察され得る。態様において、本明細書に開示される治療製剤は、動的光散乱(ＤＬＳ)分析により測定される場合に、多分散粒径分布の形成に対して抵抗性である。態様において、本発明の治療製剤の安定性の向上は、賦形剤を含まない対照製剤のメジアン粒子径と比較して、特定の経過時間後のメジアン粒子径のより低いパーセント変化として測定され得る。態様において、本明細書に開示される治療製剤の安定性の向上は、賦形剤を含まない対照製剤のメジアン粒子径のパーセント変化と比較して、ストレス条件への暴露後のメジアン粒子径のより低いパーセント変化として測定され得る。すなわち、態様において、向上された安定性は、光散乱により測定される場合に粒径の増加を防ぐ。態様において、ストレス条件は、低温保存、高温保存、空気への暴露、気体の泡への暴露、せん断条件への暴露または凍結/融解サイクルへの暴露であり得る。態様において、本明細書に開示される治療製剤の安定性の向上は、賦形剤を含まない対照製剤の粒径分布の多分散性と比較して、ＤＬＳにより測定される場合により低い多分散粒径分布として測定され得る。

【００５４】

態様において、本明細書に開示される治療製剤は、濁度、光散乱または粒子計数分析により測定される場合に沈殿に対して抵抗性である。態様において、本明細書に開示される治療製剤の安定性の向上は、賦形剤を含まない対照製剤の濁度、光散乱または粒子計数値と比較して、特定の経過時間後のより低い濁度、より低い光散乱またはより低い粒子計数として測定され得る。態様において、本明細書に開示される治療製剤の安定性の向上は、賦形剤を含まない対照製剤の濁度、光散乱または粒子計数と比較して、ストレス条件への暴露後のより低い濁度、より低い光散乱またはより低い粒子計数として測定され得る。態様において、ストレス条件は、低温保存、高温保存、空気への暴露、気体の泡への暴露、せん断条件への暴露または凍結/融解サイクルへの暴露であり得る。

【００５５】

態様において、治療賦形剤は、酸化損傷に対して治療タンパク質を安定化する酸化防止特性を有する。態様において、治療製剤は、治療タンパク質についての能力の相当な消失なしで、周囲温度または冷蔵庫条件で延長された時間保存される。態様において、治療製剤は、それが必要とされるまで保存のために乾燥され；次いで、治療製剤は、適切な溶媒、例えば水で再構成される。有利なことに、本明細書に記載される調製された製剤は、数カ月から数年の延長した期間にわたり安定であり得る。例外的に長期間の保存が望ましい場合、製剤は、タンパク質変性の恐れなく、冷凍庫で貯蔵(およびその後再活性化)され得る。態様において、製剤は、冷蔵を必要としない長期保存のために調製され得る。

【００５６】

態様において、本明細書に開示される賦形剤化合物は、安定性向上量で治療製剤に添加される。態様において、安定性向上量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の分解を少なくとも１０％低減する賦形剤化合物の量であり；本開示の目的で、対照製剤は、賦形剤化合物を欠く以外は治療製剤と重量基準で実質的に同様であるタンパク質有効成分を含む製剤である。態様において、安定性向上量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の分解を少なくとも３０％低減する賦形剤化合物の量である。態様において、安定性向上量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の分解を少なくとも５０％低減する賦形剤化合物の量である。態様において、安定性向上量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の分解を少なくとも７０％低減する賦形剤化合物の量である。態様において、安定性向上量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の分解を少なくとも９０％低減する賦形剤化合物の量である。

【００５７】

治療製剤を調製するための方法は、当業者に良く知られ得る。本発明の治療製剤は、例えば治療タンパク質を溶液に添加する前または後に、賦形剤化合物を製剤に添加することにより調製され得る。例えば治療製剤は、第1(より低い)の濃度で治療タンパク質と賦形

剤を合わせることにより作製され得、次いで第2(より高い)の濃度の治療タンパク質を調製するために、濾過または遠心分離により処理され得る。治療製剤は、カオトロープ(chaotrope)、コスモトロープ(kosmotrope)、屈水性誘発物質および塩と共に、賦形剤化合物の1つ以上を用いて作製され得る。治療製剤は、カプセル封入、分散、リポソーム、小胞形成等の技術を使用して、賦形剤化合物の1つ以上を用いて作製され得る。本明細書に開示される賦形剤化合物を含む治療製剤を調製するための方法は、賦形剤化合物の組合せを含み得る。態様において、賦形剤の組合せは、より低い粘度、向上された安定性または低減された注射部位の痛みにおいて利益を生じ得る。それらの製造の際に、保存剤、界面活性剤、糖、スクロース、トレハロース、多糖、アルギニン、プロリン、ヒアルロニダーゼ、安定化剤、緩衝剤等などの他の添加剤が治療製剤に導入され得る。本明細書で使用する場合、薬学的に許容され得る賦形剤化合物は、非毒性で、動物および/またはヒト投与に適切なものである。

【００５８】

3. 非治療製剤

一局面において、本明細書に開示される製剤および方法は、有効量の非治療タンパク質および賦形剤化合物を含む、向上または低減された粘度の安定な液体製剤を提供する。態様において、製剤は、許容され得る濃度の有効成分および許容され得る粘度を提供しながら安定性を向上する。態様において、製剤は、対照製剤と比較した場合に、安定性の向上を提供し；本開示の目的で、対照製剤は、賦形剤化合物を欠く以外は全ての様式で、乾燥重量基準で非治療製剤と実質的に同様または同一であるタンパク質有効成分を含む製剤である。

【００５９】

液体タンパク質製剤の粘度は、限定されないが：タンパク質自体(例えば酵素、構造タンパク質、加水分解の程度等)の性質；そのサイズ、三次元構造、化学的組成および分子量；製剤中のその濃度；タンパク質以外の製剤の構成成分；所望のpH範囲；ならびに製剤についての保存条件などの種々の要因により影響を受け得ることが理解される。

【００６０】

態様において、非治療製剤は、少なくとも25mg/mLのタンパク質有効成分を含む。他の態様において、非治療製剤は、少なくとも100mg/mLのタンパク質有効成分を含む。他の態様において、非治療製剤は、少なくとも200mg/mLのタンパク質有効成分を含む。さらに他の態様において、非治療製剤溶液は、少なくとも300mg/mLのタンパク質有効成分を含む。一般的に、本明細書に開示される賦形剤化合物は、約0.001～約60mg/mLの量で非治療製剤に添加される。態様において、賦形剤化合物は、約0.1～約50mg/mLの量で添加され得る。態様において、賦形剤化合物は、約1～約40mg/mLの量で添加され得る。態様において、賦形剤は、約5～約30mg/mLの量で添加され得る。

【００６１】

ある態様において、非治療製剤溶液は、少なくとも300mg/mLのタンパク質有効成分を含む。ある局面において、本明細書に開示される賦形剤化合物は、約1～約300mg/mLの量または約5～約300mg/mLの量で治療製剤に添加される。態様において、賦形剤化合物は、約10～約200mg/mLの量で添加され得る。態様において、賦形剤化合物は、約5～約100mg/mLまたは約20～約100mg/mLの量で添加され得る。態様において、賦形剤化合物は、約10～約75mg/mLまたは約20～約75mg/mLの量で添加され得る。態様において、賦形剤は、約15～約50mg/mLの量で添加され得る。

【００６２】

製剤中でタンパク質有効成分と合わされる場合、特定の有利な特性のために、種々の分子量の賦形剤化合物が選択される。賦形剤化合物を含む非治療製剤の例を以下に提供する。態様において、賦形剤化合物は、〈5000Daの分子量を有する。態様において、賦形剤化合物は、〈1000Daの分子量を有する。態様において、賦形剤化合物は、〈500Daの分子量を有する。

【００６３】

態様において、本明細書に開示される賦形剤化合物は、粘度低減量で非治療製剤に添加される。態様において、粘度低減量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の粘度を少なくとも10%低減する賦形剤化合物の量であり；本開示の目的で、対照製剤は、賦形剤化合物を欠く以外は全ての様式で、乾燥重量基準で治療製剤と実質的に同様または同一であるタンパク質有効成分を含む製剤である。態様において、粘度低減量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の粘度を少なくとも30%低減する賦形剤化合物の量である。態様において、粘度低減量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の粘度を少なくとも50%低減する賦形剤化合物の量である。態様において、粘度低減量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の粘度を少なくとも70%低減する賦形剤化合物の量である。態様において、粘度低減量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の粘度を少なくとも90%低減する賦形剤化合物の量である。

【００６４】

態様において、粘度低減量は、100cP未満の粘度を有する非治療製剤を生じる。他の態様において、非治療製剤は、50cP未満の粘度を有する。他の態様において、非治療製剤は、20cP未満の粘度を有する。さらに他の態様において、非治療製剤は、10cP未満の粘度を有する。用語「粘度」は本明細書で使用する場合、動的粘度値をいう。

【００６５】

本開示による非治療製剤は、特定の有利な特性を有し得る。態様において、非治療製剤は、せん断分解、相分離、クラウディングアウト、酸化、脱アミド化、凝集、沈殿および変性に対して抵抗性である。態様において、治療製剤は、対照製剤と比較して、より効率的に、処理、精製、保存、ポンプ輸送、濾過および遠心分離され得る。

【００６６】

態様において、非治療賦形剤は、酸化損傷に対して非治療タンパク質を安定化する酸化防止特性を有する。態様において、非治療製剤は、非治療タンパク質についての能力の相当な消失なしで、周囲温度または冷蔵庫条件で延長された時間保存される。態様において、非治療製剤は、それが必要とされるまで保存のために乾燥され；次いで、適切な溶媒、例えば水で再構成され得る。有利なことに、本明細書に記載されるように調製された製剤は、数カ月から数年の延長された期間にわたり安定である。例外的に長い保存期間が望ましい場合、製剤は、タンパク質変性の恐れなく、冷凍庫で保存(その後再活性化)される。態様において、製剤は、冷蔵を必要としない長期保存のために調製される。

【００６７】

態様において、本明細書に開示される賦形剤化合物は、安定性向上量で非治療製剤に添加される。態様において、安定性向上量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の分解を少なくとも10%低減する賦形剤化合物の量であり；本開示の目的で、対照製剤は、賦形剤化合物を欠く以外は乾燥重量基準で、治療製剤と実質的に同様または同一であるタンパク質有効成分を含む製剤である。態様において、安定性向上量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の分解を少なくとも30%低減する賦形剤化合物の量である。態様において、安定性向上量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の分解を少なくとも50%低減する賦形剤化合物の量である。態様において、安定性向上量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の分解を少なくとも70%低減する賦形剤化合物の量である。態様において、安定性向上量は、対照製剤と比較した場合に、製剤の分解を少なくとも90%低減する賦形剤化合物の量である。

【００６８】

本明細書に開示される賦形剤化合物を含む非治療製剤を調製するための方法は、当業者に良く知られ得る。例えば、賦形剤化合物は、非治療タンパク質を溶液に添加する前または後に製剤に添加され得る。非治療製剤は、第1(より低い)の濃度で作製され得、次いで第2(より高い)の濃度を作製するために濾過または遠心分離により処理され得る。非治療製剤は、カオトロープ、コスモトロープ、屈水性誘発物質および塩と共に賦形剤化合物の1つ以上を用いて作製され得る。非治療製剤は、カプセル封入、分散、リポソーム、小胞形成等の技術を使用して賦形剤化合物の1つ以上を用いて作製され得る。それらの製造の

際に、保存剤、界面活性剤、安定化剤等の他の添加剤が非治療製剤に導入され得る。

【００６９】

4. 賦形剤化合物

いくつかの賦形剤化合物が本明細書に記載され、それぞれは1つ以上の治療または非治療タンパク質を用いた使用に適切であり、それぞれは、製剤が高濃度でタンパク質(1つまたは複数)を含むように製剤を構成することを可能にする。以下に記載される賦形剤化合物のカテゴリーのいくつかは：(1)ヒンダードまたは改変されたアミン；(2)芳香族および陰イオン性芳香族；(3)官能基化アミノ酸；(4)オリゴペプチド；(5)短鎖有機酸；(6)低分子量脂肪族多価酸；ならびに(7)ジオンおよびスルホンである。

【００７０】

態様において、1つ以上の粘度低減賦形剤化合物は、同時または連続して製剤に添加され得る。態様において、少なくとも1つの粘度低減化合物はヒンダードアミンである。態様において、少なくとも1つの賦形剤化合物は、ピリミジン、メチル置換ピリミジンまたはフェネチルアミンである。ピリミジンは、少なくとも1つのピリミジン環を含む化合物であり；ピリミジン環は任意に置換され得るかおよび/または縮合環系の一部、例えば縮合二環式または三環式環系の一部であり得ることが理解される。例示的なピリミジンとしては、例えばピリミジン、ピリミジノン、トリアミノピリミジン、プリン、アデニンおよびグアニンが挙げられる。メチル置換ピリミジンは、少なくとも1つのメチル置換ピリミジン環を含む化合物である。例示的なメチル置換ピリミジンは、1,3-ジメチルウラシル、1-メチルウラシル、3-メチルウラシル、5-メチルウラシルおよび6-メチルウラシルである。さらなる例示的なピリミジンを以下により詳細に記載する。ある局面において、ピリミジンまたはメチル置換ピリミジンは、カフェインまたはキサンチンではない。なおさらなる局面において、ピリミジンは、少なくとも1つのピリミジン環を含む化合物であり、ここでピリミジン環は、縮合環系の一部ではない。態様において、少なくとも1つの賦形剤化合物は、カフェイン、サッカリン、アセスルファムカリウム、アスパルテーム、テオフィリン、タウリン、1-メチル-2-ピロリドン、2-ピロリジノン、ナイアシンアミドおよびイミダゾールからなる群より選択される。態様において、少なくとも1つの賦形剤化合物は、カフェイン、タウリン、ナイアシンアミドおよびイミダゾールからなる群より選択される。態様において、少なくとも1つの賦形剤化合物は、ウラシル、1-メチルウラシル、6-メチルウラシル、5-メチルウラシル、1,3-ジメチルウラシル、シトシン、5-メチルシトシン、3-メチルシトシン、チミン、1-メチルチミン、O-4-メチルチミン、1,3-ジメチルチミンおよびジメチルチミンダイマーからなる群より選択される。態様において、少なくとも1つの賦形剤化合物は、ジフェンヒドラミン、フェネチルアミン、N-メチルフェネチルアミン、N,N-ジメチルフェネチルアミン、β-3-ジヒドロキシフェネチルアミン、β-3-ジヒドロキシ-N-メチルフェネチルアミン、3-ヒドロキシフェネチルアミン、4-ヒドロキシフェネチルアミン、チロシノール(tyrosinol)、チラミン、N-メチルチラミンおよびホルデニンからなる群より選択される。態様において、少なくとも1つの賦形剤化合物は、陰イオン性芳香族賦形剤であり、いくつかの態様において、陰イオン性芳香族賦形剤は、4-ヒドロキシベンゼンスルホン酸であり得る。態様において、粘度低減量は、少なくとも1つの賦形剤化合物の約1mg/mL～約100mg/mLであるかまたは粘度低減量は、少なくとも1つの賦形剤化合物の約1mM～約400mMであるかまたは粘度低減量は、約2mM～約150mMの量であるかまたは粘度低減量は、約2mg/mL～約80mg/mLの量であるかまたは粘度低減量は、約5mg/mL～約50mg/mLの量であるかまたは粘度低減量は、約10mg/mL～約40mg/mLの量である。態様において、粘度低減量は、約2mM～約150mMまたは約5mM～約100mMの量であるかまたは約10mM～約75mMであるかまたは約15mM～約50mMである。態様において、担体溶液は、保存剤、糖、ポリオール、多糖、アルギニン、プロリン、界面活性剤、安定化剤および緩衝剤からなる群より選択されるさらなる剤を含む。

【００７１】

理論に拘束されることなく、本明細書に記載される賦形剤化合物は、そうでなければ粒

子間(すなわちタンパク質-タンパク質)相互作用に関与する治療タンパク質の特定の断片、配列、構造または区分と結合すると考えられる。これらの賦形剤化合物と、治療または非治療タンパク質の結合は、タンパク質が、過剰な溶液粘度を生じることなく高濃度で形成され得るように、タンパク質間相互作用を覆い得る。態様において、賦形剤化合物は、より安定なタンパク質-タンパク質相互作用を生じ得；タンパク質-タンパク質相互作用は、タンパク質拡散パラメーターkDまたは浸透性の第2のビリアル係数B22または当業者に良く知られた他の技術により測定され得る。

【００７２】

賦形剤化合物は有利に、水溶性であり得るので、水性ビヒクルを用いた使用に適切である。態様において、賦形剤化合物は、〉1mg/mLの水溶解性を有する。態様において、賦形剤化合物は、〉10mg/mLの水溶解性を有する。態様において、賦形剤化合物は、〉100mg/mLの水溶解性を有する。態様において、賦形剤化合物は、〉500mg/mLの水溶解性を有する。

【００７３】

治療タンパク質製剤に有利に、賦形剤化合物は、生物学的に許容され得、非免疫原性である材料に由来し得、そのため医薬用途に適切である。治療的態様において、賦形剤化合物は、生物学的に適合性および非免疫原性の副生成物を生じるように体内で代謝され得る。

【００７４】

a. 賦形剤化合物カテゴリー1：ヒンダードまたは改変されたアミン

治療または非治療タンパク質の高濃度溶液は、賦形剤化合物としてヒンダードまたは改変されたアミン低分子を用いて製剤化され得る。本明細書で使用する場合、用語「ヒンダードアミン」は、以下の例と一致して、少なくとも1つのかさ高いまたは立体的に妨げられた基を含む低分子をいう。本明細書で使用する場合、用語「改変されたアミン」は、以下により詳細に記載されるように、アミン官能基を含むが、かさ高いかまたは立体的に妨げられた基を有さない低分子をいう。ヒンダードまたは改変されたアミンは、遊離塩基形態、保護された形態または2つの組合せで使用され得る。保護された形態において、ヒンダードまたは改変されたアミンは、塩化物、水酸化物、臭化物、ヨウ化物、フッ化物、アセテート、ホルメート、ホスフェート、スルフェートおよびカルボキシレートなどの陰イオン性対イオンと結合し得る。

【００７５】

賦形剤化合物として有用なヒンダードアミン化合物は、第2級アミン、第3級アミン、第4級アンモニウム、ピリジニウム、ピロリドン、ピロリジン、ピペリジン、モルホリンまたはグアニジニウム基を含み得るので、賦形剤化合物は、中性pHで水溶液中に陽イオン性電荷を有する。ヒンダードアミン化合物はまた、環状芳香族、シクロ脂肪族、シクロヘキシルまたはアルキル基などの少なくとも1つのかさ高いかまたは立体的に妨げられた基を含む。態様において、立体的に妨げられた基はそれ自体、ジアルキルアミン、トリアルキルアミン、グアニジニウム、ピリジニウムまたは第4級アンモニウム基などのアミン基であり得る。理論に拘束されることなく、ヒンダードアミン化合物は、カチオンπ相互作用により、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンなどのタンパク質の芳香族区分と結合すると考えられる。態様において、ヒンダードアミンの陽イオン性基は、タンパク質中の芳香族アミノ酸残基の電子に富んだπ構造についての親和性を有し得るので、それらは、タンパク質のこれらの区分を保護し得、それによりかかる保護されたタンパク質が結合および凝集する傾向を減少させる。

【００７６】

態様において、ヒンダードアミン賦形剤化合物は、イミダゾール、イミダゾリンもしくはイミダゾリジン基、またはそれらの塩、例えばイミダゾール、1-メチルイミダゾール、4-メチルイミダゾール、1-ヘキシル-3-メチルイミダゾリウムクロライド、1-エチルイミダゾール、4-エチルイミダゾール、1-ヘキシル-3-エチルイミダゾリウムクロライド、イミダゾリン、2-イミダゾリン、イミダゾリドン、2-イミダゾリドン、ヒスタミン、4

-メチルヒスタミン、α-メチルヒスタミン、ベタヒスチン、β-アラニン、2-メチル-2-イミダゾリン、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロライド、ブチルイミダゾール、尿酸、尿酸カリウム、ベタゾール、カルノシン、スペルミン、スペルミジン、アスパルテーム、サッカリン、アセスルファムカリウム、キサンチン、テオフィリン、テオブロミン、カフェインおよびアンセリンを含む化学構造を有する。態様において、ヒンダードアミン賦形剤化合物は、ピリミジン、ピリミジノン、トリアミノピリミジン、1,3-ジメチルウラシル、1-メチルウラシル、3-メチルウラシル、1,3-ジエチルウラシル、6-メチルウラシル、ウラシル、1,3-ジメチル-テトラヒドロピリミジノン、チミン、1-メチルチミン、O-4-メチルチミン、1,3-ジメチルチミン、ジメチルチミンダイマー、テアクリン、シトシン、5-メチルシトシン、3-メチルシトシン、プリン、グアニンおよびアデニンからなる群より選択されるピリミジンである。他の局面において、ヒンダードアミン賦形剤化合物は、1-メチル-2-ピロリドン、フェニルセリン、DL-3-フェニルセリン、シクロセリン、ジシクロミンおよびシステアミンからなる群より選択される。態様において、ヒンダードアミン賦形剤化合物は、グアニジノアセテート、ジメチルエタノールアミン、エタノールアミン、ジメチルアミノエタノール、ジメチルアミノプロピルアミン、トリエタノールアミン、1,3-ジアミノプロパン、1,2-ジアミノプロパン、ポリエーテルアミン、Jeffamine(登録商標)ブランドポリエーテルアミン、ポリエーテル-モノアミン、ポリエーテル-ジアミン、ポリエーテル-トリアミン、1-(1-アダマンチル)エチルアミン、ホルデニン、ベンジルアミン、ジメチルベンジルアミン、ジメチルシクロヘキシルアミン、ジエチルシクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルメチルアミン、ヘキサメチレンビグアニド、ポリ(ヘキサメチレンビグアニド)、イミダゾール、ジメチルグリシン、メグルミン、アグマチン、硫酸アグマチン、ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン、テトラメチルエチレンジアミン、N,N-ジメチルエタノールアミン、エタノールアミンホスフェート、グルコサミン、コリンクロライド、ホスホコリン、ナイアシンアミド、イソニコチンアミド、N,N-ジエチルニコチンアミド、ニコチン酸、ニコチン酸ナトリウム塩、イソニコチン酸、チラミン、N-メチルチラミン、3-アミノピリジン、4-アミノピリジン、2,4,6-トリメチルピリジン、3-ピリジンメタノール、ジピリダモール、ニコチンアミドアデノシンジヌクレオチド、ビオチン、葉酸、ホリニン酸、ホリニン酸カルシウム塩、モルホリン、N-メチルピロリドン、2-ピロリジノン、プロカイン、リドカイン、ジシアンジアミド-タウリン付加物、2-ピリジルエチルアミン、ジシアンジアミド-ベンジルアミン付加物、ジシアンジアミド-アルキルアミン付加物、ジシアンジアミド-シクロアルキルアミン付加物およびジシアンジアミド-アミノメタンホスホン酸付加物からなる群より選択される。態様において、本開示に一致するヒンダードアミン化合物は、プロトン付加アンモニウム塩として製剤化される。態様において、本開示に一致するヒンダードアミン化合物は、対イオンとして無機アニオンまたは有機アニオンを有する塩として製剤化される。態様において、治療または非治療タンパク質の高濃度溶液は、賦形剤化合物として、カフェインと、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸またはベンゼンスルホン酸の組合せを用いて製剤化される。態様において、ヒンダードアミン賦形剤化合物は、身体内で代謝されて、生物学的に適合性の副生成物を生じる。いくつかの態様において、ヒンダードアミン賦形剤化合物は、約250mg/ml以下の濃度で製剤中に存在する。さらなる態様において、ヒンダードアミン賦形剤化合物は、約10mg/ml～約200mg/mlの濃度または約10mg/ml～約120mg/mlの濃度で製剤中に存在する。なおさらなる局面において、ヒンダードアミン賦形剤化合物は、約20mg/ml～約120mg/mlの濃度で製剤中に存在する。

