

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6953433号
(P6953433)

(45) 発行日 令和3年10月27日(2021.10.27)

(24) 登録日 令和3年10月1日(2021.10.1)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5
A 6 1 P 27/10 (2006.01)	A 6 1 P 27/10
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00

請求項の数 15 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-557209 (P2018-557209)	(73) 特許権者	516338305
(86) (22) 出願日	平成29年1月26日 (2017.1.26)		フォーマイコン アーゲー
(65) 公表番号	特表2019-504882 (P2019-504882A)		FORMYCON AG
(43) 公表日	平成31年2月21日 (2019.2.21)		ドイツ連邦共和国 8 2 1 5 2 マルティ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/051662		ンスリート/プラネック フラウンホーフ
(87) 国際公開番号	W02017/129685		アーシュトラーセ 1 5
(87) 国際公開日	平成29年8月3日 (2017.8.3)	(74) 代理人	100105957
審査請求日	令和1年11月1日 (2019.11.1)		弁理士 恩田 誠
(31) 優先権主張番号	16152767.6	(74) 代理人	100068755
(32) 優先日	平成28年1月26日 (2016.1.26)		弁理士 恩田 博宣
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100142907
			弁理士 本田 淳
(31) 優先権主張番号	16199497.5	(74) 代理人	100152489
(32) 優先日	平成28年11月18日 (2016.11.18)		弁理士 中村 美樹
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 VEGFアンタゴニストを含む液体医薬組成物および同医薬組成物を含有する充填済みシリンジ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

眼内血管新生性疾患の治療に使用するための液体の医薬組成物であって、

- a) ヒスチジン含有緩衝液と、
- b) 非イオン系界面活性剤と、
- c) VEGF受容体融合タンパク質であるVEGFアンタゴニストと、
- d) 無機塩類と、
- e) 炭水化物と

を含み、

前記組成物のpHは6.2~6.5であり、

前記非イオン系界面活性剤はポリソルベート20であり、前記VEGFアンタゴニストはアフリベルセプトであり、前記無機塩類はNaClであり、前記炭水化物はスクロースである医薬組成物。

【請求項 2】

ヒスチジン含有緩衝液はL-ヒスチジン/塩酸ヒスチジンである、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

ヒスチジン含有緩衝液は1mM~40mMの濃度で存在する、請求項1または請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

ヒスチジン含有緩衝液は10 mMの濃度で存在する、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記ポリソルベート20は0.01~0.08% (w/v)の濃度で存在する、請求項1~4のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記ポリソルベート20は0.03% (w/v)の濃度で存在する、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項7】

前記NaClは20~100 mMの濃度で存在する、請求項1~6のいずれか1項に記載の医薬組成物。

10

【請求項8】

前記NaClは40 mMの濃度で存在する、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記アフリベルセプトは6~45 mg/mlの濃度で存在する、請求項1~8のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項10】

前記スクロースは3~20% (w/v)の濃度で存在する、請求項1~9のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項11】

前記スクロースは5% (w/v)の濃度で存在する、請求項10に記載の医薬組成物。

20

【請求項12】

塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、ポリソルベート20、NaCl、アフリベルセプト、スクロース及び水で構成されており、かつ6.2又は6.5のpHを有している、請求項1~11のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項13】

10 mMの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03%のポリソルベート20 (w/v)、40 mMのNaCl、40 mg/mlのアフリベルセプト、5%のスクロース及び水で構成されており、かつ6.2又は6.5のpHを有している、請求項12に記載の医薬組成物。

【請求項14】

30

前記眼内血管新生性疾患は、加齢黄斑変性症 (AMD)、糖尿病性の黄斑浮腫 (DME) による視力障害、網膜静脈閉塞症 (分枝RVO若しくは中心RVO) に続発する黄斑浮腫による視力障害、又は病的近視に続発する脈絡膜新生血管形成 (CNV) による視力障害である、請求項1~13のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項15】

請求項1~14のいずれか1項に記載の医薬組成物を含有する充填済みシリンジ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒスチジン含有緩衝液、無機塩類、炭水化物及びポリソルベートを含んでなる、硝子体内投与のためのVEGFアンタゴニストの液体医薬組成物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は、血管発生 (すなわち新しい血管のデノボ形成) 及び血管新生 (すなわち先在する血管からの新しい血管の形成) を促進するタンパク質である。VEGFの少なくとも6つのサブタイプ、すなわちVEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、ウイルスVEGF-E及び胎盤VEGF (PIGF) が存在する。VEGF-Aは、血管透過性の増大及び細胞外マトリクスの変性に関係している。mRNAの選択的スプライシングから生じるVEGF-Aの4つの異性体が、ヒトにおいて報告されている (VEGF121、VEGF165、VEGF184、VEGF20

50

6) (非特許文献1)。さらに、VEGF110が、VEGF165からプロテアーゼ切断によって生じる。VEGF-Aは受容体VEGFR-1及びVEGFR-2に結合する(非特許文献2;非特許文献3)。

【0003】

内皮細胞に対するVEGFの作用の特異性は、異常な血管成長及び血管漏出の過程において重要な役割を支えている。抗VEGF剤は、動物モデル及び臨床試験の両方で脈絡膜新生血管形成の低減における効能を実証済みである(非特許文献4;非特許文献5)。具体的には、抗VEGF抗体が眼内血管新生性障害の治療の治療(treatment of treatments)に使用されてきた。

【0004】

現在利用可能な抗VEGF抗体はベバシズマブ及びラニズマブである。ベバシズマブは、VEGFの全てのアイソフォームを認識する完全長のヒト化型マウスモノクローナル抗体である。ラニズマブは、ベバシズマブを作出するために使用されるヒト化型マウスモノクローナル抗体のFabフラグメントであり、かつベバシズマブよりも顕著に高い親和性でVEGF-Aに結合するように親和性成熟がなされている。ラニズマブ及びベバシズマブは、まれな有害事象がベバシズマブでより多く生じるようであるものの、血管新生性の加齢黄斑変性症の治療において類似の効能プロファイルを有するようである(非特許文献6)。

【0005】

別の部類のVEGFアンタゴニストは、VEGF受容体の一部とヒト免疫グロブリンのFc部分との融合タンパク質によって代表される。特に、Eylea(登録商標)という名前で市販されているアフリベルセプトは、ヒトIgG1免疫グロブリンのFc部分に融合したヒトVEGF受容体1及び2の細胞外ドメインに由来するVEGF結合部分で構成されている、組換え融合タンパク質である。これは、滲出型黄斑変性症及びいくつかのさらなる眼疾患の治療用に承認されている。

【0006】

医療目的では、安定な医薬組成物、特に使用前に溶解又は再構成を必要としない使用準備済の溶液は、大変興味深い。そのような液体組成物の主な問題は、製造中の繰り返される凍結/融解サイクルの間の不溶性粒子の形成に起因する活性成分の含量減少、又は長期保管の間のタンパク質の分解及び分解産物の形成である。

【0007】

特許文献1は、ヒスチジン緩衝液、塩化ナトリウム、スクロース及びポリソルベート20を含んでなる、皮下又は静脈内送達のためのアフリベルセプトの液体医薬製剤を開示している。

【0008】

特に、硝子体内注射用の医薬組成物のような、眼に送達されるように意図された医薬組成物については、不溶性粒子の量を最少レベルに維持することが重要であるが、これは眼内に注射された時に粒子状物質が刺激や炎症を引き起こすかもしれないからである。

【0009】

特許文献2及び特許文献3は、眼科的使用に適している、VEGFアンタゴニスト及び抗PDGFアプタマーを含んでなる製剤を開示している。これらの製剤は、pH5.0~8.0の緩衝液及び張度調整剤を含んでなる。

【0010】

特許文献4は、リン酸ナトリウム緩衝液、塩化ナトリウム、スクロース及びポリソルベート20を含んでなるアフリベルセプトの液体医薬組成物について述べており、この製剤は眼への使用に適している。

【0011】

特許文献5は、緩衝液、非イオン系界面活性剤、及び任意選択で無機塩類を含んでなる、硝子体内注射のためのラニズマブの液体医薬製剤であって、該組成物が糖類を含有しないものを開示している。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】国際公開第2006/104852A2号

【特許文献2】米国特許出願公開第2015/157709A1号明細書

【特許文献3】米国特許出願公開第2015/182623A1号明細書

【特許文献4】国際公開第2007/149334A2号

【特許文献5】国際公開第2015/071348A1号

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】フェラーラ (Ferrara) 及びデイビス スミス (Davis Smyth)、エンドクライン・レビューズ (Endocr Rev)、1997年、第18巻、p. 1 - 22

【非特許文献2】カイダニウク (Kajdaniuk) ら、エンドクライノロギア・ポルスカ (Endokrynol Pol)、2011年、第62巻、第5号、p. 444 - 55

【非特許文献3】カイダニウク (Kajdaniuk) ら、エンドクライノロギア・ポルスカ、2011年、第62巻、第5号、p. 456 - 64

【非特許文献4】オカモト (Okamoto) ら、1997年、アメリカン・ジャーナル・オブ・パソロジー (Am J Pathol)、第151巻、p. 281 - 91

【非特許文献5】アダミス (Adamis) ら、1996年、アーカイブス・オブ・オプタルモロジー (Arch Ophthalmol)、第114巻、p. 66 - 71

【非特許文献6】ジョンソン (Johnson) 及びシャルマ (Sharma)、カレント・オピニオン・イン・オプタルモロジー (Curr Opin Ophthalmol)、2013年、第24巻、第3号、p. 205 - 12

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

しかしながら、低いタンパク質凝集体含量を有し従って硝子体内注射に適しており、かつ液体形態で安定な医薬組成物が、依然として必要とされている。好ましくは、そのような組成物はAMDの治療に適しており、かつ充填済みシリンジとして製剤化される。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、ヒスチジン緩衝液、非イオン系界面活性剤、VEGFアンタゴニスト、無機塩類及び炭水化物を含んでなる液体組成物が、驚くほど低レベルの粒子状物質を有し、かつ従って硝子体内注射及び血管新生性の眼内疾患の治療に特に適している、ということを見出した。

【0016】

本発明において使用される液体医薬組成物のさらなる利点は、該組成物が凍結乾燥のステップを必要とせず、よってより短時間かつ低費用で生産されるということである。別の利点は、該組成物が6.0 ~ 6.5の範囲のpH、すなわち生理的pHに近いpHを有するという点である。

【0017】

本発明の目的は独立請求項の主題によって解決される。好ましい実施形態は従属請求項から明白である。

従って、1つの実施形態では、本発明は、眼内血管新生性疾患の治療に使用するための液体医薬組成物であって、

- a) ヒスチジン含有緩衝液と、
- b) 非イオン系界面活性剤と、
- c) VEGFアンタゴニストと、

10

20

30

40

50

d) 無機塩類と、
e) 炭水化物と
を含んでなる組成物を提供する。

【0018】

組成物のpHは、6.0~6.5、好ましくは6.2~6.5であってよい。さらに好ましくは、pHは6.2又は6.5である。

ヒスチジン含有緩衝液はL-ヒスチジン/塩酸ヒスチジンであってよく、かつ/又は、1mM~40mM、好ましくは10mMの濃度で存在することができる。

【0019】

非イオン系界面活性剤はポリソルベート20であってよく、かつ/又は、0.01~0.08% (w/v)、好ましくは0.03% (w/v)の濃度で存在することができる。

無機塩類はNaClであってよく、かつ/又は、20~100mM、好ましくは40mMの濃度で存在することができる。

【0020】

VEGFアンタゴニストは、抗VEGF抗体若しくはそのような抗体の抗原結合性フラグメント又はVEGF受容体融合タンパク質であってよく、好ましくはアフリベルセプト又はラニビズマブであってよい。

【0021】

VEGFアンタゴニストは6~45mg/mlの濃度で存在することができる。

炭水化物はスクロースであってよく、かつ/又は、3~20% (w/v)、好ましくは5% (w/v)の濃度で存在することができる。

【0022】

本発明はさらに、塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、ポリソルベート20、NaCl、アフリベルセプト、スクロース及び水で構成されており、かつ6.2又は6.5のpHを有している、眼内血管新生性疾患の治療に使用される液体医薬組成物に関する。

【0023】

本発明はさらに、塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、ポリソルベート20、NaCl、アフリベルセプト、スクロース及び水で構成されており、かつ6.2のpHを有している、眼内血管新生性疾患の治療に使用される液体医薬組成物に関する。

【0024】

本発明はさらに、塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、ポリソルベート20、NaCl、アフリベルセプト、スクロース及び水で構成されており、かつ6.5のpHを有している、眼内血管新生性疾患の治療に使用される液体医薬組成物に関する。

【0025】

好ましくは、液体医薬組成物は、10mMの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03%のポリソルベート20 (w/v)、40mMのNaCl、40mg/mlのアフリベルセプト、5%のスクロース及び水で構成されており、かつ6.2又は6.5のpHを有する。

【0026】

同様に好ましくは、液体医薬組成物は、10mMの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03%のポリソルベート20 (w/v)、40mMのNaCl、40mg/mlのアフリベルセプト、5%のスクロース及び水で構成されており、6.2のpHを有する。

