

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-510468

(P2012-510468A)

(43) 公表日 平成24年5月10日 (2012.5.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02 Z N A	4 C 0 7 6
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531 A	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 K 47/12	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 113 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-538673 (P2011-538673)	(71) 出願人	391008788
(86) (22) 出願日	平成21年11月24日 (2009.11.24)		アボット・ラボラトリーズ
(85) 翻訳文提出日	平成23年7月22日 (2011.7.22)		ABBOTT LABORATORIES
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/065714		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
(87) 国際公開番号	W02010/062896		パーク アボット パーク ロード 1 0
(87) 国際公開日	平成22年6月3日 (2010.6.3)		O
(31) 優先権主張番号	61/118, 528	(74) 代理人	110001173
(32) 優先日	平成20年11月28日 (2008.11.28)		特許業務法人川口国際特許事務所
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	コレイア, アイバン・アール
			アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1
			8 9 0、ウインチェスター、ポンド・スト
			リート・5 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定な抗体組成物およびこれを安定させるための方法

(57) 【要約】

本発明は、鉄が、ヒスチジンの存在下で、ヒンジ領域における切断のためラムダ軽鎖を含有する組換え完全ヒト I g G 分子の断片化の増大をもたらすという観察に基づいて、ラムダ軽鎖を含む免疫グロブリンの分画を阻害するための組成物および方法を提供する。本発明は、I L-1 2 / I L-2 3 の p 4 0 サブユニットに結合している抗体またはこの抗原結合部分を含みおよびヒスチジンを含む緩衝液系を含む水性医薬製剤を更に提供し、この製剤は、断片化に対する増強した耐性等の増強した安定性を有する。

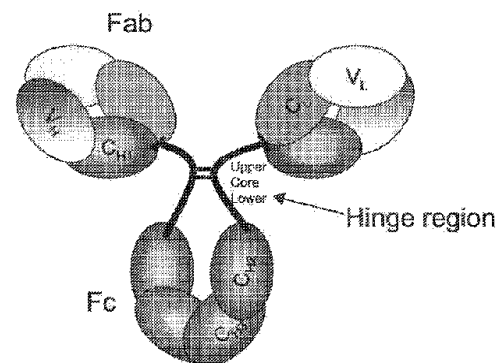


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒスチジン含有製剤におけるラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む分子の切断を阻害または防止するための方法であって、前記分子を切断する金属の能力を阻害または防止する段階を含む、方法。

【請求項 2】

阻害または防止が、製剤中に少なくとも 1 種の金属キレーターを含めることを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

阻害または防止が、濾過、緩衝液交換、クロマトグラフィーおよび樹脂交換から成る群から選択される少なくとも 1 つの手法に製剤を供することを含む、請求項 1 の方法。

10

【請求項 4】

濾過が、限外濾過および透析濾過から成る群から選択される、請求項 3 の方法。

【請求項 5】

緩衝液交換が、ヒスチジンを含む緩衝液、クエン酸塩およびリン酸塩を含む緩衝液ならびにイミダゾールを含む緩衝液から成る群から選択される緩衝液による透析を含む、請求項 3 の方法。

【請求項 6】

阻害または防止が、製剤中にクエン酸緩衝液またはリン酸緩衝液を含めることを含む、請求項 1 の方法。

20

【請求項 7】

阻害または防止が、ラムダ軽鎖における少なくとも 1 つのアミノ酸を改変することによって切断を阻害または防止することを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 8】

阻害または防止が、アミノ酸配列グルタミン酸－システイン－セリンが変化するようにラムダ鎖においてアミノ酸配列を改変することによって切断を阻害または防止することを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 9】

製剤が、約 10 mM のヒスチジンを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 10】

30

製剤が、約 1 – 100 mM のヒスチジンを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 11】

切断が、ラムダ鎖のヒンジ領域において起きる、請求項 1 の方法。

【請求項 12】

ラムダ軽鎖の少なくとも部分が、グルタミン酸－システイン－セリンのアミノ酸配列または抗体結合を阻害しない少なくとも 1 つの修飾を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 13】

切断が、グルタミン酸とシステインの間で起きる、請求項 12 の方法。

【請求項 14】

分子が、重鎖の少なくとも部分を含む、請求項 1 の方法。

40

【請求項 15】

重鎖の部分が、アミノ酸配列 S C D K または抗体結合を阻害しない少なくとも 1 つの修飾を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 16】

切断が、セリンとシステインの間で起きる、請求項 10 の方法。

【請求項 17】

切断が、システインとアスパラギン酸の間で起きる、請求項 10 の方法。

【請求項 18】

金属が Fe^{2+} である、請求項 1 の方法。

【請求項 19】

50

金属が Fe^{3+} である、請求項 1 の方法。

【請求項 20】

金属が Cu^{2+} である、請求項 1 の方法。

【請求項 21】

金属が Cu^{1+} である、請求項 1 の方法。

【請求項 22】

分子が、約 1 mg/ml から約 300 mg/ml の濃度範囲内で存在する、請求項 1 の方法。

【請求項 23】

分子が、約 2 mg/ml の濃度で存在する、請求項 1 の方法。

10

【請求項 24】

分子が、約 7 mg/ml の濃度で存在する、請求項 1 の方法。

【請求項 25】

分子が、約 100 mg/ml の濃度で存在する、請求項 1 の方法。

【請求項 26】

分子が免疫グロブリンである、請求項 1 の方法。

【請求項 27】

分子がモノクローナル抗体である、請求項 1 の方法。

【請求項 28】

分子が、DVD-Ig（商標）、Fab 断片、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 断片、キメラ抗体、CDR グラフト抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ジスルフィド連結 Fv、単ドメイン抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体および双特異性抗体から成る群から選択される、請求項 1 の方法。

20

【請求項 29】

分子が抗 IL-12/23 抗体である、請求項 1 の方法。

【請求項 30】

分子が J695 である、請求項 1 の方法。

【請求項 31】

分子が、抗 CD80 または抗 IGF1、2 抗体である、請求項 1 の方法。

【請求項 32】

切断が、約 2°C から約 25°C の温度で起きる、請求項 1 の方法。

30

【請求項 33】

切断が、約 2°C から約 8°C の温度で起きる、請求項 1 の方法。

【請求項 34】

切断が、約 4 から約 8 の pH で起きる、請求項 1 の方法。

【請求項 35】

切断が、約 5 から約 6 の pH で起きる、請求項 1 の方法。

【請求項 36】

阻害または防止が、pH を約 5 以下に低下させることを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 37】

少なくとも 1 種の金属キレーターが、クエン酸塩、シデロホア、カリクセレン、アミノポリカルボン酸、ヒドロキシアミノカルボン酸、N-置換グリシン、2-(2-アミノ-2-オキソエチル)アミノエタンスルホン酸 (BES)、二座、三座または六座鉄キレーター、ならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択される、請求項 2 の方法。

40

【請求項 38】

少なくとも 1 種の金属キレーターが、アエロバクチン、アグロバクチン、アゾトバクチン、バシリバクチン、N-(5-C3-L(5-アミノペンチル)ヒドロキシカルバモイル)-プロピオンアミド)ペンチル)-3-(5-(N-ヒドロキシアセトアミド)-ペンチル)カルバモイル)-プロプリオンヒドロキサム酸 (デフェロキサミン、デスフェリオキ

50

サミンまたはD F OもしくはD E F)、デスフェリチオシン、エンテロバクチン、エリスロバクチン、フェリクローム、フェリオキサミンB、フェリオキサミンE、フルビアバクチン、フサリニンC、ミコバクチン、パラバクチン、シュードバクチン、ビブリオバクチン、ブルニバクチン、イェルシニアバクチン、オルニバクチンならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択されるシデロホアである、請求項2の方法。

【請求項39】

金属キレーターがデスフェリオキサミンである、請求項38の方法。

【請求項40】

少なくとも1種の金属キレーターが、クエン酸塩である、請求項2の方法。

【請求項41】

少なくとも1種の金属キレーターが、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ニトリロ三酢酸(NTA)、トランス-ジアミノシクロヘキサン四酢酸(DCTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、N-2-アセトアミド-2-イミノ二酢酸(ADA)、アスパラギン酸、ビス(アミノエチル)グリコールエーテルN, N, N'-N'-四酢酸(EGTA)、グルタミン酸およびN, N'-ビス(2-ヒドロキシベンジル)エチレンジアミン-N, N'-二酢酸(HBED)ならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択されるアミノポリカルボン酸である、請求項2の方法。

【請求項42】

少なくとも1種の金属キレーターが、N-ヒドロキシエチルイミノ二酢酸(HIMDA)、N, N'-ビスヒドロキシエチルグリシン(ビシン)およびN-(トリスヒドロキシメチルメチル)グリシン(トリシン)ならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択されるヒドロキシアミノカルボン酸である、請求項2の方法。

【請求項43】

少なくとも1種の金属キレーターが、N-置換グリシンまたはこの誘導体、類似体もしくは組み合わせである、請求項2の方法。

【請求項44】

N-置換グリシンが、グリシルグリシンならびにこの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択される、請求項43の方法。

【請求項45】

少なくとも1種の金属キレーターが、2-(2-アミノ-2-オキソエチル)アミノエタンスルホン酸(BES)ならびにこの誘導体、類似体および組み合わせである、請求項2の方法。

【請求項46】

少なくとも1種の金属キレーターが、DTPAおよびDEFの組み合わせを含む、請求項2の方法。

【請求項47】

少なくとも1種の金属キレーターが、EDTA、EGTAおよびDEFの組み合わせを含む、請求項2の方法。

【請求項48】

少なくとも1種の金属キレーターが、フェノールおよびアルデヒドのヒドロキシアルキル化生成物に基づく大環状または環状オリゴマー、ならびにこの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択されるカリックスアレーンである、請求項2の方法。

【請求項49】

少なくとも1種の金属キレーターが、ヒドロキシピリジン誘導体、ヒドラゾン誘導体およびヒドロキシフェニル誘導体またはニコチニル誘導体、例えば、1,2-ジメチル-3-ヒドロキシピリジン-4-オン(Deferriprone、DFPまたはFerriprox)、2-デオキシ-2-(N-カルバモイルメチル-[N'-2'-メチル-3'-ヒドロキシピリジン-4'-オン])-D-グルコピラノース(Feralex-G)、ピリドキサルイソニコチニルヒドラゾン(PIH)、4,5-ジヒドロ-2-(2,4-ジヒドロキシフェニル)-4-メチルチアゾール-4-カルボン酸(GT56-25

10

20

30

40

50

2)、4-[3,5-ビス(2-ヒドロキシフェニル)-[1,2,4]トリアゾール-1-イル]安息香酸(ICL-670)、N,N'-ビス(o-ヒドロキシベンジル)エチレンジアミン-N,N'-二酢酸(HBED)、5-クロロ-7-ヨード-キノリン-8-オール(クリオキノール)ならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせである、請求項2の方法。

【請求項50】

少なくとも1種の金属キレーターが、トリエチレンテトラミン(トリエンチン)、テトラエチレンペンタミン、D-ペニシラミン、エチレンジアミン、ビスピリジン、フェナントロリン、バソフェナントロリン、ネオクプロイン、バトクプロインスルフォネート、クプリゾン、シス、シス-1,3,5-トリアミノシクロヘキサン(TACH)、Tachpyrならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択される銅キレーターである、請求項2の方法。