【００７７】

態様において、このヒンダードアミンカテゴリーの粘度低減賦形剤は、メチルキサンチン、例えばカフェインおよびテオフィリンを含み得るが、それらの使用は典型的に、それらの低い水溶解性のために制限される。いくつかの適用において、それらの低い水溶解性に関わらず、これらの粘度低減賦形剤のより高い濃縮溶液を有することが有利であり得る。例えば処理において、濃縮されたタンパク質溶液に添加され得る濃縮された賦形剤溶液を有することが有利であり得るので、賦形剤を添加することは、タンパク質を、所望の最

終濃度未満に希釈しない。他の場合において、その低い水溶解性に関わらず、最終的なタンパク質製剤の所望の粘度低減、安定性、張性等を達成するためにさらなる粘度低減賦形剤が必要であり得る。態様において、高度に濃縮された賦形剤溶液は、(i)有効粘度低減量よりも1.5～50倍高い濃度で粘度低減賦形剤として、または(ii)298Kで純水中その文献に報告される溶解性(例えば、The Merck Index; Royal Society of Chemistry; Fifteenth Edition, (April 30, 2013)に報告されるように)よりも1.5～50倍高い濃度で粘度低減賦形剤としてまたはその両方で製剤化され得る。

【００７８】

特定の共溶質は、これらの低溶解性粘度低減賦形剤の溶解性限度を実質的に増加させ、文献に報告される溶解性値よりも数倍高い濃度での賦形剤溶液を可能にすることが見出されている。これらの共溶質は、屈水性誘発物質の一般的なカテゴリー下で分類され得る。この適用について最も高い溶解性の向上を提供することが見出されている共溶質は一般的に、周囲温度および生理学的pHで水中に高度に溶解性であり(〉0.25M)、ピリジンまたはベンゼン環のいずれかを含んだ。共溶質として有用であり得る化合物の例としては、アニリンHCl、イソナイアシンアミド、ナイアシンアミド、n-メチルチラミンHCl、フェノール、プロカインHCl、レゾルシノール、サッカリンカルシウム塩、サッカリンナトリウム塩、アミノ安息香酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、パラヒドロキシ安息香酸ナトリウム、メタヒドロキシ安息香酸ナトリウム、2,5-ジヒドロキシ安息香酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、スルファニル酸ナトリウム、パラヒドロキシベンゼンスルホン酸ナトリウム、シネフリンおよびチラミンHClが挙げられる。

【００７９】

態様において、特定のヒンダードアミン賦形剤化合物は、他の薬理学的特性を有し得る。例として、キサンチンは、全身に吸収される場合に、刺激剤特性および気管支拡張剤特性などの独立の薬理学的特性を有するヒンダードアミンのカテゴリーである。代表的なキサンチンとしては、カフェイン、アミノフィリン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、パラキサンチン、ペントキシフィリン、テオブロミン、テオフィリン等が挙げられる。メチル化キサンチンは、心臓収縮、心拍数および気管支拡張の力に影響することが理解される。いくつかの態様において、キサンチン賦形剤化合物は、約30mg/ml以下の濃度で製剤中に存在する。

【００８０】

独立の薬理学的特性を有するヒンダードアミンの別のカテゴリーは、注射可能な局所麻酔化合物である。注射可能な局所麻酔化合物は、(a)脂肪親和性芳香族環、(b)中間体エステルまたはアミド結合、および(c)第2級または第3級アミンの3成分分子構造を有するヒンダードアミンである。ヒンダードアミンのこのカテゴリーは、ナトリウムイオンの流入を阻害することにより神経伝導を遮断して、それにより局所麻酔を誘導することが理解される。局所麻酔化合物のための脂肪親和性芳香族環は、炭素原子で形成され得る(例えばベンゼン環)かまたはヘテロ原子を含み得る(例えばチオフェン環)。代表的な注射可能な局所麻酔化合物としては、限定されないが、アミロカイン(amylocaine)、アルチカイン(articaine)、ブピバカイン(bupivicaine)、ブタカイン(butacaine)、ブタニリカイン(butanilicaine)、クロロプロカイン(chlorprocaine)、コカイン、シクロメチカイン(cyclomethycaine)、ジメトカイン(dimethocaine)、エジトカイン(editocaine)、ヘキシルカイン(hexylcaine)、イソブカイン(isobucaine)、レボブピバカイン(levobupivacaine)、リドカイン、メタブテタミン(metabutethamine)、メタブトキシカイン(metabutoxycaine)、メピバカイン、メプリルカイン、プロポキシカイン、プリロカイン、プロカイン、ピペロカイン(piperocaine)、テトラカイン、トリメカイン(trimecaine)等が挙げられる。注射可能な局所麻酔化合物は、タンパク質治療製剤において、低減された粘度、向上された安定性および注射時の低減された疼痛などの複数の利点を有し得る。いくつかの態様において、局所麻酔化合物は、約50mg/ml以下の濃度で製剤中に存在する。

【００８１】

態様において、独立した薬理学的特性を有するヒンダードアミンは、本明細書に記載される製剤および方法による賦形剤化合物として使用される。いくつかの態様において、独立した薬理学的特性を有する賦形剤化合物は、薬理学的効果を有さないかおよび/または治療的に有効でない量で存在する。他の態様において、独立した薬理学的特性を有する賦形剤化合物は、薬理学的効果を有するかおよび/または治療的に有効である量で存在する。ある態様において、独立した薬理学的特性を有するヒンダードアミンは、製剤粘度を低下させるように選択された別の賦形剤化合物と組み合わせて使用され、ここで独立した薬理学的特性を有するヒンダードアミンは、その薬理学的活性の利点を付与するように使用される。例えば、注射可能な局所麻酔化合物は、製剤粘度を低下させるように、およびまた製剤の注射時の疼痛を低減するように使用され得る。注射疼痛の低減は麻酔特性により引き起こされ得；また賦形剤により粘度が低減される場合、より低い注射力が必要とされ得る。代替的に、注射可能な局所麻酔化合物は、製剤の粘度を低減する別の賦形剤化合物と組み合され、製剤注射時に低下された局所的な感覚という所望の薬理学的利点を付与するように使用され得る。

【００８２】

他の態様において、粘度低減賦形剤は、潜在的な患者に対するその生理学的影響またはその欠如に基づいて選択される。例えば、特定の置換されたフェネチルアミンは、モノアミン神経伝達物質系などの種々の神経伝達物質を調節することが理解され、これらは、中枢神経系に対するそれらの影響のために、種々の向精神性の効果(例えば興奮性、幻覚誘発性またはエンタクトゲン性(entactogenic)の効果)を有し得るが、向精神性の効果を生じないかまたは臨床的に問題のある向精神性の効果を生じないかまたは用量関連様式で向精神性の効果生じ得るが、特定の製剤中に見られる用量で向精神性の効果を生じない、粘度低減量量の粘度低減フェネチルアミン賦形剤を使用することが望ましくあり得る。同様に、他の生理学的効果(例えば心臓血管、呼吸器、胃腸、尿生殖器等)を生じないかまたは臨床的に問題のある生理学的効果を生じないかまたは用量関連様式で生理学的効果を生じ得るが、特定の製剤中に見られる用量で生理学的効果を生じない、他の粘度低減賦形剤を使用することが望ましくあり得る。

【００８３】

態様において、改変されたアミン賦形剤は、弱塩基の共役酸であり得る。本明細書で使用する場合、用語「共役酸」は、いくらかの酸性を有する塩基のプロトン付加された形態をいい；そのためかかる分子は、塩基の共役酸として公知である。共役酸が改変されたアミン賦形剤として含まれる弱塩基としては、例えばアンモニア(NH_3)、水酸化アンモニウム(NH_4OH)、アルカノールアミンおよび尿素が挙げられる。改変されたアミン賦形剤は、かかる弱塩基と酸を反応させて、それらの共役酸を作製することにより作製され得る。例示的な改変されたアミン賦形剤としては、かかる弱塩基の共役酸、例えば塩化アンモニウム、臭化アンモニウム、フッ化アンモニウム、酢酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム、モノエタノールアミン塩酸塩、モノエタノールアミン臭化水素酸塩、モノエタノールアミンフッ化水素酸塩、モノエタノールアミン酢酸塩、モノエタノールアミンクエン酸塩、ジエタノールアミン塩酸塩、ジエタノールアミン臭化水素酸塩、ジエタノールアミンフッ化水素酸塩、ジエタノールアミン酢酸塩、ジエタノールアミンクエン酸塩、トリエタノールアミン塩酸塩、トリエタノールアミン臭化水素酸塩、トリエタノールアミンフッ化水素酸塩、トリエタノールアミン酢酸塩、トリエタノールアミンクエン酸塩、尿素塩酸塩、尿素臭化水素酸塩、尿素フッ化水素酸塩、尿素酢酸塩、尿素クエン酸塩が挙げられる。態様において、弱塩基はアンモニアまたは水酸化アンモニウムであり、改変されたアミンはそれらの共役酸である。ある態様において、弱塩基は、アルカノールアミンなどのエトキシル化アミン、例えばモノエタノールアミン、ジエタノールアミンおよびトリエタノールアミンであり、改変されたアミンはそれらの共役酸である。

【００８４】

態様において、モノエタノールアミン弱塩基は、アンモニアとエチレンオキシドを反応させる合成経路により作製され得るか、または任意にデカルボキシラーゼ酵素の補助を用

いたセリンもしくはホスファチジルセリンの脱カルボキシル化により作製され得る。他の態様において、弱塩基は尿素である。弱塩基を、酸(例えばHF、HCl、HBr、H_3PO_4、H_2SO_4、酢酸、クエン酸等)により改変して、共役酸賦形剤を作製し得、その後該賦形剤を、タンパク質を含む溶液に導入する。他の態様において、弱塩基を酸により改変して、溶液中のタンパク質の存在下で改変されたアミン賦形剤を形成し得る。

【００８５】

上に開示されるものなどの改変されたアミンは、PEG化タンパク質を含む製剤の粘度の低減に特に有用である。理論に拘束されることなく、プロトン付加されたアミン基は、水素結合およびPEG化タンパク質のPEG区分の溶媒和を変化させ、PEG鎖の骨格においてコンホメーション変化をもたらし、基本的にPEG溶液構造を変化させて、溶液粘度を低減すると考えられる。

【００８６】

b. 賦形剤化合物カテゴリー2：芳香族および陰イオン性芳香族

治療または非治療タンパク質の高濃度溶液は、賦形剤化合物として芳香族低分子化合物を用いて製剤化され得る。芳香族賦形剤化合物は、フェニル、ベンジル、アリール、アルキルベンジル、ヒドロキシベンジル、フェノール、ヒドロキシアリール、ヘテロ芳香族基または縮合芳香族基などの芳香族官能基を含み得る。芳香族賦形剤化合物はまた、カルボキシレート、オキシド、フェノキシド、スルホネート、スルフェート、ホスホネート、ホスフェートまたはスルフィドなどの官能基を含み得る。芳香族賦形剤は、陰イオン性、陽イオン性または非荷電であり得る。

【００８７】

荷電した芳香族賦形剤は、酸、塩基または塩(適用可能な場合)として記載され得、これは、種々の塩形態で存在し得る。理論に拘束されることなく、荷電した芳香族賦形剤化合物は、タンパク質の反対に荷電した区分と結合し得るかさ高い、立体的に妨げられた分子であるので、該化合物は、タンパク質のこれらの区分を保護して、それによりタンパク質含有製剤を粘性にするタンパク質分子間の相互作用を低減させ得ると考えられる。例えば、陰イオン性芳香族賦形剤は、タンパク質の陽イオン性区分と結合し得るので、該賦形剤は、タンパク質のこれらの区分を保護して、それによりタンパク質含有製剤を粘性にするタンパク質分子の間の相互作用を減少させ得る。

【００８８】

態様において、芳香族賦形剤化合物の例としては、陰イオン性芳香族化合物、例えばサリチル酸、アミノサリチル酸、ヒドロキシ安息香酸、アミノ安息香酸、パラ-アミノ安息香酸、ベンゼンスルホン酸、ヒドロキシベンゼンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ヒドロキノンスルホン酸、スルファニル酸、バニリン酸、バニリン、バニリン-タウリン付加物、アミノフェノール、アントラニル酸、桂皮酸、クマル酸、カフェイン酸、イソニコチン酸、葉酸、フォリン酸、フォリン酸カルシウム塩、フェニルセリン、DL-3-フェニルセリン、アデノシン一リン酸、デオキシアデノシン、グアノシン、デオキシグアノシン、インドール酢酸、尿酸カリウム、フランジカルボン酸、フラン-2-アクリル酸、2-フランプロピオン酸、フェニルピルビン酸ナトリウム、ヒドロキシフェニルピルビン酸ナトリウム、ジヒドロキシ安息香酸、トリヒドロキシ安息香酸、ピロガロール、安息香酸および前述の酸の塩が挙げられる。態様において、陰イオン性芳香族賦形剤化合物は、イオン化塩形態で製剤化される。態様において、陰イオン性芳香族化合物は、ヒンダードアミンの塩、例えばジメチルシクロヘキシルアンモニウムヒドロキシベンゾエートとして製剤化される。態様において、陰イオン性芳香族賦形剤化合物は、有機カチオンなどの種々の対イオンを用いて製剤化される。態様において、治療または非治療タンパク質の高濃度溶液は、陰イオン性芳香族賦形剤化合物およびカフェインを用いて製剤化される。態様において、陰イオン性芳香族賦形剤化合物は、身体内で代謝されて、生物学的に適合性の副生成物を生じる。

【００８９】

態様において、芳香族賦形剤化合物の例としては、フェノールおよびポリフェノールが

挙げられる。本明細書で使用する場合、用語「フェノール」は、少なくとも1つのヒドロキシル基に結合した少なくとも1つの芳香族基または縮合芳香族基からなる有機分子をいい、用語「ポリフェノール」は、1つより多くのフェノール基からなる有機分子をいう。かかる賦形剤は、特定の情況下、例えば溶液粘度を低下するために治療または非治療PEG化タンパク質の高濃度溶液と共に製剤中で使用される場合に有利であり得る。フェノールの非限定的な例としては、ベンゼンジオールレゾルシノール(1,3-ベンゼンジオール)、カテコール(1,2-ベンゼンジオール)およびヒドロキノン(1,4-ベンゼンジオール)、ベンゼントリオールヒドロキシキノール(1,2,4-ベンゼントリオール)、ピロガロール(1,2,3-ベンゼントリオール)、およびフロログルシノール(1,3,5-ベンゼントリオール)、ベンゼンテトラオール 1,2,3,4-ベンゼンテトラオールおよび1,2,3,5-ベンゼンテトラオール、ならびにベンゼンペントールおよびベンゼンヘキソールが挙げられる。ポリフェノールの限定的な例としては、タンニン酸、エラグ酸、没食子酸エピガロカテキン、カテキン、タンニン、エラジタンニンおよびガロタンニンが挙げられる。より一般的に、フェノール性およびポリフェノール性化合物としては、限定されないが、フラボノイド、リグナン、フェノール酸およびスチルベンが挙げられる。フラボノイド化合物としては、限定されないが、アントシアニン、カルコン、ジヒドロカルコン、ジヒドロフラボノール、フラバノール、フラバノン、フラボン、フラボノールおよびイソフラボノイドが挙げられる。フェノール酸としては、限定されないが、ヒドロキシ安息香酸、ヒドロキシ桂皮酸、ヒドロキシフェニル酢酸、ヒドロキシフェニルプロパン酸およびヒドロキシフェニルペンタン酸が挙げられる。他のポリフェノール性化合物としては、限定されないが、アルキルメトキシフェノール、アルキルフェノール、クルクミノイド、ヒドロキシベンゾアルデヒド、ヒドロキシベンゾケトン、ヒドロキシシンナムアルデヒド、ヒドロキシクマリン、ヒドロキシフェニルプロペン、メトキシフェノール、ナフトキノン、ヒドロキノン、フェノール性テルペン、レスベラトロールおよびチロソールが挙げられる。態様において、ポリフェノールはタンニン酸である。態様において、フェノールは没食子酸である。態様において、フェノールはピロガロールである。態様において、フェノールはレゾルシノールである。理論に拘束されることなく、フェノール性化合物、例えば没食子酸、ピロガロールおよびレゾルシノールのヒドロキシル基は、PEG鎖の骨格中のエーテル酸素原子と水素結合を形成して、PEG溶液構造を根本的に変化させるフェノール/PEG複合体を形成して、溶液粘度を低減する。ポリフェノール性化合物、例えばタンニン酸は、没食子酸、ピロガロールおよびレゾルシノールなどのそれらのそれぞれのフェノール基構築ブロックからそれらの粘度低減特性を誘導する。ポリフェノール性化合物内のフェノール基の特定の構成は、フェノールの添加により達成される粘度低減が、より少ない量のそれぞれのポリフェノールの添加により促進される複雑な挙動を生じ得る。

【００９０】

c. 賦形剤化合物カテゴリー3：官能基化アミノ酸

治療または非治療タンパク質の高濃度溶液は、1つ以上の官能基化アミノ酸を用いて製剤化され得、ここで単一の官能基化アミノ酸または1つ以上の官能基化アミノ酸を含むオリゴペプチドは、賦形剤化合物として使用され得る。態様において、官能基化アミノ酸化合物は、アミノ酸を生じるように加水分解または代謝され得る分子(「アミノ酸前駆体」)を含む。態様において、官能基化アミノ酸は、フェニル、ベンジル、アリール、アルキルベンジル、ヒドロキシベンジル、ヒドロキシアリール、ヘテロ芳香族基または縮合芳香族基などの芳香族官能基を含み得る。態様において、官能基化アミノ酸化合物は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ベンジル、シクロアルキル、グリセリル、ヒドロキシエチル、ヒドロキシプロピル、PEGおよびPPGエステルなどのエステル化アミノ酸を含み得る。態様において、官能基化アミノ酸化合物は、アルギニンエチルエステル、アルギニンメチルエステル、アルギニンヒドロキシエチルエステルおよびアルギニンヒドロキシプロピルエステルからなる群より選択される。態様において、官能基化アミノ酸化合物は、中性pHで水溶液中の荷電したイオン性化合物である。例えば、単一のアミノ酸は、アセテートまたはベンゾエートなどのエステルを形成することにより誘導体化され得、加水分解生

成物は、両方が天然の材料である酢酸または安息香酸およびアミノ酸である。態様において、官能基化アミノ酸賦形剤化合物は、生物学的に適合性の副生成物を生じるように体内で代謝される。

【００９１】

d. 賦形剤化合物カテゴリー4：オリゴペプチド

治療または非治療タンパク質の高濃度溶液は、賦形剤化合物としてオリゴペプチドを用いて製剤化され得る。態様において、オリゴペプチドは、構造が荷電した部分およびかさ高い部分を有するように設計される。態様において、オリゴペプチドは、2～10個のペプチドサブユニットからなる。オリゴペプチドは、二官能性、例えば無極性のものに連結した陽イオン性アミノ酸または無極性のものに連結した陰イオン性アミノ酸であり得る。態様において、オリゴペプチドは、2～5個のペプチドサブユニットからなる。態様において、オリゴペプチドは、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリリジン、ポリアルギニンおよびポリヒスチジンなどのホモペプチドである。態様において、オリゴペプチドは正味のの正の電荷を有する。他の態様において、オリゴペプチドはTrp2Lys3などのヘテロペプチドである。態様において、オリゴペプチドは、ABA反復パターンなどの互い違いの構造を有し得る。態様において、オリゴペプチドは、陰イオン性および陽イオン性のアミノ酸の両方、例えばArg-Gluを含み得る。理論に拘束されることなく、オリゴペプチドは、高粘度の溶液をもたらす分子間相互作用を低減するような様式で、タンパク質と結合し得る構造を含み；例えばオリゴペプチド-タンパク質結合は、電荷-電荷相互作用であり得、いくらかの無極性アミノ酸を残してタンパク質の周りの水和層の水素結合を破壊し、粘度を低下させる。いくつかの態様において、オリゴペプチド賦形剤は、約50mg/ml以下の濃度で組成物中に存在する。

【００９２】

e. 賦形剤化合物カテゴリー5：短鎖有機酸

本明細書で使用する場合、用語「短鎖有機酸」は、C2-C6有機酸化合物およびその塩、エステルまたはラクトンをいう。このカテゴリーは、飽和および不飽和のカルボン酸、ヒドロキシ官能基化カルボン酸、ならびに直鎖、分岐または環状のカルボン酸を含む。態様において、短鎖有機酸中の酸性基は、カルボン酸、スルホン酸、ホスホン酸またはそれらの塩である。