【0027】

同様に好ましくは、液体医薬組成物は、10mMの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03%のポリソルベート20 (w/v)、40mMのNaCl、40mg/mlのアフリベルセプト、5%のスクロース及び水で構成されており、6.5のpHを有する。

【0028】

本発明はさらに、10mMの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03%のポリソルベート20 (w/v)、40mMのNaCl、40mg/mlのアフリベルセプト、5%のスクロース及び水で構成されており、かつ6.2又は6.5のpHを有している液体医

10

20

30

40

50

薬組成物に関する。

【0029】

本発明はさらに、10 mMの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03%のポリソルベート20 (w/v)、40 mMのNaCl、40 mg/mlのアフリベルセプト、5%のスクロース及び水で構成されており、かつ6.2のpHを有している液体医薬組成物に関する。

【0030】

本発明はさらに、10 mMの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03%のポリソルベート20 (w/v)、40 mMのNaCl、40 mg/mlのアフリベルセプト、5%のスクロース及び水で構成されており、かつ6.5のpHを有している液体医薬組成物に関する。

10

【0031】

本発明はさらに、10 mMの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03%のポリソルベート20 (w/v)、40 mMのNaCl、組換えタンパク質、5%のスクロース及び水で構成されており、かつ6.2又は6.5のpHを有している液体医薬組成物に関する。

【0032】

本発明はさらに、10 mMの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03%のポリソルベート20 (w/v)、40 mMのNaCl、組換えタンパク質、5%のスクロース及び水で構成されており、かつ6.2のpHを有している液体医薬組成物に関する。

20

【0033】

本発明はさらに、10 mMの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03%のポリソルベート20 (w/v)、40 mMのNaCl、組換えタンパク質、5%のスクロース及び水で構成されており、かつ6.5のpHを有している液体医薬組成物に関する。

【0034】

眼内血管新生性疾患は、加齢黄斑変性症 (AMD)、糖尿病性の黄斑浮腫 (DME) による視力障害、網膜静脈閉塞症 (分枝RVO若しくは中心RVO) に続発する黄斑浮腫による視力障害、又は病的近視に続発する脈絡膜新生血管形成 (CNV) による視力障害であってよい。

【0035】

本発明はさらに、本明細書中に定義されるような医薬組成物を含有する充填済みシリンジに関する。

30

本発明の典型的な実施形態について、以下の図面を参照して下記に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1a】様々な条件に供された試料F1~F7を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによる高分子量種の検出を示す図。a) ストレス条件 (3回の凍結/融解サイクル又は7日間の振盪) に供された試料の分析。

【図1b】様々な条件に供された試料F1~F7を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによる高分子量種の検出を示す図。b) 5 で1か月又は3か月間保管された試料の分析

40

【図1c】様々な条件に供された試料F1~F7を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによる高分子量種の検出を示す図。c) 25 / 60% 相対湿度で2週間、1か月、2か月又は3か月間保管された試料の分析。

【図1d】様々な条件に供された試料F1~F7を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによる高分子量種の検出を示す図。d) 40 / 75% 相対湿度で2週間、1か月、2か月又は3か月間保管された試料の分析。

【図2】SDS-PAGEによる、25 / 60% 相対湿度又は40 / 75% 相対湿度で3か月間の保管の後の試料F3、F4、F5及びF7におけるタンパク質断片化の分析について示す図。

50

【図3】40 / 75%相対湿度で3か月間インキュベートされた試料S6及びS2の非還元下SDS-PAGEを示す図。

【図4】40 / 75%相対湿度で3か月間のインキュベーション後の表9に示された試料(a)~(d)の非還元下SDS-PAGEを示す図。

【図5】40 / 75%相対湿度で3か月間のインキュベーション後の表9に示された試料(a)~(d)の還元下SDS-PAGEを示す図。

【発明を実施するための形態】

【0037】

以降に例証として説明されるような本発明は、本明細書中で具体的には開示されていない任意の1又は複数の要素、1又は複数の限定が存在しない状態で、適切に実行可能である。

10

【0038】

本発明は特定の実施形態に関して説明されることになるが、しかし本発明はそれに限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

用語「~を含んでなる(comprising)」が本節の説明及び特許請求の範囲において使用される場合、該用語は他の要素を排除しない。本発明の目的上、用語「~で構成されている(consisting of)」は、用語「~を含んでなる(comprising of)」の好ましい実施形態であると考えられる。本明細書中以下において、群が少なくともある一定数の実施形態を含んでなるものと定義される場合、これは、それらの実施形態のみで構成されていることが好ましい群を、開示するようにも理解される

20

【0039】

本発明の目的上、用語「得られた(obtained)」は、用語「入手可能である(obtainable)」の好ましい実施形態であると考えられる。本明細書中以下において、例えば細胞又は生物体が固有の方法によって入手可能であると定義される場合、これはその方法によって得られる細胞又は生物体を開示するようにも理解されることになっている。

【0040】

単数名詞を指すときに、不定冠詞又は定冠詞、例えば「1つの(a)」、「1つの(an)」又は「その(the)」が使用される場合、これは何か他のことが具体的に記述されないかぎりその名詞の複数形を含んでいる。

30

【0041】

本明細書中で使用されるような用語「医薬組成物」は、化学物質又は活性成分を含んでなる任意の組成物であって、該組成物は疾患の医学的な療法、治療、又は予防において使用するためのものであり、かつ活性成分が有効であることを可能にするような形態である、組成物を指す。特に、医薬組成物は、該組成物が投与されることになっている対象者にとって許容しがたいほど有毒な添加剤を含有しない。医薬組成物は、滅菌状態である、すなわち無菌でありかつ全ての生きた微生物及びその孢子を含まない。本発明で使用される医薬組成物は液体でありかつ安定である。

【0042】

40

「液体組成物」において、薬学的に活性な作用薬、例えばVEGFアンタゴニストは、保管後も安定で活性のある薬剤を保証するために、様々な添加剤と組み合わせることが可能である。本発明で使用される液体医薬組成物はどの時点においても凍結乾燥されない、すなわち生産方法は凍結乾燥ステップを含まず、かつ組成物は保管のために凍結乾燥されない。液体組成物は、バイアル、IVバッグ、アンプル、カートリッジ、及び充填済み又は使用準備済のシリンジの中で保管可能である。

【0043】

「安定な」液体組成物とは、その中に含有されるVEGFアンタゴニストがある一定期間にわたり保管されたときにその物理的安定性及び/又は化学的安定性及び/又は生物学的活性を本質的に保持しているものである。好ましくは、該組成物は、保管時にその物理的

50

及び化学的安定性、並びにその生物学的活性を本質的に保持している。タンパク質の安定性を計測するための様々な分析技法が当分野において利用可能であり、かつ例えばビンセント・リー (Vincent Lee) 編「ペプチド及びタンパク薬物送達 (Peptide and Protein Drug Delivery)」、ニューヨーク州ニューヨークのマルセル・デッカー社 (Marcel Dekker, Inc)、Pubs、1991年、p. 247 - 301、及びジョーンズ (Jones)、アドバンスト・ドラッグ・デリバリー・レビューズ (Adv Drug Delivery Rev)、1993年、第10巻、p. 29 - 90において、論評されている。例えば、安定性は選択された時間の間選択された温度で計測可能である。安定性は、様々な異なる方法で、例えば凝集体形成の評価 (例えば、サイズ排除クロマトグラフィーを使用するもの、濁度の計測によるもの、及び/又は目視検査によるもの)、陽イオン交換クロマトグラフィー又はキャピラリーゾーン電気泳動を使用して電荷の不均一性を評価すること、アミノ末端又はカルボキシ末端配列分析、質量分光分析、凝集した分子又は断片化した分子を検出するSDS-PAGE分析、ペプチドマップ (例えば、トリプシン消化又はLYS-C) 分析、アンタゴニストの生物学的活性又は結合を評価すること等により、定性的に及び/又は定量的に、評価することが可能である。

10

【0044】

好ましくは、医薬組成物は約40の温度で少なくとも1~2週間安定である、及び/又は約5の温度で少なくとも3か月間安定である、及び/又は約25の温度で少なくとも2週間又は1か月間安定である。さらに、該製剤は好ましくは、本明細書中実施例に記載されるような該製剤の凍結 (例えば - 20まで) 及び25での融解の後、例えば1、2、3又は4サイクルの凍結融解の後に、安定である。

20

【0045】

例えば、本発明で使用される医薬組成物において、サイズ排除クロマトグラフィーによって計測されるようなVEGFアンタゴニストの総量に対する高分子量種の割合 (%) は、5で3か月間の該組成物の保管後に、4%以下、好ましくは3.5%又は3.25%以下、より好ましくは3.0%又は2.75%以下、及び最も好ましくは2.5%以下である。

【0046】

「緩衝液」とは、弱酸及びその共役塩基、又はその逆のもの混合物で構成されている水溶液であって、そのpHの変化に抵抗しその結果としてpHをほぼ一定の値に維持する水溶液である。本発明の緩衝液は、約6.0~約7.0、好ましくは約6.1~約6.8、より好ましくは約6.0~6.5、さらにより好ましくは約6.2~6.5の範囲のpHを有することが好ましく、最も好ましくは約6.2又は6.5のpHを有する。

30

【0047】

本発明で使用される緩衝液はヒスチジン含有緩衝液である。好ましくは、ヒスチジン含有緩衝液は本発明の液体製剤中に存在する唯一の緩衝液である。

「ヒスチジン含有緩衝液」及び「ヒスチジン緩衝液」という用語は本明細書中で互換的に使用されており、ヒスチジンを含んでなる緩衝液を指す。ヒスチジン緩衝液の例には、ヒスチジクロリド、塩酸ヒスチジン、酢酸ヒスチジン、リン酸ヒスチジン及び硫酸ヒスチジンが含まれる。本発明の好ましいヒスチジン緩衝液はさらにL-ヒスチジンを含んでなる。さらにより好ましくは、本発明のヒスチジン緩衝液は塩酸ヒスチジンを含んでなり、最も好ましくは塩酸ヒスチジン及びL-ヒスチジンを含んでなる。好ましくは、ヒスチジン緩衝液又は塩酸ヒスチジン緩衝液若しくは塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン緩衝液は、約6.0~約7.0、好ましくは約6.1~約6.8、より好ましくは約6.0~6.5、さらにより好ましくは約6.2~6.5の範囲のpHを有し、最も好ましくは約6.2又は6.5のpHを有する。

40

【0048】

特定の好ましい実施形態において、ヒスチジン含有緩衝液は、1mM~40mM、好ましくは2mM~35mM、より好ましくは3mM~30mM、さらにより好ましくは5m

50

M ~ 20 mM、及び最も好ましくは 8 mM ~ 15 mM の範囲の濃度で塩酸ヒスチジン / L - ヒスチジンを含んでなる。

【0049】

別の特定の好ましい実施形態では、緩衝液は 10 mM の濃度の塩酸ヒスチジン / L - ヒスチジンである。

別の特定の好ましい実施形態では、緩衝液は、10 mM の濃度であり 6.2 又は 6.5 の pH を有する塩酸ヒスチジン / L - ヒスチジンである。

【0050】

本発明の医薬組成物は、L - ヒスチジン、L - ヒスチジン HCl、炭水化物、好ましくはスクロース、及び無機塩類、好ましくは塩化ナトリウムを水に溶解した後に、非イオン系界面活性剤、好ましくはポリソルベート 20 を添加し、次に VEGF アンタゴニストを添加することにより、調製されることが好ましい。

【0051】

本明細書中で使用されるような「界面活性剤」は、両親媒性化合物、すなわち疎水基及び親水基の両方を含有する化合物であって 2 つの液体の間又は液体と固体との間の表面張力（若しくは界面張力）を低下させる化合物を指す。「非イオン系界面活性剤」はその頭部に荷電した基を有していない。抗体を含有する組成物の凍結 / 融解サイクル中の不溶性粒子の形成は、界面活性剤の添加によって著しく阻害することが可能である。「非イオン系界面活性剤」の例には、例えばポリオキシエチレングリコールアルキルエーテル、例えばオクタエチレングリコールモノデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノデシルエーテルなど；ポリオキシプロピレングリコールアルキルエーテル；グルコシドアルキルエーテル、例えばデシルグルコシド、ラウリルグルコシド、オクチルグルコシドなど；ポリオキシエチレングリコールオクチルフェノールエーテル、例えば *tritron*（登録商標）X - 100 など；ポリオキシエチレングリコールアルキルフェノールエーテル、例えばノノキシノール 9 など；グリセロールアルキルエステル、例えばラウリン酸グリセリルなど；ポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル、例えばポリソルベートなど；ソルビタンアルキルエステル、例えばスパン（登録商標）など；ココミド MEA、ココミド DEA、ドデシルジメチルアミノオキシド；ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコールのブロックコポリマー、例えばポロキサマーなど；並びにポリエトキシ化獣脂アミン（POEA）が挙げられる。本発明の医薬組成物はこれらの界面活性剤のうち 1 つ以上を組み合わせる含有することが可能である。