10

【請求項51】

製剤が、アミノ酸、糖、糖アルコール、緩衝液、塩および界面活性剤から成る群から選択される少なくとも1種の更なる賦形剤を含む、請求項1の方法。

【請求項52】

製剤が、約1から約60mg/mlのマニトール、約1から約50mMのメチオニン、約0.001%から約0.5%(w/v)のポリソルベート80、約0.001%から約1%(w/v)のポリオキサマー188、約1から約150mMの塩化ナトリウム、約1から約30mMの酢酸塩、約1から約30mMのクエン酸塩、約1から約30mMのリン酸塩および約1から約30mMのアルギニンから成る群から選択される少なくとも1種の更なる賦形剤を含む、請求項1の方法。

20

【請求項53】

製剤中に少なくとも1種の金属キレーターを含める段階および切断について分子の少なくとも部分を分析する段階を含む、ヒスチジン含有製剤においてラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む分子の切断を検出するための方法。

【請求項54】

ラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む分子と、ヒスチジンを含む緩衝液系とを含み、実質的に金属を含まない安定な製剤。

【請求項55】

金属がFe²⁺またはFe³⁺である、請求項54の製剤。

30

【請求項56】

金属がCu²⁺またはCu¹⁺である、請求項54の製剤。

【請求項57】

製剤が、濾過、緩衝液交換、クロマトグラフィーおよび樹脂交換から成る群から選択される少なくとも1つの手法に供した後で金属を実質的に含まない、請求項54の製剤。

【請求項58】

緩衝液交換が、ヒスチジンを含む緩衝液、クエン酸塩およびリン酸塩を含む緩衝液ならびにイミダゾールを含む緩衝液から成る群から選択される緩衝液による透析を含む、請求項57の製剤。

40

【請求項59】

金属が、約5,060ppb未満、約1,060ppb未満、約560ppb未満、約310ppb未満、約160ppb未満、約110ppb未満および約70ppb未満から成る群から選択される濃度で存在する、請求項54の製剤。

【請求項60】

金属が、約160ppb未満の濃度で存在する、請求項59の製剤。

【請求項61】

金属が、約70ppb未満の濃度で存在する、請求項59の製剤。

【請求項62】

ポリオールおよび界面活性剤から成る群から選択される少なくとも1種の更なる賦形剤

50

を更に含む、請求項 54 の製剤。

【請求項 63】

安定剤を更に含む、請求項 62 の製剤。

【請求項 64】

マンニトール、ポリソルベート 80 およびメチオニンを更に含む、請求項 54 の製剤。

【請求項 65】

緩衝液系が、クエン酸塩またはリン酸塩を更に含む、請求項 54 の製剤。

【請求項 66】

pH が約 5 以下である、請求項 54 の製剤。

【請求項 67】

(a) 1-10% のマンニトール、
(b) 0.001%-0.1% のポリソルベート 80、
(c) 5 から 7 の pH を有する 1-100 mM のヒスチジンおよび 1-50 mM のメチオニンを含む緩衝液系
を含む、請求項 64 の製剤。

10

【請求項 68】

(a) 2-6% のマンニトール、
(b) 0.005-0.05% のポリソルベート 80、
(c) 5 から 7 の pH を有する 5-50 mM のヒスチジンおよび 5-20 mM のメチオニンを含む緩衝液系
を含む、請求項 64 の製剤。

20

【請求項 69】

(a) 約 4% のマンニトール、
(b) 約 0.01% のポリソルベート 80、
(c) 約 6 の pH を有する約 10 mM のヒスチジンおよび約 10 mM のメチオニンを含む緩衝液系
を含む、請求項 64 の製剤。

【請求項 70】

分子が、モノクローナル抗体またはこの抗原結合部分である、請求項 54 から 69 のいずれか一項の製剤。

30

【請求項 71】

抗体またはこの抗原結合部分の濃度が、約 1 から約 250 mg/ml の間である、請求項 70 の製剤。

【請求項 72】

抗体またはこの抗原結合部分の濃度が、約 40 から約 200 mg/ml の間である、請求項 70 の製剤。

【請求項 73】

抗体またはこの抗原結合部分の濃度が、約 100 mg/ml である、請求項 70 の製剤。

【請求項 74】

抗体が、IL-12/IL-23 の p40 サブユニットのエピトープに結合し得るヒト抗体またはこの抗原結合部分である、請求項 70 の製剤。

40

【請求項 75】

ヒト抗体が、抗体 J695 またはこの抗原結合部分である、請求項 74 の製剤。

【請求項 76】

少なくとも 24 ヶ月間の貯蔵寿命を有する、請求項 74 または 75 の製剤。

【請求項 77】

少なくとも 5 回の製剤の凍結融解サイクルの後で安定性を維持する、請求項 74 または 75 の製剤。

【請求項 78】

50

更なる薬剤を更に含む、請求項 7 4 または 7 5 の製剤。

【請求項 7 9】

更なる薬剤が治療剤である、請求項 7 8 の製剤。

【請求項 8 0】

治療剤が、ブデノシド、上皮成長因子、コルチコステロイド、サイクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチレート、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、メトロニダゾール、リボキシゲナーゼ阻害剤、メサラミン、オルサラジン、バルサラジド、抗酸化剤、トロンボキサン阻害剤、IL-1 受容体アンタゴニスト、抗 IL-1 β モノクローナル抗体、抗 IL-6 モノクローナル抗体、成長因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニルイミダゾール化合物、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGF および PDGF の抗体またはアゴニスト、CD 2、CD 3、CD 4、CD 8、CD 25、CD 28、CD 30、CD 40、CD 45、CD 69、CD 90 またはこれらのリガンドに対する抗体、メトトレキサート、FK 506、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、レフルノミド、NSAID、イブプロフェン、プレドニゾロン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作動剤、IRAK、NIK、IKK、p 38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TNF α 変換酵素阻害剤、T 細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体、可溶性 p 55 TNF 受容体、可溶性 p 75 TNF 受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗炎症性サイトカイン、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 および TGF β から成る群から選択される、請求項 7 9 の製剤。

10

20

【請求項 8 1】

治療剤が、抗 TNF 抗体およびこの抗体断片、TNFR-Ig 構築物、TACE 阻害剤、PDE 4 阻害剤、コルチコステロイド、ブデノシド、デキサメタゾン、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸、オルサラジン、IL-1 β 変換酵素阻害剤、IL-1ra、チロシンキナーゼ阻害剤、6-メルカプトプリンおよび IL-11 から成る群から選択される、請求項 7 9 の製剤。

【請求項 8 2】

治療剤が、メチルプレドニゾロン、シクロホスファミド、4-アミノピリジン、チザニジン、インターフェロン- β 1a、インターフェロン- β 1b、コポリマー 1、高圧酸素、静脈内免疫グロブリン、クラプリビン、TACE 阻害剤、キナーゼ阻害剤、sIL-13R、抗 P 7 および p-セレクチン糖タンパク質リガンド (PSGL) から成る群から選択される、請求項 7 9 の製剤。

30

【請求項 8 3】

金属の存在下でヒンジ領域内において切断されない、ラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む分子と、イミダゾールを含む緩衝液系と、金属とを含む安定な製剤。

【請求項 8 4】

ヒンジ領域内において切断されない、または金属キレーターの非存在下で観察された切断のレベル未満のレベルでヒンジ領域内において切断される、ラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む分子と、ヒスチジンを含む緩衝液系と、金属キレーターとを含む安定な製剤。

40

【請求項 8 5】

金属が、Fe²⁺ または Fe³⁺ である、請求項 8 3 または 8 4 の製剤。

【請求項 8 6】

金属が、Cu²⁺ または Cu¹⁺ である、請求項 8 3 または 8 4 の製剤。

【請求項 8 7】

金属キレーターが、シデロホア、カリクセレン、アミノポリカルボン酸、ヒドロキシアミノカルボン酸、N-置換グリシン、2-(2-アミノ-2-オキシエチル)アミノエタンスルホン酸 (BES)、二座、三座または六座鉄キレーター、銅キレーター、クエン酸塩、ならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択される、請求

50

項 8 4 の製剤。

【請求項 8 8】

金属キレーターがデスフェリオキサミンである、請求項 8 7 の製剤。

【請求項 8 9】

ポリオールおよび界面活性剤から成る群から選択される少なくとも 1 種の更なる賦形剤を更に含む、請求項 8 3 または 8 4 の製剤。

【請求項 9 0】

安定剤を更に含む、請求項 8 9 の製剤。

【請求項 9 1】

マンニトール、ポリソルベート 8 0 およびメチオニンを更に含む、請求項 8 4 の製剤。

10

【請求項 9 2】

緩衝液系が、クエン酸塩またはリン酸塩を更に含む、請求項 8 4 の製剤。

【請求項 9 3】

製剤の pH が約 5 以下である、請求項 8 3 または 8 4 の製剤。

【請求項 9 4】

(a) 1 - 1 0 % のマンニトール、
(b) 0 . 0 0 1 % - 0 . 1 % のポリソルベート 8 0 、
(c) 5 から 7 の pH を有する 1 - 1 0 0 m M のヒスチジンおよび 1 - 5 0 m M のメチオニンを含む緩衝液系
を含む、請求項 9 1 の製剤。

20

【請求項 9 5】

(a) 2 - 6 % のマンニトール、
(b) 0 . 0 0 5 - 0 . 0 5 % のポリソルベート 8 0 、
(c) 5 から 7 の pH を有する 5 - 5 0 m M のヒスチジンおよび 5 - 2 0 m M のメチオニンを含む緩衝液系
を含む、請求項 9 1 の製剤。

【請求項 9 6】

(a) 約 4 % のマンニトール、
(b) 約 0 . 0 1 % のポリソルベート 8 0 、
(c) 約 6 の pH を有する約 1 0 m M のヒスチジンおよび約 1 0 m M のメチオニンを含む緩衝液系
を含む、請求項 9 1 の製剤。

30

【請求項 9 7】

分子が、モノクローナル抗体またはこの抗原結合部分である、請求項 8 4 から 9 6 のいずれか一項の製剤。

【請求項 9 8】

抗体またはこの抗原結合部分の濃度が、約 1 から約 2 5 0 m g / m l の間である、請求項 9 7 の製剤。

【請求項 9 9】

抗体またはこの抗原結合部分の濃度が、約 4 0 から約 2 0 0 m g / m l の間である、請求項 9 7 の製剤。

40

【請求項 1 0 0】

抗体またはこの抗原結合部分の濃度が、約 1 0 0 m g / m l である、請求項 9 7 の製剤。

【請求項 1 0 1】

抗体が、I L - 1 2 / I L - 2 3 の p 4 0 サブユニットのエピトープに結合し得るヒト抗体またはこの抗原結合部分である、請求項 9 7 の製剤。