【００９３】

上述の4つの賦形剤カテゴリーに加えて、治療または非治療タンパク質の高濃度溶液は、賦形剤化合物として、短鎖有機酸、例えばソルビン酸、吉草酸、プロピオン酸、グルクロン酸、カプロン酸およびアスコルビン酸の酸または塩の形態を用いて製剤化され得る。このカテゴリーの賦形剤化合物の例としては、ソルビン酸カリウム、タウリン、プロピオン酸ナトリウム、プロピオン酸カルシウム、プロピオン酸マグネシウムおよびアスコルビン酸ナトリウムが挙げられる。

【００９４】

f. 賦形剤化合物カテゴリー6：低分子量脂肪族多価酸

治療または非治療PEG化タンパク質の高濃度溶液は、より低い溶液粘度を可能にする特定の賦形剤化合物を用いて製剤化され得、ここでかかる賦形剤化合物は、低分子量脂肪族多価酸である。本明細書で使用する場合、用語「低分子量脂肪族多価酸」は、〈約1500の分子量を有し、少なくとも2つの酸性基を有する有機脂肪族多価酸をいい、ここで酸性基は、プロトン供与部分であることが理解される。酸性基は、プロトン付加酸性形態、塩形態またはそれらの組合せであり得る。酸性基の非限定的な例としては、カルボキシレート、ホスホネート、ホスフェート、スルホネート、スルフェート、ニトレートおよびニトライト基が挙げられる。低分子量脂肪族多価酸上の酸性基は、カルボキシレート、ホスホネート、ホスフェート、スルホネート、スルフェート、ニトレートおよびニトライトなどの陰イオン性塩形態であり得；それらの対イオンは、ナトリウム、カリウム、リチウムおよびアンモニウムであり得る。本明細書に記載されるPEG化タンパク質と相互作用するために適した低分子量脂肪族多価酸の具体例としては、マレイン酸、酒石酸、グルタ

ル酸、マロン酸、イタコン酸、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、アスパラギン酸、グルタミン酸、アレンドロン酸、エチドロン酸およびそれらの塩が挙げられる。それらの陰イオン性塩形態の低分子量脂肪族多価酸のさらなる例としては、ホスフェート(PO_4^{3-})、ハイドロジェンホスフェート(HPO_4^{3-})、ジハイドロジェンホスフェート($H_2PO_4^-$)、スルフェート(SO_4^{2-})、バイスルフェート(HSO_4^-)、ピロホスフェート($P_2O_7^{4-}$)、ヘキサメタホスフェート、カルボネート(CO_3^{2-})およびバイカルボネート(HCO_3^-)が挙げられる。陰イオン性塩についての対イオンは、Na、Li、Kまたはアンモニウムイオンであり得る。これらの賦形剤はまた、賦形剤と組み合わせて使用され得る。本明細書で使用する場合、低分子量脂肪族多価酸はまた、αヒドロキシ酸であり得、ここで第1の酸性基に隣接するヒドロキシル基、例えばグリコール酸、乳酸およびグルコン酸ならびにそれらの塩がある。態様において、低分子量脂肪族多価酸は、2つより多くの酸性基を有するオリゴマー形態、例えばポリアクリル酸、ポリリン酸塩、ポリペプチドおよびそれらの塩である。いくつかの態様において、低分子量脂肪族多価酸賦形剤は、約50mg/ml以下の濃度で組成物中に存在する。

【００９５】

g. 賦形剤化合物カテゴリー7：ジオンおよびスルホン

有効な粘度低減賦形剤は、298Kで少なくとも1g/Lまで純水に可溶性であり、pH7で正味の中性電荷を有するスルホン、スルホンアミド、またはジオン官能基を含む分子であり得る。好ましくは、該分子は、1000g/mol未満およびより好ましくは500g/mol未満の分子量を有する。粘度の低減に有効なジオンおよびスルホンは、複数の二重結合を有し、水溶性であり、pH7で正味の電荷を有さず、強力な水素結合供与体ではない。理論に拘束されることなく、二重結合特性は、タンパク質との弱いπスタッキング相互作用を可能にし得る。態様において、高いタンパク質濃度でかつ高濃度で高い粘度のみを生じるタンパク質において、荷電賦形剤は、静電的相互作用がより長い範囲の相互作用であるので有効ではない。溶媒和化したタンパク質表面は、十分に親水性であり、該表面を可溶性にする。タンパク質の疎水性領域は一般的に、三次元構造内で覆われるが、該構造は、絶えず漸進的に変化し、アンフォールドされ、リフォールドされ(ときどき「ブリージング(breathing)」と称される)、隣接するタンパク質の疎水性領域は、互いに接触して、疎水性相互作用により凝集をもたらし得る。ジオンおよびスルホン賦形剤のπスタッキング特性は、かかる「ブリージング」の間に暴露され得る疎水性パッチを遮断し得る。賦形剤の別の他の重要な役割は、密に近接しているタンパク質間の疎水性相互作用および水素結合を妨害することであり得、これは溶液粘度を効果的に低減させる。この記載に適合するジオンおよびスルホン化合物としては、ジメチルスルホン、エチルメチルスルホン、エチルメチルスルホニルアセテート、エチルイソプロピルスルホン、ビス(メチルスルホニル)メタン、メタンスルホンアミド、メチオニンスルホン、重亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸メナジオンナトリウム、1,2-シクロペンタンジオン、1,3-シクロペンタンジオン、1,4-シクロペンタンジオンおよびブタン-2,3-ジオンが挙げられる。

【００９６】

h. 賦形剤化合物カテゴリー8：両性イオン性賦形剤

治療または非治療タンパク質の溶液は、安定性を向上させるためまたは粘度を低減するために、賦形剤として、特定の両性イオン性化合物を用いて製剤化され得る。本明細書で使用する場合、用語「両性イオン性」は、陽イオン性荷電部分および陰イオン性荷電部分を有する化合物をいう。態様において、両性イオン性賦形剤化合物はアミンオキシドである。態様において、反対の電荷は、2～8の化学結合により互いに分離される。態様において、両性イオン性賦形剤化合物は、約50～約500g/molの分子量を有するものなどの低分子であり得るか、または約500～約2000g/molの分子量を有するものなどの中分子量分子であり得るか、または約2000～約100,000g/molの分子量を有するポリマーなどの高分子量分子であり得る。

【００９７】

両性イオン性賦形剤化合物の例としては、(3-カルボキシプロピル)トリメチルアンモ

ニウムクロライド、1-アミノシクロヘキサンカルボン酸、ホモシクロロイシン、1-メチル-4-イミダゾール酢酸、3-(1-ピリジニオ(pyridinio))-1-プロパンスルホン酸、4-アミノ安息香酸、アレンドロン酸塩、アミノエチルスルホン酸、アミノ馬尿酸、アスパルテーム、アミノトリス(メチレンホスホン酸)(ATMP)、カルコブトロール(calcobutrol)、カルテリドール、コカミドプロピルベタイン、コカミドプロピルヒドロキシスルタイン、クレアチン、シチジン、シチジンモノリン酸、ジアミノピメリン酸、ジエチレントリアミン五酢酸、ジメチルフェニルアラニン、メチルグリシン、サルコシン、ジメチルグリシン、両性イオン性ジペプチド(例えば、Arg-Glu、Lys-Glu、His-Glu、Arg-Asp、Lys-Asp、His-Asp、Glu-Arg、Glu-Lys、Glu-His、Asp-Arg、Asp-Lys、Asp-His)、ジエチレントリアミンペンタ(メチレンホスホン酸)(DTPMP)、ジパルミトイルホスファチジルコリン、エクトイン、エチレンジアミンテトラ(メチレンホスホン酸)(EDTMP)、葉酸安息香酸混合物、葉酸ナイアシンアミド混合物、ゼラチン、ヒドロキシプロリン、イミノ二酢酸、イソグバシン、レシチン、ミリスタミンオキシド(myristamine oxide)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)、アスパラギン酸、N-メチルアスパラギン酸、N-メチルプロリン、リジン、N-トリメチルリジン、オルニチン、オキソリン酸、リセドロン酸塩(risendronate)、アリルシステイン、S-アリル-L-システイン、ソマプシタン(somapacitan)、タウリン、テアニン、トリゴネリン(trigonelline)、ビガバトリン(vigabatrin)、エクトイン、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸、o-オクチルホスホリルコリン、ニコチンアミドモノヌクレオチド、トリグリシン、テトラグリシン、β-グアニジノプロピオン酸、5-アミノレブリン酸塩酸塩、ピコリン酸、リドフェニン(lidofenin)、ホスホコリン、1-(5-カルボキシペンチル)-4-メチルピリジン-1-イウムブロミド、L-アンセリン硝酸塩、還元L-グルタチオン、N-エチル-L-グルタミン、N-メチルプロリン、(Z)-1-[N-(2-アミノエチル)-N-(2-アンモニオエチル(ammonioethyl))アミノ]ジアゼン-1-イウム-1,2-ジオレート(DETA-NONOate)、(Z)-1-[N-(3-アミノプロピル)-N-(3-アンモニオプロピル(ammoniopropyl))アミノ]ジアゼン-1-イウム-1,2-ジオレート(diolate)(DPTA-NONate)およびゾレドロン酸が挙げられる。

【００９８】

理論に拘束されることなく、両性イオン性賦形剤化合物は、タンパク質と相互作用することにより、例えば電荷相互作用、疎水性相互作用および立体相互作用により、タンパク質を凝集に対してより抵抗性にすることにより、または電解質寄与、表面張力低減、利用可能な未結合の水の量の変化もしくは誘電率の変化などのタンパク質製剤中の水のバルク特性に影響することにより、粘度低減または安定化効果を発揮し得る。

【００９９】

i. 賦形剤化合物カテゴリー9：水素結合要素を有するクラウディング剤

治療または非治療タンパク質の溶液は、安定性を向上させるためまたは粘度を低減するために、賦形剤として、水素結合要素を有するクラウディング剤を用いて製剤化され得る。本明細書で使用する場合、用語「クラウディング剤」は、タンパク質を溶液に溶解するために利用可能な水の量を低減し、有効なタンパク質濃度を増加する製剤添加剤をいう。態様において、クラウディング剤は、タンパク質粒子サイズを低下し得るかまたは溶液中のタンパク質アンフォールディングの量を低減し得る。態様において、クラウディング剤は、水素結合および水和効果により水の構造化を引き起こす溶媒改質剤(solvent modifier)として作用し得る。態様において、クラウディング剤は、溶液中のタンパク質間の分子間相互作用の量を低減し得る。態様において、クラウディング剤は、酸素、硫黄または窒素原子に結合した水素などの少なくとも1つの水素結合供与体要素を含む構造を有する。態様において、クラウディング剤は、約6～約11のpKaを有する少なくとも1つの弱い酸性水素結合供与体要素を含む構造を有する。態様において、クラウディング剤は、約2～約50の水素結合供与体要素を含む構造を有する。態様において、クラウディング剤は、ルイス塩基などの少なくとも1つの水素結合受容体要素を含む構造を有する。態様において、クラウディング剤は、約2～約50の水素結合受容体要素を含む構造を有する。

態様において、クラウディング剤は、約50～500g/molの分子量を有する。態様において、クラウディング剤は、約100～350g/molの分子量を有する。他の態様において、ラフィノース、イヌリン、プルランまたはシニストリンなどのクラウディング剤は、500g/molを超える分子量を有し得る。

【０１００】

水素結合要素を有するクラウディング剤賦形剤の例としては、1,3-ジメチル-3,4,5,6-テトラヒドロ-2(1H)-ピリミジオン(pyrimidione)、15-クラウン-5、18-クラウン-6、2-ブタノール、2-ブタノン、2-フェノキシエタノール、アセトアミノフェン、アラントイン、アラビノース、メグルミン、アラビトール、ベンジルアセトアセテート、ベンジルアルコール、クロロブタノール、コレスタノールテトラアセチル-b-グルコシド、シンナムアルデヒド、シクロヘキサノン、デオキシリボース、炭酸ジエチル、炭酸ジメチル、ジメチルイソソルビド、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、ジメチロールエチレンウレア、ジメチルウラシル、エピラクトース、エリスリトール、エリトロース、乳酸エチル、エチルマルトール、炭酸エチレン、ホルムアミド、フコース、ガラクトース、ゲニステイン、ゲンチジン酸エタノールアミド、グルコノラクトン、グリセルアルデヒド、グリセロール、炭酸グリセロール、グリセロールホルマール、グリセロールウレタン、グリチルリチン酸、ゴッシピン(gossypin)、ハルパゴシド(harpagoside)、ヘデラコシド(hederacoside)C、イコデキストリン、イジトール、イミダゾリドン、イノシトール、イヌリン、イソマルチトール、コウジ酸、ラクチトール、ラクトビオン酸、ラクトース、ラクツロース、リキソース、マデカソサイド(madecassoside)、マルトトリオース、マンギフェリン、マンノース、メレジトース(melzitose)、乳酸メチル、メチルピロリドン、モグロシドV、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルノイラミン酸、N-メチルアセトアミド、N-メチルホルムアミド、N-メチルプロピオンアミド、ペンタエリスリトール、ピノレシノールジグルコシド、グルクロン酸、ピラセタム、没食子酸プロピル、炭酸プロピレン、プシコース、プルラン、ピロガロール、キナ酸、ラフィノース、レバウジオシド(rebaudioside)A、ラムノース、リビトール、リボース、リブロース、サッカリン、セドヘプツロース、シニストリン、ソルケタール(solketal)、スタキオース、スクラロース、タガトース、t-ブタノール、テトラグリコール、トリアセチン、N-アセチル-d-マンノサミン、ニストース、ケストース、ツラノース、アカルボース、D-糖酸1,4-ラクトン、チオジガラクトシド、フコイダン、ヒドロキシサフロールイエロー(hydroxysafflor yellow)A、シキミ酸、ジオスミン、プラバスタチンナトリウム塩、D-アルトロース、L-グロン酸γラクトン(gulonic gamma-lactone)、ネオマイシン、ルブソシドジヒドロアルテミシニン、フロログルシノール、ナリンギン、バイカレイン、ヘスペリジン、アピゲニン、ピロガロール、モリン(morin)、サルサラート、ケンフェロール、ミリセチン、3',4',7-トリヒドロキシイソフラボン、(±)-タキシホリン、シリビン(silybin)、ペルセイトールジホルマール(perseitol diformal)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、スルファセタミド、イソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド、エチル2,5-ジヒドロキシベンゾエート、スペクチノマイシン、レスベラトロール、ケルセチン、硫酸カナマイシン、1-(2-ピリミジル)ピペラジン、2-(2-ピリジル)エチルアミン、2-イミダゾリドン、DL-1,2-イソプロピリデングリセロール、メトホルミン、m-キシレンジアミン、x-キシリレンジアミン、デメクロサイクリン(demeclocycline)、トリプロピレングリコール、ツベイモシド(tubeimoside)I、ベルベナロシド(verbenaloside)、キシリトールおよびキシロースが挙げられる。

【０１０１】

6. タンパク質/賦形剤溶液：特性およびプロセス

ある態様において、治療または非治療タンパク質の溶液は、ヒンダードまたは改変されたアミン、芳香族、官能基化アミノ酸、オリゴペプチド、短鎖有機酸、低分子量脂肪族多価酸、ジオンおよびスルホン、両性イオン性賦形剤、ならびにクラウディング剤などの上で同定された賦形剤化合物またはそれらの組合せ(「賦形剤添加剤」)を用いて製剤化され、タンパク質拡散相互作用パラメーターkDにより、バイオレイヤー干渉法により、表面

プラスモン共鳴により、または第2のビリアル係数B22を決定するによりもしくは同様の方法により測定された場合、向上されたタンパク質-タンパク質相互作用特性またはタンパク質自己相互作用を生じる。本明細書で使用する場合、上で同定された賦形剤化合物またはそれらの組合せを使用して試験製剤により達成される1つ以上のタンパク質-タンパク質相互作用パラメーターにおける「向上」は、試験製剤を、賦形剤化合物または賦形剤添加剤を含まない同等の製剤と同等の条件下で比較した場合に、誘引性タンパク質-タンパク質相互作用における低下をいい得る。kDおよびB22の測定は、工業における標準的な技術を使用してなされ得、向上した溶液特性または溶液中のタンパク質の安定性の指標であり得る。例えば、高度に負のkD値は、タンパク質が強力な誘引性相互作用を有し、これにより凝集、不安定性および流動性問題がもたらされ得ることを示し得る。特定の上で同定された賦形剤化合物またはその組合せの存在下で製剤化される場合、同じタンパク質は、より小さい負のkD値または0に近いもしくは0を超えるkD値の向上した代理のパラメーターを有し得、この向上した代理のパラメーターは、製剤化関連パラメーターにおける向上と関連する。

【０１０２】

態様において、特定の上で同定された賦形剤化合物またはその組合せ、例えばヒンダードまたは改変されたアミン、芳香族、官能基化アミノ酸、オリゴペプチド、短鎖有機酸、低分子量脂肪族多価酸、ジオンおよびスルホン、両性イオン性賦形剤、および/またはクラウディング剤は、タンパク質含有溶液の製造、処理、滅菌充填、精製および分析などのタンパク質関連プロセスを、濾過、注射、移送、ポンプ輸送、混合、熱移送による加熱または冷却、気体移送、遠心分離、クロマトグラフィー、膜分離、遠心分離濃縮、タンジェンシャルフローフィルトレーション、ラジアルフローフィルトレーション、アキシャルフロー(axial flow)フィルトレーション、凍結乾燥およびゲル電気泳動などの処理方法を使用して向上させるために使用される。これらのプロセスおよび処理方法は、製造、処理、精製および分析工程の間の溶液中のタンパク質のより低い粘度、向上した溶解性または向上した安定性のために、向上した効率を有し得る。さらに、タンパク質処理設備の掃除、滅菌および維持などの設備関連プロセスは、減少された汚れ、減少された変性、より低い粘度および向上されたタンパク質の溶解性のために上で同定された賦形剤の使用により容易にされ得、これらのプロセスの向上に関連するパラメーターは、同様に向上される。

【実施例】

【０１０３】

実施例

材料：

・ウシガンマグロブリン(BGG)、〉99%純度、Sigma Aldrich

・ヒスチジン、Sigma Aldrich

・以下の実施例に記載される他の材料は、そうではないと特定されないかぎりSigma Aldrichのものであった。

【０１０４】

実施例1：賦形剤化合物および試験タンパク質を含む製剤の調製

製剤は、賦形剤化合物および試験タンパク質を使用して調製し、ここで試験タンパク質は、治療製剤において使用される治療タンパク質または非治療製剤において使用される非治療タンパク質のいずれかをシミュレートすることが意図された。かかる製剤は、以下の方法での粘度測定のために、異なる賦形剤化合物を伴って50mM塩酸ヒスチジンにおいて調製された。1.94gのヒスチジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を蒸留水に溶解して、1Mの塩酸(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用いてpHを約6.0に調整し、次いで容量フラスコ中、蒸留水を用いて250mLの最終体積まで希釈することにより、塩酸ヒスチジンを最初に調製した。次いで、賦形剤化合物を50mMヒスチジンHClに溶解した。賦形剤のリストを実施例4、5、6および7において以下に提供する。いくつかの場合において、賦形剤化合物をpH6に調整して、その後50mMヒスチジンHClに溶解した。この場合、賦形剤化合物を最初に、約5wt%で脱イオン水に溶解し、塩酸または水酸化ナ

トリウムのいずれかを用いてpHを約6.0に調整した。次いで調製された塩溶液を、華氏約150度(約65℃)で対流式実験室オーブンに入れて水を蒸発させ、固形賦形剤を単離した。一旦50mMヒスチジンHCl中の賦形剤溶液が調製されると、試験タンパク質(ウシガンマグロブリン(「BGG」)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))を、賦形剤溶液1mL当たり約0.336gのBGGの割合で溶解した。これにより約280mg/mLの最終タンパク質濃度が得られた。賦形剤を伴う50mMヒスチジンHCl中BGGの溶液を20mLバイアル中で製剤化し、オービタルシェーカーテーブル上100rpmで一晩振盪した。次いで溶液を2mLマイクロ遠心分離チューブに移し、IEC MicroMaxマイクロ遠心分離機中2300rpmで10分間遠心分離し、粘度測定の前に含まれる空気を除去した。

【０１０５】

実施例2：粘度測定

実施例1に記載されるように調製した製剤の粘度測定はDV-IIT LV円錐およびプレート粘度計(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)を用いて行った。粘度計はCP-40円錐を備え、3rpm、25℃で操作された。製剤は、0.5mLの体積で粘度計に負荷し、所定のせん断速度および温度で3分間インキュベートし、その後測定収集期間が20秒続いた。次いでこれに、1分のせん断インキュベーションおよびその後の20秒の測定収集期間からなる2つのさらなる工程を続けた。次いで収集した3つのデータ点を平均して、試料の粘度として記録した。

【０１０６】

実施例3：タンパク質濃度測定

実験溶液中のタンパク質の濃度を、UV/VIS分光計(Perkin Elmer Lambda 35)中280nmの波長でタンパク質溶液の吸光度を測定することにより決定した。最初に装置を、pH6の50mMヒスチジンバッファを用いて0吸光度に較正した。次いでタンパク質溶液を、同じヒスチジンバッファで300倍に希釈し、280nmで吸光度を記録した。溶液中のタンパク質の終濃度は、1.264mL/(mg x cm)の吸光系数値を使用して計算した。

【０１０７】

実施例4：ヒンダードアミン賦形剤化合物を用いた製剤

実施例1に記載されるように280mg/mL BGGを含む製剤を調製し、いくつかの試料は添加された賦形剤化合物を含んだ。これらの試験において、ジメチルシクロヘキシルアミン(DMCHA)、ジシクロヘキシルメチルアミン(DCHMA)、ジメチルアミノプロピルアミン(DMAPA)、トリエタノールアミン(TEA)、ジメチルエタノールアミン(DMEA)およびナイアシンアミドの塩酸塩を、ヒンダードアミン賦形剤化合物の例として試験した。また、DMCHAのヒドロキシ安息香酸塩およびタウリン-ジシアンジアミド付加物を、ヒンダードアミン賦形剤化合物の例として試験した。それぞれのタンパク質溶液の粘度は実施例2に記載されるように測定し、結果を以下の表1に示し、これは粘度の低下における添加された賦形剤化合物の利点を示す。