【0052】

本発明の医薬組成物で使用される好ましい非イオン系界面活性剤は、ポリソルベート 20、40、60 又は 80 のようなポリソルベートであり、特にポリソルベート 20（すなわち *Tween*（登録商標）20）である。

【0053】

非イオン系界面活性剤の濃度は、組成物の全体積に対して 0.01 ~ 0.08 % (w/v) の範囲内、好ましくは 0.015 ~ 0.06 % (w/v) の範囲内、より好ましくは 0.02 ~ 0.04 % (w/v) の範囲内にあり、最も好ましくは 0.03 % (w/v) である。

【0054】

好ましい実施形態において、非イオン系界面活性剤は、組成物の全体積に対して 0.015 ~ 0.06 % (w/v) の範囲内、より好ましくは 0.02 ~ 0.04 % (w/v) の範囲内の濃度のポリソルベート 20 であり、最も好ましくは 0.03 % (w/v) のポリソルベート 20 である。

【0055】

特に好ましい実施形態では、非イオン系界面活性剤は、組成物の全体積に対して 0.03 % (w/v) の濃度のポリソルベート 20 である。

本明細書中において、「無機塩類」は、浸透圧調節性を有するイオン化合物を指す。塩化ナトリウム (NaCl) のような無機塩類は溶液中で解離してその成分イオンとなる、

10

20

30

40

50

すなわちNaClは解離してNa⁺及びCl⁻イオンとなり、これらはいずれも溶液の浸透圧すなわちモル浸透圧濃度に影響する。本発明の医薬製剤において使用される好ましい無機塩類は、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム及び重炭酸ナトリウムである。好ましくは、無機塩類はナトリウム塩であり、より好ましくは塩化ナトリウム(NaCl)である。

【0056】

本発明で使用される医薬組成物中の無機塩類の濃度は、好ましくは20~100mMの範囲内、より好ましくは25~80mMの範囲内にあり、さらにより好ましくは無機塩類は30~60mM又は35~45mMの範囲内の濃度を有し、最も好ましくは濃度は40mMである。

10

【0057】

特定の好ましい実施形態では、無機塩類は20~100mMの範囲内、より好ましくは25~80mMの範囲内の濃度のNaClであり、さらにより好ましくは無機塩類は30~60mM又は35~45mMの範囲内の濃度を有し、最も好ましくは濃度は40mMである。

【0058】

最も好ましい実施形態では、無機塩類は40mMの濃度のNaClである。

さらなる実施形態では、医薬組成物は、無機塩類、好ましくはNaClを、好ましくは40mMの濃度で、ポリソルベート20を0.03%(w/v)の濃度で、スクロースを5%(w/v)の濃度で、並びに10mMの濃度及び6.5のpHの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン緩衝液、又は10mMの濃度及び6.2のpHの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン緩衝液を、含んでなる。

20

【0059】

用語「VEGFアンタゴニスト」は、VEGFと特異的に相互作用し、かつその生物学的活性のうち1以上、例えばその細胞分裂促進活性、血管形成活性及び血管透過活性のうち少なくともいずれかを阻害する分子を指す。該用語は、抗VEGF抗体及び該抗体の抗原結合性フラグメント並びに非抗体VEGFアンタゴニストの両方を含むように意図されている。

【0060】

非抗体VEGFアンタゴニストには、アフリベルセプト、ペガプタニブ及び抗体ミメティックが挙げられる。好ましくは、非抗体VEGFアンタゴニストはアフリベルセプトである。現在Eylea(登録商標)という名称で市販されておりVEGFトラップとしても知られているアフリベルセプトは、VEGF受容体1の第2免疫グロブリン様ドメイン及びVEGF受容体2の第3免疫グロブリン様ドメインがヒトIgG1のFc部分に融合している、組換えヒト可溶性VEGF受容体融合タンパク質である(ホラシュ(Holash)ら、米国科学アカデミー紀要(Proc.Natl.Acad.Sci.)、2002年、第99巻、第17号、p.11393-11398;国際公開第00/75319A1号)。アフリベルセプトのCAS番号は862111-32-8である。同剤は、滲出型加齢黄斑変性症、糖尿病性の黄斑浮腫(DME)による視力障害及び糖尿病性の黄斑浮腫の患者における糖尿病性網膜症の治療について販売承認を受けている。現在の市販のアフリベルセプト製剤は、リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ポリソルベート20、スクロース及び注射用水を含有し、かつ40mg/mlの濃度で供給される。

30

40

【0061】

Macugen(登録商標)という名称で現在市販されているペガプタニブは、PEG化された抗血管内皮細胞増殖因子(VEGF)アダマーである(ベル(Bell)ら、イン・ビトロ・セルラー・アンド・ディベロプメンタル・バイオロジー-アニマル(In Vitro Cell Dev Biol Anim.)、1999年、第35巻、第9号、p.533-42)。VEGFアンタゴニストである抗体ミメティックには、VEGFに結合してその受容体への結合を阻害するアンキリンリピートドメインを含んでなる結合タンパク質、例えばDARPin(登録商標)MP0112が挙げられる(国際公開

50

第2010/060748号及び国際公開第2011/135067号も参照されたい)。

【0062】

用語「抗体」又は「免疫グロブリン」は、本明細書中では最も広い意味で使用され、かつ完全長の抗体、遺伝子操作された抗体、組換え抗体、多価抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、及び機能性を維持しかつ所望の生物学的活性を示す限りはそのような抗体のフラグメント、が挙げられる。抗体の「生物学的活性」とは、該抗体が抗原に結合し、かつ *in vitro* 又は *in vivo* で計測可能な生物学的応答を生じる能力を指す。

【0063】

完全長の抗体は、軽鎖 (V_L) 及び重鎖 (V_H) の抗原結合可変領域、軽鎖定常領域 (C_L) 並びに重鎖定常ドメイン C_{H1} 、 C_{H2} 及び C_{H3} を含んでなる。

用語「抗体フラグメント」又は「抗原結合性フラグメント」は、本明細書中では最も広い意味で使用され、かつ完全長の抗体の一部であって、好ましくはその抗原結合領域又は可変領域を含んでなるものを、含んでなる。抗体フラグメントは、もとの免疫グロブリンの元の特異性を保持している。抗体フラグメントの例には、例えば Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、及び Fv フラグメント、ダイアボディ、線状の抗体、単鎖抗体分子、及び抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が挙げられる。好ましくは、抗体フラグメントは Fab フラグメントである。

【0064】

「モノクローナル抗体」とは、抗原の単一のエピトープに特異的な、すなわち抗原上の単一の決定基に対する、抗体である。モノクローナル抗体を生産する方法は当業者に既知である。

【0065】

用語「組換え抗体」は、遺伝子組換え手段によって調製、発現、作出又は単離された全ての抗体、例えば遺伝子導入された宿主細胞（例えば NS0 若しくは CHO 細胞）から、若しくは免疫グロブリン遺伝子に関して遺伝子導入された動物から単離された抗体、又は宿主細胞（例えば SP2/0 マウス骨髄腫細胞）にトランスフェクションされた組換え発現ベクターを使用して発現された抗体から単離された抗体を指す。

【0066】

「ヒト化抗体」とは、抗原結合部分 (CDR) がマウスなどヒト以外の生物種に由来し、よってもとの免疫グロブリンとは異なる特異性を有している、ヒト抗体である。CDR タンパク質配列は、ヒトにおいて自然状態で生産される抗体バリエーションとの類似性を高めるために改変されることが可能である。

【0067】

用語「抗 VEGF 抗体」とは、VEGF に特異的に結合してその生物学的活性のうち 1 以上、例えば VEGF の細胞分裂促進活性、血管形成活性及び血管透過活性のうち少なくともいずれかを阻害する、抗体又は抗体フラグメント、例えば Fab 若しくは scFv フラグメントを指す。抗 VEGF 抗体は、例えば、細胞の受容体への VEGF の結合を妨害することにより、細胞の受容体への VEGF 結合後の血管内皮細胞の活性化を妨害することにより、又は、VEGF によって活性化された細胞を殺滅することにより、作用する。抗 VEGF 抗体には、例えば抗体 A4.6.1、ペバシズマブ、ラニズマブ、G6、B20、2C3、並びにその他の、例えば国際公開第 98/45331 号、米国特許出願公開第 2003/0190317 号明細書、米国特許第 6,582,959 号明細書、米国特許第 6,703,020 号明細書、国際公開第 98/45332 号、国際公開第 96/30046 号、国際公開第 94/10202 号、国際公開第 2005/044853 号、欧州特許第 0666868 B1 号、国際公開第 2009/155724 号及びポプコフ (Popkov) ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー・メソッド (J. Immunol. Meth.)、2004 年、第 288 巻、p. 149-64 に記載されるようなものが挙げられる。好ましくは、本発明で使用される医薬組成物中に存在する抗 VEGF 抗体又

10

20

30

40

50

はその抗原結合性フラグメントは、ラニビズマブ又はベバシズマブである。最も好ましくは、該抗体又はその抗原結合性フラグメントはラニビズマブ又はその抗原結合性フラグメントである。

【0068】

「ラニビズマブ」は、国際公開第98/45331号の配列番号115及び116並びにチェン(Chen)ら、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.)、1999年、第293巻、p. 865-81に記載されているような、Y0317の軽鎖及び重鎖可変ドメイン配列を有しているVEGF-Aに対するヒト化モノクローナルFabフラグメントである。ラニビズマブのCAS番号は347396-82-1である。ラニビズマブは内皮細胞の増殖及び新生血管形成を阻害し、血管新生性の(滲出型)加齢黄斑変性症(AMD)の治療、糖尿病性の黄斑浮腫(DME)による視力障害の治療、網膜静脈閉塞症(分枝RVO若しくは中心RVO)に続発する黄斑浮腫による視力障害の治療、又は病的近視に続発する脈絡膜新生血管形成(CNV)による視力障害の治療用に承認済みである。ラニビズマブはベバシズマブと関連がありベバシズマブと同じ親マウス抗体に由来するが親分子よりもはるかに小さく、かつVEGF-Aへのより強い結合を提供するように親和性成熟が施されている。ラニビズマブは、例えば国際公開第98/45331A2号に記載されたようにして、大腸菌で組換え生産される。現在の市販のラニビズマブ製剤は、
、
-トレハロース二水和物、塩酸ヒスチジン-水和物、ヒスチジン、ポリソルベート20及び注射用水を含有しており、10mg/mlの濃度で供給される。

10

20

【0069】

「ベバシズマブ」は、VEGFの全てのアイソフォームを認識し、かつラニビズマブの親抗体である、完全長のヒト化型ネズミ科動物モノクローナル抗体である。ベバシズマブのCAS番号は216974-75-3である。ベバシズマブは血管新生を阻害し、かつ目下様々な種類のがんの治療について承認されている。しかしながら、加齢黄斑変性症のような眼科疾患においても適応外使用で用いられる。現在の市販のベバシズマブ製剤は、
、
-トレハロース二水和物、リン酸ナトリウム、ポリソルベート20及び注射用水を含有しており、25mg/mlの濃度の濃縮物として供給される。

【0070】

1つの実施形態では、VEGFアンタゴニストは製剤中の唯一の薬理活性物質である。代替実施形態では、製剤はVEGFアンタゴニストに加えて1以上の薬理活性物質を含有する。薬理活性物質は、対象者に投与された時に薬理的な効果を及ぼすことができる。好ましくは、追加の薬理活性物質はPDGFアンタゴニスト又はAng2アンタゴニストである。より好ましくは、PDGFアンタゴニストはリヌクマブ(rinucumab)のような抗PDGF抗体又はFovista(登録商標)として市販されているE10030のようなアプタマーである。最も好ましくは、PDGFアンタゴニストは、グリーン(Green)ら、バイオケミストリー(Biochemistry)、1996年、第35巻、p. 14413;米国特許第6,207,816号明細書;米国特許第5,731,144号明細書;米国特許第5,731,424号明細書;及び米国特許第6,124,449号明細書に記載されているE10030である。同様により好ましくは、Ang2抗体は抗Ang2抗体であり、最も好ましくはネスバクマブである。

30

40

【0071】

医薬組成物中のVEGFアンタゴニストの濃度は、典型的には5~80mg/ml、好ましくは7~60mg/ml、より好ましくは8~50mg/ml、及び最も好ましくは10又は40mg/mlである。VEGFアンタゴニストがアフリベルセプトならば、VEGFアンタゴニストすなわちアフリベルセプトの濃度は好ましくは40mg/mlである。VEGFアンタゴニストがラニビズマブならば、VEGFアンタゴニストすなわちラニビズマブの濃度は好ましくは6又は10mg/mlである。

【0072】

用語「炭水化物」は、炭素、水素、及び酸素のみを含んでなり、通常は2:1の水素:

50

酸素原子比率でありかつ実験式 $C_m(H_2O)_n$ の有機化合物を指す。用語「炭水化物」には、単糖類、二糖類、オリゴ糖類及び多糖類が含まれる。炭水化物の例には、グルコース、フルクトース、ガラクトース、キシロース、リボース、スクロース、マンノース、ラクトース、マルトース、トレハロース、でんぷん及びグリコーゲンが挙げられる。様々な他の形態の糖質が知られており、例えば糖アルコール、例えばグリセロール、マンニトール、ソルビトール、及びキシリトールなど；糖酸、例えばアスコルビン酸のようなアルドン酸、酒石酸のようなアルダル酸；還元糖、例えばグルコース、グリセルアルデヒド、ガラクトース、ラクトース、及びマルトース；アミノ糖類、例えばN - アセチルグルコサミン、ガラクトサミン、グルコサミン、及びシアル酸；又はスルホキノボース、グルコースのスルホン酸誘導体である。

10

【0073】

本発明で使用される医薬組成物は、希釈剤、可溶化剤、等張化剤、添加剤、pH 変更剤、無痛化剤、緩衝剤、硫黄含有還元剤、酸化防止剤又はその他同種のをさらに含有する。本発明で使用される医薬組成物はPEG 3350 及び/又はグリシンを含有しない。

【0074】

好ましくは、本発明で使用される医薬組成物は、塩酸ヒスチジン/L - ヒスチジン、ポリソルベート20、NaCl、スクロース、水及びアフリベルセプトを含有し、かつさらなる構成成分又は活性物質は含有しない、すなわち、該医薬組成物は、塩酸ヒスチジン/L - ヒスチジン、ポリソルベート20、NaCl、スクロース、水及びアフリベルセプトで構成されている。より好ましくは、本発明で使用される医薬組成物は、10 mMの塩酸ヒスチジン/L - ヒスチジン、0.03% (w/v) のポリソルベート20、40 mMのNaCl、5% (w/v) のスクロース、水及び40 mg/mlのアフリベルセプトで構成されている。

20

【0075】

同じく好ましくは、本発明で使用される医薬組成物は、塩酸ヒスチジン/L - ヒスチジン、ポリソルベート20、NaCl、スクロース、水及びラニビズマブを含有し、かつさらなる構成成分又は活性物質は含有しない、すなわち、該医薬組成物は、塩酸ヒスチジン/L - ヒスチジン、ポリソルベート20、NaCl、スクロース、水及びラニビズマブで構成されている。より好ましくは、本発明で使用される医薬組成物は、10 mMの塩酸ヒスチジン/L - ヒスチジン、0.03% (w/v) のポリソルベート20、40 mMのNaCl、5% (w/v) のスクロース、水及び10 mg/mlのラニビズマブで構成されている。

30

【0076】

「眼内血管新生性疾患」とは眼内の新生血管形成を特徴とする疾患である。眼内血管新生性疾患の例には、例えば増殖性網膜症、脈絡膜新生血管形成(CNV)、加齢黄斑変性症(AMD)、糖尿病性及びその他虚血関連の網膜症、糖尿病性の黄斑浮腫、病的近視、フォンヒッペル・リンダウ病、眼ヒストプラスマ症、網膜中心静脈閉塞症(CRVO)、網膜静脈分枝閉塞症(BRVO)、角膜新生血管形成、並びに網膜新生血管形成が挙げられる。用語「加齢黄斑変性症」とは、通常は高齢者が罹患し、網膜の損傷により視野の中心(黄斑)における視力喪失を生じる医学的状態を指す。

40

【0077】

本発明で使用される医薬組成物中に存在するVEGFアンタゴニストがアフリベルセプトである場合、該医薬組成物は好ましくは、血管新生性の(滲出型)加齢黄斑変性症(AMD)、網膜静脈閉塞症(分枝RVO若しくは中心RVO)に続発する黄斑浮腫による視力障害、糖尿病性の黄斑浮腫(DME)による視力障害又は近視性脈絡膜新生血管形成(近視性CNV)による視力障害の治療に使用するためのものである。

【0078】

本発明で使用される医薬組成物中に存在するVEGFアンタゴニストがラニビズマブである場合、該医薬組成物は好ましくは、血管新生性の(滲出型)加齢黄斑変性症(AMD

50

）の、糖尿病性の黄斑浮腫（DME）による視力障害の、網膜静脈閉塞症（分枝RVO若しくは中央RVO）に続発する黄斑浮腫による視力障害の、又は病的近視（PM）に続発する脈絡膜新生血管形成（CNV）による視力障害の、治療に使用するためのものである。

【0079】

用語「硝子体内注射」は、物質が眼の中に直接注射される医薬組成物の投与を指す。より具体的には、物質は、ヒト及び他の脊椎動物の眼球のレンズと網膜との間の空間を満たす透明なゲルである硝子体液（硝子体又は単にガラス質とも呼ばれる）の中に注入される。

【0080】

本発明の医薬組成物は、バイアル、アンプル若しくはシリンジのような規定の容積を有するか又はボトルのような大容積を有している、密封及び滅菌されたプラスチック、ガラス又はその他の適切なコンテナに入れて供給可能である。

【0081】

VEGFアンタゴニスト、好ましくはアフリベルセプト又はラニビズマブを含有する液体医薬組成物は、充填済みシリンジに入れて供給されることが好ましい。「使用準備済シリンジ（ready-to-use syringe）」又は「充填済みシリンジ（prefilled syringe）」とは、充填された状態で供給されるシリンジである、すなわち投与される医薬組成物が既にシリンジの中にあって投与の準備ができています。充填済みシリンジには、別々に提供されるシリンジ及びバイアルと比較して、高い利便性、手頃な価格、正確性、滅菌状態、及び安全性など数多くの有益性がある。充填済みシリンジの使用は、投与量の正確さを高め、バイアルから薬剤を取り出す間に生じうる針刺し損傷の可能性を低下させ、投与量を計量済みとして薬剤の再構成及びシリンジ内への吸引のうち少なくともいずれか一方の必要性に起因する投薬過誤を低減し、かつ、シリンジの過剰充填を少なくして薬物の無駄を最小限にすることによる費用低減の助けになる。充填済みシリンジの外筒はガラス製又はプラスチック製であってよい。好ましくは、充填済みシリンジの外筒はプラスチック製であり、より好ましくは環状オレフィンポリマー製である。充填済みシリンジの外筒はシリコーンでコーティングされないことが好ましい。

【0082】

好ましい実施形態では、本発明で使用される液体医薬組成物のpHは、約6.0～約7.0、好ましくは約6.1～約6.8、より好ましくは約6.0～6.5、さらにより好ましくは約6.2～6.5の範囲内にあり、最も好ましくは約6.2又は6.5のpHを有している。

【0083】

本発明で使用される液体医薬組成物は、加齢黄斑変性症（AMD）のような眼内血管新生性疾患の治療、糖尿病性の黄斑浮腫（DME）による視力障害の治療、網膜静脈閉塞症（分枝RVO若しくは中心RVO）に続発する黄斑浮腫による視力障害の治療、又は病的近視に続発する脈絡膜新生血管形成（CNV）による視力障害の治療に使用されることになる。

【0084】

特に、本発明は、AMDのような眼内血管新生性疾患の治療に使用される液体医薬組成物であって、ヒスチジン含有緩衝液、非イオン系界面活性剤、無機塩類、炭水化物及びVEGFアンタゴニストを含んでなる組成物に関する。

【0085】

本発明の1つの実施形態では、AMDのような眼内血管新生性疾患の治療に使用される硝子体内投与用の液体医薬組成物は、ヒスチジン含有緩衝液、非イオン系界面活性剤、無機塩類、炭水化物及びVEGFアンタゴニストを含んでなる。

【0086】

本発明の好ましい実施形態において、AMDのような眼内血管新生性疾患の治療に使用される硝子体内投与用の液体医薬組成物は、1mM～40mMの濃度のヒスチジン含有緩

10

20

30

40

50

衝液、0.01～0.08% (w/v) の濃度の非イオン系界面活性剤、20～100 mM の濃度の無機塩類、3～20% (w/v) の濃度の炭水化物及びVEGFアンタゴニストを含んでなる。

【0087】

本発明の別の好ましい実施形態において、AMDのような眼内血管新生性疾患の治療に使用される硝子体内投与用の液体医薬組成物は、1 mM～40 mM の濃度の塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.01～0.08% (w/v) の濃度のポリソルベート20、20～100 mM の濃度のNaCl、3～20% (w/v) の濃度のスクロース及びアフリベルセプトを含んでなる。

【0088】

本発明の別の好ましい実施形態では、AMDのような眼内血管新生性疾患の治療に使用される硝子体内投与用の液体医薬組成物は、10 mM の塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03% (w/v) のポリソルベート20、40 mM のNaCl、5% (w/v) のスクロース及びアフリベルセプトを含んでなる。

【0089】

本発明の別の好ましい実施形態では、眼内血管新生性疾患の治療に使用される硝子体内投与用の液体医薬組成物は、10 mM の塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03% (w/v) のポリソルベート20、40 mM のNaCl、5% (w/v) のスクロース及び40 mg/ml のアフリベルセプトを含んでなる。

【0090】

本発明の別の好ましい実施形態では、眼内血管新生性疾患の治療に使用される硝子体内投与用の液体医薬組成物は、10 mM の塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03% (w/v) のポリソルベート20、40 mM のNaCl、5% (w/v) のスクロース及び40 mg/ml のアフリベルセプトで構成されている。

【0091】

本発明の別の好ましい実施形態では、眼内血管新生性疾患の治療に使用される硝子体内投与用の液体医薬組成物は、10 mM の塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03% (w/v) のポリソルベート20、40 mM のNaCl、5% (w/v) のスクロース及び40 mg/ml のアフリベルセプトで構成されており、かつ6.2又は6.5のpHを有する。

【0092】

本発明の別の好ましい実施形態において、AMDのような眼内血管新生性疾患の治療に使用される硝子体内投与用の液体医薬組成物は、1 mM～40 mM の濃度の塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.01～0.08% (w/v) の濃度のポリソルベート20、20～100 mM の濃度のNaCl、3～20% (w/v) の濃度のスクロース及びラニビズマブを含んでなる。

【0093】

本発明の別の好ましい実施形態では、AMDのような眼内血管新生性疾患の治療に使用される硝子体内投与用の液体医薬組成物は、10 mM の塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03% (w/v) のポリソルベート20、40 mM のNaCl、5% (w/v) のスクロース及びラニビズマブを含んでなる。

【0094】

本発明の別の好ましい実施形態では、眼内血管新生性疾患の治療に使用される硝子体内投与用の液体医薬組成物は、10 mM の塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03% (w/v) のポリソルベート20、40 mM のNaCl、5% (w/v) のスクロース及び6又は10 mg/ml のラニビズマブを含んでなる。

【0095】

本発明の別の好ましい実施形態では、眼内血管新生性疾患の治療に使用される硝子体内投与用の液体医薬組成物は、10 mM の塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03% (w/v) のポリソルベート20、40 mM のNaCl、5% (w/v) のスクロース及び

10

20

30

40

50

6又は10mg/mlのラニズマブで構成されている。

【0096】

本発明の別の好ましい実施形態では、眼内血管新生性疾患の治療に使用される硝子体内投与用の液体医薬組成物は、10mMの塩酸ヒスチジン/L-ヒスチジン、0.03%(w/v)のポリソルベート20、40mMのNaCl、5%(w/v)のスクロース及び6又は10mg/mlのラニズマブで構成されており、かつ6.2又は6.5のpHを有する。

【0097】

さらに、本発明は、AMDのような眼内血管新生性疾患を治療するための、本発明の液体医薬組成物の有効な量での対象者への硝子体内投与を包含する。好ましい実施形態では、硝子体内投与のための本発明の液体医薬組成物は充填済みシリンジ中に存在する。

10

【0098】

本発明について、図面及び前述の説明において詳細に例証及び説明してきたが、そのような例証及び説明は事例的又は典型的なものであって限定的ではないとみなされるべきである。本発明は開示された実施形態に限定されない。開示された実施形態についての他の変形形態は、特許請求の範囲に記載された発明を実行する際に当業者が、図面、開示内容及び従属請求項の検討から、理解及び達成することが可能である。

【0099】

詳細な説明は、単に全くの典型例にすぎず、適用及び用途を限定するようには意図されない。以降の実施例は本発明をさらに例証するが、ただし本発明の範囲を該実施例に限定するものではない。当業者は本発明の説明に基づいて様々な変更及び改変を行なうことが可能であり、そのような変更及び改変も本発明に含まれている。

20

【実施例】

【0100】

実施例1.1~1.4は、以下の表1の7つの組成物を用いて実施された第1組の安定性試験に関する。実施例2.1~2.6は、充填済みシリンジ中の表2に記載の試料2及び6の安定性試験の結果を示す。実施例3.1~3.9は、表9の4つの組成物を用いて実施された第2組の安定性試験に関する。

【0101】

実施例1：第1組の安定性試験

30

[実施例1.1：試料の調製]