【請求項 1 0 2】

ヒト抗体が、抗体 J 6 9 5 またはこの抗原結合部分である、請求項 1 0 1 の製剤。

【請求項 1 0 3】

50

少なくとも24ヵ月間の貯蔵寿命を有する、請求項101または102の製剤。

【請求項104】

少なくとも5回の製剤の凍結融解サイクルの後で安定性を維持する、請求項101または102の製剤。

【請求項105】

更なる薬剤を更に含む、請求項101または102の製剤。

【請求項106】

更なる薬剤が治療剤である、請求項105の製剤。

【請求項107】

治療剤が、ブデノシド、上皮成長因子、コルチコステロイド、サイクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチレート、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、メトロニダゾール、リボキシゲナーゼ阻害剤、メサラミン、オルサラジン、バルサラジド、抗酸化剤、トロンボキサン阻害剤、IL-1受容体アンタゴニスト、抗IL-1βモノクローナル抗体、IL-1受容体抗体、抗IL-6モノクローナル抗体、IL-6受容体抗体、成長因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニル-イミダゾール化合物、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、EMAP-I I、GM-CSF、FGFおよびPDGFの抗体またはアゴニスト、CD2、CD3、CD4、CD8、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはこれらのリガンドに対する抗体、メトトレキサート、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、レフルノミド、NSAID、イブプロフェン、プレドニゾロン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、S1P1アゴニスト、bc1-2阻害剤、補体阻害剤、アドレナリン作動剤、IRAK、NIK、IKK、p38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1β変換酵素阻害剤、TNFα変換酵素阻害剤、T細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体、可溶性p55 TNF受容体、可溶性p75 TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗炎症性サイトカイン、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGFβから成る群から選択される、請求項106の製剤。

【請求項108】

治療剤が、抗TNF抗体およびこの抗体断片、TNFR-Ig構築物、TACE阻害剤、PDE4阻害剤、コルチコステロイド、ブデノシド、デキサメタゾン、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸、オルサラジン、IL-1β変換酵素阻害剤、IL-1ra、チロシンキナーゼ阻害剤、6-メルカプトプリンおよびIL-11から成る群から選択される、請求項106の製剤。

【請求項109】

治療剤が、メチルプレドニゾロン、シクロホスファミド、4-アミノピリジン、チザニジン、インターフェロンβ1a、インターフェロンβ1b、コポリマー1、高圧酸素、静脈内免疫グロブリン、クラブリビン、TACE阻害剤、キナーゼ阻害剤、sIL-13R、抗P7およびp-セレクチン糖タンパク質リガンド(PSGL)から成る群から選択される、請求項106の製剤。

【請求項110】

金属がヒスチジンの存在下でラムダ軽鎖の切断をもたらさない濃度で存在する、約5から約7のpHを有するヒスチジンを含む緩衝溶液中にラムダ軽鎖を含む治療上有効量の抗体を含む、安定な製剤。

【請求項111】

切断が、ラムダ鎖のヒンジ領域において起こる、請求項110の製剤。

【請求項112】

金属が、Fe²⁺またはFe³⁺である、請求項110の製剤。

【請求項113】

金属が、Cu²⁺またはCu¹⁺である、請求項110の製剤。

10

20

30

40

50

【請求項 114】

金属が、約 5, 060 ppb 未満、約 1, 060 ppb 未満、約 560 ppb 未満、約 310 ppb 未満、約 160 ppb 未満、約 110 ppb 未満および約 70 ppb 未満から成る群から選択される濃度で存在する、請求項 110 の製剤。

【請求項 115】

金属が、約 160 ppb 未満の濃度で存在する、請求項 110 の製剤。

【請求項 116】

金属が、約 70 ppb 未満の濃度で存在する、請求項 110 の製剤。

【請求項 117】

ポリオールおよび界面活性剤から成る群から選択される少なくとも 1 種の更なる賦形剤を含む、請求項 110 の製剤。 10

【請求項 118】

安定剤を更に含む、請求項 117 の製剤。

【請求項 119】

マンニトール、ポリソルベート 80 およびメチオニンを更に含む、請求項 110 の製剤。

【請求項 120】

緩衝溶液が、リン酸塩またはクエン酸塩を更に含む、請求項 110 の製剤。

【請求項 121】

pH が約 5 以下である、請求項 110 の製剤。 20

【請求項 122】

抗体が、IL-12 / IL-23 の p40 サブユニットのエピトープに結合し得るヒト抗体またはこの抗原結合部分である、請求項 110 の製剤。

【請求項 123】

ヒト抗体またはこの抗原結合部分が、Y61 および J695 から成る群から選択される抗体が結合する IL-12 / IL-23 の p40 サブユニットのエピトープに結合する、請求項 122 の製剤。

【請求項 124】

ヒト抗体が、抗体 J695 またはこの抗原結合部分である、請求項 123 の製剤。

【請求項 125】

少なくとも 24 ヶ月間の貯蔵寿命を有する、請求項 110 から 124 のいずれか一項の製剤。 30

【請求項 126】

少なくとも 5 回の製剤の凍結融解サイクルの後で安定性を維持する、請求項 110 から 124 のいずれか一項の製剤。

【請求項 127】

(a) IL-12 / IL-23 の p40 サブユニットのエピトープに結合する 1-250 mg/ml のヒト抗体、

(b) 1-10 % のマンニトール、

(c) 0.001 % - 0.1 % のポリソルベート 80、 40

(d) 1-50 mM のメチオニン、および

(e) 5 から 7 の pH を有する 1-100 mM のヒスチジンを含み、金属を実質的に含まない水性医薬製剤。

【請求項 128】

金属が、約 5, 060 ppb 未満、約 1, 060 ppb 未満、約 560 ppb 未満、約 310 ppb 未満、約 160 ppb 未満、約 110 ppb 未満および約 70 ppb 未満から成る群から選択される濃度で存在する、請求項 127 の製剤。

【請求項 129】

金属が、約 160 ppb 未満の濃度で存在する、請求項 128 の製剤。

【請求項 130】

金属が、約 70 p p b 未満の濃度で存在する、請求項 128 の製剤。

【請求項 131】

ヒト抗体またはこの抗原結合部分が、Y61 および J695 から成る群から選択される抗体が結合する IL-12 / IL-23 の p40 サブユニットのエピトープに結合する、請求項 127 の製剤。

【請求項 132】

ヒト抗体が、抗体 J695 またはこの抗原結合部分である、請求項 131 の製剤。

【請求項 133】

少なくとも 24 ヶ月間の貯蔵寿命を有する、請求項 127 から 132 のいずれか一項の製剤。

10

【請求項 134】

少なくとも 5 回の製剤の凍結融解サイクルの後で安定性を維持する、請求項 127 から 132 のいずれか一項の製剤。

【請求項 135】

(a) IL-12 / IL-23 の p40 サブユニットのエピトープに結合する約 100 mg / ml のヒト抗体、

(b) 約 4 % のマンニトール、

(b) 約 0.01 % のポリソルベート 80、

(c) 約 10 mM のメチオニン、および

(d) 約 6 の pH を有する 10 mM のヒスチジンを含む、水性医薬製剤。

20

【請求項 136】

ヒト抗体またはこの抗原結合部分が、Y61 および J695 から成る群から選択される抗体が結合する IL-12 / IL-23 の p40 サブユニットのエピトープに結合する、請求項 135 の製剤。

【請求項 137】

ヒト抗体が、抗体 J695 またはこの抗原結合部分である、請求項 136 の製剤。

【請求項 138】

金属を実質的に含まない、請求項 135 から 137 のいずれか一項の製剤。

【請求項 139】

金属キレーターを更に含む、請求項 135 から 137 のいずれか一項の製剤。

30

【請求項 140】

金属が、約 5,060 p p b 未満、約 1,060 p p b 未満、約 560 p p b 未満、約 310 p p b 未満、約 160 p p b 未満、約 110 p p b 未満および約 70 p p b 未満から成る群から選択される濃度で存在する、請求項 135 の製剤。

【請求項 141】

金属が、約 160 p p b 未満の濃度で存在する、請求項 140 の製剤。

【請求項 142】

金属が、約 70 p p b 未満の濃度で存在する、請求項 140 の製剤。

【請求項 143】

少なくとも 24 ヶ月間の貯蔵寿命を有する、請求項 135 から 137 のいずれか一項の製剤。

40

【請求項 144】

少なくとも 5 回の製剤の凍結融解サイクルの後で安定性を維持する、請求項 135 から 137 のいずれか一項の製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への参照)

本出願は、2008 年 11 月 28 日に提出した米国仮出願第 61 / 118,528 号の

50

優先権を主張するものであり、その内容は参照により本明細書に組み込まれている。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

インターロイキン12 (IL-12) および関連するサイトカインIL-23は、共通のp40サブユニットを共有するサイトカインのIL-12スーパーファミリーのメンバーである (Andersonら (2006) Springer Semin. Immunopathol. 27:425-42)。IL-12は、Th1細胞の分化および後続のインターフェロンガンマの分泌を主に刺激するのに対して、IL-23は、ナイーブT細胞からIL-17 (炎症誘発性媒介物質) を分泌するエフェクターヘルパーT細胞 (Th17) への分化を優先的に刺激する (RosmarinおよびStrober (2005) J. Drugs Dermatol. 4:318-25、Harringtonら (2005) Nature Immunol. 6:1123-32、Parkら (2005) Nature Immunol. 6:1132-41)。

10

【0003】

ヒトインターロイキン12 (IL-12) は、固有の構造および多面的効果を有するサイトカインである (Kobayashiら (1989) J. Exp. Med. 170:827-845、Sederら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:10188-92、Lingら (1995) J. Exp. Med. 154:116-127、Podlaskiら (1992) Arch. Biochem. Biophys. 294:230-237)。IL-12は、35kDaサブユニット (p35) および40kDaサブユニット (p40) の両方がジスルフィド架橋によって連結された (「p70サブユニット」と称される) ヘテロダイマータンパク質である。ヘテロダイマータンパク質は、単球、マクロファージおよび樹状細胞等の抗原提示細胞によって主に産生される。これらの細胞型は、p70サブユニットに比べて過剰のp40サブユニットをも分泌する。p40サブユニットおよびp35サブユニットは、遺伝子的に無関係であり、いずれも生物学的活性を持たないことが報告されているが、p40ホモダイマーはIL-12アンタゴニストとして機能することができる。IL-12は、免疫応答および炎症反応に関与する幾つかの疾患に伴う病状において重要な役割を果たす。IL-12、その生物学的活性および疾患におけるその役割の総説は、Gatelyら (1998) Ann. Rev. Immunol. 16:495-521において見出され得る。

20

30

【0004】

機能的に、IL-12は、自己免疫障害の開始および進行を司る抗原特異的ヘルパーT型 (Th1) および2型 (Th2) リンパ球のバランスを調節する上で中心的な役割を果たしており、Th1リンパ球の分化および成熟の調節において重要である。Th1細胞によって放出されたサイトカインは炎症性であり、インターフェロン γ (IFN γ 、IL-2およびリンホトキシン (LT) が含まれる。Th2細胞は、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10およびIL-13を分泌し、液性免疫、アレルギー性反応および免疫抑制を助長する。

【0005】

ヒトインターロイキン23 (IL-23) は、19kDaサブユニット (p19) および共通の40kDaサブユニット (p40) がジスルフィド架橋によって連結されたヘテロダイマータンパク質である。IL-12と同様に、IL-23は、単球、マクロファージおよび樹状細胞等の抗原提示細胞によって主に産生される。IL-23の主な役割は、サイトカインIL-17を産生するための (IL-17T細胞またはTh17とも称される) CD4+T細胞のサブセットの刺激を含む。IL-17もまた、内皮細胞およびマクロファージによる炎症誘発性サイトカインの産生を誘発する自己免疫性炎症の確立および永続化における重要な成分である (Kastelleinら (2007) Annu. Rev. Immunol. 25:221-42)。