【表１】

表1

試験番号	添加された賦形剤	賦形剤濃度 (mg/mL)	粘度(cP)	粘度低減
4.1	なし	0	79	0%
4.2	DMCHA-HCl	28	50	37%
4.3	DMCHA-HCl	41	43	46%
4.4	DMCHA-HCl	50	45	43%
4.5	DMCHA-HCl	82	36	54%
4.6	DMCHA-HCl	123	35	56%
4.7	DMCHA-HCl	164	40	49%
4.8	DMAPA-HCl	87	57	28%
4.9	DMAPA-HCl	40	54	32%
4.10	DCHMA-HCl	29	51	35%
4.11	DCHMA-HCl	50	51	35%
4.14	TEA-HCl	97	51	35%
4.15	TEA-HCl	38	57	28%
4.16	DMEA-HCl	51	51	35%
4.17	DMEA-HCl	98	47	41%
4.20	DMCHA-ヒドロキシベンゾエート	67	46	42%
4.21	DMCHA-ヒドロキシベンゾエート	92	42	47%
4.22	実施例8の生成物	26	58	27%
4.23	実施例8の生成物	58	50	37%
4.24	実施例8の生成物	76	49	38%
4.25	実施例8の生成物	103	46	42%
4.26	実施例8の生成物	129	47	41%
4.27	実施例8の生成物	159	42	47%
4.28	実施例8の生成物	163	42	47%
4.29	ナイアシンアミド	48	39	51%
4.30	N-メチル-2-ピロリドン	30	45	43%
4.31	N-メチル-2-ピロリドン	52	52	34%

【０１０８】

実施例５：陰イオン性芳香族賦形剤化合物を用いた製剤化

実施例１に記載されるように２８０ｍｇ/ｍＬのＢＧＧの製剤を調製し、いくつかの試料は添加された賦形剤化合物を含んだ。それぞれの溶液の粘度は実施例２に記載されるように測定し、結果を以下の表２に示し、これは粘度の低減における添加された賦形剤化合物の利点を示す。

【表２】

表2

試験番号	添加された賦形剤	賦形剤濃度 (mg/mL)	粘度(cP)	粘度低減
5.1	なし	0	79	0%
5.2	アミノ安息香酸ナトリウム	43	48	39%
5.3	ヒドロキシ安息香酸ナトリウム	26	50	37%
5.4	スルファニル酸ナトリウム	44	49	38%
5.5	スルファニル酸ナトリウム	96	42	47%
5.6	インドール酢酸ナトリウム	52	58	27%
5.7	インドール酢酸ナトリウム	27	78	1%
5.8	バニリン酸、ナトリウム塩	25	56	29%
5.9	バニリン酸、ナトリウム塩	50	50	37%
5.10	サリチル酸ナトリウム	25	57	28%
5.11	サリチル酸ナトリウム	50	52	34%
5.12	アデノシン一リン酸	26	47	41%
5.13	アデノシン一リン酸	50	66	16%
5.14	安息香酸ナトリウム	31	61	23%
5.15	安息香酸ナトリウム	56	62	22%

【０１０９】

実施例6：オリゴペプチド賦形剤化合物を用いた製剤

〉95%の純度のNeoBioLab Inc.(Woburn, MA)により遊離アミンとしてN末端および遊離酸としてC末端を有するオリゴペプチド(n=5)を合成した。LifeTein LLCにより95%の純度のジペプチド(n=2)を合成した。実施例1に記載されるように280mg/mLのBGGの製剤を調製し、いくつかの試料は添加された賦形剤化合物として合成オリゴペプチドを含んだ。それぞれの溶液の粘度は実施例2に記載されるように測定し、結果を以下の表3に示し、これは粘度の低下における添加された賦形剤化合物の利点を示す。

【表３】

表3

試験番号	添加された賦形剤	賦形剤濃度 (mg/mL)	粘度(cP)	粘度低減
6.1	なし	0	79	0%
6.2	ArgX5	100	55	30%
6.3	ArgX5	50	54	32%
6.4	HisX5	100	62	22%
6.5	HisX5	50	51	35%
6.6	HisX5	25	60	24%
6.7	Trp2Lys3	100	59	25%
6.8	Trp2Lys3	50	60	24%
6.9	AspX5	100	102	-29%
6.10	AspX5	50	82	-4%
6.11	ジペプチドLE (Leu-Glu)	50	72	9%
6.12	ジペプチドYE (Tyr-Glu)	50	55	30%
6.13	ジペプチドRP (Arg-Pro)	50	51	35%
6.14	ジペプチドRK (Arg-Lys)	50	53	33%
6.15	ジペプチドRH (Arg-His)	50	52	34%
6.16	ジペプチドRR (Arg-Arg)	50	57	28%
6.17	ジペプチドRE (Arg-Glu)	50	50	37%
6.18	ジペプチドLE (Leu-Glu)	100	87	-10%
6.19	ジペプチドYE (Tyr-Glu)	100	68	14%
6.20	ジペプチドRP (Arg-Pro)	100	53	33%
6.21	ジペプチドRK (Arg-Lys)	100	64	19%
6.22	ジペプチドRH (Arg-His)	100	72	9%
6.23	ジペプチドRR (Arg-Arg)	100	62	22%
6.24	ジペプチドRE (Arg-Glu)	100	66	16%

【０１１０】

実施例8：グアニルタウリン賦形剤の合成

米国特許第2,230,965に記載される方法に従ってグアニルタウリンを調製した。タウリン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)3.53部を1.42部のジシアンジアミド(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)と混合し均一な混合物が得られるまで、乳鉢および乳棒においてすりつぶした。次いで混合物をフラスコに入れて、200℃で4時間加熱した。生成物は、さらなる精製無しで使用した。

【０１１１】

実施例9：賦形剤化合物を含むタンパク質製剤

賦形剤化合物および試験タンパク質を使用して製剤を調製し、ここで試験タンパク質は、治療製剤において使用される治療タンパク質または非治療製剤において使用される非治療タンパク質のいずれかをシミュレートすることを意図した。かかる製剤は、以下の様式で、粘度測定のために異なる賦形剤化合物を伴う50mMの塩酸ヒスチジンバッファ水溶液中で調製した。1.94gのヒスチジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を蒸留水に溶解し、1M塩酸(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用いてpHを約6.0に調整し、次いで容量フラスコ中蒸留水を用いて250mLの最終体積まで希釈することにより、最初に塩酸ヒスチジンバッファ溶液を調製した。次いで賦形剤化合物を50mMのヒスチジンHClバッファ溶液に溶解した。賦形剤化合物のリストを表4に提供する。いくつかの場合、賦形剤化合物を50mMのヒスチジンHClに溶解し、得られた溶液のpHを少量の濃水酸化ナトリウムまたは塩酸でpH6を達成するように調整し、次いでモデルタンパク質を溶解した。いくつかの場合、賦形剤化合物をpH6に調整した後50mMのヒスチジンHClに溶解した。この場合、賦形剤化合物は最初に、約5wt%で脱イオン水に溶解し、塩酸または水酸化ナトリウムのいずれかを用いてpHを約6.0に調整した。次いで調製した塩溶液を華氏約150度(約65℃)の対流式実験室オーブンに入れ、水を蒸発させ、固形賦形剤を単離した。一旦50mMヒスチジンHCl中で賦形剤溶液が調製されると、試験タンパク質ウシガンマグロブリン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を、約280mg/mLの最終タンパク質濃度を達成する割合で溶解した。賦形剤を伴う50mMヒスチジンHCl中のBGGの溶液を20mLバイアル中で製剤化し、オービタルシェーカーテーブル上、100rpmで一晩振盪した。次いで溶液を2mLマイクロ遠心分離チューブに移し、IEC MicroMaxマイクロ遠心分離機中2300rpmで10分間遠心分離して、粘度測定の前に含まれる空気を除去した。

【０１１２】

上述のように調製した製剤の粘度測定は、DV-IIT LV円錐およびプレート粘度計(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)を用いて行った。粘度計は、CP-40円錐を備え、3rpmおよび25℃で操作された。製剤を、0.5mLの体積で粘度計に負荷し、所定のせん断速度および温度で3分間インキュベートし、その後測定収集期間が20秒続いた。次いでこの後に、1分のせん断インキュベーションおよびその後の20秒間の測定収集期間からなるさらなる2工程を続けた。次いで、収集した3つのデータ点を平均して、試料の粘度として記録した。賦形剤を有する溶液の粘度を、賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度に対して標準化した。標準化された粘度は、賦形剤を有するモデルタンパク質溶液の粘度 対 賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度の割合である。

【表４】

表4

試験番号	添加された賦形剤	賦形剤濃度(mg/mL)	標準化された粘度(cP)	粘度低減
9.1	DMCHA-HCl	120	0.44	56%
9.2	ナイアシンアミド	50	0.51	49%
9.3	イソニコチンアミド	50	0.48	52%
9.4	チラミンHCl	70	0.41	59%
9.5	ヒスタミンHCl	50	0.41	59%
9.6	イミダゾールHCl	100	0.43	57%
9.7	2-メチル-2-イミダゾリンHCl	60	0.43	57%
9.8	1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロライド	100	0.48	52%
9.9	プロカインHCl	50	0.53	47%
9.10	3-アミノピリジン	50	0.51	49%
9.11	2,4,6-トリメチルピリジン	50	0.49	51%
9.12	3-ピリジンメタノール	50	0.53	47%
9.13	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド	20	0.56	44%
9.15	フェニルピルビン酸ナトリウム	55	0.57	43%
9.16	2-ピロリジノン	60	0.68	32%
9.17	モルホリンHCl	50	0.60	40%
9.18	硫酸アグマチン	55	0.77	23%
9.19	1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムヨーダイド	60	0.66	34%
9.21	L-アンセリン硝酸塩	50	0.79	21%
9.22	1-ヘキシル-3-メチルイミダゾリウムクロライド	65	0.89	11%
9.23	N,N-ジエチルニコチンアミド	50	0.67	33%
9.24	ニコチン酸、ナトリウム塩	100	0.54	46%
9.25	ビオチン	20	0.69	31%

【０１１３】

実施例10：賦形剤組合せおよび試験タンパク質を含む製剤の調製

第1の賦形剤化合物、第2の賦形剤化合物および試験タンパク質を使用して製剤を調製し、ここで試験タンパク質は、治療製剤に使用される治療タンパク質または非治療製剤に使用される非治療タンパク質のいずれかをシミュレートすることを意図した。第1の賦形剤化合物は、以下の表5に列挙される陰イオンおよび芳香族官能基の両方を有する化合物から選択された。第2の賦形剤化合物は、以下の表5に列挙される、pH6で非イオン性または陽イオン性電荷のいずれかを有し、イミダゾリンまたはベンゼン環のいずれかを有する化合物から選択された。これらの賦形剤の製剤は、以下の様式における粘度測定のために、50mM塩酸ヒスチジンバッファ溶液中で調製した。塩酸ヒスチジンは、最初に1.94gのヒスチジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を蒸留水に溶解し、1M塩酸(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用いてpHを約6.0に調整し、次いで容量フラスコ中で蒸留水を用いて250mLの最終体積まで希釈することにより調製した。次いで個々の第1および第2の賦形剤化合物を50mMヒスチジンHClに溶解した。第1および第2の賦形剤の組合せを50mMヒスチジンHClに溶解し、得られた溶液のpHを、少量の濃水酸化ナトリウムまたは塩酸によりpH6を達成するように調整し、その後モデルタンパク質を溶解した。一旦上述のように賦形剤溶液が調製されると、試験タンパク質(ウシガンマグロブリン(BGG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))を、約280mg/mLの最終タンパク質濃

度を達成するような割合でそれぞれの試験溶液に溶解した。賦形剤を有する50mMヒスチジンHCl中のBGGの溶液を20mLバイアル中で製剤化し、オービタルシェーカーテーブル上、100rpmで一晩振盪した。次いで溶液を2mLマイクロ遠心分離チューブに移し、IEC MicroMaxマイクロ遠心分離機中2300rpmで10分間遠心分離し、含まれる空気を除去した後粘度測定を行った。

【０１１４】

上述のように調製した製剤の粘度測定は、DV-IIT LV円錐およびプレート粘度計(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)を用いて行った。粘度計は、CP-40円錐を備え、3rpmおよび25℃で操作された。製剤を、0.5mLの体積で粘度計に負荷し、所定のせん断速度および温度で3分間インキュベーションして、その後測定収集期間が20秒続いた。次いで、これの後に、1分のせん断インキュベーションおよびその後の20秒の測定収集期間からなるさらなる2工程を続けた。次いで収集した3つのデータ点を平均し、試料の粘度として記録した。賦形剤を有する溶液の粘度を、賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度に対して標準化し、以下の表5にまとめた。標準化された粘度は、賦形剤を有するモデルタンパク質溶液の粘度 対 賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度の割合である。該実施例は、第1および第2の賦形剤の組合せは、単一賦形剤よりも良い結果を与え得ることを示す。

【表５】

表5

	第1の賦形剤		第2の賦形剤		
試験番号	名称	濃度 (mg/mL)	名称	濃度 (mg/mL)	標準化された粘度
10.1	サリチル酸	30	なし	0	0.79
10.2	サリチル酸	25	イミダゾール	4	0.59
10.3	4-ヒドロキシ安息香酸	30	なし	0	0.61
10.4	4-ヒドロキシ安息香酸	25	イミダゾール	5	0.57
10.5	4-ヒドロキシベンゼンスルホン酸	31	なし	0	0.59
	第1の賦形剤		第2の賦形剤		
10.6	4-ヒドロキシベンゼンスルホン酸	26	イミダゾール	5	0.70
10.7	4-ヒドロキシベンゼンスルホン酸	25	カフェイン	5	0.69
10.8	なし	0	カフェイン	10	0.73
10.9	なし	0	イミダゾール	5	0.75

【０１１５】

実施例11：賦形剤組合せおよび試験タンパク質を含む製剤の調製

第1の賦形剤化合物、第2の賦形剤化合物および試験タンパク質を使用して製剤を調製し、ここで試験タンパク質は、治療製剤に使用される治療タンパク質または非治療製剤に使用される非治療タンパク質をシミュレートすることを意図した。第1の賦形剤化合物は、以下の表6に列挙される陰イオン性および芳香族官能基の両方を有する化合物から選択された。第2の賦形剤化合物は、以下の表6に列挙されるpH6で非イオン性または陽イオン性電荷のいずれかを有し、イミダゾリンまたはベンゼン環のいずれかを有する化合物から選択された。これらの賦形剤の製剤は、以下の様式における粘度測定のために蒸留水中で調製された。第1および第2の賦形剤の組合せを蒸留水に溶解し、得られた溶液のpHを、pH6を達成するように少量の濃水酸化ナトリウムまたは塩酸で調整し、その後モデル

タンパク質を溶解した。一旦蒸留水中で賦形剤溶液が調製されると、試験タンパク質(ウシガンマグロブリン(BGG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))を、約280mg/mLの最終タンパク質濃度を達成するような割合で溶解した。賦形剤を有する蒸留水中のBGGの溶液を20mLのバイアル中で製剤化し、オービタルシェーカーテーブル上100rpmで一晩振盪した。次いで溶液を2mLマイクロ遠心分離チューブに移し、IEC MicroMaxマイクロ遠心分離機中2300rpmで10分間遠心分離し、含まれる空気を除去し、その後粘度測定を行った。

【０１１６】

上述のように調製した製剤の粘度測定は、DV-IIT LV円錐およびプレート粘度計(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)を用いて行った。粘度計は、CP-40円錐を備え、3rpmおよび25℃で操作された。製剤を0.5mLの体積で粘度計に負荷し、所定のせん断速度および温度で3分間インキュベートして、次いで20秒の測定収集期間が続いた。次いでこの後に、1分のせん断インキュベーションおよびその後の20秒の測定収集期間からなるさらなる2工程を続けた。次いで収集した3つのデータ点を平均し、試料の粘度として記録した。賦形剤を有する溶液の粘度を、賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度に対して標準化し、以下の表6にまとめた。標準化された粘度は、賦形剤を有するモデルタンパク質溶液の粘度 対 賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度の割合である。この例は、第1および第2の賦形剤の組合せは、単一賦形剤よりも良好な結果を与え得ることを示す。

【表６】

表6

	第1の賦形剤		第2の賦形剤		
試験番号	名称	濃度(mg/mL)	名称	濃度(mg/mL)	標準化された粘度
11.1	サリチル酸	20	なし	0	0.96
11.2	サリチル酸	20	カフェイン	5	0.71
11.3	サリチル酸	20	ナイアシンアミド	5	0.76
11.4	サリチル酸	20	イミダゾール	5	0.73

【０１１７】

実施例12：賦形剤化合物およびPEGを含む製剤の調製

材料：全ての材料はSigma-Aldrich, St. Louis, MOから購入した。製剤は賦形剤化合物およびPEGを使用して調製し、ここでPEGは、治療製剤に使用される治療PEG化タンパク質をシミュレートすることを意図した。かかる製剤は、等体積のPEGの溶液と賦形剤の溶液を混合することにより調製した。両方の溶液は、7.3のpHで10mM Tris、135mM NaClおよび1mMトランス桂皮酸からなるTrisバッファ中で調製した。

【０１１８】

PEG溶液は、3gのポリ(エチレンオキシド)平均Mw約1,000,000(Aldrichカタログ＃372781)と97gのTrisバッファ溶液を混合して調製した。完全な溶解のために混合物を一晩撹拌した。

【０１１９】

賦形剤溶液調製物の例は以下のとおりである：Trisバッファ中のクエン酸の約80mg/mL溶液は、0.4gのクエン酸(Aldrich cat.＃251275)を5mLのTrisバッファ溶液に溶解して調製し、最小量の10M NaOH溶液を用いてpHを7.3に調整した。

【０１２０】

PEG賦形剤溶液は、0.5mLのPEG溶液と0.5mLの賦形剤溶液を混合して調製し、ボルテックスを数秒間使用して混合した。0.5mLのPEG溶液と0.5mLのTrisバッファ溶液を混合して対照試料を調製した。

【０１２１】

実施例13：賦形剤化合物およびPEGを含む製剤の粘度測定

調製した製剤の粘度測定は、DV-IIT LV円錐およびプレート粘度計(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)を用いて行った。粘度計は、CP-40円錐を備え、3rpmおよび25℃で操作された。製剤を0.5mLの体積で粘度計に負荷し、所定のせん断速度および温度で3分間インキュベートし、次いで20秒の測定収集期間を続けた。次いでこの後に、1分のせん断インキュベーションおよびその後の20秒の測定収集期間からなるさらなる2工程を続けた。次いで収集した3つのデータ点を平均し、試料の粘度として記録した。

【０１２２】

表7に示された結果は、粘度の低減における添加された賦形剤化合物の効果を示す。

【表７】

表7

試験番号	賦形剤	賦形剤濃度 (mg/mL)	粘度(cP)	粘度低減
13.1	なし	0	104.8	0%
13.2	クエン酸Na塩	40	56.8	44%
13.3	クエン酸Na塩	20	73.3	28%
13.4	リン酸グリセロール	40	71.7	30%
13.5	リン酸グリセロール	20	83.9	18%
13.6	エチレンジアミン	40	84.7	17%
13.7	エチレンジアミン	20	83.9	15%
13.8	EDTA/K塩	40	67.1	36%
13.9	EDTA/K塩	20	76.9	27%
13.10	EDTA/Na塩	40	68.1	35%
13.11	EDTA/Na塩	20	77.4	26%
13.12	D-グルコン酸/K塩	40	80.32	23%
13.13	D-グルコン酸/K塩	20	88.4	16%
13.14	D-グルコン酸/Na塩	40	81.24	23%
13.15	D-グルコン酸/Na塩	20	86.6	17%
13.16	乳酸/K塩	40	80.42	23%
13.17	乳酸/K塩		85.1	19%
13.18	乳酸/Na塩	40	86.55	17%
13.19	乳酸/Na塩	20	87.2	17%
13.20	エチドロン酸/K塩	24	71.91	31%
13.21	エチドロン酸/K塩	12	80.5	23%
13.22	エチドロン酸/Na塩	24	71.6	32%
13.23	エチドロン酸/Na塩	12	79.4	24%

【０１２３】

実施例１４：BSA1分子当たり1PEG鎖を有するPEG化BSAの調製

ビーカーに、２００mLのリン酸緩衝化食塩水(Aldrich Cat.＃P4417)および4gのBSA(Aldrich Cat.＃A7906)を添加して、磁気バーで混合した。次いで、４００mgのメトキシポリエチレングリコールマレイミド、MW=5,000(Aldrich Cat.＃63187)を添加した。反応混合物を室温で一晩反応させた。翌日、２０滴のHCl 0.1Mを添加して反応を停止させた。反応生成物は、SDS-PageおよびSECにより特徴付けされ、明確にPEG化BSAを示した。反応混合物を30,000の分子量カットオフ(MWCO)を有するAmicon遠心分離チューブに入れ、数ミリリットルまで濃縮した。次いで、試料を、約６のpHのヒスチ

ジンバッファ、50mMを用いて20倍希釈し、次いで高粘度流体が得られるまで濃縮した。タンパク質溶液の終濃度は、280nmで吸光度を測定して、BSAについて0.6678の吸光係数を使用して得た。結果は、溶液中のBSAの終濃度が342mg/mLであったことを示した。

【０１２４】

実施例15：BSA1分子当たり複数のPEG鎖を有するPEG化BSAの調製

7.2のpHのリン酸バッファ、25mM中5mg/mL溶液のBSA(Aldrich A7906)は、0.5gのBSAと100mLのバッファを混合することにより調製した。次いで1gのメトキシPEGプロピオンアルデヒドMw=20,000(JenKem Technology, Plano, TX 75024)、その後0.12gのシアノ水素化ホウ素ナトリウム(Aldrich 156159)を添加した。反応を室温で一晩進行させた。翌日、反応混合物を、Trisバッファ(10mM Tris、135mM NaCl、pH=7.3)で13倍希釈し、30,000のMWCOのAmicon遠心分離チューブを使用して、約150mg/mLの濃度が達成されるまで遠心分離した。