アフリベルセプトの様々な製剤を表1に従って調製した。

【0102】

【表 1】

表1. 試験した医薬組成物。試料7は市販のアフリベルセプト(Eylea®)製剤に相当する。

	緩衝液	無機塩	界面活性剤	炭水化物
1	10mM クエン酸ナトリウム, pH 6.2	40 mM NaCl	0.03% PS 20	5% スクロース
2	10mM クエン酸ナトリウム, pH 6.2	---	0.03% PS 20	10% スクロース
3	10mM L-His/ HisHCl; pH 6.2	40 mM NaCl	0.03% PS 20	5% スクロース
4	10mM L-His/ HisHCl; pH 6.2	---	0.03% PS 20	10% スクロース
5	10mM L-His/ HisHCl; pH 6.5	40 mM NaCl	0.03% PS 20	5% スクロース
6	10mM L-His/ HisHCl; pH 6.2	150 mM NaCl	0.01% PS 20	---
7	10 mM リン酸ナトリウム; pH 6.2	40 mM NaCl	0.03% PS 20	5% スクロース

10

20

【0103】

上記に列挙された医薬組成物はすべて40 mg / mlのアフリベルセプトを含有していた。

医薬組成物はアフリベルセプトを含めずに調製し、アフリベルセプトは後に透析によって該組成物中に含めた。添加剤であるスクロース、可能性として塩化ナトリウム及び界面活性剤のポリソルベート20を、表示された濃度の、緩衝作用を有する構成要素であるL-ヒスチジン及びL-塩酸ヒスチジン又はクエン酸三ナトリウム及びクエン酸にそれぞれ溶解した。緩衝液の塩基性成分及び酸性成分の比率により、6.2または6.5のpHがそれぞれもたらされた。浸透圧重量モル濃度はゴノテック(Gonotec)のOsmomat(登録商標)030によって測定した。全ての製剤を、等張に達するように300 mOsmol / kg ± 20 mOsm / kgに調整した。

30

【0104】

透析の前に、透析チューブをH₂Oで水和した。プールしたアフリベルセプトの透析は、分子量カットオフが12 kDa ~ 14 kDaの再生セルロース膜によって6で一晚実施した。透析の後、アフリベルセプトの濃度をMWC0が50 kDaの遠心濾過機Vivaspin(登録商標)6により40 mg / mL ± 2 mg / mLに調整し、該アフリベルセプト製剤を、滅菌濾過し(0.2 µmのPVDF膜シリンジフィルタ)、かつ予め滅菌された2 mLのFIOLAX(登録商標)タイプIガラスバイアル中に無菌的に充填した。

40

【0105】

[実施例1.2:試験条件]

最も安定した製剤を同定するために、試料を様々な条件に供した後に分析した。

一方の組の実験では、試料を様々なストレス条件に供した。これらのストレス条件はアフリベルセプトの化学的及び物理的な分解経路を強制的に進めるように選ばれており、次の条件すなわち:

a) 振盪(試料を300 rpmで25にて7日間振盪した)、及び

b) 凍結/融解(試料を±1 / 分の速さで3回凍結及び融解(25 ~ -20))し

50

;各冷却/加熱ステップの後、温度(それぞれ25及び-20)を10分間一定に保った)

を備えたものであった。

【0106】

別の組の実験では、試料を5の温度で1か月間若しくは3か月間、又は25の温度及び60%の相対湿度若しくは40及び75%の相対湿度で2週間、1か月間、2か月間若しくは3か月間、保管した。

【0107】

試料を上記に概説されるような様々な条件に供した後、部分標本を採取し、分析、例えばドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)及びサイズ排除クロマトグラフィーによる分析に供した。

10

【0108】

[実施例1.3:サイズ排除クロマトグラフィーによる分析]

サイズ排除クロマトグラフィーを、高分子量種(HMWs)すなわちアフリベルセプトの凝集体を検出するために使用した。

【0109】

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)は、様々な大きさの分子を分離するために多孔性粒子を使用する。同法は一般に、生体分子をその分子質量及び希釈溶液中での形状に従って分離するために使用される。固定相は調節された孔径の球状多孔性粒子で構成されており、該固定相を通して生体分子がその分子サイズの差に基づいて様々な程度に拡散する。小さな分子は細孔内まで自由に拡散し、カラムを通る該分子の移動に遅れが出る一方、大きな分子は細孔に入ることができず、従ってより早く溶出される。このように、分子は分子質量が減少する順に分離され、最も大きな分子が最初にカラムから溶出する。

20

【0110】

安定性プログラムの試料を、SECの溶離液で終濃度0.5mg/mLに希釈し、SECの計測まで6でHPLCバイアル中に保管した。

サイズ排除クロマトグラフィーの条件は以下すなわち:

カラム: TSKgel(登録商標)G3000SWXL

流量: 1.0mL/分、均一濃度溶離

カラム温度: 25

オートサンプラー温度: 6

検出: UV 214nm/280nm

注入量: 20µL(c=0.5mg/mL)

溶離剤: 0.02Mリン酸ナトリウム+0.8M NaCl、pH6.

30

0

実行時間: 20分

とした。

【0111】

214nmでの検出の結果を評価に使用した。主ピーク及び全ての他の信号対雑音比10の試料特異的なピークを評価した。特定のピーク、例えば凝集分子種の面積を、S/N10を備えた全ての試料特異的なピークの合計と比較し、相対比率を得た。

40

【0112】

この分析の結果は図1に示されている。25又は40で3か月間保管された場合、10mMのL-ヒスチジン/塩酸ヒスチジン、40mMのNaCl、5%のスクロース及び0.03%のポリソルベート20を含んでなり、かつそれぞれ6.2及び6.5のpHを有している製剤F3及びF5は、最も少ない量の高分子量種、すなわち凝集タンパク質を示した。特に、製剤F3及びF5における高分子量種の量は、市販のアフリベルセプト(Eylea(登録商標))製剤よりも低かった。このように、これらの製剤は市販のアフリベルセプト(Eylea(登録商標))製剤よりも安定していると考えることが可能である。

50

【 0 1 1 3 】

[実施例 1 . 4 : S D S P A G E]

S D S - P A G E により、表 1 の様々な製剤 1 ~ 7 におけるアフリベルセプトの断片化及びオリゴマー化のような物理的变化を測定した。

【 0 1 1 4 】

S D S - P A G E は還元条件下で実施した。試料を水で 0 . 4 m g / m l に希釈し、さらに還元性の S D S 試料用バッファーで 0 . 2 m g / m l に希釈した。該試料を 9 5 で 5 分間インキュベートした。試料ウェルを泳動用バッファーで洗浄してから試料 (n = 2) を投入した。泳動の実行後、ゲルを水で洗浄し、クマシーで一晩染色した。脱色の後、ゲルを走査して Q u a n t i t y O n e (登録商標) ソフトウェアを使用して分析した。

10

【 0 1 1 5 】

泳動条件は以下すなわち :

- 電圧 : 1 2 5 V
- 電流 : 3 5 m A
- 電力 : 5 W
- 時間 : 1 1 0 分

であった。

【 0 1 1 6 】

S D S P A G E 分析の結果は図 2 に示されている。

2 5 又は 4 0 で 3 か月間インキュベートされた全ての試料の S D S - P A G E 分析では、アフリベルセプトの断片を表わすバンドを見ることができた。最も少ない量のフラグメントは、1 0 m M の L - ヒスチジン / 塩酸ヒスチジン、p H 6 . 5、4 0 m M の N a C l、5 % のスクロース及び 0 . 0 3 % のポリソルベート 2 0 を含有する製剤 F 5 について検出された。

20

【 0 1 1 7 】

実施例 2 : 充填済みシリンジ中のアフリベルセプト製剤の安定性

[実施例 2 . 1 : アフリベルセプト製剤を含有している充填済みシリンジの調製]

4 0 m g / m l の V E G F アンタゴニストであるアフリベルセプト、及び 1 0 m M のヒスチジン緩衝液、4 0 m M の塩化ナトリウム、5 % (w / v) のスクロース、0 . 0 3 % (w / v) のポリソルベート 2 0 を含有している溶液 (p H 6 . 2) を 1 6 5 μ l、表 2 に列挙したようなシリンジ中に充填した。

30

【 0 1 1 8 】

【表 2】

表2:

No.	シリンジの大きさ	シリンジの外筒	シリンジの種類	シリコーンのレベル [mg]	ストッパーのコーティング
2	1.0 ml	ホウケイ酸ガラス	ルアーコーン	0.16 (焼き付け)	フルオロポリマー (Flurotec(登録商標))
6	1.0 mL	シクロオレフィンポリマー	ルアーコーン	シリコーン無し	フルオロポリマー (Flurotec(登録商標))

40

【 0 1 1 9 】

表 2 に列挙したシリンジを、5、2 5 / 6 0 % 相対湿度、及び 4 0 / 7 5 % 相対湿度で、1 か月間及び 3 か月間インキュベートした。

50

その後、試料を、タンパク質濃度についてはUV-Vis法により、高分子量種(HMWS)の存在についてはサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)及び非対称流フィールドフローフラクショネーション(AF4)により、断片及びHMWSの存在については還元下硫酸ドデシルナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)により、メチオニン酸化及び脱アミド化の存在については還元型ペプチドマッピングにより、分析した。等電点電気泳動法(IEF)は、アフリベルセプトの電荷バリエーションを生じる化学修飾について試料を分析するために使用した。pHについても全インキュベーション期間の範囲内でモニタリングした。

【0120】

安定性プログラム全体を通して、全ての試料においてタンパク質濃度(280nmにおける分光学的定量; $n = 3$)においてもpH($n = 2$)においても同じように、有意な変化は検出されなかった。

【0121】

[実施例2.2: 充填済みシリンジ中で保管されたアフリベルセプト製剤のAF4分析]

非対称流フィールドフローフラクショネーション(asymmetric flow field flow fractionation)(AF4)は、アフリベルセプトの高分子量種をその大きさに基づいて同定及び定量する技法である。この分離は、チャンネルを横切る液体の流れによって引き起こされた流動場における移動度(拡散係数)の違いによって得られる。濃度依存性の検出器としてのMALS(多角度光散乱)及びUV(280nm)の組み合わせで、アフリベルセプト凝集体を特徴付けして定量することが可能である。

【0122】

20 μ gのアフリベルセプトを、15.5cmの分離チャンネル15.5cm(短チャンネル)にW490分離スペーサ(いずれもワイアット・テクノロジー(Wyatt Technology))及びPLGC 10kD SC-5メンブレン(ミリポア(Millipore))を組み合わせたものに装荷した。タンパク質を、0.1Mのリン酸ナトリウム(pH6.0)及び0.02%のアジ化ナトリウムを使用して、分離時のクロスフロー及びフォーカスフローを表している表3に示した溶離条件に従って溶離させた(チャンネルフロー: 0.8mL/分)。

【0123】

溶出された分子種を波長280nmで検出し、溶出分子種の濃度対時間を示すグラフに表示した。溶出プロファイルは、凝集していないタンパク質を有する主ピークと、より高い分子量の形態のタンパク質を表わしているいくつかのさらなるタンパク質のピークとを示した。対応する分子量はMALS検出器で計算した。

【0124】

10

20

30

【表3】

表3:

ステップ	差分 t [分]	時間 [分]	モード	X _{開始} [mL/分]	X _{終了} [mL/分]	FF [mL/分]
1	4.0	4.0	溶出	1.5	1.5	---
2	1.0	5.0	フォーカス	---	---	2.0
3	2.0	7.0	フォーカス+注入	---	---	2.0
4	1.0	8.0	フォーカス	---	---	2.0
5	32.0	40.0	溶出	1.5	1.5	---
6	10.0	50.0	溶出	1.5	0.2	---
7	10.0	60.0	溶出	0.2	0.2	---
8	10.0	70.0	溶出+注入	0.2	0.0	---
9	10.0	80.0	溶出+注入	0.0	0.0	---

10

20

【0125】

表4は、40 / 75 % 相対湿度で1か月間及び3か月間インキュベートされた表2のシリンジについての、溶出された分子種の合計ピーク面積に対する高分子量種のピーク面積の割合(%)を示している。特に明記されないかぎり、各試料は2連の計測で検査された。全ての他の温度(5 及び25 / 60 % 相対湿度)では、出発物質と比較して保管中に高分子量種の有意な増加は示されなかった。

【0126】

【表4】

表4:

条件	シリンジ	HMWS [%]	SD [%]
T0	S2	1.1	n.a. ^{*)}
	S6	1.1	n.a. ^{*)}
1M 40°C	S2	10.7	0.1
	S6	10.2	0.4
3M 40°C	S2	26.8	0.7
	S6	26.3	n.a. ^{*)}

*)1回のみ計測

30

40

【0127】

A F 4 - M A L S によって測定された H M W S の生成は、40 / 75 相対湿度で最大3か月間のインキュベーション中、2つのシリンジ S 2 (ガラスシリンジ) 及び S 6 (C O P) の間で非常に類似していた。高分子量種の同一性及び温度依存的な反応速度論の両方が、この2つの一次包装システムの間で類似していた。

50

【 0 1 2 8 】

[実施例 2 . 3 : 充填済みシリンジ中で保管されたアフリベルセプト製剤の S E C 分析]

シリンジのタンパク質試料を、アフリベルセプトの高分子量種を検出するために T S K g e l (登録商標) G 3 0 0 0 S W X L (東ソー (T o s o h) 、 3 0 0 × 7 . 8 m m 、 5 μ m) カラムに装荷した。