40

【0006】

50

自己免疫疾患においてTh1応答が優勢であることならびにIFN γ およびIL-17の炎症誘発性活性に合致して、IL-12およびIL-23は、例えば、関節リウマチ(RA)、多発性硬化症(MS)、乾癬、インスリン依存型糖尿病およびクローン病(CD)等の多くの自己免疫疾患および炎症性疾患に伴う病状において主要な役割を果たす。

【0007】

健康な対照と比較して、IL-12p70の上昇したレベルが、RA患者の滑液において検出されている(Moritaら(1998) *Arthritis and Rheumatism* 41:306-314)。RA滑液におけるサイトカインメッセンジャーリボ核酸(mRNA)発現のプロファイルにより、主にTh1サイトカインが同定された。(Buchtaら(1996) *Clin. Exp. Immunol.* 103:347-367)。IL-23のp19サブユニットまたはIL-12/23のp40サブユニットを欠失している遺伝子標的化マウスを用いて、IL-23がコラーゲン誘導関節炎の発生にとって重要であることが示された(Murphyら、(2003) *J. Exp. Med.* 198(12):1951-1957)。

【0008】

ヒトMS患者は、急性MSプラークにおけるp40mRNAレベルによって報告されているように、IL-12/IL-23発現の増加を示した。(例えば、Windhagenら(1995) *J. Exp. Med.* 182:1985-96参照)。更に、MS患者に由来するCD40L発現T細胞による抗原提示細胞のエキスポ刺激は、対照T細胞と比較して増加したIL-12産生をもたらし、このことはCD40/CD40L相互作用がIL-12の強力な誘発物質であるという観察と一致した。IL-23を欠失している遺伝子標的化マウスを用いて、IL-23は、脳の自己免疫性炎症にとって重要であることが示された(Cuaら(2003) *Nature* 421:7440748)。

【0009】

IFN γ およびIL-12の増加した発現は、CD患者の腸粘膜において観察されている(Faisら(1994) *J. Interferon Res.* 14:235-238、Parronchiら(1997) *Am. J. Path.* 150:823-832、Monteleoneら(1997) *Gastroenterology* 112:1169-1178およびBerrebiら(1998) *Am. J. Path.* 152:667-672)。CD患者の基底膜由来のT細胞のサイトカイン分泌プロファイルは、大きく上昇したIFN γ レベル等の主にTh1応答の特性である(Fussら(1996) *J. Immunol.* 157:1261-1270)。更に、CD患者に由来する大腸組織切片は、大量のIL-12発現マクロファージおよびIFN γ 発現T細胞を示す(Parronchiら(1997) *Am. J. Path.* 150:823-832)。IL-23の増加した発現もまた、クローン病患者において観察され、および炎症性腸疾患のマウスモデルにおいて観察されている。IL-23は、T細胞媒介性大腸炎にとって不可欠であり、大腸炎のマウスモデルにおけるIL-17依存性機構およびIL-6依存性機構を通じて炎症を促進するために不可欠である(例えば、Zhangらによる総説、(2007) *Intern. Immunopharmacology* 7:409-416参照)。

【0010】

乾癬皮膚病変におけるIL-12/IL-23 p40およびIL-23 p19メッセンジャーRNAの過剰発現は、IL-12/23 p40サブユニットタンパク質に対する中和抗体によるIL-12およびIL-23の阻害が乾癬の処置のための有効な治療アプローチを提供する可能性があることを示唆する(Yawalakarら(1998) *J. Invest. Dermatol.* 111:1053-57、Leeら(2004) *J. Exp. Med.* 199:125-30、Shakerら(2006) *Clin. Biochem.* 39:119-25、Piskinら(2006) *J. Immunol.* 176:1908-15、また、Tortoraらによる最近の総説(2007) *J. Am. Acad. Dermatol.* 57(6):1059-1068も参照、Fitchら(2007) *Current Rheumatology Reports* 9:461-4

10

20

30

40

50

67))。両方のサイトカインは、乾癬における1型ヘルパーT細胞(Th1)免疫応答の発生に寄与するが、各々は固有の役割を有する(RosmarinおよびStrober(2005) J. Drugs Dermatol. 4:318-25、Hongら(1999) J. Immunol. 162:7480-91、Yawalkarら(1998) J. Invest. Dermatol. 111:1053-57)。乾癬の処置のかかる治療アプローチが、当技術分野において明らかに必要である。

【0011】

様々なヒトの障害におけるヒトIL-12およびIL-23の役割のため、IL-12/IL-23活性を阻害し、またはそれに拮抗するように治療戦略が設計されてきた。特に、IL-12/IL-23のp40サブユニットに結合しそれを中和する抗体が、IL-12/IL-23活性を阻害するための手段として求められてきた。最も初期の抗体の内の幾つかは、IL-12によって免疫化されたマウスのリンパ球から調製されたハイブリドーマによって分泌されたマウスモノクローナル抗体(mAb)であった(例えば、StroberらによるPCT公開第WO97/15327号、Neurathら(1995) J. Exp. Med. 182:1281-1290、Duchmannら(1996) J. Immunol. 26:934-938参照)。短い血清半減期、ある種のヒトエフェクター機能を誘発することの不可能性およびヒトにおけるマウス抗体に対する望ましくない免疫応答の惹起(「ヒト抗マウス抗体」(HAMA)反応)等、ヒトへのマウス抗体の投与に伴う問題があるため、これらのマウスIL-12抗体は、インビボでのこれらのマウスIL-12抗体の使用について限定される。

【0012】

一般に、ヒトにおける完全マウス抗体の使用に伴う問題を克服するための試みは、抗体をより「ヒト様」に遺伝子操作することを含む。例えば、抗体鎖の可変領域がマウス由来であり、抗体鎖の定常領域がヒト由来であるキメラ抗体が調製されてきた(Jung et al. (1990) Cancer Res. 50:1495-1502、Brownら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2663-2667、Kettlboroughら(1991) Protein Engineering 4:773-783)。しかし、これらのキメラ抗体およびヒト化抗体は、幾つかのマウス配列をなお保持しているので、とりわけ、長期間にわたって投与された場合、望ましくない免疫反応(ヒト抗キメラ抗体(HACA)反応)をなお惹起し得る。

【0013】

マウス抗体またはこれらの派生体(例えば、キメラ抗体またはヒト化抗体)に比べて好ましいIL-12/IL-23阻害剤は、長期間にわたって使用される場合であってもかかる剤がHAMA反応を惹起するはずはないので、完全なヒト抗IL-12/IL-23抗体である。高親和性および低解離速度を有するヒトIL-12/IL-23のp40サブユニットに結合し、ならびにhIL-12誘発フィトヘマグルチニン芽球増殖およびhIL-12誘発ヒトIFN γ 産生が含まれるヒトIL-12を中和する能力を有する組換えヒト抗体が記載されている(米国特許第6,914,128号参照)。

【0014】

特異性抗原に対するモノクローナル抗体(MAb)の選択性によって、それらのモノクローナル抗体は優れた治療用候補物質になる。しかし、抗体分子の構造のため、それらのモノクローナル抗体は、酵素的および非酵素的分解に弱い。例えば、長期間にわたる上昇した温度における抗体の保存は、抗体の非酵素的分解をもたらす(Connell, G. E. および R. H. Painter (1966) Can. J. Biochem. 44(3):371-9、Cordoba, A. J. ら(2005) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 818(2):115-21、Cohen, S. L. ら(2007) J. Am. Chem. Soc. 129(22):6976-7)。

【0015】

一般に、ヒト免疫グロブリンガンマ(IgG)抗体は、2つの同一の軽鎖および重鎖か

ら構成される。重鎖はガンマ型であるが、軽鎖はカップ型またはラムダ型のいずれかであり得、それらのカルボキシ末端の定常領域が異なる。鎖間ジスルフィド架橋は、重鎖同士を結合させる。ジスルフィド架橋の数は、IgGサブクラスによって変わる。IgG1について、例えば、2つの重鎖間ジスルフィド架橋およびそれぞれの軽鎖と重鎖を結合させる1つのジスルフィド架橋がある。

【0016】

IgG分子は、ヒンジ領域によって連結されたFc領域および2つのFab領域から構成される。ヒンジ領域は、上部領域、コア領域および下部領域の3つの部分に分割される(図1)。上部領域はFabアームをコアに連結し、下部領域はFc部分をコアに連結する。コア領域は、鎖間ジスルフィド結合を含有し、高プロリン含有量を有する。ヒンジ領域の長さは、IgGサブクラスによって変わり、Fabアームに柔軟性をもたらし、それによって、アーム間の角度の変化ならびにそれらの軸を中心とした回転の自由の両方が可能になる。その柔軟性の結果として、ヒンジ領域は露出され、従って、温度および長期間の保存によって容易に攪乱される。例えば、ヒンジ領域は、抗体のFc断片およびFab断片を生成するために通常用いられるパパインおよびlys-C等のプロテアーゼに接近可能である。この領域におけるIgG分子を切断する他の酵素としては、カテプシンL、プラスミンおよびメタロプロテアーゼが挙げられる。

【0017】

液状製剤中のモノクローナル抗体は、長期間にわたって5℃で保存された場合に非酵素的加水分解を受け、Fab+FcおよびFab断片を生じる(Jiskoot, W. ら(1990) Pharm. Res. 7(12):1234-41、Alexander, A. J. およびD. E. Hughes(1995) Anal. Chem. 67(20):3626-32、Cordoba, A. J. ら(2005) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 818(2):115-21、Liu, H. ら(2006) J. Chrom. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 837:35-43、ならびにCohen, S. L. ら(2007) J. Am. Chem. Soc. 129(22):6976-7)。典型的にはサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によってモニターされる断片化は、極度のpH条件および高温において増大する(Cohen, S. L. ら(2007) J. Am. Chem. Soc. 129(22):6976-7)。切断は、重鎖領域配列Ser-Cys-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cysにわたる多数のペプチド結合において起きる。重鎖配列Cys-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cysにわたる切断はFab断片(48kDa)の対応するラダーをもたらしたが、一方で、Ser-Cys残基間の切断はベータ脱離機構を介して起き、重鎖断片および軽鎖断片(23kDa)をもたらした。

【0018】

カップ軽鎖を含有するIgG分子のヒンジ領域における金属誘発断片化は、組換えモノクローナル抗体(CamPATH)において実証された(Smith, M. A. ら(1996) Int. J. Pept. Protein Res. 48(1):48-55)。Smithらは、わずかにアルカリ性のpHにおける銅媒介断片化を報告し、切断は、重鎖配列Ser-Cys-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cysのヒンジ領域におけるリシン残基とスレオニン残基の間で特異的に局在した。切断の機構は前記著者によって明らかにされなかったが、pH5-6の酸性条件において切断は減少した。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0019】