【０１２５】

実施例16：リゾチーム1分子当たり複数のPEG鎖を有するPEG化リゾチームの調製

7.2のpHのリン酸バッファ、25mM中5mg/mL溶液のリゾチーム(Aldrich L6876)は、0.5gのリゾチームと100mLのバッファを混合することにより調製した。次いで1gのメトキシPEGプロピオンアルデヒドMw=5,000(JenKem Technology, Plano, TX 75024)、次いで0.12gのシアノ水素化ホウ素ナトリウム(Aldrich 156159)を添加した。室温で一晩反応を進行させた。翌日、反応混合物を、7.2のpHの25mMのリン酸バッファで49倍希釈し、30,000のMWCOのAmicon遠心分離チューブを使用して濃縮した。タンパク質溶液の終濃度は、280nmで吸光度を測定し、リゾチームについての2.63の吸光係数を使用して得た。溶液中のリゾチームの終濃度は140mg/mLであった。

【０１２６】

実施例17：BSA1分子当たり1PEG鎖を有するPEG化BSAの粘度に対する賦形剤の効果

賦形剤を有するPEG化BSA(上述の実施例14由来)の製剤は、6または12ミリグラムの賦形剤塩を0.3mLのPEG化BSA溶液に添加することにより調製した。溶液は緩やかに振盪することにより混合し、粘度は500秒$^{-1}$のせん断速度でA10チャンネル(100ミクロンの深さ(depth))を備えるRheoSense microViscにより測定した。周囲温度で粘度計測定を完了した。

【０１２７】

表8に示される結果は、粘度の低減における添加された賦形剤化合物の効果を示す。

【表８】

表8

試験番号	賦形剤	賦形剤濃度(mg/mL)	粘度(cP)	粘度低減
17.1	なし	0	228.6	0%
17.2	α-シクロデキストリン硫酸化Na塩	20	151.5	34%
17.3	酢酸K	40	89.5	60%

【０１２８】

実施例18：BSA1分子当たり複数のPEG鎖を有するPEG化BSAの粘度に対する賦形剤の効果

賦形剤としてクエン酸Na塩を有するPEG化BSA(上述の実施例15由来)の製剤は、8ミリグラムの賦形剤塩を0.2mLのPEG化BSA溶液に添加することにより調製した。溶液は緩やかに振盪して混合し、粘度は500秒$^{-1}$のせん断速度でA10チャンネル(100ミクロンの深さ)を備えたRheoSense microViscにより測定した。粘度計測定は周囲温度で完了

した。表9に示される結果は、粘度の低減における添加された賦形剤化合物の効果を示す。

【表９】

表9

試験番号	添加された賦形剤	賦形剤濃度(mg/mL)	粘度(cP)	粘度低減
18.1	なし	0	56.8	0%
18.2	クエン酸Na塩	40	43.5	23%

【０１２９】

実施例19：リゾチーム1分子当たり複数のPEG鎖を有するPEG化リゾチームの粘度に対する賦形剤の効果

賦形剤として酢酸カリウムを有するPEG化リゾチーム(上述の実施例16由来)の製剤は、6ミリグラムの賦形剤塩を0.3mLのPEG化リゾチーム溶液に添加することにより調製した。溶液は、緩やかに振盪することにより混合し、粘度は、500秒$^{-1}$のせん断速度でA10チャンネル(100ミクロンの深さ)を備えたRheoSense microViscにより測定した。粘度計測定は周囲温度で完了した。次の表に示される結果は、粘度の低減における添加された賦形剤化合物の利益を示す。

【表１０】

表10

試験番号	賦形剤	賦形剤濃度(mg/mL)	粘度(cP)	粘度低減
19.1	なし	0	24.6	0%
19.2	酢酸K	20	22.6	8%

【０１３０】

実施例20：賦形剤組合せを含むタンパク質製剤

賦形剤化合物または2つの賦形剤化合物の組合せおよび試験タンパク質を使用して製剤を調製し、ここで試験タンパク質は、治療製剤に使用される治療タンパク質をシミュレートするように意図された。これらの製剤は、以下の様式における粘度測定のために異なる賦形剤化合物を伴って20mMヒスチジンバッファ中で調製した。賦形剤組合せを20mMヒスチジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)に溶解し、得られた溶液のpHは、少量の濃水酸化ナトリウムまたは塩酸を用いてpH6を達成するように調整し、その後モデルタンパク質を溶解した。この実施例についての賦形剤化合物を以下の表11に列挙する。一旦賦形剤溶液が調製されると、試験タンパク質(ウシガンマグロブリン(BGG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))は、約280mg/mLのタンパク質終濃度を達成する割合で溶解された。賦形剤溶液中のBGGの溶液は、5mL滅菌ポリプロピレンチューブ中で製剤化し、オービタルシェーカーテーブル上、80～100rpmで一晩振盪した。次いで溶液を2mLマイクロ遠心分離チューブに移し、IEC MicroMaxマイクロ遠心分離機中2300rpmで約10分間遠心分離し、含まれる空気を除去してその後粘度測定を行った。

【０１３１】

上述のように調製した製剤の粘度測定は、DV-IIT LV円錐およびプレート粘度計(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)を用いて行った。粘度計は、CP-40円錐を備え、3rpmおよび25℃で操作された。製剤を、0.5mLの体積で粘度計に負荷し、所定のせん断速度および温度で3分間インキュベートし、次いで20秒の測定収集期間を続けた。次いでこの後に、1分のせん断インキュベーションおよびその後の20秒の測定収集

期間からなるさらなる2工程を続けた。次いで収集した3つのデータ点を平均し、試料の粘度として記録した。賦形剤を有する溶液の粘度を、賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度に対して標準化し、結果を以下の表11に示す。標準化された粘度は、賦形剤を有するモデルタンパク質溶液の粘度 対 賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度の割合である。

【表１１】

表11

試験#	賦形剤A		賦形剤B		標準化された粘度
	名称	Conc. (mg/mL)	名称	Conc. (mg/mL)	
20.1	なし	0	なし	0	1.00
20.2	アスパルテーム	10	なし	0	0.83
20.3	サッカリン	60	なし	0	0.51
20.4	アセスルファムK	80	なし	0	0.44
20.5	テオフィリン	10	なし	0	0.84
20.6	サッカリン	30	なし	0	0.58
20.7	アセスルファムK	40	なし	0	0.61
20.8	カフェイン	15	タウリン	15	0.82
20.9	カフェイン	15	チラミン	15	0.67

【０１３２】

実施例21：粘度および注射の疼痛を低減するための賦形剤を含むタンパク質製剤

賦形剤化合物、第2の賦形剤化合物および試験タンパク質を使用して製剤を調製し、ここで試験タンパク質は、治療製剤に使用される治療タンパク質をシミュレートするように意図された。第1の賦形剤化合物、賦形剤Aは、局所麻酔特性を有する化合物の群から選択された。第1の賦形剤、賦形剤Aおよび第2の賦形剤、賦形剤Bは表12に列挙される。これらの製剤は、それらの粘度が測定され得るように、以下の様式において賦形剤Aおよび賦形剤Bを使用して20mMヒスチジンバッファ中で調製した。表12に開示される量の賦形剤を20mMヒスチジン(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)に溶解し、得られた溶液のpHを、pH6を達成するように少量の濃水酸化ナトリウムまたは塩酸で調整し、その後モデルタンパク質を溶解した。一旦賦形剤溶液が調製されると、試験タンパク質(ウシガンマグロブリン(BGG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))は、約280mg/mLのタンパク質終濃度を達成するような割合で賦形剤溶液中に溶解された。賦形剤溶液中のBGGの溶液を、5mL滅菌ポリプロピレンチューブ中で製剤化し、オービタルシェーカーテーブル上80～100rpmで一晩振盪した。次いでBGG-賦形剤溶液を2mLマイクロ遠心分離チューブに移し、IEC MicroMaxマイクロ遠心分離機中2300rpmで約10分間遠心分離し、含まれる空気を除去してその後粘度測定を行った。

【０１３３】

上述のように調製した製剤の粘度測定は、DV-IIT LV円錐およびプレート粘度計(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)を用いて行った。粘度計は、CP-40円錐を備え、3rpmおよび25℃で操作された。製剤は、0.5mLの体積で粘度計に負荷し、所定のせん断速度および温度で3分間インキュベートし、次いで20秒の測定収集期間を続けた。次いでこの後に、1分のせん断インキュベーションおよびその後の20秒の測定収集期間からなるさらなる2工程を続けた。次いで収集した3つのデータ点を平均し、試料の粘度として記録した。賦形剤を有する溶液の粘度を、賦形剤を有さないモデルタンパク質

溶液の粘度に対して標準化し、結果を以下の表12に示す。標準化された粘度は、賦形剤を有するモデルタンパク質溶液の粘度 対 賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度の割合である。

【表１２】

表12

試験#	賦形剤A		賦形剤B		標準化された粘度
	名称	Conc. (mg/mL)	名称	Conc. (mg/mL)	
21.1	なし	0	なし	0	1.00
21.2	リドカイン	45	なし	0	0.73
21.3	リドカイン	23	なし	0	0.74
21.4	リドカイン	10	カフェイン	15	0.71
21.5	プロカインHCl	40	なし	0	0.64
21.6	プロカインHCl	20	カフェイン	15	0.69

【０１３４】

実施例22：賦形剤化合物およびPEGを含む製剤

賦形剤化合物およびPEGを使用して製剤を調製し、ここでPEGは、治療製剤に使用される治療PEG化タンパク質をシミュレートするように意図され、賦形剤化合物は、表13に列挙される量で提供された。これらの製剤は、等体積のPEGの溶液と賦形剤の溶液を混合することにより調製された。両方の溶液はDI水中で調製した。

【０１３５】

PEG溶液は、16.5gのポリ(エチレンオキシド)平均Mw約100,000(Aldrich カタログ＃181986)と83.5gのDI水を混合することにより調製された。完全な溶解のために混合物を一晩撹拌した。

【０１３６】

賦形剤溶液は、この一般的な方法によりおよび以下の表13に詳述されるように調製した：DI水中リン酸カリウム三塩基(Aldrichカタログ＃P5629)の約20mg/mL溶液は、0.05gのリン酸カリウムを5mLのDI水に溶解することにより調製した。PEG賦形剤溶液は、0.5mLのPEG溶液と0.5mLの賦形剤溶液を混合して調製し、ボルテックスを数秒間使用して混合した。対照試料は、0.5mLのPEG溶液と0.5mLのDI水を混合することにより調製した。粘度を測定し、結果を以下の表13に記録する。

【表１３】

表13

試験番号	賦形剤	賦形剤 濃度 (mg/mL)	粘度(cP)	粘度 低減 (%)
22.1	なし	0	79.7	0
22.2	クエン酸Na塩	10	74.9	6.0
22.3	リン酸カリウム	10	72.3	9.3
22.4	クエン酸Na塩/リン酸カリウム	10/10	69.1	13.3
22.5	硫酸ナトリウム	10	75.1	5.8
22.6	クエン酸Na塩/硫酸ナトリウム	10/10	70.4	11.7

【０１３７】

実施例23：賦形剤を有するタンパク質溶液の向上した処理

2つのBGG溶液は、0.25gの固体BGG(Aldrichカタログ番号G5009)と4mlのバッファ溶液を混合することにより調製した。試料Aについて：バッファ溶液は20mMヒスチジンバッファ(pH=6.0)であった。試料Bについて：バッファ溶液は15mg/mlのカフェインを含む20mMヒスチジンバッファ(pH=6)であった。固体BGGの溶解は、試料を100rpmに設定したオービタルシェーカーに配置することにより行った。カフェイン賦形剤を含むバッファ試料は、タンパク質をより速く溶解することが観察された。カフェイン賦形剤を有する試料(試料B)についてBGGの完全溶解は15分で達成された。カフェインを有さない試料(試料A)について、溶解は35分必要であった。

【０１３８】

次いで試料を、30,000分子量カットオフを有する2つの別個のAmicon Ultra 4遠心分離フィルターユニットに配置し、試料を10分間隔で、2,500rpmで遠心分離した。それぞれの10分遠心分離ラン後に回収された濾過液体積を記録した。表14の結果は、試料Bについてのより速い濾過液回収を示す。また、試料Bは、全てのさらなるランで濃縮され続けたが、試料Aは、最大濃度点に達し、さらなる遠心分離はさらなる試料濃縮を生じなかった。

【表１４】

表14

遠心分離時間(分)	収集された試料A濾過液(mL)	収集された試料B濾過液(mL)
10	0.28	0.28
20	0.56	0.61
30	0.78	0.88
40	0.99	1.09
50	1.27	1.42
60	1.51	1.71
70	1.64	1.99
80	1.79	2.29
90	1.79	2.39
100	1.79	2.49

【０１３９】

実施例２４：複数の賦形剤を含むタンパク質製剤

この実施例は、賦形剤としてのカフェインとアルギニンの組合せはＢＧＧ溶液の粘度の低下に対してどのように有益な効果を有するのかを示す。４つのＢＧＧ溶液は、０.１８ｇの固体ＢＧＧ(Ａｌｄｒｉｃｈカタログ番号Ｇ５００９)と０.５ｍＬの２０ｍＭヒスチジンバッファ、ｐＨ６を混合することにより調製した。それぞれのバッファ溶液は、以下の表に記載される異なる賦形剤または賦形剤の組合せを含んだ。溶液の粘度は先の実施例に記載されるように測定した。結果は、ヒンダードアミン賦形剤、カフェインは、アルギニンなどの公知の賦形剤と組み合され得、該組合せは、個々の賦形剤自体よりも良好な粘度低減特性を有することを示す。

【表１５】

表15

試料	添加された賦形剤(1つまたは複数)	粘度 (cP)	粘度低減 (%)
A	なし	130.6	0
B	カフェイン(10 mg/ml)	87.9	33
C	カフェイン(10 mg/ml)/アルギニン(25 mg/ml)	66.1	49
D	アルギニン(25 mg/ml)	76.7	41

【０１４０】

アルギニンはヒスチジンバッファ、ｐＨ６中２８０ｍｇ/ｍＬ溶液のＢＧＧに添加した。表１６に示されるように、５０ｍｇ/ｍＬを超えるレベルで、より多くのアルギニンの添加は粘度をさらには低下しなかった。

【表１６】

表16

添加されたアルギニン (mg/mL)	粘度(cP)	粘度低減 (%)
0	79.0	0%
53	40.9	48%
79	46.1	42%
105	47.8	40%
132	49.0	38%
158	48.0	39%
174	50.3	36%
211	51.4	35%

【０１４１】

カフェインはヒスチジンバッファ、pH6中280mg/mL溶液のBGGに添加した。表17に示されるように、10mg/mlを超えるレベルで、より多くのカフェインの添加は粘度をさらには低下しなかった。

【表１７】

表17

添加されたカフェイン (mg/mL)	粘度(cP)	粘度低減 (%)
0	79	0%
10	60	31%
15	62	23%
22	50	45%

【０１４２】

実施例25：脱イオン水中の共溶質の溶液の調製

水中のカフェイン溶解性を高めるための共溶質として使用される化合物は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)から入手し、該化合物としてはナイアシンアミド、プロリン、プロカインHCl、アスコルビン酸、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、リドカイン、サッカリン、アセスルファムK、チラミンおよびアミノ安息香酸が挙げられた。それぞれの共溶質の溶液は、乾燥固体を脱イオン水に溶解し、いくつかの場合には必要に応じて5M塩酸または5M水酸化ナトリウムを用いてpHを約6のpH～約8のpHの値に調整することにより調製された。次いで溶液を、クラスA容量フラスコならびに溶解した化合物の質量および溶液の最終体積に基づいて記録された濃度を使用して、25mLまたは50mLのいずれかの最終体積まで希釈した。調製した溶液は、ストレート(neat)でまたは脱イオン水で希釈してのいずれかで使用した。

【０１４３】

実施例26：カフェイン溶解性試験

周囲温度(約23C)でのカフェインの溶解性に対する異なる共溶質の影響を、以下の様式で評価した。乾燥カフェイン粉末(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を20mLのガラ

スシンチレーションバイアルに添加して、カフェインの質量を記録した。実施例25に従って調製された10mLの共溶質溶液を、ある場合において(表18に記録されるように)カフェイン粉末に添加し；他の場合において(表18に記録されるように)、共溶質溶液と脱イオン水の混合物をカフェイン粉末に添加し、10mLの最終添加体積を維持した。乾燥カフェイン粉末の体積寄与は、これらの混合物のいずれにおいても無視できると仮定された。バイアルに小さい磁気撹拌バーを入れて、溶液を、撹拌プレート上で約10分間激しく混合させた。約10分後、バイアルを、乾燥カフェイン粉末の溶解について観察し、結果を以下の表18に示す。これらの観察は、ナイアシンアミド、プロカインHCl、2,5-ジヒドロキシ安息香酸ナトリウム塩、サッカリンナトリウム塩およびチラミン塩化物塩は全てカフェインの溶解を、報告されたカフェイン溶解限界(solubility limit)(Sigma-Aldrichによると室温で約16mg/mL)の少なくとも約4倍まで可能にしたことを示した。

【表１８】

表18

試験番号.	共溶質		カフェイン	観察
	名称	Conc. (mg/mL)	(mg/mL)	
26.1	プロリン	100	50	DND
26.2	ナイアシンアミド	100	50	CD
26.3	ナイアシンアミド	100	60	CD
26.4	ナイアシンアミド	100	75	CD
26.5	ナイアシンアミド	100	85	CD
26.6	ナイアシンアミド	100	100	CD
26.7	ナイアシンアミド	80	85	CD
26.8	ナイアシンアミド	50	80	CD
26.9	プロカインHCl	100	85	CD
26.10	プロカインHCl	50	80	CD
26.11	ナイアシンアミド	30	80	DND
26.12	プロカインHCl	30	80	DND
26.13	ナイアシンアミド	40	80	MD
26.14	プロカインHCl	40	80	DND
26.15	アスコルビン酸, Na	50	80	DND
26.16	アスコルビン酸, Na	100	80	DND
26.17	2,5 DHBA, Na	40	80	CD
26.18	2,5 DHBA, Na	20	80	MD
26.19	リドカイン HCl	40	80	DND
26.20	サッカリン, Na	90	80	CD
26.21	アセスルファムK	80	80	DND
26.22	チラミンHCl	60	80	CD
26.23	Naアミノベンゾエート	46	80	DND
26.24	サッカリン, Na	45	80	DND
26.25	チラミンHCl	30	80	DND

CD=完全に溶解; MD=ほとんど溶解; DND=溶解しなかった

【０１４４】

実施例27：タンパク質製剤に対するより高いカフェイン濃度の影響

第1の賦形剤化合物、第2の賦形剤化合物および試験タンパク質を使用して製剤を調製し、ここで試験タンパク質は、治療製剤に使用される治療タンパク質をシミュレートする

ように意図された。第1の賦形剤化合物は、低い溶解性および示される粘度低減の両方を有する化合物から選択された。第2の賦形剤化合物は、より高い溶解性およびピリジンまたはベンゼン環のいずれかを有する化合物から選択された。かかる製剤は、以下の様式での粘度測定のために異なる賦形剤化合物を伴って20mMヒスチジンバッファ中で調製された：賦形剤組合せを20mMヒスチジンバッファ溶液に溶解し、得られた溶液のpHを、少量の濃水酸化ナトリウムまたは塩酸で、pH6を達成するように調整し、その後モデルタンパク質を溶解した。ある実験において、第1の賦形剤は、文献において報告されるその室温溶解性限度を大きく超える量で添加した。一旦賦形剤溶液が調製されると、試験タンパク質(ウシガンマグロブリン(BGG、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))を、約280mg/mLの最終タンパク質濃度を達成する割合で溶解した。賦形剤溶液中のBGGの溶液を、20mLのバイアル中で製剤化し、オービタルシェーカーテーブル上100rpmで一晩振盪させた。次いで溶液を、2mLマイクロ遠心分離チューブに移し、IEC MicroMaxマイクロ遠心分離機中2300rpmで10分間遠心分離して、含まれる空気を除去し、その後粘度測定を行った。

【０１４５】

上述のように調製される製剤の粘度測定は、DV-IIT LV円錐およびプレート粘度計(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)を用いて行った。粘度計は、CP-40円錐を備え、3rpmおよび25℃で操作した。製剤を、0.5mLの体積で粘度計に負荷し、所定のせん断速度および温度で3分間インキュベートし、その後20秒の測定収集期間を続けた。次いでこの後に、1分のせん断インキュベーションおよびその後の20秒の測定収集期間からなるさらなる2工程を続けた。次いで収集した3つのデータ点を平均し、以下の表19に示されるように、試料の粘度として記録した。賦形剤を有する溶液の粘度を、賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度に対して標準化した。標準化された粘度は、賦形剤を有するモデルタンパク質溶液の粘度 対 賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度の割合である。

【表１９】

表19

試験番号	第1の賦形剤		第2の賦形剤		標準化された粘度
	名称	Conc. (mg/mL)	名称	(mg/mL)	
27.1	カフェイン	15	なし	0	0.75
試験番号	第1の賦形剤		第2の賦形剤		標準化された粘度
	名称	Conc. (mg/mL)	名称	(mg/mL)	
27.2	カフェイン	15	サッカリン	14	0.62
27.3	カフェイン	15	プロカイン HCl	20	0.61
27.4	カフェイン	60	ナイアシンアミド	50	0.61
27.5	カフェイン	60	プロカイン HCl	50	0.60
27.6	カフェイン	60	サッカリン	50	0.66

【０１４６】

実施例28：賦形剤としてカフェインを用いたアダリムマブ溶液の向上した安定性

カフェイン賦形剤を有するおよび有さないアダリムマブ溶液の安定性を、試料を2つの異なるストレス条件：撹拌および凍結-融解に暴露した後に評価した。実施例32により詳細に記載される性質を有するアダリムマブ薬物製剤HUMIRA(登録商標)を使用した。HU

MIRA(登録商標)試料を、実施例32に記載される元のバッファ溶液中で200mg/mLアダリムマブ濃度まで濃縮し；この濃縮した試料を「試料1」と指定する。第2の試料は、実施例33に記載されるように、約200mg/mLのアダリムマブおよび15mg/mLの添加したカフェインを用いて調製し；カフェインを添加したこの濃縮された試料を「試料2」と指定する。両方の試料は、以下の通りに希釈剤を用いて1mg/mLアダリムマブの終濃度まで希釈した：試料1希釈剤は元のバッファ溶液であり、試料2希釈剤は20mMヒスチジン、15mg/mLカフェイン、pH=5である。両方のHUMIRA(登録商標)希釈液を0.22μシリンジフィルターで濾過した。全ての希釈された試料について、層流フード中で2mlのエッペンドルフチューブ内で3バッチの300μlのそれぞれを調製した。試料を以下のストレス条件に供した：撹拌について、試料を、300rpmで91時間、オービタルシェーカーに置き；凍結-融解について、1条件当たり平均6時間の間に、試料を、-17から30℃までのサイクルに7回供した。表20は調製された試料を記載する：