【 0 1 2 9 】

タンパク質は、25 にて 1 . 0 m L / 分の流量で 0 . 0 2 M のリン酸ナトリウム (p H 6 . 0) 及び 0 . 8 M の塩化ナトリウムを使用して、均一濃度溶離によって溶出させた。溶出された分子種 (s p e c i e s) を 2 1 4 n m の波長で検出し、溶出分子種の濃度対時間を示すグラフに表示した。溶出プロファイルは、凝集していないタンパク質を有する主ピークと、より高い分子量の形態のタンパク質を表わしているいくつかのさらなるタンパク質のピークとを示した。全てのピークの面積を測定した。表 5 は、表 2 のシリンジについて、溶出された分子種の合計ピーク面積に対する凝集体のピーク面積の割合 (%) を示す。各試料を 2 連の計測で検査した。

10

【 0 1 3 0 】

【表5】

表5:

条件	シリンジ	HMWS [%]	SD [%]
T0	S2	2.20	0.01
	S6	2.19	0.02
1M 5°C	S2	2.31	0.01
	S6	2.26	0.01
3M 5°C	S2	2.38	0.01
	S6	2.36	0.02
2W 25°C	S2	2.45	0.01
	S6	2.45	0.00
1M 25°C	S2	2.55	0.01
	S6	2.53	0.01
3M 25°C	S2	3.03	0.01
	S6	3.01	0.00
0.5M 40°C	S2	9.80	0.02
	S6	9.76	0.06
1M 40°C	S2	15.58	0.01
	S6	15.49	0.06
3M 40°C	S2	33.71	0.01
	S6	33.93	0.05

10

20

30

【0131】

SECによって測定されたHMWSの生成は、全てのインキュベーションパラメータ（温度、保管時間）にわたって、2つのシリンジS2（ガラスシリンジ）及びS6（COP）の間で非常に類似していた。高分子量種の同一性及び温度依存的な反応速度論の両方が、この2つの一次包装システムの間で類似していた。

40

【0132】

[実施例2.4：充填済みシリンジ中で保管されたアフリベルセプト製剤の非還元下SDS-PAGE分析]

非還元下SDS-PAGEにより、表2による様々なシリンジシステム中でのアフリベルセプトの断片化及びオリゴマー化のような物理的变化を測定した。

【0133】

SDS-PAGEは、4～12%トリス-グリシゲル中で非還元条件下にて実施した。試料を水で0.4mg/mlに予備希釈し、さらにSDS試料用バッファーで0.2m

50

g / m l に希釈した。該試料を 9 5 で 5 分間インキュベートした。

【 0 1 3 4 】

泳動後、ゲルを 1 0 0 m L の脱イオン水で 3 回すすぎ、クマシーを用いて室温で一晩染色した。脱色の後、ゲルを走査して Q u a n t i t y O n e ソフトウェアを使用して分析した。

【 0 1 3 5 】

泳動条件は以下すなわち：

電圧： 1 2 5 V

電流： 3 5 m A

電力： 5 W

時間： 1 3 0 分

とした。

【 0 1 3 6 】

非還元下 S D S - P A G E 分析は、上記に列挙されたすべての温度で 3 か月間インキュベートされた試料について実施した。5 での試料の保管は、全ての一次包装システムにおいてバンド生成パターンの有意な変化をもたらさず、新しい不純物バンドの生成又は既存の不純物バンドの有意な増加は、インキュベーション期間全体にわたっていずれのシリンジ材料においても検出不可能であった。2 5 / 6 0 % 相対湿度での試料の保管は、より強い不純物バンドをもたらし、4 0 / 7 5 % 相対湿度で 3 か月インキュベートされた試料の非還元下 S D S P A G E 分析の結果は図 3 に示されている。

【 0 1 3 7 】

4 0 / 7 5 相対湿度で 3 か月間インキュベートされた全ての試料の非還元下 S D S - P A G E 分析では、アフリベルセプトの断片及び高分子量種を表わすバンドが見て明らかであった。3 か月のインキュベーションの間の断片及び H M W S の生成は、反応速度論及び不純物の同一性において、表 2 に示された両方の一次包装システムで非常に類似していた。

【 0 1 3 8 】

[実施例 2 . 5 : 充填済みシリンジ中で保管されたアフリベルセプト製剤の I E F 分析]

等電点電気泳動法 (I E F) は、例えば脱アミド化によるその等電点の違いに起因する、アフリベルセプトの様々なアイソフォームを分離する。使用準備済み I E F ゲル (セルバ (S e r v a) のフォーカスゲル (F o c u s G e l) (p H 6 - 1 1) 、 N o . 4 3 3 2 9 . 0 1) は、ゲル内に p H 勾配を含有している。投入後、タンパク質はその総電荷により p H 勾配の中を、該タンパク質の等電点 (I E P 、 I P) と等しい p H に達するまで移動する。

【 0 1 3 9 】

アフリベルセプト試料を超純水で 0 . 5 m g / m l に希釈した。そのうち 1 0 μ l (5 μ g のアフリベルセプトに相当) をフォーカスゲルに投入した。各試料を 2 連として分析した。泳動後、タンパク質を、1 2 % (w / v) のトリクロロ酢酸及び 3 . 5 % の 5 - スルホサリチル酸二水和物 (w / v) を含有する溶液中で 6 0 分間固定し、脱イオン水で 3 回すすぎ、クマシーを用いて室温で一晩染色した。2 0 % エタノールを用いた脱色の後、ゲルをバイオラッド (B i o R a d) の G S 8 0 0 デンシトメータで走査して分析した。表 6 は電気泳動 (f o c u s i n g) 条件を示す。

【 0 1 4 0 】

10

20

30

40

【表 6】

表6:

段階	時間(分)	電力(W)	電流(mA)	電圧(V)
プレ電気泳動	20	10	50	1000
試料投入	30	10	30	500
等電点電気泳動	90	20	18	1500
鮮明化	30	25	15	2000

10

【 0 1 4 1 】

この I E F では、全ての温度で、1 か月間の保管後に全ての一次包装システムにおいて、基準物と比較したアフリベルセプトのバンド生成パターンの変化は検出不可能であった。3 か月後には、5 及び 2 5 / 6 0 % でインキュベートされた試料のみが基準に適合し、出発物質と比較して変質を示さなかった。4 0 / 7 5 % 相対湿度でインキュベートされた試料は、全ての試験した一次包装材料中で類似した酸性の分子種へのシフトを示し、表 2 に示された異なる一次包装材料に関しては、違いはなかった。

【 0 1 4 2 】

[実施例 2 . 6 : 充填済みシリンジ中で保管されたアフリベルセプト製剤の還元型ペプチドマッピング分析]

還元型ペプチドマッピングにより、脱アミド化及びメチオニン酸化に関するアフリベルセプトの純度を、トリプシン消化及び質量分析に連結された液体クロマトグラフィー (L C - M S) の後に分析した。

【 0 1 4 3 】

還元及びアルキル化の後、タンパク質を、トリプシンを用いる酵素的切断に供した。結果として生じるペプチドを R P - U P L C (登録商標) - M S によって分析した。クロマトグラフィーの間、移動相を極性のより高いもの (トリフルオロ酢酸を水に含めたもの) から極性のより低いもの (トリフルオロ酢酸をアセトニトリル中に含めたもの) へと変化させることによりペプチドを溶離させ、質量分析 (X e v o (登録商標) G 2 - X S Q T O F) によって分析した。ペプチドデータを処理し、酸化及び脱アミド化を検出するために理論上のタンパク質配列及び基準試料と比較した。

【 0 1 4 4 】

表 2 に示されたシリンジについて、5 、 2 5 / 6 0 % 相対湿度及び 4 0 / 7 5 相対湿度で 3 か月間のインキュベーションの後に単回計測として分析し、出発物質 t 0 と比較した。

【 0 1 4 5 】

試料を変性バッファー (5 0 m M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン) で 1 . 2 5 m g / m L のアフリベルセプト濃度に希釈した。希釈した試料のうち 8 0 μ l を 1 0 μ l の 0 . 5 % R a p i G e s t (商標) (ウォーターズ (W a t e r s) 製、5 0 m M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンに溶解) と混合し、9 5 で 5 分間インキュベートした。4 . 5 μ l の 0 . 0 2 M D T T (5 0 m M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンに溶解) を還元のために添加し、3 7 で 3 0 分間インキュベートした。アフリベルセプトの消化については、5 μ l の 1 m g / m L トリプシン溶液 (5 0 m M 酢酸に溶解) を添加し、3 7 でさらに 3 時間インキュベートした。この反応を、2 0 μ l の 2 % (v / v) トリフルオロ酢酸及び 3 7 で 3 0 分間のインキュベーションにより停止させた。上清を、ペプチドの分析用に 5 0 m M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンで 0 . 1 2 5 m g / m L に希釈した。

【 0 1 4 6 】

50

[U P L C のパラメータ]

シリンジ由来の消化されたタンパク質試料を、ウォーターズ製のアキュイティ (A C Q U I T Y) U P L C - C S H (商標) C - 1 8 カラム、1 0 0 m m × 2 . 1 m m、1 . 7 μ m に装荷した。消化された試料 0 . 2 5 μ g を、以下の表 7 に従った溶離剤 A (水)、溶離剤 B (アセトニトリル)、溶離剤 C (0 . 2 5 % トリフルオロ酢酸) 及び D (n - プロパノール) の勾配を用いて 6 5 で溶離させた。

【 0 1 4 7 】

【 表 7 】

表 7:

時間 [分]	溶離剤 A [%]	溶離剤 B [%]	溶離剤 C [%]	溶離剤 D [%]
0.0	89.0	1.0	10.0	0.0
2.5	89.0	1.0	10.0	0.0
5.0	80.0	8.0	10.0	2.0
50.0	57.5	26.0	10.0	6.5
52.0	0.0	72.0	10.0	18.0
54.0	0.0	72.0	10.0	18.0
56.0	89.0	1.0	10.0	0.0
60.0	89.0	1.0	10.0	0.0

10

20

【 0 1 4 8 】

[質量分析用の方法パラメータ]

イオン化法 :	E S I	極性 :	ポジティブ
分析器モード :	感度	実験タイプ :	M S
開始時質量 :	5 0 m / z	コーンガス流 :	3 0 L / h
終了時質量 :	2 0 0 0 m / z	脱溶媒和ガス流 :	1 0 0 0 L / h
ソース温度 :	1 2 0	走査時間 :	0 . 5 s
脱溶媒和温度 :	4 5 0	キャピラリー電圧 :	3 . 0 k V
コーン電圧 :	3 5 V		

30

[L o c k S p r a y (商標) のプロファイル]

基準化合物 :	ロイシンエンケファリン
M S ロックマス :	5 5 6 . 2 7 6 6 m / z
走査時間 :	0 . 5 s
間隔 :	3 0 s

40

アフリベルセプト中の 4 つの酸化したメチオニン残基をペプチド中に同定することができたが (1 : T 1 _ A S 2 0、1 : T 2 2、1 : T 2 8、1 : T 4 8)、これらを全体の酸化の評価のためにまとめた (表 8 を参照)。アフリベルセプトの 6 つの脱アミド化部位をペプチド中に同定することができたが (1 : T 1 0 _ A S 1 2 ; 1 : T 1 1 ; 1 : T 1 0 _ A S 1 2 ; 1 : T 1 2 _ A S 3 ; 1 : T 1 2 _ A S 3 ; 1 : T 3 0 _ A S 1 2 ; 1 : T 3 0 _ A S ? ; 1 : T 3 3 _ A S 1 4)、これらを全体の脱アミド化の評価のためにまとめた (表 8 を参照)。

【 0 1 4 9 】

【表 8】

表8:

条件	シリンジ	全体のメチオニン酸化 [%]	全体の脱アミド化 [%]
T0	S2	23.1	35.3
	S6	22.5	37.6
3M 5°C	S2	27.7	36.8
	S6	22.4	36.9
3M 25°C	S2	24.5	44.0
	S6	23.4	45.3
3M 40°C	S2	25.7	92.0
	S6	27.3	90.0

10

20

【 0 1 5 0 】

表 2 に示されたいずれのシリンジも、メチオニン酸化及び脱アミド化に関して同じ安定性を備えている。全ての温度条件において、メチオニン酸化の有意な増加はいずれのシリンジ材料（ガラス対 COP）においても検出不可能であったが、脱アミド化の増加は温度依存的であった。いずれのシリンジシステムも、安定性プログラムにおいて脱アミド化の同等な増加を伴っていた。

【 0 1 5 1 】

示された結果から、充填済みのプラスチック製シリンジ（シリンジ 6）の中の本発明のアフリベルセプト製剤の安定性は、試験した条件下ではガラス製シリンジ（シリンジ 2）の中の安定性と少なくとも同等であることが明白である。

30

【 0 1 5 2 】

実施例 3：第 2 組の安定度試験

[実施例 3 . 1 : 試料調製]