【特許文献1】国際公開第97/15327号

【特許文献2】米国特許第6,914,128号明細書

【非特許文献】

【0020】

10

20

30

40

50

- 【非特許文献1】Andersonら(2006) Springer Semin. Immunopathol. 27:425-42
- 【非特許文献2】RosmarinおよびStrober(2005) J. Drugs Dermatol. 4:318-25
- 【非特許文献3】Harringtonら(2005) Nature Immunol. 6:1123-32
- 【非特許文献4】Parkら(2005) Nature Immunol. 6:1132-41)
- 【非特許文献5】Kobayashiら(1989) J. Exp. Med. 170:827-845 10
- 【非特許文献6】Sederら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:10188-92
- 【非特許文献7】Lingら(1995) J. Exp. Med. 154:116-127
- 【非特許文献8】Podlaskiら(1992) Arch. Biochem. Biophys. 294:230-237)
- 【非特許文献9】Gatelyら(1998) Ann. Rev. Immunol. 16:495-521
- 【非特許文献10】Kastleinら(2007) Annu. Rev. Immunol. 25:221-42
- 【非特許文献11】Moritaら(1998) Arthritis and Rheumatism 41:306-314 20
- 【非特許文献12】Buchtaら(1996) Clin. Exp. Immunol. 103:347-367
- 【非特許文献13】Murphyら、(2003) J. Exp. Med. 198(12):1951-1957
- 【非特許文献14】Windhagenら(1995) J. Exp. Med. 182:1985-96
- 【非特許文献15】Cuaら(2003) Nature 421:7440748
- 【非特許文献16】Faisら(1994) J. Interferon Res. 14:235-238 30
- 【非特許文献17】Parronchiら(1997) Am. J. Pathol. 150:823-832
- 【非特許文献18】Monteleoneら(1997) Gastroenterology 112:1169-1178
- 【非特許文献19】Berrebiら(1998) Am. J. Pathol. 152:667-672
- 【非特許文献20】Fussら(1996) J. Immunol. 157:1261-1270
- 【非特許文献21】Zhangら、(2007) Intern. Immunopharmacology 7:409-416 40
- 【非特許文献22】Yawalkarら(1998) J. Invest. Dermatol. 111:1053-57
- 【非特許文献23】Leeら(2004) J. Exp. Med. 199:125-30
- 【非特許文献24】Shakerら(2006) Clin. Biochem. 39:119-25
- 【非特許文献25】Piskinら(2006) J. Immunol. 176、1908-15
- 【非特許文献26】Tortiら(2007) J. Am. Acad. Dermatol. 57(6):1059-1068
- 【非特許文献27】Fitchら(2007) Current Rheumatology 50

y Reports 9:461-467

【非特許文献28】Hongら(1999) J. Immunol. 162:7480-91

【非特許文献29】Neurathら(1995) J. Exp. Med. 182:1281-1290

【非特許文献30】Duchmannら(1996) J. Immunol. 26:934-938

【非特許文献31】Jungmansら(1990) Cancer Res. 50:1495-1502

【非特許文献32】Brownら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2663-2667 10

【非特許文献33】Kettleboroughら(1991) Protein Engineering 4:773-783

【非特許文献34】Connell, G. E. およびR. H. Painter(1966) Can. J. Biochem. 44(3):371-9

【非特許文献35】Cordoba, A. J. ら(2005) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 818(2):115-21

【非特許文献36】Cohen, S. L. ら(2007) J. Am. Chem. Soc. 129(22):6976-7 20

【非特許文献37】Jiskoot, W. ら(1990) Pharm. Res. 7(12):1234-41

【非特許文献38】Alexander, A. J. およびD. E. Hughes(1995) Anal. Chem. 67(20):3626-32

【非特許文献39】Liu, H. ら(2006) J. Chrom. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 837:35-43

【非特許文献40】Smith, M. A. ら(1996) Int. J. Pept. Protein Res. 48(1):48-55

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】 30

【0021】

安定な組成物(例えば、製剤)ならびに処理および保存の間におけるそれらの製剤中の抗体の切断を防止するための方法を提供するために、抗体分子の断片化を取り巻くパラメータを決定する必要性が残っている。

【0022】

例えば、有害なIL-12および/またはIL-23活性を阻害し、またはそれに拮抗するための治療的使用に適切で、処理および長期保存の間で増強された安定性を有し、ラムダ軽鎖の断片化に対する増強された耐性を有する抗体またはこの断片を含む水性医薬製剤の必要性が残っている。

【課題を解決するための手段】 40

【0023】

(発明の要旨)

第1の態様において、本発明は、ラムダ鎖を含む抗体、例えば有害なIL-12および/またはIL-23活性を阻害し、またはそれに拮抗するための治療的使用に適切な抗体またはこの抗原結合部分を含み、当技術分野において認識されている製剤と比較して改善した性質を有する水性製剤を提供する。例えば、本発明の製剤は、例えば液体状態または固体状態において、少なくとも24ヵ月間の貯蔵寿命を有する。別の一実施形態において、本発明の製剤は、少なくとも5回の製剤の凍結融解サイクルの後で安定性を維持する。

【0024】

第2の態様において、本発明は、ヒンジ領域における特異的切断により、ラムダ軽鎖を 50

含有する抗体の増大した断片化をヒスチジンの存在下で鉄がもたらすという観察に基づいて、ラムダ軽鎖を含む免疫グロブリンの断片化を阻害するための組成物および方法を提供する。製剤中にヒスチジンだけが存在することは、断片化に影響を及ぼさなかった。断片化のレベルは、鉄レベルおよびヒスチジンレベルの両方に関して用量依存的であった。鉄およびヒスチジンによって引き起こされた断片化の上昇したレベルは、カップ軽鎖を含有する抗体において観察されなかった。ラムダ鎖含有抗体は、軽鎖および重鎖を接合するジスルフィド結合の近くでヒンジ領域に存在する残基において切断される。

【0025】

第1の態様において、本発明は、ラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む分子と、ヒスチジンを含む緩衝液系とを含み、実質的に金属を含まない安定な製剤を提供する。

10

【0026】

一実施形態において、金属はFe²⁺またはFe³⁺である。別の一実施形態において、金属はCu²⁺またはCu¹⁺である。

【0027】

別の一実施形態において、本発明は、金属がヒスチジンの存在下でラムダ軽鎖の切断をもたらさない濃度で存在する、約5から約7のpHを有するヒスチジンを含む緩衝溶液中にラムダ軽鎖を含む治療上有効量の分子を含む安定な製剤を更に提供する。

【0028】

別の一実施形態において、本発明は、金属の存在下でヒンジ領域内において切断されない、ラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む分子と、イミダゾールを含む緩衝液系と、金属とを含む安定な製剤を更に提供する。

20

【0029】

一実施形態において、製剤は、濾過、緩衝液交換、クロマトグラフィーおよび樹脂交換から成る群から選択される少なくとも1つの手法に供した後で金属を実質的に含まない。一実施形態において、緩衝液交換は、ヒスチジンを含む緩衝液、クエン酸塩およびリン酸塩を含む緩衝液ならびにイミダゾールを含む緩衝液から成る群から選択される緩衝液による透析を含む。

【0030】

一実施形態において、金属は、例えば、約5,060 part per billion (ppb)未満、約1,060 ppb未満、約560 ppb未満、約310 ppb未満、約160 ppb未満、約110 ppb未満および約70 ppb未満の濃度で存在する。特定の一実施形態において、金属は、約160 ppb未満の濃度、より好ましくは約70 ppb未満の濃度で存在する。

30

【0031】

一実施形態において、製剤は、ラムダ軽鎖を含む分子ならびにポリオールおよび界面活性剤から成る群から選択される少なくとも1種の更なる賦形剤を含む。一実施形態において、製剤は安定剤を更に含む。一実施形態において、製剤は、マンニトール、ポリソルベート80およびメチオニンを更に含む。一実施形態において、製剤は、クエン酸緩衝液またはリン酸緩衝液を更に含む。一実施形態において、pHは約5以下である。別の一実施形態において、製剤は、(a) 1-10%のマンニトール、(b) 0.001%-0.1%のポリソルベート80、ならびに(c) 5から7のpHを有する1-100 mMのヒスチジンおよび1-50 mMのメチオニンを含む緩衝液系を含む。更に別の実施形態において、製剤は、(a) 2-6%のマンニトール、(b) 0.005-0.05%のポリソルベート80、ならびに(c) 5から7のpHを有する5-50 mMのヒスチジンおよび5-20 mMのメチオニンを含む緩衝液系を含む。特定の一実施形態において、製剤は、(a) 約4%のマンニトール、(b) 約0.01%のポリソルベート80、ならびに(c) 約6のpHを有する約10 mMのヒスチジンおよび約10 mMのメチオニンを含む緩衝液系を含む。

40

【0032】

一実施形態において、本発明は、(a) IL-12/IL-23のp40サブユニット

50

のエピトープに結合する $1-250 \text{ mg/ml}$ のヒト抗体、(b) $1-10\%$ のマンニトール、(c) $0.001\%-0.1\%$ のポリソルベート80、(d) $1-50 \text{ mM}$ のメチオニンおよび(e) 5から7のpHを有する $1-100 \text{ mM}$ のヒスチジンを含み、金属を実質的に含まない水性医薬製剤を提供する。

【0033】

一実施形態において、医薬製剤は、約 2.5 mS/cm 未満の伝導率を有さない。別の一実施形態において、医薬製剤は、米国特許第6,914,128号の実施例9において用いられた製剤ではない。

【0034】

一実施形態において、分子は、モノクローナル抗体またはこの抗原結合部分である。様々な実施形態において、抗体またはこの抗原結合部分の濃度は、例えば、約1から約 250 mg/ml の間、約40から約 200 mg/ml の間または約 100 mg/ml である。

【0035】

一実施形態において、抗体は、IL-12/IL-23のp40サブユニットのエピトープに結合し得るヒト抗体またはこの抗原結合部分である。一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、p40サブユニットがIL-12のp35サブユニットに結合する場合、p40サブユニットのエピトープに結合し得る。別の一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、p40サブユニットがIL-23のp19サブユニットに結合する場合、p40サブユニットのエピトープに結合し得る。更に別の一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、p40サブユニットがIL-12のp35サブユニットに結合する場合、そしてまた、p40サブユニットがIL-23のp19サブユニットに結合する場合、p40サブユニットのエピトープに結合し得る。特定の一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、Y61およびJ695から成る群から選択される抗体が結合するIL-12/IL-23のp40サブユニットのエピトープに結合する。

【0036】

特定の一実施形態において、本発明は、また更に、(a) IL-12/IL-23のp40サブユニットのエピトープに結合する約 100 mg/ml のヒト抗体、(b) 約4%のマンニトール、(b) 約 0.01% のポリソルベート80、(c) 約 10 mM のメチオニンおよび(d) 約6のpHを有する 10 mM のヒスチジンを含む水性医薬製剤を提供する。

【0037】

一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって決定される通りの $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 以下の K_d または $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下の k_{of} 速度定数によってIL-12/IL-23のp40サブユニットから解離する。

【0038】

一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、IL-12/IL-23のp40サブユニットの生物学的活性を中和する。一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、IL-12の生物学的活性を中和する。特定の一実施形態において、IL-12機能の中和は、ヒト抗体またはこの断片とIL-12のp40サブユニットとの相互作用によって達成される。特定の一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、インビトロPHAアッセイにおいて、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 以下の IC_{50} においてフィトヘマグルチニン芽球増殖を阻害し、またはそれは、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 以下の IC_{50} においてヒトIFN γ 産生を阻害する。別の一実施形態において、ヒト抗体またはこの結合部分は、IL-23の生物学的活性を中和する。特定の一実施形態において、IL-23機能の中和は、ヒト抗体またはこの断片とIL-23のp40サブユニットとの相互作用によって達成される。

【0039】

一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、配列番号1のアミノ酸配列

を含む重鎖CDR3および配列番号2のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する。別の一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2を有する。別の一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、配列番号5のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1および配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1を有する。更に別の一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の一実施形態において、ヒト抗体は、抗体J695またはこの抗原結合部分である。

【0040】

一実施形態において、製剤は、少なくとも24ヵ月間の貯蔵寿命を有する。別の一実施形態において、製剤は、少なくとも5回の製剤の凍結融解サイクルの後で安定性を維持する。