【表２０】

表20

試料 #	添加された賦形剤	ストレス条件
1-C	なし	なし
1-A	なし	撹拌
1-FT	なし	凍結-融解
2-C	15mg/mLカフェイン	なし
2-A	15mg/mLカフェイン	撹拌
2-FT	15mg/mLカフェイン	凍結-融解

【０１４７】

動的光散乱(DLS)による安定性の評価

Brookhaven Zeta Plus動的光散乱装置を使用して、試料中のアダリムマブ分子の流体力学的半径を測定し、凝集物集団の形成の証拠を探した。表21には、表20に記載される6試料についてのDLSの結果を示す：それらのいくつか(1-A、1-FT、2-Aおよび2-FT)はストレス条件に暴露され(ストレスをかけられた試料)、他のもの(1-Cおよび2-C)はストレスをかけられなかった。賦形剤としてのカフェインの非存在下で、ストレスをかけられた試料1-Aおよび1-FTは、ストレスをかけられなかった試料1-Cよりも大きな有効直径を示し、さらにそれらは、有意により大きな直径の粒子の第2の集団を示し；より大きな直径を有する粒子のこの新しいグループ分けは、肉眼では見えない粒子への凝集の証拠である。カフェインを含むストレスをかけられた試料(試料2-Aおよび2-FT)はストレスをかけられなかった試料2-Cと同様の粒径での、1つの粒子の集団のみを示す。これらの結果は、凝集または肉眼では見えない粒子の形成を低減または最小化するカフェインの添加の効果を示す。表21および図1、2および3は、モノクローナル抗体の多様な粒径分布が、カフェインを含まないストレスをかけられた試料において明白であるDLSデータを示す。

【表２１】

表21

試料 #	有効直径 (nm)	集団 #1の直径 (nm)	集団#1の強度%	集団 #2 の直径 (nm)	集団#2の強度%
1-C	10.9	10.8	100	-	-
1-A	11.5	10.8	87	28.9	13
1-FT	20.4	11.5	66	112.2	44
2-C	10.5	10.5	100	-	-
2-A	10.8	10.8	100	-	-
2-FT	11.4	11.4	100	-	-

【０１４８】

表22Aおよび表22Bは、粒子サイズ分布を示す、アダリムマブ試料のDLSの生のデータを示す。G(d)は、強度-加重(intensity-weighted)示差的サイズ分布である。C(d)は、累積強度-加重示差的サイズ分布である。

【表２２Ａ】

表22A

試料 1-C			試料 1-A			試料 1-FT		
直径 (nm)	G (d)	C(d)	直径 (nm)	G (d)	C(d)	直径 (nm)	G (d)	C(d)
10.6	14	4	9.3	13	3	8.2	12	2
10.6	53	20	9.8	47	15	9.2	55	13
10.7	92	46	10.3	87	37	10.3	98	32
10.8	100	76	10.8	100	63	11.5	100	52
10.9	61	93	11.4	67	80	12.9	57	63
10.9	22	100	12	27	87	14.5	14	66
			26.1	4	88	89.3	5	67
			27.5	10	91	100.1	27	72
			28.9	13	94	112.2	52	83
			30.5	13	97	125.7	52	93
			32.1	7	99	140.8	30	99
			33.8	4	100	157.8	7	100

【表２２Ｂ】

表22B

試料 2-C			試料 2-A			試料 2-FT		
直径 (nm)	G (d)	C(d)	直径 (nm)	G (d)	C(d)	直径 (nm)	G (d)	C(d)
10.3	14	4	10.6	7	2	11.3	28	9
10.4	52	19	10.6	43	16	11.3	64	29
10.5	91	46	10.7	79	40	11.4	100	60
10.5	100	75	10.8	100	71	11.5	79	85
10.6	62	93	10.8	64	91	11.5	43	98
10.7	23	100	10.9	29	100	11.6	7	100

【０１４９】

実施例29：サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)による安定性の評価

SECを使用して、上記のストレスをかけられたおよびストレスをかけられなかったアダリムマブ試料からの約0.1ミクロン未満のサイズの任意の肉眼では見えない粒子を検出した。ガードカラムを有するTSKgel SuperSW3000カラム(Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA)を使用して、280nmで溶出をモニタリングした。それぞれのストレスをかけられたおよびストレスをかけられなかった試料の合計10μlを、0.35mL/分の流速で、pH6.2バッファ(100mMリン酸塩、325mM NaCl)を用いてイソクラティックに(isocratically)溶出した。アダリムマブモノマーの保持時間は約9分であった。データは、賦形剤としてカフェインを含む試料は検出可能な凝集物を何ら示さなかったことを示した。また、全ての3試料中のモノマーの量は一定のままであった。

【０１５０】

実施例30：HERCEPTIN(登録商標)の粘度低減

モノクローナル抗体トラスツズマブ(HERCEPTIN(登録商標)、Genentech製)は、凍結乾燥粉末として受領して、DI水中21mg/mLに再構成した。得られた溶液を、Amicon Ultra 4遠心分離濃縮器チューブ(分子量カットオフ、30kDa)中の場合と同様に、3500rpmで1.5時間遠心分離して濃縮した。濃度は、試料を適切なバッファ中で200倍に希釈して、1.48mL/mgの吸光係数を使用して280nmで吸光度を測定することにより測定した。RheoSense microVisc粘度計を使用して、粘度を測定した。

【０１５１】

サリチル酸およびカフェインのいずれか単独または組合せを含む賦形剤バッファは、ヒスチジンおよび賦形剤を蒸留水に溶解し、次いでpHを適切なレベルに調整することにより調製した。バッファ系1および2の条件を表23にまとめる。

【表２３】

表23

バッファ系#	サリチル酸 濃度	カフェイン 濃度	重量オスモル濃度(mOsm/kg)	pH
1	10mg/mL	10mg/mL	145	6
2	-	15mg/mL	86	6

【０１５２】

HERCEPTIN(登録商標)溶液を、約1:10の比で、賦形剤バッファ中で希釈し、Amico

n Ultra 15 (MWCO 30kDa)濃縮器チューブ中で濃縮した。Bradfordアッセイを使用して濃度を測定し、ストックHERCEPTIN(登録商標)試料から作成した標準較正曲線と比較した。RheoSense microViscを使用して粘度を測定した。種々のHERCEPTIN(登録商標)溶液の濃度および粘度測定値を以下の表24に示し、ここでバッファ系1および2は表23で同定されるこれらのバッファをいう。

【表２４】

表24

添加された賦形剤なしの対照溶液		10mg/mLカフェイン＋10mg/ml サリチル酸が添加された溶液(バッファ系1)		15mg/mLカフェインが添加された溶液(バッファ系2)	
粘度(cP)	抗体濃度(mg/mL)	粘度(cP)	抗体濃度(mg/mL)	粘度(cP)	抗体濃度(mg/mL)
37.2	215	9.7	244	23.4	236
9.3	161	7.7	167	12.2	200
3.1	108	2.9	122	5.1	134
1.6	54	2.4	77	2.1	101

【０１５３】

サリチル酸およびカフェインの両方を含むバッファ系1は、対照試料と比較して、215mg/mLで76%の最大粘度低減を有した。カフェインのみを含むバッファ系2は、200mg/mLで59%までの粘度低減を有した。

【０１５４】

実施例31：AVASTIN(登録商標)の粘度低減

AVASTIN(登録商標)(Genentechにより販売されるベバシズマブ製剤)は、ヒスチジンバッファ中25mg/mL溶液として受領した。試料は、Amicon Ultra 4遠心分離濃縮器チューブ(MWCO 30kDa)中3500rpmで濃縮した。RheoSense microViscにより粘度を測定し、280nmでの吸光度(吸光係数、1.605mL/mg)により濃度を決定した。10mg/mLカフェインと共に25mMヒスチジンHClを添加することにより賦形剤バッファを調製した。AVASTIN(登録商標)ストック溶液を賦形剤バッファで希釈して、次いでAmicon Ultra 15遠心分離濃縮器チューブ(MWCO 30kDa)中で濃縮した。賦形剤試料の濃度は、Bradfordアッセイにより決定し、粘度は、RheoSense microViscを使用して測定した。結果を以下の表25に示す。

【表２５】

表25

濃度(mg/mL)	添加された賦形剤なしの粘度(cP)	10mg/mL の添加されたカフェイン賦形剤での粘度(cP)	賦形剤からの%粘度低減
266	297	113	62%
213	80	22	73%
190	21	13	36%

【０１５５】

AVASTIN(登録商標)は、10mg/mLのカフェインとともに213mg/mLに濃縮した場

合に、対照AVASTIN試料と比較した場合、73%の最大粘度低減を示した。

【0156】

実施例32：HUMIRA(登録商標)のプロフィール

HUMIRA(登録商標)(AbbVie Inc., Chicago, IL)は、典型的に関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎などの自己免疫疾患の炎症性応答、中程度～重度の慢性乾癬および若年性特発性関節炎を低減するために処方される治療モノクローナル抗体アダリムマブ、TNFαブロッカーの市販の製剤である。HUMIRA(登録商標)は、40mgのアダリムマブ、4.93mg塩化ナトリウム、0.69mgリン酸ナトリウム一塩基二水和物、1.22mgリン酸ナトリウム二塩基二水和物、0.24mgクエン酸ナトリウム、1.04mgクエン酸一水和物、9.6mgマンニトールおよび0.8mgポリソルベート80を含む0.8mLの単回使用用量で販売される。この製剤の粘度 対 濃度プロフィールは、以下の様式で作成された。30kDa分子量カットオフを有するAmicon Ultra 15遠心分離濃縮器(EMD-Millipore, Billerica, MA)に、約15mLの脱イオン水を充填し、Sorvall Legend RT (Kendro Laboratory Products, Newtown, CT)中、4000rpmで10分間遠心分離して膜をすすいだ。その後、残存水を除去し、2.4mLのHUMIRA(登録商標)液体製剤を濃縮器チューブに添加し、25℃、4000rpmで60分間遠心分離した。保持液の濃度は、10マイクロリットルの保持液を1990マイクロリットルの脱イオン水で希釈し、希釈試料の吸光度を280nmで測定し、希釈係数および1.39mL/mg-cmの吸光係数を使用して濃度を計算することにより決定した。濃縮試料の粘度は、250秒$^{-1}$のせん断速度、23℃で、A05チップを備えたmicroVisc粘度計(RheoSense, San Ramon, CA)を用いて測定した。粘度測定後、試料を、少量の濾過液で希釈し、濃度および粘度の測定を繰り返した。このプロセスを使用して、以下の表26に記載される種々のアダリムマブ濃度での粘度値を作成した。

【表26】

表 26

アダリムマブ濃度(mg/mL)	粘度(cP)
277	125
253	63
223	34
202	20
182	13

【0157】

実施例33：粘度低減賦形剤を用いたHUMIRA(登録商標)の再製剤化

以下の実施例には、粘度低減賦形剤を有するバッファ中でHUMIRA(登録商標)を再製剤化した一般的なプロセスが記載される。粘度低減賦形剤の溶液は、約0.15gヒスチジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)および0.75gカフェイン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を脱イオン水に溶解することにより、20mMヒスチジン中で調製した。得られた溶液のpHは、5M塩酸を用いて約5まで調整した。次いで溶液を、容量フラスコ中脱イオン水を用いて50mLの最終体積まで希釈した。次いで、得られた緩衝化粘度低減賦形剤溶液を使用して、HUMIRA(登録商標)を高mAb濃度で再製剤化した。次いで、約0.8mLのHUMIRA(登録商標)を、30kDa分子量カットオフを有するすすいだAmicon Ultra 15遠心分離濃縮器チューブに添加して、Sorvall Legend RT中、4000rpmおよび25℃で8～10分間遠心分離した。その後、上記のように調製した約14mLの緩衝化粘度低減賦形剤溶液を、遠心分離濃縮器中、濃縮されたHUMIRA(登録商標)に添加した。緩やかに混合後、試料を、4000rpmおよび25℃で約40～60分間遠心分離した。保持液

は、粘度低減賦形剤を有するバッファ中で再製剤化されたHUMIRA(登録商標)の濃縮試料であった。試料の粘度および濃度を測定し、次いでいくつかの場合は少量の濾過液で希釈して、低濃度での粘度を測定した。以前の実施例における濃縮されたHUMIRA(登録商標)製剤と同じ様式で、microVisc粘度計を用いて粘度測定を完了した。脱イオン水中に希釈されたHUMIRA(登録商標)ストック溶液から作成された標準曲線を使用して、Bradfordアッセイにより濃度を決定した。以下の表27に示されるように、粘度低減賦形剤を用いたHUMIRA(登録商標)の再製剤化により、再製剤化なしで市販のバッファ中に濃縮したHUMIRA(登録商標)の粘度値と比較して、30%～60%の粘度低減がもたらされた。

【表２７】

表 27

アダリムマブ濃度(mg/mL)	粘度(cP)
290	61
273	48
244	20
205	14

【０１５８】

実施例34：カフェイン、第2の賦形剤および試験タンパク質を含む製剤の調製

賦形剤化合物としてカフェインまたはカフェインと第2の賦形剤化合物の組合せおよび試験タンパク質を使用して製剤を調製し、ここで試験タンパク質は、治療製剤に使用される治療タンパク質をシミュレートするように意図された。かかる製剤は、以下の様式における粘度測定のために異なる賦形剤化合物を有する20mMヒスチジンバッファ中で調製した。賦形剤組合せ(以下の表28に記載される賦形剤AおよびB)を20mMヒスチジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)に溶解して、得られた溶液のpHを、少量の濃水酸化ナトリウムまたは塩酸を用いてpH6を達成するように調整し、その後モデルタンパク質を溶解した。一旦賦形剤溶液が調製されると、試験タンパク質(ウシガンマグロブリン(BGG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))を、約280mg/mLのタンパク質終濃度を達成するような割合で溶解した。賦形剤溶液中のBGGの溶液は、20mLガラスシンチレーションバイアル中で製剤化し、オービタルシェーカーテーブル上で一晩、80～100rpmで振盪した。次いで溶液を2mLマイクロ遠心分離チューブに移し、IEC MicroMaxマイクロ遠心分離機中2300rpmで約10分間遠心分離し、含まれる空気を除去して、その後粘度測定を行った。

【０１５９】

上述のように調製した製剤の粘度測定は、DV-IIT LV円錐およびプレート粘度計(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)を用いて行った。粘度計は、CP-40円錐を備え、3rpmおよび25℃で操作された。製剤を、0.5mLの体積で粘度計に負荷し、所定のせん断速度および温度で3分間インキュベートし、その後20秒の測定収集期間を続けた。次いでこの後に、1分のせん断インキュベーションおよびその後の20秒の測定収集期間からなるさらなる2工程を続けた。次いで収集した3つのデータ点を平均し、試料の粘度として記録した。賦形剤を有する溶液の粘度を、賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度に対して標準化した。標準化された粘度は、賦形剤を有するモデルタンパク質溶液の粘度 対 賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度の割合である。

【表２８】

表28

賦形剤A		賦形剤B		標準化された粘度
名称	Conc. (mg/mL)	名称	Conc. (mg/mL)	
-	0	-	0	1.00
カフェイン	15	-	0	0.77
カフェイン	15	酢酸ナトリウム	12	0.77
カフェイン	15	硫酸ナトリウム	14	0.78
カフェイン	15	アスパラギン酸	20	0.73
カフェイン	15	$CaCl_2$二水和物	15	0.65
カフェイン	15	ジメチルスルホン	25	0.65
カフェイン	15	アルギニン	20	0.63
カフェイン	15	ロイシン	20	0.69
カフェイン	15	フェニルアラニン	20	0.60
カフェイン	15	ナイアシンアミド	15	0.63
カフェイン	15	エタノール	22	0.65

【０１６０】

実施例35：ジメチルスルホンおよび試験タンパク質を含む製剤の調製

賦形剤化合物としてジメチルスルホン(Jarrow Formulas, Los Angeles, CA)および試験タンパク質を使用して製剤を調製し、ここで試験タンパク質は、治療製剤に使用される治療タンパク質をシミュレートするように意図された。かかる製剤は以下の様式における粘度測定のために、20mMヒスチジンバッファ中で調製した。ジメチルスルホンを20mMヒスチジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)に溶解し、得られた溶液のpHを、pH6を達成するように少量の濃水酸化ナトリウムまたは塩酸で調整し、次いで0.22ミクロンフィルターで濾過し、その後モデルタンパク質を溶解した。一旦賦形剤溶液が調製されると、試験タンパク質(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO製ウシガンマグロブリン(BGG))を、約280mg/mLの濃度で溶解した。賦形剤溶液中のBGGの溶液は20mLガラスシンチレーションバイアル中で製剤化し、オービタルシェーカーテーブル上で一晩、80～100rpmで振盪した。次いで溶液を2mLマイクロ遠心分離チューブに移し、IEC MicroMaxマイクロ遠心分離機中、2300rpmで約10分間遠心分離して、含まれる空気を除去し、その後粘度測定を行った。

【０１６１】

上述のように調製した製剤の粘度測定は、DV-IIT LV円錐およびプレート粘度計(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)を用いて行った。粘度計は、CP-40円錐を備え、3rpmおよび25℃で操作された。製剤を0.5mLの体積で粘度計に負荷し、所定のせん断速度および温度で3分間インキュベートし、その後20秒の測定収集期間を続けた。次いでこの後に、1分のせん断インキュベーションおよびその後の20秒の測定収集期間からなるさらなる2工程を続けた。次いで収集した3つのデータ点を平均し、試料の粘度として記録した。賦形剤を有する溶液の粘度を、賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度に対して標準化した。標準化された粘度は、賦形剤を有するモデルタンパク質溶液の粘度 対 賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度の割合である。

【表２９】

表29

ジメチルスルホン濃度(mg/mL)	標準化された粘度
0	1.00
15	0.92
30	0.71
50	0.71
30	0.72

【０１６２】

実施例36：タンニン酸を含む製剤の調製

この実施例において、高分子量ポリ(エチレンオキシド)(PEG)分子を、PEG化タンパク質の粘度挙動を模倣するためのモデル化合物として使用する。対照試料(表30中＃36.1)は、1,000,000の粘度平均分子量(MV)を有するPEG(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)と脱イオン(DI)水を混合して、滅菌5mLポリプロピレン遠心分離チューブ中で約1.8重量%のPEG溶液を作製することにより調製した。タンニン酸(TA, Spectrum Chemicals, New Brunswick, NJ)を有する2つの試料＃36.2および36.3は、適切な量のPEG、TAおよびDI水中に調製された1mM KClを混合することにより、約1:100および1:1000のそれぞれのTA:PEGの質量比で調製した。全ての試料を200rpmでDaigger Scientific (Vernon Hills, IL) Labgeniusオービタルシェーカー上に一晩配置した。粘度測定は、microVISC rheometer (RheoSense, San Ramon, CA)上、20℃および250s^{-1}の壁せん断速度で行った。測定後、粘度を、それぞれのPEG濃度に対して標準化して、粘度の濃度依存性を計上した。試料36.1、36.2および36.3についてのPEG濃度、TA濃度、粘度、標準化された粘度および粘度低減を以下の表30に列挙する。濃縮されたPEG溶液へのTAの添加は、溶液粘度を約40%だけ実質的に低下させる。

【表３０】

表30

試料	PEG濃度 (wt. %)	TA濃度 (wt. %)	粘度(cP)	標準化された粘度 (粘度/ wt. % PEG)	対照からの標準化された粘度の%低減
36.1	1.79	0	128	71.4	N/A
36.2	1.79	1.78×10^{-2}	75.0	41.9	41.3
36.3	1.80	1.71×10^{-3}	84.5	46.9	34.3

【０１６３】

実施例37：賦形剤用量プロフィールを有する製剤

異なるモル濃度の賦形剤および試験タンパク質を用いて製剤を調製し、ここで試験タンパク質は、治療製剤に使用される治療タンパク質をシミュレートするように意図された。かかる製剤は、その後の様式での粘度測定のために、20mMヒスチジンバッファ中で調製した。0および80mMのカフェイン賦形剤のストック溶液を20mMヒスチジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)中で調製し、得られた溶液のpHを、pH6を達成するように少量の濃水酸化ナトリウムまたは塩酸で調整し、その後モデルタンパク質を溶解した。種々のカフェイン濃度でのさらなる溶液は、2つのストック溶液を種々の体積比で混合することにより調製した。一旦賦形剤溶液が調製されると、試験タンパク質(ウシガンマグロ

ブリン(BGG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))は、0.7mLの溶液を0.25gの凍結乾燥されたタンパク質に添加することにより、約280mg/mLのタンパク質終濃度を達成する割合で溶解された。賦形剤溶液中のBGGの溶液は、5mL滅菌ポリプロピレンチューブ中で製剤化し、オービタルシェーカーテーブル上、100rpmで一晩振盪して溶解した。次いで溶液を2mLマイクロ遠心分離チューブに移し、IEC MicroMaxマイクロ遠心分離機中2400rpmで5分間遠心分離し、含まれる空気を除去してその後粘度測定を行った。

【０１６４】

上述のように調製した製剤の粘度測定は、microVisc粘度計(RheoSense, San Ramon, CA)を用いて行った。粘度計は、100ミクロンのチャンネル深さを有するA-10チップを備え、250s^{-1}のせん断速度および25℃で操作された。粘度を測定するために、ピペットから全ての気泡が除去されるように注意しながら、製剤を粘度計に負荷した。負荷された試料製剤を有するピペットを装置に配置し、測定温度で5分間インキュベートした。次いで、チャンネルが試験流体で十分に平衡化され、安定な粘度読み取りにより示されるまで装置を走らせ、次いで粘度をセンチポアズで記録した。これらの測定の結果を表31に列挙する。

【表３１】

表31

試験#	賦形剤conc. (mM)	賦形剤conc. (mg/mL)	粘度(cP)	標準化された粘度
37.1	20	3.9	77	0.92
37.2	50	9.7	65	0.78
37.3	10	1.9	70	0.84
37.4	5	1.0	67	0.81
37.5	30	5.8	63	0.76
37.6	40	7.8	65	0.78
37.7	0	0.0	83	1.00
37.8	70	13.6	50	0.60
37.9	80	15.5	50	0.60
37.10	60	11.7	57	0.69