EU 市販品の E y l e a（登録商標）由来のアフリベルセプトを、3 ステップ透析により、3 つの異なる製剤であって表 9 に示されるように（a）10 mM ヒスチジン / 塩酸ヒスチジン、40 mM 塩化ナトリウム、5 %（w / v）スクロース、0 . 0 3 %（w / v）ポリソルベート 20、pH 6 . 2（b）10 mM ヒスチジン / 塩酸ヒスチジン、40 mM 塩化ナトリウム、5 %（w / v）スクロース、0 . 0 3 %（w / v）ポリソルベート 20、pH 6 . 5 及び（c）10 mM リン酸ナトリウム、40 mM 塩化ナトリウム、5 %（w / v）スクロース、0 . 0 3 %（w / v）ポリソルベート 20、pH 6 . 2 を含有している製剤中に移行させた。

40

【 0 1 5 3 】

透析されたアフリベルセプトを 40 mg / mL ± 10 % に調整し、ガラスバイアル中に 5 %、25 % / 60 % 相対湿度及び 40 % / 75 % 相対湿度で最大 3 か月間保管した。加えて、様々な製剤中のアフリベルセプトに、5 回の凍結 / 融解サイクルによってストレスをかけた。

【 0 1 5 4 】

EU 市販品の E y l e a（登録商標）を、対照試料（d）として安定性プログラムに含めた（表 9 を参照）。

50

【 0 1 5 5 】

【 表 9 】

表9:

試料	アフリベル セプト	緩衝液系	スクロース	塩化ナトリウム	ポリソルベート 20	pH
(a)	40 mg/mL	10 mM L-ヒスチジン/ ヒスチジン/HCl	5 % (w/v)	40 mM	0.03 % (w/v)	pH 6.2
(b)	40 mg/mL	10 mM L-ヒスチジン/ ヒスチジン/HCl	5 % (w/v)	40 mM	0.03 % (w/v)	pH 6.5
(c)	40 mg/mL	10 mM リン酸 二水素ナトリウ ム/ リン酸水素 二ナトリウム	5 % (w/v)	40 mM	0.03 % (w/v)	pH 6.2
(d)	Eylea [®]					

10

20

【 0 1 5 6 】

その後、表9の試料を、タンパク質濃度についてはUV - V i s法により、高分子量種 (H M W S) の存在についてはサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) により、断片及び H M W S の存在については還元 / 非還元下の硫酸ドデシルナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (S D S - P A G E) より、分析した。メチオニン酸化及び脱アミド化のような化学修飾は、還元型ペプチドマッピングにより定量した。二次構造の変化は F T I R 分析によってモニタリングした。試料中のアフリベルセプトの活性は、力価測定 E L L I S A (P o t e n c y E L I S A) により、またバイオレイヤー干渉法による F c R N への結合により、測定した。

30

【 0 1 5 7 】

[実施例 3 . 2 : U V - V i s 法]

安定性プログラム全体をとおして、タンパク質濃度 (2 8 0 n m での分光学的定量 ; n = 3) 及び外観 (目に見える粒子状物質、変色) の著しい変化はいずれの試料においても検出されなかった。

40

【 0 1 5 8 】

[実施例 3 . 3 : サイズ排除クロマトグラフィー]

安定性研究のタンパク質試料を、アフリベルセプトの高分子量種を検出するために T S K g e l (登録商標) G 3 0 0 0 S W X L (東ソー、3 0 0 × 7 . 8 m m 、 5 μ m) カラムに装荷した。

【 0 1 5 9 】

タンパク質を、0 . 0 2 M リン酸ナトリウム (p H 6 . 0) 及び 0 . 8 M 塩化ナトリウムを 2 5 、流量 1 . 0 m L / 分で使用して、均一濃度溶離によって溶離させた。溶出された分子種を 2 1 4 n m の波長で検出し、溶出分子種の濃度対時間を示すグラフに表示した。溶離プロファイルは、凝集していないタンパク質を有する主ピークと、より高い分子

50

量の形態のタンパク質を表わしているいくつかのさらなるタンパク質のピークとを示した。全てのピークの面積を測定した。表10は、表9の試料について、溶出された分子種の合計ピーク面積に対する凝集体のピーク面積の割合(%)を示す。各試料を2連の計測で検査し、平均値及び標準偏差を算出した。

【0160】

【表10】

表10:

条件	製剤	HMWS [%]	SD [%]
T0	(a)	1.46	0.00
	(b)	1.51	0.00
	(c)	1.50	0.00
	(d)	1.49	0.00
1M 5°C	(a)	1.49	0.00
	(b)	1.60	0.00
	(c)	1.49	0.01
	(d)	1.57	0.00
2M 5°C	(a)	1.59	0.04
	(b)	1.61	0.01
	(c)	1.51	0.00
	(d)	1.62	0.04
3M 5°C	(a)	1.58	0.01
	(b)	1.78	0.11
	(c)	1.66	0.00
	(d)	1.73	0.03
1M 25°C	(a)	1.63	0.01
	(b)	1.88	0.02
	(c)	1.81	0.01
	(d)	2.00	0.01

10

20

30

40

2M 25°C	(a)	2.03	0.00
	(b)	2.20	0.01
	(c)	2.13	0.01
	(d)	2.46	0.01
3M 25°C	(a)	2.30	0.07
	(b)	2.78	0.06
	(c)	2.32	0.06
	(d)	2.79	0.08
1M 40°C	(a)	13.18	0.00
	(b)	12.83	0.00
	(c)	13.32	0.00
	(d)	13.53	0.07
2M 40°C	(a)	24.69	0.02
	(b)	24.10	0.05
	(c)	24.39	0.11
	(d)	25.29	0.10
3M 40°C	(a)	29.77	0.13
	(b)	28.40	0.33
	(c)	29.19	0.34
	(d)	30.27	0.20

SECにより測定されるようなHMWSの生成は、全てのインキュベーションパラメータ（温度、保管時間）について様々な製剤の間で同等であった。高分子量種の同一性及び温度依存的な反応速度論の両方が、様々な試料の間で同等であった。

【0161】

[実施例3.4：非還元下SDS-PAGE]

非還元下SDS-PAGEを、各々の保管温度で3か月間保管された試料を用いて実施例2.4に記載の条件を使用して実施した。

【0162】

5 又は25 / 60%相対湿度での試料の保管は、全ての製剤においてバンド生成パターンの著明な変化をもたらさなかった。特に、新しい不純物バンド又は既存の不純物バンドの有意な増加は、全インキュベーション期間にわたって表9に示した全ての試料で検出不可能であった。40 / 75%相対湿度での試料の保管は、より低い温度で保管された試料と比較してより強い不純物バンドをもたらした。40 / 75%相対湿度で3か月

10

20

30

40

50

間インキュベートされた試料の還元下 SDS PAGE 分析の結果は、図 4 に示されている。全ての試料をゲル中の 2 連の計測として評価した。

【 0 1 6 3 】

40 / 75 % 相対湿度で 3 か月間インキュベートされた全試料の還元下 SDS - PAGE 分析では、アフリベルセプトの断片及び高分子量種を表わすバンドが見て明らかであった。3 か月のインキュベーション中の断片及び HMWS の生成は、表 9 に示された全ての試験した製剤の間で、反応速度論及び不純物の同一性において同等であった。

【 0 1 6 4 】

[実施例 3 . 5 : 還元下 SDS - PAGE]

還元下 SDS - PAGE によって、表 9 の様々な製剤におけるアフリベルセプトの断片化及びオリゴマー化のような物理的变化を測定した。

【 0 1 6 5 】

SDS - PAGE を、4 ~ 12 % トリス - グリシンゲルにて還元条件下で実施した。試料を水で 0 . 4 mg / ml に予備希釈し、DTT を含有する SDS 試料用バッファでさらに 0 . 2 mg / ml に希釈した。該試料を 95 で 5 分間インキュベートした。電気泳動後、ゲルを 100 mL の脱イオン水で 3 回すすぎ、クマシーを用いて室温で一晩染色した。脱色の後、ゲルを走査して Quantity One ソフトウェアを使用して分析した。

【 0 1 6 6 】

泳動条件は以下のとおり、すなわち：

電圧： 125 V

電流： 35 mA

電力： 5 W

時間： 200 分

とした。

【 0 1 6 7 】

還元下 SDS - PAGE を、各々の保管温度で 3 か月間保管された試料を用いて実施した。

5 又は 25 / 60 % 相対湿度での試料の保管は、全ての製剤においてバンド生成パターンの著明な変化をもたらさなかった。特に、新しい不純物バンドの生成又は既存の不純物バンドの有意な増加は、全インキュベーション期間にわたって表 9 に示した全ての試料で検出不可能であった。40 / 75 % 相対湿度での試料の保管は、より低い温度で保管された試料と比較してより強い不純物バンドをもたらした。これらの不純物バンドは、反応速度論及び不純物の同一性のいずれにおいても表 9 に示された全ての試験した製剤の間で同等であった。40 / 75 % 相対湿度で 3 か月間インキュベートされた試料の還元下 SDS PAGE 分析の結果は図 5 に示されている。

【 0 1 6 8 】

[実施例 3 . 6 : FTIR]

FTIR (フーリエ変換赤外分光法) 分光法は、タンパク質の二次構造についての情報を提供し、赤外線照射を用いた試料の励起及びタンパク質に吸収された波長の検出によって機能する。

【 0 1 6 9 】

タンパク質はそれぞれ、その赤外線スペクトルに固有の一連の吸収帯を有している。タンパク質及びポリペプチドの赤外線スペクトルに見出される特性吸収帯には、アミド I 及びアミド II 領域が挙げられる。これらは、タンパク質主鎖においてアミノ酸を連結するペプチド結合から生じている。二次構造の構成要素である α - ヘリックス及び β - シートをモニタリングするために、アミド I バンドをこのアッセイにおいて評価した。

【 0 1 7 0 】

安定性研究からの試料を、そのアフリベルセプトを含まない対応する製剤 (偽薬製剤) を用いて 10 mg / mL アフリベルセプトの濃度に希釈し、マイクロ・ビオリティクス (M

10

20

30

40

50

icro Biolytics)製のAquaSpec(商標)セルの中でブルカー・オブティクス(Bruker Optics)製のFTIR Tensor 27によって分析した。データ分析はOpus 6.5ソフトウェア(ブルカー・オブティクス)を用いて実施した。10回の計測を2.0 µlの注入量で実施し、二次微分スペクトルを1700 ~ 1600 cm⁻¹のアミドI吸収領域において分析した。アフリベルセプトを含まない製剤の分析はバックグラウンドの計測値としての役割を果たし、その信号をタンパク質のスペクトルから差し引いた。

【0171】

FTIRのためのデバイスの設定

分解能:	4 cm ⁻¹	10
試料の走査時間:	30 スキャン	
バックグラウンドの走査時間:	30 スキャン	
結果のスペクトル:	吸収度	
光源の設定:	MIR	
ビームスプリッタ:	KBr	
検出器の設定:	LN-MCT 光起電力型 12 H	
走査器速度:	20 kHz	
水バッチ (Water batch):	25	

表9に示されたアフリベルセプト含有製剤のFTIRによる二次構造に関する分析からは、安定性プログラム全体を通して変質は明らかにならなかった。全ての試料が約10%のらせん及び40%のシートという同等の一定した割合(%)を示した。

20

【0172】

[実施例3.7:還元型ペプチドマッピング]

還元型ペプチドマッピングによって、アスパラギン脱アミド化及びメチオニン酸化に関するアフリベルセプトの純度を、様々な温度で3か月間保管されたか又は5回の凍結/融解サイクルに供された表9の全ての製剤について分析した。分析の条件は実施例2.6で使用されたものと同じとした。

【0173】

アフリベルセプト中の5つの酸化したメチオニンを同定することができたが(AA20; AA163; AA192、AA237、AA413)、これらを全体のメチオニン酸化の評価のためにまとめた(表11を参照)。5つのアスパラギンの脱アミド化を同定することができたが(AA84; AA91; AA99; AA271; AA300)、これらを全体の脱アミド化の評価のためにまとめた(表11を参照)。

30

【0174】

【表 1 1】

表11:

条件	製剤	全体のメチオニン酸化 [%]	全体の脱アミド化 [%]
T0	(a)	22.1	33.3
	(b)	21.3	29.7
	(c)	25.1	31.0
	(d)	24.0	30.8
3M 5°C	(a)	23.6	32.4
	(b)	21.8	31.2
	(c)	24.1	32.4
	(d)	23.3	31.6
3M 25°C	(a)	24.3	40.0
	(b)	25.2	46.2
	(c)	27.1	39.2
	(d)	23.8	37.9
3M 40°C	(a)	27.4	87.6
	(b)	24.6	102.2
	(c)	29.5	87.1
	(d)	25.0	102.2
5 x F/T	(a)	21.1	32.4
	(b)	19.1	30.5
	(c)	24.4	34.1
	(d)	22.5	33.6