【0041】

一実施形態において、製剤は、更なる薬剤（例えば更なる治療剤）を更に含む。

【0042】

一実施形態において、更なる治療剤は、ブデノシド、上皮成長因子、コルチコステロイド、サイクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチレート、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、メトロニダゾール、リポキシゲナーゼ阻害剤、メサラミン、オルサラジン、バルサラジド、抗酸化剤、トロンボキサン阻害剤、IL-1受容体アンタゴニスト、抗IL-1βモノクローナル抗体、抗IL-1受容体抗体、抗IL-6モノクローナル抗体、抗IL-6受容体抗体、成長因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニルイミダゾール化合物、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGFおよびPDGFの抗体またはアゴニスト、CD2、CD3、CD4、CD8、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはこれらのリガンドに対する抗体、メトトレキサート、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、レフルノミド、NSAID、イブプロフェン、プレドニゾロン、ホスホエステラーゼ阻害剤、S1P1アゴニスト、bc1-2阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作動剤、IRAK、NIK、IKK、p38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1β変換酵素阻害剤、TNFα変換酵素阻害剤、T細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体、可溶性p55TNF受容体、可溶性p75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗炎症性サイトカイン、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGFβから成る群から選択される。

【0043】

別の一実施形態において、更なる治療剤は、抗TNF抗体およびこの抗体断片、TNFR-Ig構築物、TACE阻害剤、PDE4阻害剤、コルチコステロイド、ブデノシド、デキサメタゾン、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸、オルサラジン、IL-1β変換酵素阻害剤、IL-1ra、チロシンキナーゼ阻害剤、6-メルカプトプリンおよびIL-11から成る群から選択される。

【0044】

更に別の一実施形態において、更なる治療剤は、メチルプレドニゾロン、シクロホスファミド、4-アミノピリジン、チザニジン、インターフェロンβ1a、インターフェロンβ1b、コポリマー1、高圧酸素、静脈内免疫グロブリン、クラブリビン、TACE阻害剤、キナーゼ阻害剤、sIL-13R、抗P7およびp-セレクチン糖タンパク質リガンド（PSGL）から成る群から選択される。

【0045】

別の一実施形態において、本発明は、ヒンジ領域の中で切断されない、または金属キレーターの非存在下で観察された切断のレベル未満のレベルでヒンジ領域の中で切断される、ラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む分子と、ヒスチジンを含む緩衝液系と、金属キレー

10

20

30

40

50

ターとを含む安定な製剤を更に提供する。

【0046】

一実施形態において、金属はFe²⁺またはFe³⁺である。別の一実施形態において、金属はCu²⁺またはCu¹⁺である。

【0047】

一実施形態において、金属キレーターは、クエン酸塩、シデロホア、カリクセレン (calixerene)、アミノポリカルボン酸、ヒドロキシアミノカルボン酸、N-置換グリシン、2-(2-アミノ-2-オキソエチル)アミノエタンスルホン酸 (BES)、二座、三座または六座鉄キレーター、銅キレーターならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択される。好ましい一実施形態において、金属キレーターはデスフェリオキサミンである。

10

【0048】

第2の態様において、本発明は、ラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む分子を切断する金属の能力を阻害または防止する段階を含む、ヒスチジン含有製剤における前記分子の切断を阻害または防止するための方法を提供する。一実施形態において、阻害または防止は、製剤中に少なくとも1種の金属キレーターを含めることを含む。別の一実施形態において、阻害または防止は、濾過 (例えば、限外濾過および透析濾過)、緩衝液交換、クロマトグラフィーおよび樹脂交換から成る群から選択される少なくとも1つの手法に分子を供することを含む。一実施形態において、緩衝液交換は、ヒスチジンを含む緩衝液、クエン酸塩およびリン酸塩を含む緩衝液ならびにイミダゾールを含む緩衝液から成る群から選択される緩衝液による透析を含む。

20

【0049】

なお別の一実施形態において、阻害または防止は、ラムダ軽鎖または重鎖における少なくとも1つのアミノ酸を改変することによって切断を阻害または防止することを含む。更に別の一実施形態において、阻害または防止は、アミノ酸配列グルタミン酸-システイン-セリンが変化するようにラムダ鎖においてアミノ酸配列を改変することによって切断を阻害または防止することを含む。更に別の一実施形態において、阻害または防止は、より酸性レベルの方に (例えば5以下のpHに) 製剤のpHを低下させることを含む。別の一実施形態において、阻害または防止は、製剤中にクエン酸緩衝液またはリン酸緩衝液等の更なる緩衝液を含めることを含む。一実施形態において、製剤は、約1-100mMのヒスチジン (例えば、約10mMのヒスチジン) を含む。

30

【0050】

一実施形態において、製剤は、25℃または40℃で6ヵ月後にラムダ鎖含有抗体の切断をもたらさないレベルの鉄を含み、例えば、鉄は約160ppb未満で存在する。

【0051】

一実施形態において、分子は、約1mg/mlから約300mg/ml、例えば約2mg/ml、例えば約7mg/ml、例えば約100mg/mlの濃度範囲内で存在する。

【0052】

一実施形態において、分子は、免疫グロブリン (例えば、モノクローナル抗体) である。特定の一実施形態において、分子は、抗IL-12/23抗体 (例えば、J695) である。別の一実施形態において、抗体は、抗CD-80または/および抗IGF1、2抗体である。

40

【0053】

別の一実施形態において、分子は、DVD-Ig (商標)、Fab断片、F(ab')₂断片、キメラ抗体、CDRグラフト抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ジスルフィド連結Fv、単ドメイン抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体および双特異性抗体から成る群から選択されるヒンジ領域を含有する。一実施形態において、分子は、重鎖の少なくとも部分を含む。別の一実施形態において、重鎖の部分は、アミノ酸配列セリン-システイン-アスパラギン酸-リシン (SCDK) または抗体結合を阻害しない少なくとも1つの修飾を含む。別の一実施形態において、切断は、セリンとシステイン残基の間のヒンジ領域

50

において起きる。更に別の一実施形態において、切断は、システインとアスパラギン酸残基の間で起きる。

【0054】

一実施形態において、金属は Fe^{2+} または Fe^{3+} である。別の一実施形態において、金属は Cu^{2+} または Cu^{1+} である。

【0055】

一実施形態において、ラムダ鎖は、グルタミン酸-システイン-セリン (ECS) のアミノ酸配列または抗体結合を阻害しない少なくとも1つの修飾を含む。別の一実施形態において、切断は、ラムダ鎖のヒンジ領域において起きる。別の一実施形態において、切断は、グルタミン酸とシステイン残基の間で起きる。更に別の一実施形態において、切断は、セリンとシステイン残基の間で起きる。

10

【0056】

一実施形態において、切断は、約 $2^{\circ}C$ から約 $25^{\circ}C$ の温度、例えば約 $2^{\circ}C$ から約 $8^{\circ}C$ の温度で起きる。一実施形態において、切断は、約4から約8のpH、例えば約5から約6のpHで起きる。

【0057】

一実施形態において、少なくとも1種の金属キレーターは、アエロバクチン、アグロバクチン、アゾトバクチン、バシリバクチン、N-(5-C3-L(5アミノペンチル)ヒドロキシカルバモイル)-プロピオンアミド(ペンチル)-3-(5-(N-ヒドロキシアセトアミド)-ペンチル)カルバモイル)-プロプリオンヒドロキサム酸(デスフェロキサミン、デスフェリオキサミンまたはDFOもしくはDEF)、デスフェリチオシン、エンテロバクチン、エリスロバクチン、フェリクローム、フェリオキサミンB、フェリオキサミンE、フルビアバクチン、フサリニンC、ミコバクチン、パラバクチン、シュードバクチン、ビブリオバクチン、ブルニバクチン、イェルシニアバクチン、オルニバクチンならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択されるシデロホアである(Roosenberg, J. M. ら(2000) Studies and Syntheses of Siderophores, Microbial Iron Chelators, and Analogs as Potential Drug Delivery Agents. Current Medicinal Chem. 7:159-197)。好ましい一実施形態において、金属キレーターはデスフェリオキサミンである。

20

30

【0058】

別の一実施形態において、少なくとも1種の金属キレーターは、クエン酸塩またはリン酸塩である。

【0059】

別の一実施形態において、少なくとも1種の金属キレーターは、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ニトリロ三酢酸(NTA)、トランス-ジアミノシクロヘキサン四酢酸(DCTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、N-2-アセトアミド-2-イミノ二酢酸(ADA)、アスパラギン酸、ビス(アミノエチル)グリコールエーテルN, N, N'-四酢酸(EGTA)、グルタミン酸およびN, N'-ビス(2-ヒドロキシベンジル)エチレンジアミン-N, N'-二酢酸(HBED)ならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択されるアミノポリカルボン酸である。

40

【0060】

別の一実施形態において、少なくとも1種の金属キレーターは、N-ヒドロキシエチルイミノ二酢酸(HIMDA)、N, N-ビスヒドロキシエチルグリシン(ビシン)およびN-(トリスヒドロキシメチルメチル)グリシン(トリシン)ならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択されるヒドロキシアミノカルボン酸である。

【0061】

別の一実施形態において、少なくとも1種の金属キレーターは、N-置換グリシンまたはこの誘導体、類似体もしくは組み合わせである。例えば、N-置換グリシンは、グリシ

50

ルグリシンならびにこの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択される。

【0062】

別の一実施形態において、少なくとも1種の金属キレーターは、2-(2-アミノ-2-オキソエチル)アミノエタンスルホン酸(BES)またはこの誘導体、類似体および組み合わせである。

【0063】

別の一実施形態において、少なくとも1種の金属キレーターは、カリックスアレーン、例えば、フェノールおよびアルデヒドのヒドロキシアルキル化生成物に基づく大環状もしくは環状オリゴマー、またはこの誘導体、類似体もしくは組み合わせである(Gutsche, C. D. (1989) Calixarenes. Cambridge: Royal Society of Chemistry, Dharam, PおよびHarjit, S. (2006) Syntheses, Structures and Interactions of Heterocalixarenes, Arcivoc)。

10

【0064】

別の一実施形態において、少なくとも1種の金属キレーターは、DTPAおよびDEFの組み合わせを含む。別の一実施形態において、少なくとも1種の金属キレーターは、EDTA、EGTAおよびDEFの組み合わせを含む。

【0065】

別の一実施形態において、少なくとも1種の金属キレーターは、ヒドロキシピリジン誘導体、ヒドラゾン誘導体およびヒドロキシフェニル誘導体またはニコチニル誘導体、例えば、1,2-ジメチル-3-ヒドロキシピリジン-4-オン(Deferiprone、DFPまたはFerriprox)、2-デオキシ-2-(N-カルバモイルメチル-[N'-2'-メチル-3'-ヒドロキシピリジン-4'-オン])-D-グルコピラノース(Feralex-G)、ピリドキサルイソニコチニルヒドラゾン(PIH)、4,5-ジヒドロ-2-(2,4-ジヒドロキシフェニル)-4-メチルチアゾール-4-カルボン酸(GT56-252)、4-[3,5-ビス(2-ヒドロキシフェニル)-[1,2,4]トリアゾール-1-イル]安息香酸(ICL-670)、N,N'-ビス(o-ヒドロキシベンジル)エチレンジアミン-N,N'-二酢酸(HBED)、5-クロロ-7-ヨードキノリン-8-オール(クリオキノール)またはこれらの誘導体、類似体もしくは組み合わせである。