【０１６５】

実施例38：フェノール性化合物を含む製剤の調製

この実施例において、PEG化タンパク質の粘度挙動を模倣するためのモデル化合物として、高分子量ポリ(エチレンオキシド) (PEG)分子を使用する。対照試料は、滅菌5mLポリプロピレン遠心分離チューブ中、1,000,000の粘度平均分子量(MV)を有するPEG(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)と脱イオン(DI)水を約1.8重量%のPEGまで混合することにより調製した。フェノール性化合物没食子酸(GA、Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)、ピロガロール(PG、Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)およびレゾルシノール(R, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)を以下のように賦形剤として試験した。適切な量のPEG、賦形剤およびDI水を混合することにより、GA、PGおよびRを約3:50、1:2および1:2それぞれの賦形剤:PEG質量比で添加した3つのPEG含有試料を調製した。試料を、200rpmで一晩Daigger Scientific (Vernon Hills, IL) Labgeniusオービタルシェーカー上に置いた。粘度測定は、microVISC rheometer (RheoSense, San Ramon, CA)上、20℃および250s^{-1}の壁せん断速度で行った。測定後、粘度を

、それぞれのPEG濃度に対して標準化して、粘度の濃度依存性を計上した。対照および賦形剤含有試料についてのPEG濃度、賦形剤濃度、粘度、標準化された粘度および粘度低減を以下の表32に列挙する。

【表３２】

表32

試料 #	PEG conc. (wt. %)	添加された賦形剤	賦形剤conc. (wt. %)	粘度 (cP)	標準化された粘度(粘度 / wt. % PEG)	対照からの標準化された粘度の%低減
38.1	1.80	なし	0.000	134	74.5	N/A
38.2	1.80	GA	0.206	120	67.0	10.1
38.3	1.80	PG	0.870	106	59.2	19.6
38.4	1.80	R	1.00	113	63.1	15.3

【０１６６】

実施例39：ピリミジン環を有する賦形剤および試験タンパク質を含む製剤の調製

1つのピリミジン環を含む構造を有する賦形剤化合物および試験タンパク質を使用して製剤を調製し、ここで試験タンパク質は、治療製剤に使用される治療タンパク質をシミュレートするように意図された。かかる製剤は、以下の様式で、異なる賦形剤化合物を用いて20mMヒスチジンバッファ中で調製した。表33に列挙される賦形剤化合物を、20mMヒスチジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)の水溶液に溶解し、得られた溶液のpHを、pH6を達成するように少量の濃水酸化ナトリウムまたは塩酸で調整し、その後モデルタンパク質を溶解した。一旦賦形剤溶液が調製されると、試験タンパク質(ウシガンマグロブリン(BGG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))は、280mg/mLのタンパク質終濃度を達成する割合でそれぞれに溶解された。賦形剤溶液中のBGGの溶液を、20mLのガラスシンチレーションバイアル中で製剤化し、オービタルシェーカーテーブル上100rpmで一晩撹拌した。次いで溶液を2mLマイクロ遠心分離チューブに移し、IEC Micro Maxマイクロ遠心分離機中2300rpmで10分間遠心分離し、含まれる空気を除去してその後粘度測定を行った。

【０１６７】

上述のように調製した製剤の粘度測定は、DV-IIT LV円錐およびプレート粘度計(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)を用いて行った。粘度計は、CP-40円錐を備え、3rpmおよび25℃で操作された。製剤を、0.5mLの体積で粘度計に負荷し、所定のせん断速度および温度で3分間インキュベートし、その後測定収集期間が20秒続いた。次いでこの後に、1分のせん断インキュベーションおよびその後の20秒間の測定収集期間からなるさらなる2工程を続けた。次いで、収集した3つのデータ点を平均して、試料の粘度として記録した。賦形剤を有する溶液の粘度を、賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度に対して標準化した。標準化された粘度は、賦形剤を有するモデルタンパク質溶液の粘度 対 賦形剤を有さないモデルタンパク質溶液の粘度の割合である。これらの試験の結果を表33に示す。

【表３３】

表33

試料 #	添加された賦形剤	賦形剤 MW (g/mol)	賦形剤Conc (mg/mL)	標準化された 粘度
39.1	ピリミジノン	96.1	14	0.73
39.2	1,3-ジメチルウラシル	140.1	22	0.67
39.3	トリアミノピリミジン	125.1	20	0.87
39.4	カフェイン	194	15	0.77
39.5	ピリミジノン	96.1	7	0.82
39.6	1,3-ジメチルウラシル	140.1	11	0.76
39.7	ピリミジン	80.1	13	0.78
39.8	ピリミジン	80.1	6.5	0.87
39.9	なし	n/a	0	0.97
39.10	なし	n/a	0	1.00
39.11	なし	n/a	0	0.95
39.12	テアクリン	224	15	0.73
39.13	テアクリン	224	15	0.77

【０１６８】

実施例４０：賦形剤およびＰＥＧモデル化合物を含む製剤の調製

この実施例の材料としては、ＰＥＧ-２０Ｋと略される線形の２０,０００分子量を有するＰＥＧ分子が挙げられた。弱塩基の共役酸を含む構造を有する賦形剤化合物およびＰＥＧ-２０Ｋモデル化合物を使用して製剤を調製し、ここでＰＥＧ-２０Ｋモデル化合物は、ＰＥＧ化タンパク質をシミュレートするように意図された。

【０１６９】

第１に、水中および２０ｍＭクエン酸バッファ中の異なる濃度でのＰＥＧ-２０Ｋの粘度プロフィールを、１条件当たりｎ=３の反復測定で以下の表３４に示されるように、ベースライン条件として決定した。

【表３４】

表34

PEG-20K (mg/mL) 濃度	水溶液		20mMクエン酸バッファ溶液	
	粘度(cP)	SD	粘度(cP)	SD
240	80.64	0.67	83.99	1.08
180	35.20	0.49	35.64	0.66
210	54.81	0.61	58.25	1.08
150	23.78	0.43	24.37	0.54
120	14.98	0.12	15.23	0.29
90	7.86	0.08	7.96	0.20

【０１７０】

次いで、賦形剤ストック溶液を、20mMクエン酸バッファ中1Mの濃度で調製した。ストック溶液のpHは約5に調整した。PEG-20K溶液は、140mLの300mg/mL PEG-20Kストックと20～60μLの賦形剤ストックを混合することにより調製した。スパイクされる賦形剤の量に応じて、40～0μLのクエン酸バッファを添加することにより最終試料体積を200μLに調整した。PEG-20Kおよび賦形剤を含む混合された溶液は全て、pH4.9～5.0に調整したクエン酸バッファを用いて調製したので、任意の弱塩基賦形剤は、バッファ溶液中でそれらの共役酸に変換された。異なる賦形剤と共に210mg/mLのPEG-20Kを含むそれぞれのPEG-20K試料の粘度は、少なくとも3回、MicroVISCで測定し、結果を以下の表35にまとめる。

【表３５】

表35

210mg/mL PEG 20K溶液に添加された賦形剤	粘度(cP)	SD
なし(対照)	59.3	0.1
NH4OH (0.3 M)	52.6	0.8
NH4OH (0.1 M)	54.4	0.5
プロリン	55.6	1.7
トリゴネリン(0.1M)	56.2	3.5
イミダゾール(0.1 M)	56.5	0.9
NaF (0.1M)	56.9	1.2
NH4F (0.6M)	57.5	2.9
α-シクロデキストリン硫酸K (2%)	57.6	0.2
リン酸グリセロール	57.9	1.2
ジシクロミン(0.05M)	58.3	0.3
硫酸アンモニウム(0.1M)	58.4	0.5
L-イソロイシン	58.6	0.5
ホウ酸(0.1M)	58.8	0.5
スペルミン	58.8	3.6
アラニン(0.3M)	59.0	2.8
酢酸カリウム	59.1	0.2
尿素(0.1M)	59.4	2.0
酢酸アンモニウム	59.5	0.5
Tris (0.1M)	59.8	1.3
NH4F (0.1M)	60.3	1.8
ZnCl2 (0.1M)	60.6	0.3
グリシン(0.3M)	60.9	1.3
ソルビトール(5%)	66.0	0.1

【０１７１】

実施例41：カフェインを使用したタンジェンシャルフローフィルトレーションの向上

100mg/mLのストックをリン酸緩衝化食塩水(PBS)に希釈して35mg/mLの濃度の400mLのヒトガンマグロブリン(Octagam, Octapharma, USA)を調製した。1.8mM KH_2PO_4、10mM Na_2HPO_4、137mM NaCl、2.7mM KClを1LのMilli-Q水に溶解してバッファを調製した。50mMカフェイン、1.8mM KH_2PO_4、10mM Na_2HPO_4、137mM NaCl、2.7mM KClを1LのMilli-Q水に溶解してカフェインPBS溶液を調製した。EMD Millipore (Billerica, MA)製のDirect-Q 3 UV精製系を用いて水道水を精製してDI水を作製した。ヒトガンマグロブリン(HGG)溶液を、30KDa MWCO Pellicon XL TFFカセット(Millipore, Billerica, MA)を備える実験室スケールタンジェンシャルフローフィルトレーション(TFF)系(Millipore, Billerica, MA)のレザバーに移した。使用の前に、カセットにMilli-Q水次いでPBSを流し、水透過性試験を行って膜完全性および効率を確実にした。Quattroflowポンプ(Cole-Parmer, IL)を使用してHGG溶液を、カセットを通してポンプ輸送して、保持液ラインは試料レザバーへと逆に進み、透過液はメスシリンダー(graduated measuring cylinder)において収集された。スターラーバーにより、供給物と保持液の適切な混合を確実にした。120mL/分で供給物をカセットに送達するように供給ポンプを設定した。保持液制限器を使用して、大まかに20～30psiの範囲の経膜的圧力(TMP)を得て、供給ポンプおよび保持液制限器を調整することによりランを通してTMPが一定のままであることが確実にされた。圧力および流速のデータロギング(data logging)を行い、試料を30分ごとに採取した。供給物濃度

を計算するために、試料をSE-HPLCで分析し、ここで50mgを、TSKgel SuperSW3000カラム(30cm×4.6mm ID, Tosoh Bioscience, King of Prussia, PA)およびAgilent G1351Bダイオードアレイ検出器が適合されたAgilent 1100 HPLC系に負荷した。移動相として0.35mL/分の流速でPBSを使用した。ピーク下の面積を積分することによりタンパク質濃度を計算した。時間の関数としてプロットされた供給物濃度を使用して、カフェイン存在下のTFF効率と対照系を使用したTFFを比較した。以下の表36に示されるように、開始供給物濃度からのより高いパーセント濃度変化は、対照と比較してカフェインにより、より短い時間で観察され、これはTFF効率の増加を示した。

【表３６】

表36

時間(分)	対照系, タンパク質 conc (mg/mL)	対照系, %変化	カフェイン系, タンパク質 conc (mg/mL)	カフェイン系, %変化
0	38.62	0	37.07	0
30	67.42	74.6	82.11	121.5
60	78.14	102.3	120.63	225.4
90	101.94	163.9	141.88	282.7
120	140.81	264.6	198.96	436.7
150	162.39	320.4	222.50	500.2
180	226.06	485.3	286.68	673.3
210	254.76	559.6	305.39	723.8
240	281.58	629.0		
270	291.99	656.0		

【０１７２】

実施例42：プロテインA樹脂からの精製収率を向上するためのカフェインの使用

20mMリン酸ナトリウム、pH7バッファ中15mg/mLでBioceros (Utrecht, The Netherlands)から購入した研究等級のオマリズマブを試験試料として使用した。このタンパク質溶液は0.2μmポリエーテルスルホン(PES)フィルターを通して濾過された。濾過した材料を、20mMリン酸ナトリウムからなる結合バッファと、pH7、DI中で1:1の比で混合した。EMD Millipore (Billerica, MA)製のDirect-Q 3 UV精製系を用いて水道水を精製し、DI水を作製した。GE Healthcare (Chicago, IL)製のHiTrap Protein-A HP 1mLカラムを使用して、プロテインA精製を行った。カラム平衡化のために10mLの結合バッファを使用して、その後30mgのタンパク質を負荷した。次いでカラムを5mLの結合バッファで洗浄して、未結合のタンパク質を除去した。対照バッファとして0.1Mグリシンバッファ、pH3.5または0.1Mグリシン、50mMカフェインバッファ、pH3.5のいずれかを使用して、結合したオマリズマブを、カラムから1mL画分中に溶出した。7.5gのグリシンをDI水に溶解して、6M HClを使用してpHを3.5に調整して、体積を1Lに調整することにより対照バッファを調製した。7.5gのグリシンおよび10gのカフェインをDI水に溶解して、6M HClを使用してpHを3.5に調整して、体積を1Lに調整することによりカフェインバッファを調製した。5つの1mL画分を収集し；これらの溶出画分をE1、E2、E3、E4およびE5と標識した。最終的に、プロテインAは、カラムを5mLの0.1Mグリシン、pH3.0バッファで洗浄することにより再生した。それぞれの工程についての流速は1mL/分であり、これはFusion 100注入ポンプ(Chemyx, Stafford, TX)により維持された。10mL NormJectルアーロックシリンジを使用した(Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Germany、参照番号4100-000V0)。

【０１７３】

5つの溶出画分E1、E2、E3、E4およびE5を、高性能サイズ排除クロマトグラフィー(

SEC)分析により、総タンパク質含有量についてアッセイした。SEC分析は、Agilent HP 1100 HPLC系に連結されたTSKgel SuperSW3000カラム(30cm×4.6mm ID, Tosoh Bioscience, King of Prussia, PA)を使用して行った。室温、0.35mL/分の流速での移動相としてPBSを使用した。タンパク質濃度は、G1315Bダイオードアレイ検出器を使用して、280nmでの吸光度によりモニタリングした。プロテインA樹脂から溶出したタンパク質の総量は、クロマトグラムを積分することにより決定し、以下の表37に示されるように、カフェインの存在下で、収率において約8%の増加が観察された。

【表３７】

表37

試料画分	カフェイン含有バッファなしで溶出された画分中のタンパク質濃度 (mg/mL)	カフェイン含有バッファで溶出された画分中のタンパク質濃度 (mg/mL)
E1	0.277	1.13
E2	2.14	6.72
E3	6.58	4.67
E4	2.24	1.40
E5	1.06	0.708
総収量	12.29	14.63
%回収	**44.38**	**52.83**

【０１７４】

実施例43：低pH保持(hold)の間の安定化のための賦形剤

20mMリン酸ナトリウム、pH7バッファ中15mg/mLでBioceros (Utrecht, The Netherlands)から購入した研究等級のイピリムマブを試験試料として使用した。タンパク質溶液は、0.2μmポリエーテルスルホン(PES)フィルターを通して濾過した。ラフィノース五水和物はSigma (St Louis, MO)から入手した。1Mの濃度でのラフィノース五水和物を0.15Mグリシンバッファ、pH2.75に溶解することにより賦形剤ストックを調製した。7.5gのグリシンを0.9L Milli-Q水に溶解し、1M HClを使用してpHを2.75に調整し、体積を0.1Lにすることによりバッファを調製した。1つの対照製剤および3つの賦形剤含有製剤は、0mM、100mM、200mMおよび400mMの最終賦形剤濃度ならびに2mg/mLの最終イピリムマブ濃度で賦形剤をイピリムマブ溶液に添加することにより調製した。試料を酸性pH(2.75)で24時間、一晩インキュベートして、SE-HPLCにより、試料を分析し、ここで50mgを、TSKgel SuperSW3000カラム(30cm×4.6mm ID, Tosoh Bioscience, King of Prussia, PA)およびAgilent G1351Bダイオードアレイ検出器が適合されたAgilent 1100 HPLC系に負荷した。0.35mL/分の流速での移動相としてPBSを使用した。モノマーピーク下の面積を積分することによりモノマータンパク質(イピリムマブ)濃度を計算した。低pHに暴露されない未処理試料からのモノマー画分を100%に対して標準化し、処理された試料のモノマー画分をこの未処理試料の変化のパーセンテージとして表した。以下の表38の結果は、試料中のラフィノースの存在が、低pH保持の後により高いパーセンテージモノマー形態のイピリムマブを生じたことを示す。

【表３８】

表38

試料	モノマー形態のイピリムマブの%
0mMラフィノース	38.69
100mMラフィノース	52.68
200mMラフィノース	63.07
400mMラフィノース	78.88
未処理	100

【０１７５】

実施例44：バッファおよび賦形剤調製

賦形剤の製剤化およびタンパク質バッファ交換における使用のためにストックの20mM塩酸ヒスチジン(His HCl)バッファを調製した。6.206グラムのヒスチジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を1型超純水に溶解して2リットルのHis HClを調製した。溶解したヒスチジンの溶液を、濃塩酸を使用してpH6.0に滴定した。次いで容量フラスコを使用してHis HCl溶液を2リットルにして、0.2μm膜ボトルトップフィルターデバイス(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)を通して濾過した。実施例46(表39に列挙される)で試験される賦形剤を、その後の試験のための賦形剤溶液として以下のように調製した。それぞれの賦形剤は、賦形剤を、上述のこのHis HClバッファ中に溶解して、濃水酸化ナトリウムまたは濃塩酸を用いてpHを調整することにより、10X(1M)で調製した。次いでそれぞれの賦形剤溶液を、0.2μmの膜フィルターを使用して濾過した。

【０１７６】

実施例45：タンパク質溶液調製

2つの試験タンパク質、Bioceros (The Netherlands)から購入した精製オマリズマブおよびヒト血清由来ポリクローナルIgG(Octagam 10%)を、20kDa分子量カットオフ透析カセット(Fisher Scientific)を使用して、His HClに(実施例44で調製されるように)バッファ交換した。それぞれのタンパク質溶液を、ブイに取り付けられかつバッファ交換のためにフラスコ内に配置された透析カセットに移した。〉50x開始タンパク質体積まで合計3回のバッファ交換を行った。最終バッファ交換工程で、タンパク質溶液を透析カセットから除去して、0.2μm膜フィルターを通して濾過し、His HClバッファに100倍希釈してA280によりタンパク質濃度を測定した。次いで100μLをUV透明96ハーフウェルマイクロプレート(Greiner Bio-One, Austria)に移して、Synergy HTプレートリーダー(BioTek, Winooski, VT)を用いて280nmの波長で吸光度を測定した。次いでブランクのパス長さで補正A280測定値を、それぞれの吸光係数で割り、希釈係数をかけて、タンパク質濃度を決定した。実施例46における動的光散乱(DLS)粘度測定のために調製物中のタンパク質を濃縮するためのその後の濃縮工程が必要であった。30kDa分子量カットオフ(EMD Millipore, Billerica, MA)を有するAmicon-15遠心分離デバイスを使用して濃縮を行い、ベンチトップ遠心分離(Sorvall Legend RT)上4000xgで遠心分離することにより、遠心分離デバイス中の保持液質量に基づいて175mg/mLに濃縮した。

【０１７７】

実施例46：拡散相互作用パラメーターのDLS測定

この実施例において、希釈タンパク質溶液の拡散相互作用パラメーター(kD)を、0.1Mの賦形剤溶液の存在下でDLSにより測定した。試験されている賦形剤を表39に列挙する。それぞれの賦形剤について、賦形剤の0.2M溶液は、以前に調製された1M賦形剤ストックから別々に調製した。0.1M賦形剤の存在下、10mg/mL～0.6mg/mLの範囲の5

つの異なる濃度のオマリズマブ(実施例45に記載されるように調製)を使用して、DLSによりkDを測定した。任意の賦形剤の非存在下、同じ濃度のオマリズマブを含む同じ一連の対照試料を調製した。それぞれの試験試料について、384ウェルプレート(Aurora Microplates, Whitefish, MT)上で20μLのタンパク質溶液を、20μLの0.2M賦形剤溶液と合わせた(1:1混合物)。試料を負荷した後、プレート振盪器上でウェルプレートを振盪して、内容物を5分間混合した。混合の際に、ウェルプレートをSorvall Legend RT中、1分間、400xgで遠心分離し、任意の空気ポケットを除去した。次いでウェルプレートをDynaPro II DLSプレートリーダー(Wyatt Technologies Corp., Goleta, CA)に負荷し、それぞれの試料の拡散係数を25℃で測定した。それぞれの賦形剤について、測定された拡散係数を、タンパク質濃度の関数としてプロットし、データの線形適合の傾斜をkDとして記録した。この例において、それぞれの測定値は、対照平均に対して標準化し、対照に対するパーセントとして報告した。これらの結果を以下の表39に示す。

【表３９－１】

表39

賦形剤	タンパク質	対照からのkD値の%変化
3-(1-ピリジニオ(pyridinio))-1-プロパンスルホネート	オマリズマブ	22%
アスパラギン酸	オマリズマブ	72%
オルニチン	オマリズマブ	49%
β-アラニン	オマリズマブ	25%
リジン	オマリズマブ	47%
トリゴネリン	オマリズマブ	28%
(3-カルボキシプロピル)トリメチルクロライドアンモニウム	オマリズマブ	59%
アミノ馬尿酸	オマリズマブ	20%
アルギニン	オマリズマブ	81%
1-ヘキシル-3-メチルイミダゾリウムクロライド	オマリズマブ	25%
NaCl (200mM)	オマリズマブ	70%
エタノールアミンHCL	オマリズマブ	25%
スペルミジン	オマリズマブ	54%
4-アミノピリジン	オマリズマブ	25%
リジン	オマリズマブ	66%
システアミンHCl	オマリズマブ	38%
x-キシレンジアミン	オマリズマブ	56%
ニコチン酸	オマリズマブ	18%
キナ酸	オマリズマブ	19%
1,3-ジアミノプロパン	オマリズマブ	62%
ラクトビオン酸	オマリズマブ	47%
グルタミン酸	オマリズマブ	35%
アスコルビン酸ナトリウム	オマリズマブ	35%
プロピオン酸ナトリウム	オマリズマブ	33%
キナ酸	オマリズマブ	27%
安息香酸ナトリウム	オマリズマブ	33%
グルクロン酸	オマリズマブ	32%
ヒドロキシ安息香酸	オマリズマブ	50%
重亜硫酸ナトリウム	オマリズマブ	57%
サリチル酸	オマリズマブ	43%
エチドロン酸塩	オマリズマブ	56%
アセスルファムK+塩	オマリズマブ	49%
プロピオン酸カルシウム	オマリズマブ	83%
クエン酸	オマリズマブ	47%
スルホン酸ヒドロキノン	オマリズマブ	36%
メナジオン重亜硫酸ナトリウム	オマリズマブ	25%
2-ジメチルアミノエタノール	オマリズマブ	31%
2-メチル-2-イミダゾリン	オマリズマブ	17%
シクロセリン	オマリズマブ	9%