10

20

30

【 0 1 7 5】

表 9 に示された製剤は、メチオニン酸化及びアスパラギンの脱アミド化に関して同等の安定性を示した。全ての温度条件で、様々な製剤におけるメチオニン酸化のごく軽微な増加が検出されたが、脱アミド化の増加は著しく温度依存的であった。表 9 のアフリベルセプト含有製剤は全て、25 / 60 % 相対湿度又は 40 / 75 % 相対湿度で 3 か月間保管されたときに脱アミド化の同程度の増加を示した。凍結 / 融解は、全ての試験した製剤においてメチオニン酸化及びアスパラギン脱アミド化のいずれに対する影響も示さなかった。

40

【 0 1 7 6】

[実施例 3 . 8 : 相対的な力値]

アフリベルセプトの相対的な力値を、血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) へのアフリベ

50

ルセプトの結合に基づくELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）によって測定した。

【0177】

試験の試料は全て、Starting Block（商標）（PBS）ブロッキング・バッファー（サーモ・フィッシャー（Thermo Fisher）、No. 37538）を用いて1.7 pMアフリベルセプトのアッセイ濃度に希釈し、VEGF-A165（2.5 ng/mLのアッセイ濃度）と混合し、4 で一晩インキュベートした。100 μlの該試料を、抗VEGF抗体でコーティングされたマイクロタイタープレートに移した。中和されていないVEGFは、マイクロタイターウェル内にコーティングされた抗VEGF抗体に結合し、その一方でアフリベルセプト/VEGFの複合体はPBS/0.1%（w/v）ポリソルベート20を用いた3回の洗浄ステップ（各300 μl）によって除去された。マイクロタイタープレートを粘着性ホイルで密閉し、適度に振盪しながら室温で15分間インキュベートした。追加の洗浄ステップ（3×300 μlのPBS/0.1%（w/v）ポリソルベート20）の後、VEGFの結合を、ビオチン化ポリクローナル抗VEGF165抗体の添加（200 μg/mL溶液を100 μl）、密閉、暗所でさらに120分間のインキュベーションにより検出し、そしてストレプトアビジン-HRP（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）コンジュゲートを使用して3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）の酸化を介して視覚化した。比色定量反応は暗所で20分のインキュベーション後に硫酸と共に適度に振盪することにより停止させ、吸収をマイクロタイタープレート用の蛍光読取り装置（テカン（Tecan）のInfinite（登録商標）M200 Pro）を用いて450 nmの波長で計測し、アフリベルセプト標準品と比較した。

10

20

【0178】

試験の試料は全て2連として分析した。

5 及び25 / 60%相対湿度での3か月のインキュベーションの間、相対的な力値の有意な喪失は出発物質と比較した表9に示す全ての製剤において検出不可能であった。凍結/融解サイクルも、試験した製剤の各々においてアフリベルセプトの相対的な力値に影響を及ぼさなかった。40 / 75%相対湿度での3か月間のインキュベーションは、全ての製剤において相対的な力値の同程度の減少をもたらした。

【0179】

[実施例3.9：FcRNへの結合]

安定性アッセイの際の、胎児性Fc受容体（FcRn）と表9に示す製剤中のアフリベルセプトとの間の相互作用に関する、バイオレイヤー干渉法技術（ポール・フォルテバイオ（Pall-ForteBio）のOctet（登録商標）RED96）を使用した速度論的パラメータ（KD、 k_{on} 、 k_{dis} ）の評価は、同様の状況を示した。

30

【0180】

バイオレイヤー干渉法（BLI）は、生体分子相互作用を計測するための、標識を用いない技術である。同法は、2つの表面すなわちバイオセンサチップ上の固定化タンパク質の層及び内部基準層から反射された白色光の干渉縞を分析する光学的分析技法である。ニッケルでチャージされたトリス-NTA（ポール・フォルテバイオのNo. 18-5101）でコーティングされたNi-NTAバイオセンサの表面に固定化されたHISタグ付き胎児性Fc受容体（FcRn、シノバイオロジカル社（Sino Biological Inc.）のNo. CT009-H08H）と、アフリベルセプトとの間の結合は、バイオセンサチップにおける光学的厚さの増大を引き起こし、これが波長シフトをもたらし、この波長シフトは、生物学的な層の厚さの変化の直接的尺度であり、かつ結合特異性並びに会合及び解離の速さを測定する能力を提供する。

40

【0181】

表9の試料を、5 及び40 / 75%相対湿度で3か月のインキュベーションの後に分析し、出発物質と比較した。試料を、そのアフリベルセプトを含まない対応する製剤（偽薬製剤）を用いて10 mg/mLアフリベルセプトに希釈し、速度論用バッファー（DPBS/0.05%（w/v）BSA/0.02%（w/v）ポリソルベート20/0.

50

5 M塩化ナトリウム、pH 6.0)を用いてさらに0.704 $\mu\text{g/mL}$ 、0.352 $\mu\text{g/mL}$ 及び0.176 $\mu\text{g/mL}$ アフリベルセプトに希釈した。Ni-NTAバイオセンサーを200 μL の速度論用バッファーで水和した。各ウェルを、以下の表12のスキームに従って200 μL の速度論用バッファー、リガンド溶液及び被検体溶液で満たした。

【0182】

【表12】

表12:

	ベースライン	リガンド [mg/mL]	ベースライン2	ベースライン3+ 解離	アフリベルセプト [mg/mL]
	1/7	2/8	3/9	4/10	5/11
A	速度論用 バッファー	1.0	速度論用 バッファー	速度論用 バッファー	0.704
B	速度論用 バッファー	1.0	速度論用 バッファー	速度論用 バッファー	0.352
C	速度論用 バッファー	1.0	速度論用 バッファー	速度論用 バッファー	0.176
D	速度論用 バッファー	1.0	速度論用 バッファー	速度論用 バッファー	速度論用 バッファー

10

20

【0183】

行Dには、基準物としての役割を果たすように被検体の代わりに速度論用バッファーをピペットで注入した。

計測パラメータ:

* プレート温度: 30

* 振盪速度: 1000 rpm

* 取得速度: 標準的反應速度論 (5.0 Hz、20で平均化)。

【0184】

試料の信号を表13に従って記録した。

【0185】

【表13】

表13:

No.	ステップ	時間 [秒]	試料の列
1	ベースライン	300	1/7
2	装荷	600	2/8
3	ベースライン 2	150	3/9
4	ベースライン 3	150	4/10
5	会合	400	5/11
6	解離	2400	4/10

40

【0186】

データをOctetデータ分析ソフトウェアで分析して速度論的パラメータ K_D 、 k_o 。

50

n 及び k_{dis} 値を得た。

【 0 1 8 7 】

【 表 1 4 】

表14:

条件	製剤	K_D	k_{on}	k_{dis}
T0	(a)	1.18E-10 M	5.56E+05 1/M*s	6.56E-05 1/s
	(b)	1.06E-11 M	6.13E+05 1/M*s	6.47E-05 1/s
	(c)	1.07E-10 M	6.05E+05 1/M*s	6.44E-05 1/s
	(d)	9.93E-11 M	5.60E+05 1/M*s	5.56E-05 1/s
3M 5°C	(a)	9.80E-11 M	5.96E+05 1/M*s	5.84E-05 1/s
	(b)	9.23E-11 M	6.19E+05 1/M*s	5.71E-05 1/s
	(c)	1.03E-10 M	6.10E+05 1/M*s	6.28E-05 1/s
	(d)	9.68E-11 M	6.31E+05 1/M*s	6.11E-05 1/s
3M 40°C	(a)	9.05E-11 M	4.54E+05 1/M*s	4.11E-05 1/s
	(b)	5.91E-11 M	4.83E+05 1/M*s	2.86E-05 1/s
	(c)	5.91E-11 M	4.59E+05 1/M*s	2.71E-05 1/s
	(d)	6.09E-11 M	4.93E+05 1/M*s	3.00E-05 1/s

10

20

【 0 1 8 8 】

速度論的パラメータ (K_D 、 k_{on} 及び k_{off}) は、全ての製剤について 5 で 3 か月のインキュベーションの後も開始時の状態と同様であった。40 / 75 % 相対湿度で 3 か月間の試料の保管は、主として解離速度 k_{dis} の低下に起因する K_D の低下をもたらした。この低下は表 9 の全ての試験した製剤について同程度であった。

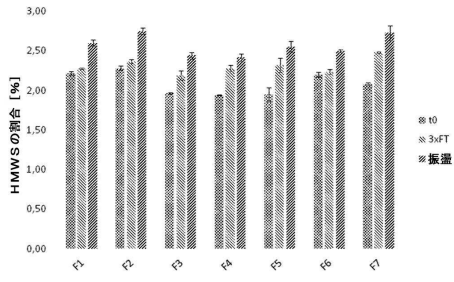
30

【 0 1 8 9 】

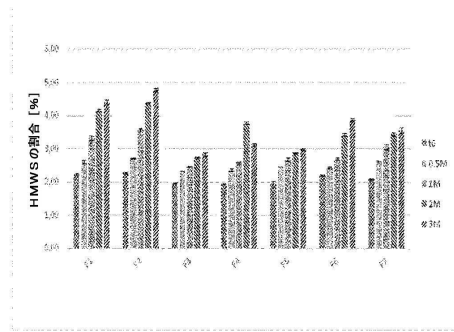
まとめると、5 、 25 / 60 % 相対湿度及び 40 / 75 % 相対湿度で 3 か月間保管されるか又は凍結 / 融解サイクルで処理されたとき、表 9 に示された製剤の間の有意差は物理的及び化学的安定性のいずれに関しても検出不可能であり、さらに生物学的活性における傾向も製剤間に違いはなかった。示された結果から、本発明のヒスチジン系製剤 (a 及び b) におけるアフリベルセプトの安定性は、試験した条件下において、リン酸緩衝液を用いる製剤 (c) 又は EU で市販される E y l e a (登録商標) の製剤中の安定性と、少なくとも同等である。

40

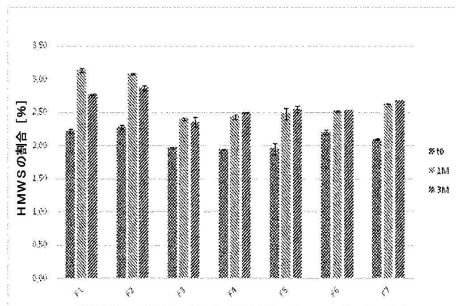
【図 1 a】



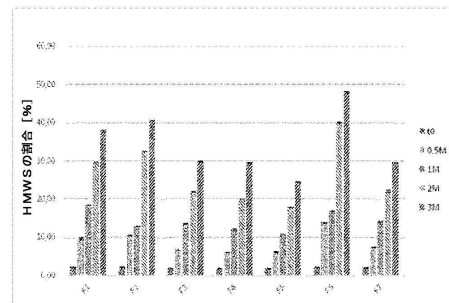
【図 1 c】



【図 1 b】

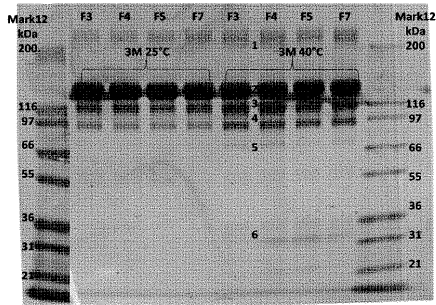


【図 1 d】



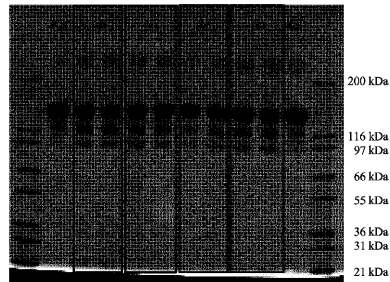
【図 2】

Figure 2



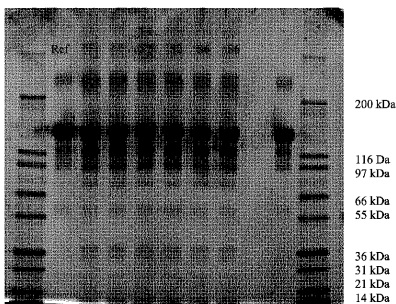
【図 4】

Figure 4



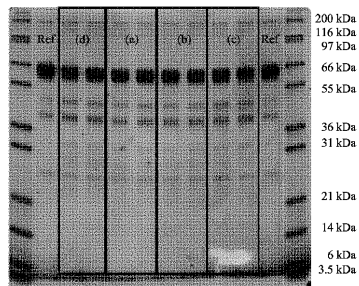
【図 3】

Figure 3



【図 5】

Figure 5



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K 9/08	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K 47/26	(2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K 47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/26	
A 6 1 K 47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K 38/17	(2006.01)	A 6 1 K	47/68	
		A 6 1 K	39/395	D
		A 6 1 K	38/17	

(72)発明者 ジーグル、ライナー
ドイツ連邦共和国 8 6 8 9 9 ランツベルク アム レヒ フィヒテンシュトラッセ 15アー

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 米国特許出願公開第2015/0157709 (US, A1)
特表2015-528454 (JP, A)
特表2008-535819 (JP, A)
国際公開第2014/203182 (WO, A1)
特表2015-519373 (JP, A)
特表2009-540001 (JP, A)
国際公開第2015/071348 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8