20

30

【0066】

別の一実施形態において、少なくとも1種の金属キレーターは、トリエチレンテトラミン(トリエンチン)、テトラエチレンペンタミン、D-ペニシラミン、エチレンジアミン、ビスピリジン、フェナントロリン(phenantrolin)、バソフェナントロリン、ネオクプロイン、バトクプロインスルフォネート、クプリゾン、シス、シス-1,3,5-トリアミノシクロヘキサン(TACH)、Tachpyrならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせから成る群から選択される銅キレーターである。

【0067】

別の一実施形態において、少なくとも1種の金属キレーターは、当技術分野において記載されている、例えば、Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery、第6版、3巻: Cardiovascular Agents and Endocrines、Abraham編、D. J, John Wiley & Sons, Inc. 2003におけるBergeron, R. らによる「Iron Chelators and Therapeutic Uses」において記載されているキレート剤、薬剤の類似体および誘導体から選択され得る。更に、キレーターは、米国特許第6,083,966号、米国特許第6,521,652号、米国特許第6,525,080号、米国特許第6,559,315号、PCT/US2004/029318、PCT/US2003/022012、WO/2002/043722およびWO2004/007520において記載されているキレート剤、薬剤の類似体および誘導体から選択され得る。

40

50

【0068】

別の一実施形態において、製剤は、アミノ酸、糖、糖アルコール、緩衝液、塩および界面活性剤から成る群から選択される少なくとも1種の更なる賦形剤を含む。

【0069】

別の一実施形態において、製剤は、約1から約60 mg/mlのマンニトール、約1から約50 mMのメチオニン、約0.001%から約0.5% (w/v)のポリソルベート80、約0.001%から約1% (w/v)のポリオキサマー188、約1から約150 mMの塩化ナトリウム、約1から約30 mMの酢酸塩、約1から約30 mMのクエン酸塩、約1から約30 mMのリン酸塩および約1から約30 mMのアルギニンから成る群から選択される少なくとも1種の更なる賦形剤を含む。

10

【0070】

別の一実施形態において、断片化の阻害または防止は、酸の添加、滴定またはpHを下させるための当技術分野で知られている透析もしくは様々な濾過プロセス、例えば、限定されないが、透析またはタンジェント流濾過によってより酸性レベルの方に製剤のpHを変更することを含む。

【0071】

別の一実施形態において、断片化の阻害または防止は、リン酸塩またはクエン酸塩等の特定の緩衝液の使用を含む。

【0072】

第2の態様の別の一実施形態において、本発明は、製剤中に少なくとも1種の金属キレーターを含める段階および切断についてラムダ軽鎖の少なくとも部分を分析する段階を含む、ヒスチジン含有製剤においてラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む分子の切断を検出するための方法を提供する。

20

【0073】

本発明の前述のおよび他の目的、特性および利点、ならびに本発明自体は、添付の図面と一緒に読まれる場合、以下の好ましい実施形態の記載からより完全に理解される。

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1】抗体分子のヒンジ領域を示す図である。

【図2】サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の後のJ695の異なる種の分画 (画分1-4) を示すグラフである。

30

【図3】非還元性 (NR) 種、重鎖 (HC)、軽鎖 (LC)、ならびに画分3におけるHC (HC-Fc) ならびに画分4におけるLCおよびHC-Fabの断片を示す、SDS-PAGEによって分析された図2のSECからの異なる画分の評価を示す図である。

【図4】ヒンジ領域におけるHC上における多数の切断部位を示す、脱グリコシル化後における図2からの画分3のLC/ESI-MSによる分析を示すグラフである。ピークは(a)から(e)として示され、ピークおよび切断部位の同一性は表1において提供される。

【図5】この画分中における対応するFab断片を示す図2からの画分4のMSによる分析を示すグラフである。ピークは(f)から(j)として示され、ピークおよび切断部位の同一性は表1において提供される。

40

【図6】アミノ酸残基1-215由来の遊離LCおよびアミノ酸残基1-217由来の遊離HCを示す、図2からの画分4のMSによる分析を示すグラフである。

【図7】画分4がFabならびにLCおよびHC断片を含有したのに対して断片2 (Fab+Fc) を示す、図2からの画分3のCE-SDSによる分析を示すグラフである。完全抗体中における断片2は、他のピークから十分に解像される。

【図8】10,000のMWCO膜を用いたクエン酸緩衝液に対する500 ppb鉄を含有するJ695 (Mab-ロット1) の透析を示すグラフである。

【図9】40℃で1ヵ月間恒温放置され、CE-SDSによって分析されたJ695の正常対照ロット中にスパイクされた金属塩の異なるレベル (2.5、10および50 ppm

50

）を示すグラフである。

【図 10】1 mM のデスフェリオキサミンを用いた、500 ppb の鉄を含有する J 6 9 5 の 40 °C で 1 ヶ月間の恒温放置の後の C E - S D S による分析を示すグラフである。

【図 11】水に対する透析ならびにヒスチジン、鉄または鉄およびヒスチジンの両方のいずれかによる恒温放置の後の鉄を有さない J 6 9 5 の正常ロットを示すグラフである。

【図 12】ストレスをかけた正常ロットに対する 500 ppb の鉄を含有するストレスをかけた J 6 9 5 の E S I / L C - M S による図 2 からの断片 2 の比較を示すグラフである。

【図 13】鉄を含有するストレスをかけた J 6 9 5 を、ストレスをかけた正常ロットと比較した場合に切断部位が同等だったことを明らかにする対応する F a b 種の分析を示すグラフである。

【図 14】重鎖（1-217）および軽鎖（1-215）のより高いレベルの断片を明らかにする L C 断片および H C 断片の分析を示すグラフである。

【図 15】ラムダ軽鎖またはカッパ軽鎖のいずれかを含有する I g G 分子の鉄誘発断片化の検討を示すグラフである。

【図 16】ラムダ軽鎖またはカッパ軽鎖および切断された結合上の残基の配列を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0075】

（発明の詳細な記述）

I. 定義

「抗体」という用語は、広く、4本のポリペプチド鎖（ジスルフィド結合によって相互接続された2本の重（H）鎖および2本の軽（L）鎖）から構成されるあらゆる免疫グロブリン（I g）分子または（I g 分子の本質的なエピトープ結合特性を保持する）そのあらゆる機能的断片、突然変異体、変異体もしくは派生体を指す。かかる突然変異体、変異体または派生体の抗体フォーマットは当技術分野において公知であり、その非限定的な実施形態は本明細書において考察される。

【0076】

完全長抗体において、各重鎖は、（本明細書において H C V R または V H と略記される）重鎖可変領域および重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン（C H 1、C H 2 および C H 3）から構成される。各軽鎖は、（本明細書において L C V R または V L と略記される）軽鎖可変領域および軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン（C L）から構成される。V H および V L 領域は、フレームワーク領域（F R）と称されるより保存されている領域に散在する相補性決定領域（C D R）と称される超可変性の領域に更に小区分され得る。各 V H および V L は、アミノ末端からカルボキシ末端に以下の順序、F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4 において配置された3つの C D R および4つの F R から構成される。免疫グロブリン分子は、任意の型（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A および I g Y）、クラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 および I g A 2）またはサブクラスのものであり得る。

【0077】

「F c 領域」という用語は、完全抗体のパパイン消化によって生成され得る、免疫グロブリン重鎖の C 末端領域を指す。F c 領域は、ネイティブ配列 F c 領域または変異体 F c 領域であってよい。免疫グロブリンの F c 領域は、一般に、2つの定常ドメイン（C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメイン）を含み、場合によって C H 4 ドメインを含む。抗体エフェクター機能を改変するための F c 部分におけるアミノ酸残基の置き換えは、当技術分野において公知である（米国特許第 5, 648, 260 号および米国特許第 5, 624, 821 号）。抗体の F c 部分は、幾つかの重要なエフェクター機能、例えば、サイトカイン誘導、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）、食作用、補体依存性細胞障害（C D C）ならびに抗体および抗原抗体複合体の半減期／クリアランス速度を媒介する。ある種

10

20

30

40

50

のヒトIgGアイソタイプ、特にIgG1およびIgG3は、それぞれFcγRおよび補体C1qへの結合を介してADCCおよびCDCを媒介する。免疫グロブリンの2つの同一の重鎖の二量体化は、CH3ドメインの二量体化によって媒介され、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合によって安定化される(Huberら(1976)Nature 264:415-20、Thiesら(1999)J. Mol. Biol. 293:67-79)。重鎖間ジスルフィド結合を防止するためのヒンジ領域の中のシステイン残基の突然変異は、CH3ドメインの二量体化を不安定化させる。CH3二量体化を担う残基が同定されている(Dall'Acqua(1998)Biochem. 37:9266-73)。ゆえに、一価の半Igを生成することが可能である。一価の半Ig分子は、IgGおよびIgA両サブクラスについて天然に見出されている(Seligman(1978)Ann. Immunol. 129:855-70、Biewengaら(1983)Clin. Exp. Immunol. 51:395-400)。半Ig分子は、通常の抗体よりそのサイズが小さいので、組織透過においてある種の利点を有し得る。一実施形態において、少なくとも1つのアミノ酸残基は、重鎖の二量体化が破壊されて半Ig分子をもたらすように、本発明の結合タンパク質の定常領域、例えばFc領域において置き換えられる。軽鎖は、カッパ型またはラムダ型であってよい。

【0078】

抗体の「抗原結合部分」または「抗体部分」という用語は、抗原(例えば、hIL-12および/またはhIL-23)に特異的に結合する能力を保持する抗体の断片を包含する。かかる抗体の実施形態は、双特異性、二重特異性または多重特異性であってもよく、例えば2つ以上の異なる抗原に特異的に結合する。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって実施され得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語の中に包含される結合断片の例としては、(i) Fab断片(VL、VH、CLおよびCH1ドメインから成る一価断片)、(ii) F(ab')₂断片(ヒンジ領域におけるジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片)、(iii) VHおよびCH1ドメインから成るFd断片、(iv) 抗体の単一アームのVLおよびVHドメインから成るFv断片、(v) VHドメインから成るdAb断片(Wardら(1989)Nature 341:544-546)、ならびに(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。更に、Fv断片の2つのドメイン(VLおよびVH)が別々の遺伝子によってコードされるが、これらは、VLおよびVH領域が対合して一価分子を形成している単一タンパク質鎖としてこれらを作製することを可能にする合成リンカーによって、組換え法を用いて接合され得る(一本鎖Fv(scFv)として公知である。例えば、Birdら(1988)Science 242:423-426およびHustonら(1988)Proc. Natl Acad. Sci. USA 85:5879-5883参照)。かかる一本鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」という用語の中に包含されることが意図される。ダイアボディ等の一本鎖抗体の他の形態も包含される。ダイアボディは、VHおよびVLドメインが一本鎖ポリペプチド鎖上に発現されているが、同一鎖上における2つのドメイン間における対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用し、それによってドメインを別の鎖の相補的ドメインと対合するように強制し、2つの抗原結合部位を作製する二価の双特異性抗体である(例えば、Holliger, P. ら(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448、Poljak, R. J. ら(1994)Structure 2:1121-1123参照)。かかる抗体結合部分は、当技術分野において公知である(KontermannおよびDubel編(2001)Antibody Engineering, Springer-Verlag, New York, 790頁。更に、一本鎖抗体はまた、相補的軽鎖ポリペプチドと一緒に抗原結合領域の対を形成するタンデムFvセグメントの対を含む「直鎖抗体」(VH-CH1-VH-CH1)も挙げられる(Zapataら(1995)Protein Eng. 8(10):1057-1062、米国特許第5,641,870号)。