【表３９－２】

賦形剤	タンパク質	対照からのkD値の%変化
3-アミノピリジン	オマリズマブ	6%
4-アミノピリジン	オマリズマブ	23%
硫酸アグマチン	オマリズマブ	69%
シチジン	オマリズマブ	29%
エタノールアミン	オマリズマブ	29%
メグルミン	オマリズマブ	171%
モルホリン	オマリズマブ	17%
トリエタノールアミン	オマリズマブ	40%

【０１７８】

実施例47：DLSによる粘度測定

Bioceros (The Netherlands)から購入した精製オマリズマブおよびヒト血清由来ポリクローナルIgG(Octagam 10%, Pfizer)をモデルタンパク質系として使用して、賦形剤の粘度効果を調べた。賦形剤(表40および41に列挙される)の濃縮ストック溶液を、実施例44に記載されるプロトコルに従ってHis HClバッファ中10X (1M)で調製した。オマリズマブは、Amicon-15遠心分離(30kDa MWCO)デバイスを使用してHis HClバッファにバッファ交換して、遠心分離デバイス中保持液質量に基づいて175mg/mLに濃縮した。1部の10X賦形剤および9部のタンパク質を添加して、賦形剤および濃縮したタンパク質を200μL PCRチューブ中で合わせた。ポリエチレングリコール表面改質金ナノ粒子(nanoComposix, San Diego, CA)のさらなる2μLの5倍希釈溶液をそれぞれのPCRチューブに添加して、反転により完全に混合した。賦形剤を何ら添加しない以外は同様に対照試料を調製した。それぞれの試料(試験試料および対照)を384ウェルマイクロプレート(Aurora Microplates, Whitefish, MT)に二連で(ウェル当たり25μL)移し、400xgで1分間遠心分離し、その後分析を行った。DynaPro II DLSプレートリーダー(Wyatt Technology Corp., Goleta, CA)を使用して、25℃で金ナノ粒子の見かけの粒子サイズを測定した。金ナノ粒子の見かけの粒子サイズ 対 水中の金ナノ粒子の既知の粒子サイズの割合を使用して、ストークス-アインシュタインの式に従って、タンパク質製剤の粘度を決定した。この実施例において、それぞれの測定値を対照平均に対して標準化し、対照と比較してパーセント低減として報告し、標準偏差を示し、結果を以下の表40および41に示す。

【表４０】

表40

賦形剤(100mM)	タンパク質	% 低減	Std. dev.
ジメチルウラシル	hIgG	36.5%	1.5%
ホルデニン	hIgG	33.7%	0.7%
アセスルファムK	hIgG	32.6%	2.5%
ニコチンアミド	hIgG	26.8%	2.1%
アルギニン	hIgG	21.8%	3.0%
アスパルテーム	hIgG	20.0%	2.4%
サッカリン	hIgG	17.5%	3.7%
3-(1-ピリジニオ)-1-プロパンスルホネート	hIgG	15.0%	1.9%
カフェイン	hIgG	19.8%	7.8%
イミダゾール	hIgG	8.7%	3.3%
チラミン	hIgG	3.6%	4.4%
対照	hIgG	0.0%	2.8%
ジメチルグリシン	hIgG	2.5%	10.0%
4-アミノピリジン	hIgG	29.7%	2.9%
ニコチンアミド/カフェイン	hIgG	30.0%	1.0%
ニコチンアミド/カフェイン	hIgG	33.4%	3.5%
ホルデニンHCl	hIgG	32.9%	5.5%
ジメチルウラシル/アルギニン	hIgG	22.2%	0.6%
Jeffamine M600	hIgG	16.5%	2.1%
ジメチルウラシル	hIgG	18.1%	9.4%
ジエチルニコチンアミド	hIgG	11.1%	2.8%
アルギニンHCl	hIgG	14.6%	6.9%
アルギニン/グルタミン酸	hIgG	17.5%	11.2%
ニコチンアミド	hIgG	12.1%	5.8%
セリン/トレオニン (theonine)	hIgG	5.8%	5.1%
イソニコチンアミド	hIgG	8.8%	8.5%
(3-カルボキシプロピル)トリメチルクロリドアンモニウム	hIgG	5.2%	12.1%

【表４１－１】

表41

賦形剤(100mM)	タンパク質	% 低減	Std. dev.
4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸	オマリズマブ	71%	1.3%
O-(オクチルホスホリル)コリン	オマリズマブ	38%	0.1%
ニコチンアミドモノヌクレオチド	オマリズマブ	61%	8%
イタコン酸	オマリズマブ	54%	1%
3-(1-ピリジニオ)-1-プロパンスルホネート	オマリズマブ	4%	0.2%
N-メチルアスパラギン酸	オマリズマブ	73%	0.6%
L-オルニチン	オマリズマブ	82%	0.0%
β-アラニン	オマリズマブ	25%	5.4%
エチレンジアミン四酢酸(EDTA)	オマリズマブ	64%	3.1%
トリゴネリン	オマリズマブ	63%	1.1%
(3-カルボキシプロピル)トリメチルクロリドアンモニウム	オマリズマブ	64%	3.6%
イミノ二酢酸	オマリズマブ	51%	0.6%
アミノ馬尿酸	オマリズマブ	66%	2.4%
カフェイン酸	オマリズマブ	35%	8.0%
アスパルテーム(50mM)	オマリズマブ	32%	2.0%
1-(1-アダマンチル)エチルアミン塩酸塩(100mg/mL)	オマリズマブ	32%	4.0%
ナフタレンジスルホン酸(100mg/mL)	オマリズマブ	9%	8.0%
x-キシレンジアミン	オマリズマブ	78%	2.4%
1,3-ジアミノプロパン	オマリズマブ	78%	1.5%
イソニコチン酸	オマリズマブ	45%	17.2%
リジン	オマリズマブ	54%	3.4%
4-アミノピリジン	オマリズマブ	41%	2.8%
イミダゾール	オマリズマブ	62%	1.8%
アデノシン一リン酸	オマリズマブ	73%	2.7%
ジシクロミン(100mg/mL)	オマリズマブ	43%	2.4%
2-イミダゾリドン	オマリズマブ	10%	3.0%
ピリドキシンHCl	オマリズマブ	63%	11.0%
2-エチルイミダゾール	オマリズマブ	51%	1.7%
トリエタノールアミン	オマリズマブ	69%	2.9%
エタノールアミン	オマリズマブ	49%	5.1%
ベンジルアミン	オマリズマブ	81%	0.6%
1-ブチルイミダゾール	オマリズマブ	60%	4.6%
ジフェンヒドラミンHCl	オマリズマブ	77%	0.2%
プロカインHCl	オマリズマブ	71%	8.1%
2-ジメチルアミノエタノール	オマリズマブ	72%	6.7%
アセスルファムK	オマリズマブ	74%	3.3%
アスコルビン酸ナトリウム	オマリズマブ	55%	0.6%
グルタミン酸	オマリズマブ	49%	5.0%
エチドロン酸塩	オマリズマブ	72%	0.0%

【表４１－２】

賦形剤(100mM)	タンパク質	% 低減	Std. dev.
サリチル酸	オマリズマブ	72%	1.1%
キナ酸	オマリズマブ	58%	7.8%
ヒドロキシ安息香酸	オマリズマブ	68%	5.1%
グルクロン酸	オマリズマブ	60%	6.0%
ラクトビオン酸	オマリズマブ	46%	0.1%
ヘキサメタリン酸ナトリウム	オマリズマブ	75%	0.5%
重亜硫酸ナトリウム	オマリズマブ	71%	6.5%
安息香酸ナトリウム	オマリズマブ	60%	12.8%
プロピオン酸カルシウム	オマリズマブ	75%	3.5%
プロピオン酸ナトリウム	オマリズマブ	56%	-
2-ジメチルアミノエタノール	オマリズマブ	65%	10.6%
2-メチル-2-イミダゾリン	オマリズマブ	49%	12.6%
シクロセリン	オマリズマブ	33%	1.2%
3-アミノピリジン	オマリズマブ	59%	4.0%
4-アミノピリジン	オマリズマブ	73%	2.3%
硫酸アグマチン	オマリズマブ	85%	1.8%
シチジン	オマリズマブ	68%	1.6%
ジフェンヒドラミン	オマリズマブ	81%	0.1%
エタノールアミン	オマリズマブ	93%	1.6%
メグルミン	オマリズマブ	91%	0.2%
モルホリン	オマリズマブ	78%	2.7%

【０１７９】

実施例48：粘度計による粘度測定

表42および43に列挙されるこれらの賦形剤についての賦形剤溶液を、His HClバッファ中0.1Mまたは0.075Mで調製し、濃水酸化ナトリウムまたは濃塩酸を使用してpHを調整した。Amicon-15遠心分離デバイス(30kDa MWCO)を使用して、オマリズマブおよびヒトIgGを、それぞれの賦形剤製剤にバッファ交換した。バッファ交換の後、遠心分離デバイス中の保持液質量に基づいて、タンパク質溶液を、オマリズマブについて150mg/mLおよびヒトIgGについて250mg/mLまで濃縮した。賦形剤の非存在下である以外は同じ様式で対照製剤を調製した。25℃に設定された温度制御封入体に封入されたA05チップを使用して、RheoSenseマイクロ粘度計で粘度測定を行った。せん断速度は250 s^{-1}に設定した。それぞれの製剤の粘度は3回測定し、次いで20μLのそれぞれのバッファを添加して希釈し、再度粘度を測定した。5～6の異なるタンパク質濃度についての粘度データを作成するために、これをそれぞれ5～6回繰り返した。サイズ排除カラム(TOSOH TSKgel SuperSW3000)と組み合わせたAgilent 1100シリーズ高圧液体クロマトグラフィー装置を使用して、280nmでの吸光度によりタンパク質濃度を測定した。それぞれの賦形剤製剤についての濃度の関数として粘度をプロットして、散乱プロットを作成した。指数関数的傾向曲線(trendline)をそれぞれの製剤に適合させ、式$y=a*e^{(b*x)}$(式中、yはcP単位の粘度であり、xはmg/mLのタンパク質の濃度であり、aおよびbは式についての適合パラメーターであり、R^2は決定の統計的係数である)による指数関数的適合に基づいて、濃度での粘度を計算した。この例について、粘度は固定された濃度の関数として報告され、結果を以下の表42および43に示す。

【表４２】

表42

賦形剤	タンパク質	バッファ	指数方程式 計算			
			a	b	R^2	Calc. 粘度@ 250mg/mL
カフェイン	ヒトIgG	His HCl pH 5.5	0.469	0.0187	0.9194	50.3
ニコチンアミド	ヒトIgG	His HCl pH 5.5	0.6136	0.0198	0.9329	86.6
ホルデニンHCl	ヒトIgG	His HCl pH 5.5	0.4116	0.0197	0.9535	56.7
1,3-ジメチルウラシル	ヒトIgG	His HCl pH 5.5	0.0586	0.0282	0.9929	67.6
対照	ヒトIgG	His HCl pH 5.5	0.2059	0.0248	0.9995	101.5

【表４３】

表43

賦形剤	タンパク質	バッファ	指数方程式			
			a	b	R^2	Calc. 粘度 @120mg/mL
スルファニル酸	オマリズマブ	His HCl pH 6.0	1.2194	0.0185	0.8218	11.2
ニコチン酸	オマリズマブ	His HCl pH 6.0	1.0171	0.0244	0.8041	19.0
オルニチン	オマリズマブ	His HCl pH 6.0	0.1068	0.0419	0.6874	16.3
対照	オマリズマブ	His HCl pH 6.0	0.8156	0.0319	0.9763	37.5
1,3 ジアミノプロパン	オマリズマブ	His HCl pH 6.0	0.1498	0.0274	0.9835	4.0

【０１８０】

実施例49：自己相互作用のBLI測定

この実施例において、ForteBio Octet Red-96装置を用いてバイオレイヤー干渉法(BLI)試験を行った。アミン反応性第2世代(AR2G)バイオセンサー(Molecular Devices, CA)をオマリズマブとコンジュゲートさせて、賦形剤の存在下でのタンパク質自己相互作用を検出した。表44に列挙される賦形剤についての賦形剤溶液は、His HClバッファ中0.1Mで調製した。1.679gのリン酸二塩基ナトリウム七水和物(Sigma, St. Louis)および1.895gのリン酸一塩基ナトリウム一水和物(Sigma, St. Louis)をDI水に溶解し、体積を1Lに調整することにより20mMリン酸ナトリウム、pH6.4バッファを調製した。Bioceros (Utrecht, The Netherlands)から購入した研究等級のオマリズマブは、Amicon-15遠心分離(30kDa MWCO)デバイスを使用して、リン酸バッファ、pH6.4にバッファ交換した。20mMリン酸ナトリウム、pH6.4バッファ中15mg/mLのこのオマリズマブストック溶液は、Sephadex G-25 PD-10脱塩カラム(GE Healthcare Life Sciences)を使用してさらにバッファ交換し、調製した賦形剤を0.1Mで含む20mMリン酸ナトリウム、pH6.4バッファを用いて溶出した。対照は、Sephadex G-25 PD-10脱塩カラム(GE Healthcare Life Sciences)を使用して同様に調製し、20mMリン酸ナトリウム、pH6.4バッファを用いて溶出した。UV透明(clear)96ハーフウェルマイクロプレート(Greiner Bio-One, Austria)を使用してタンパク質濃度を測定し、Synergy HTプレートリーダー(BioTek, Winooski, VT)を用いて280nmの波長で吸光度を測定した。調製した賦形剤バッファ中に希釈してタンパク質濃度を5mg/mLに調整した。黒色底96ウェルマイクロプレート(Greiner Bio-One, Austria)において、20mMリン酸ナトリウム、pH6.4バッファ中0.1Mの250μLのそれぞれの賦形剤溶液を縦列Bに移し、0.1Mの賦形剤を含む250μLの5mg/mlオマリズマブ溶液を縦列Cに移した。96ウェルプレートは、縦列が個々の製剤を示し、横列がタンパク質含有製剤を識別するように設定した。次いで分析のためにトレイをForteBio Octet Red-96に移した。オマリズマブにコンジュゲートされたバイオセンサーを、タンパク質を含まない製剤に120秒間浸し、ベースラインを作成した。次いでバイオセンサーを除去して、タンパク質を含む製剤に300秒間浸した。この例において、本発明者らは、対照の結合信号と比較し

て、300秒での結合信号のパーセントでのデルタを報告し、結果を以下の表44にまとめる。

【表４４】

表44

賦形剤	300sでの結合(nm)	%変化
対照	7	0%
オルニチン	2.5	64%
イミノ二酢酸	1.25	82%
ニコチン酸	0.5	93%
スルファニル酸	0.3	96%

【０１８１】

均等物

本発明の具体的な態様が本明細書に開示されるが、上記明細書は例示的であり限定的ではない。本発明は、その好ましい態様を参照して特に示され、記載されるが、添付の特許請求の範囲に包含される発明の範囲を逸脱することなく、形態および詳細における種々の変更が本発明においてなされ得ることが当業者には理解されよう。本発明の多くの変形は、本明細書の検討に際して当業者に明らかであろう。そうではないと示されない限り、反応条件、成分の量などを表す全ての数は、本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、全ての例において用語「約」により修飾されていると理解される。したがって、それとは反対と示されない限り、本明細書に示される数的パラメーターは、本発明が得ようとする所望の特性に応じて変化し得る近似値である。

【図面】

【図１】

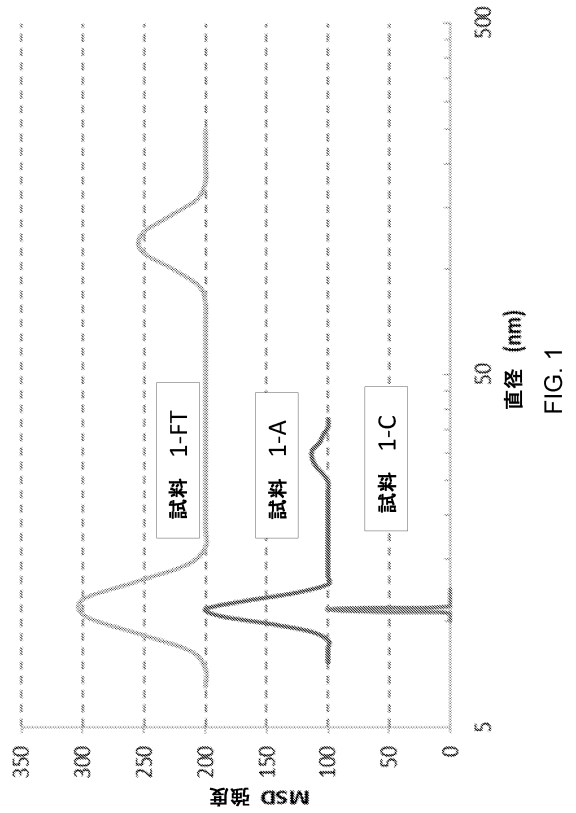


FIG. 1

【図２】

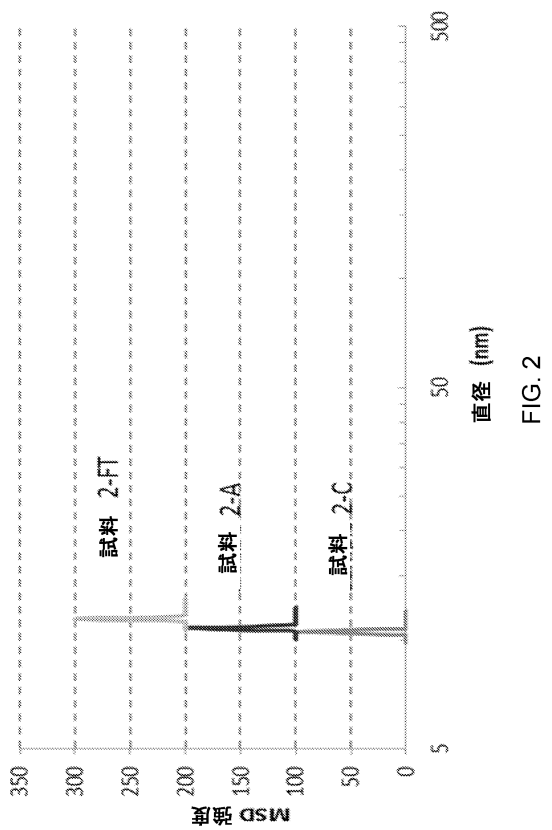


FIG. 2

【図３】

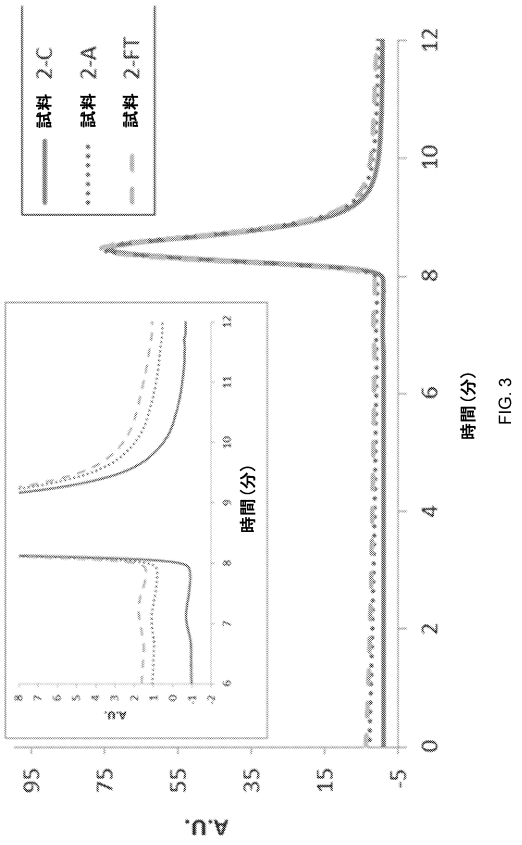


FIG. 3

【国際調査報告】

PCT/US2020/062051 11.02.2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/62051

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 39/395; A61K 47/12; A61K 47/18 (2021.01)
CPC - A61K 38/385; A61K 38/47; A61K 39/395

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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017/0232103 A1 (ReForm Biologics, LLC) 17 August 2017 (17.08.2017); entire document, especially abstract, claim 1, claim 2, claim 6, claim 28, claim 37, [0012], [0013], [0021], [0040], [0041], [0102], [0156], [0157]	1-36
A	US 10,206,924 B2 (The Regents of the University of Michigan) 19 February 2019 (19.02.2019); entire document	1-36
A	US 9,943,601 B2 (Coherus Biosciences, Inc.) 17 April 2018 (17.04.2018); entire document	1-36
A	US 10,000,562 B2 (Genentech, Inc.) 19 June 2018 (19.06.2018); entire document	1-36

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
19 January 2021	11 FEB 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類	FI	テーマコード（参考）
A61K 47/18 (2006.01)	A61K 47/18	

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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,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

弁理士　宮脇 薫
(74)代理人　100095832
弁理士　細田 芳徳
(74)代理人　100187850
弁理士　細田 芳弘
(72)発明者　ソーン，デービッド，エス．
アメリカ合衆国 フロリダ ３３４８０ パーム ビーチ，ブラジリアン アベニュー １３０
(72)発明者　ヴュートリッヒ，フィリップ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７２ ウォータータウン，ブロムフィールド ストリート １４
(72)発明者　マホニー，ロバート，ピー．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１９２２ ニューベリー，オースティン レーン ２
(72)発明者　ゼン，ユーホン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２０ レキシントン，バートウェル ロード ６０
(72)発明者　ナイク，スバシュチャンドラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７２ ウォータータウン，ローレル ストリート １３
(72)発明者　トラン，ティモシー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１５５ メドフォード，フェルスウェイ １０４６

Fターム（参考）　4C076　AA11 CC41 DD24 DD26 DD41 DD43 DD49 DD51 DD52 DD57
DD60 DD61 DD63 EE39 EE41 EE59 FF11
4C084　AA17 MA16 NA13 ZA332 ZA592 ZA962 ZB132 ZB152 ZB262
4C085　AA14 BB01 BB11 BB17 CC23 EE01