【0079】

10

20

30

40

50

なお更に、抗体またはこの抗原結合部分は、抗体または抗体部分と1種以上の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合性または非共有結合性会合によって形成されるより大きな免疫接着分子の一部であってよい。かかる免疫接着分子の例としては、四量体 s c F v 分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用 (K i p r i y a n o v, S. M. ら (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) ならびに二価およびビオチン化された s c F v 分子を作製するためのシステイン残基、マーカーペプチドおよびC末端ポリヒスチジンタグの使用 (K i p r i y a n o v, S. M. ら (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058) が挙げられる。F a b および F (a b')₂ 断片等の抗体部分は、それぞれ完全抗体のパパインまたはペプシン消化等の慣用技術を用いて完全抗体から調製され得る。更に、抗体、抗体部分および免疫接着分子は、本明細書において記載されるように標準組換えDNA技術を用いて得られ得る。好ましい抗原結合部分は、完全なドメインまたは完全なドメインの対である。

10

【0080】

「多価結合タンパク質」という用語は、2つ以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質を指す。一実施形態において、多価結合タンパク質は、3つ以上の抗原結合部位を有するように操作され、一般に、天然に存在する抗体ではない。「多重特異性結合タンパク質」という用語はまた、2つ以上の関連する標的または無関係な標的に結合することが可能なタンパク質をも指す。二重可変ドメイン (D V D-I g (商標)) 結合タンパク質は、2つ以上の抗原結合部位を含み、四価または多価結合タンパク質である。D V D-I g (商標) は、単一特異性であり得 (すなわち、1つの抗原に結合することができる。) または多重特異性であり得る (すなわち、2つ以上の抗原に結合することができる。)。2つの重鎖 D V D-I g (商標) ポリペプチドおよび2つの軽鎖 D V D-I g (商標) ポリペプチドを含む D V D-I g (商標) 結合タンパク質は、D V D-I g (商標) と称される。D V D-I g (商標) の各半分は、重鎖 D V D-I g (商標) ポリペプチドおよび軽鎖 D V D-I g (商標) ポリペプチドおよび2つの抗原結合部位を含む。各結合部位は重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含み、合計6つのC D Rが抗原結合部位当たりの抗原結合に参与する。

20

【0081】

「双特異性抗体」という用語は、クアドローマ技術によって (M i l s t e i n, C. および A. C. C u e l l o (1983) Nature 305 (5934):537-40)、2つの異なるモノクローナル抗体の化学的コンジュゲーションによって (S t a e r z, U. D. ら (1985) Nature 314 (6012):628-31)、またはノブイントゥホールもしくはF c 領域中に突然変異を導入する類似のアプローチによって (H o l l i g e r, P. ら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-8. 18) 生成され、その内の1つのみが機能的双特異性抗体である多数の異なる免疫グロブリン種をもたらす完全長抗体を指す。分子機能によって、双特異性抗体は、その2つの結合アーム (H C/L C の1つの対) の1つの上の1つの抗原 (またはエピトープ) に結合し、その第2のアーム (H C/L C の異なる対) の上の異なる抗原 (またはエピトープ) に結合する。この定義によって、双特異性抗体は、(特異性およびC D R 配列の両方において) 2つの異なる抗原結合アームを有し、それが結合する各抗原に対して一価である。

30

40

【0082】

「二重特異性抗体」という用語は、その2つの結合アーム (H C/L C の対) の各々の中における2つの異なる抗原 (またはエピトープ) に結合することが可能な完全長抗体を指す (P C T 公開第 W O 0 2 / 0 2 7 7 3 号)。従って、二重特異性結合タンパク質は、同一の特異性および同一のC D R 配列を有する2つの同一の抗原結合アームを有し、それが結合する各抗原に対して二価である。

【0083】

免疫グロブリン定常ドメインは、重鎖または軽鎖定常ドメインを指す。ヒト I g G 重鎖

50

および軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は、当技術分野において公知である。

【0084】

「モノクローナル抗体」または「mAb」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、前記集団を含む個々の抗体は、わずかな量で存在し得る可能な天然に存在する突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原に対して特異的である。更に、異なる決定因子（エピトープ）に対して特異的な異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物と異なり、各mAbは、抗原上の単一の決定因子に対して特異的である。「モノクローナル」という修飾語句は、いずれかの特定の方法による抗体の産生を必要とするものと解釈すべきではない。一実施形態において、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術によって産生される。

10

【0085】

「キメラ抗体」という用語は、ヒト定常領域に連結されたマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体等、ある種に由来する重鎖および軽鎖可変領域配列ならびに別の種に由来する定常領域配列を含む抗体を指す。

【0086】

「CDRグラフト抗体」という用語は、マウスCDRの内の1つ以上（例えば、CDR3）をヒトCDR配列によって置き換えたマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体等、ある種に由来する重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、VHおよび／またはVLのCDR領域の内の1つ以上の配列を別の種のCDR配列によって置き換えた抗体を指す。

【0087】

「ヒト抗体」という用語は、Kabatら（Kabatら（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242参照）によって記載されているように、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に対応する可変および定常領域を有する抗体を包含する。本発明のヒト抗体は、例えば、CDR、特にCDR3において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロにおける無作為の突然変異誘発もしくは部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボにおける体細胞突然変異によって導入された突然変異）を含むことができる。突然変異は、好ましくは、その全体の内容が参照により本明細書に組み込まれている米国特許第6,914,128号に記載されている「選択的突然変異誘発アプローチ」を用いて導入される。ヒト抗体は、アミノ酸残基、例えば、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていない活性増強アミノ酸残基によって置き換えられた少なくとも1つの位置を有することができる。ヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列の一部でないアミノ酸残基によって置き換えられた最高20個の位置を有することができる。他の実施形態において、最高10個、最高5個、最高3個または最高2個の位置が置き換えられる。好ましい一実施形態において、これらの置き換えは、以下において詳細に記載されているようにCDR領域の中にある。しかし、本明細書において使用される「ヒト抗体」という用語は、マウス等の別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上にグラフトされた抗体を含むことが意図されるものではない。ヒト抗体または完全ヒト抗体を生成するための方法は、当技術分野において公知であり、ヒトB細胞のEBV形質転換、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、mRNAディスプレイまたは他のディスプレイ技術によって調製された抗体ライブラリーに由来するヒト抗体または完全ヒト抗体の選択、更に上で定義された重鎖および軽鎖ゲノム領域の全部または一部を含むヒトIg遺伝子座の全部または一部に対してトランスジェニックであるマウスまたは他の種にも由来するヒト抗体または完全ヒト抗体の選択を包含する。選択されたヒト抗体は、意図された標的に対する親和性を増強するために、好ましくはCDR領域または隣接する残基のインビトロ突然変異誘発を含む、当技術分野において認識されている方法によって親和性成熟させることができる。

20

30

40

【0088】

50

「組換えヒト抗体」という句は、組換え手段によって調製、発現、作製もしくは単離されたヒト抗体を包含し、例えば、宿主細胞中にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現させた抗体（以下のセクション I I において更に記載されている）、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体（以下のセクション I I において更に記載されている）、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対してトランスジェニックな動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Taylor, L. D. ら（1992）Nuc l. A c i d s Res. 20: 6287-6295 参照）または他の DNA 配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含む他のいずれかの手段によって調製、発現、作製もしくは単離された抗体を包含する。かかる組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する（Kabat, E. A. ら（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242 参照）。しかし、ある種の実施形態において、かかる組換えヒト抗体はインビトロ突然変異誘発（または、ヒト Ig 配列にトランスジェニックな動物が使用される場合、インビボ体細胞突然変異誘発）に供され、従って、組換え抗体の VH および VL 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列 VH および VL 配列に由来し、近縁であるが、インビボにおいてヒト抗体生殖系列レパートリの中で天然に存在しなくてもよい配列である。しかし、ある種の実施形態において、かかる組換え抗体は、選択的突然変異誘発アプローチもしくは復帰突然変異または両方の結果である。

10

20

【0089】

本明細書において使用される「単離抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すことが意図される（例えば、ヒト IL-12 および／または IL-23 に特異的に結合する、例えばヒト IL-12 / IL-23 の p40 サブユニットに特異的に結合する単離抗体は、ヒト IL-12 および IL-23 以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない。）。しかし、ヒト IL-12 および／または IL-23 に特異的に結合する単離抗体は、他の種に由来するヒト IL-12 および／または IL-23 分子等の他の抗原との交差反応性を有し得る。更に、単離抗体は、他の細胞材料および／または化学物質を実質的に含まなくてよい。

【0090】

本明細書において使用される「中和抗体」（または「ヒト IL-12 および／または IL-23 活性を中和する抗体」もしくは「IL-12 / IL-23 の p40 サブユニットの活性を中和する抗体」）は、ヒト IL-12 および／または IL-23 に結合することによって（例えば、IL-12 / IL-23 の p40 サブユニットに結合することによって）、ヒト IL-12 および／または IL-23 の生物学的活性（例えば、IL-12 / IL-23 の p40 サブユニットの生物学的活性）を阻害する抗体を指すことが意図される。ヒト IL-12 および／または IL-23 の生物学的活性のこの阻害は、フィトヘマグルチニン芽球増殖アッセイ（PHA）におけるヒトフィトヘマグルチニン芽球増殖の阻害、またはヒト IL-12 および／または IL-23 受容体結合アッセイ（例えば、インターフェロンガンマ誘導アッセイ）における受容体結合の阻害等、ヒト IL-12 および／または IL-23 生物学的活性の1つ以上の指標を測定することによって評価され得る。ヒト IL-12 および／または IL-23 生物学的活性のこれらの指標は、当技術分野において公知の、その全体の内容が参照により本明細書に組み込まれている米国特許第6,914,128号（例えば、実施例3、第9欄第31行から第113欄第55行）に記載されている幾つかの標準インビトロまたはインビボアッセイの内の1つ以上によって評価され得る。

30

40

【0091】

「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト種（例えば、マウス）に由来する重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、VH および／または VL 配列の少なくとも部分がより「ヒト様」になるように、すなわちヒト生殖系列可変配列により類似するように改変させた抗体を指

50

す。ヒト化抗体の1つの型は、ヒトCDR配列が非ヒトVHおよびVL配列中に導入されて対応する非ヒトCDR配列を置き換えたCDRグラフト抗体である。また、「ヒト化抗体」は、対象となる抗原に特異的に結合し、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク（FR）領域および非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域（CDR）を含む抗体またはこの変異体、派生体、類似体もしくは断片である。

【0092】

「ヒンジ領域」という用語は、CH1ドメインをCH2ドメインに接合する重鎖分子の部分を意味する。ヒンジ領域は、約25の残基を含み、柔軟であるため、2つのN末端抗原結合領域を独立して移動させることができる。ヒンジ領域は、上部、中央および下部のヒンジドメインという、3つの異なるドメインに小区分され得る（Rouxら（1998）J. Immunol. 161:4083）。単一ジスルフィド結合を形成することが必要であるだけであるので、抗体分子の組み立てを容易にするためにヒンジ領域におけるシステイン残基の数が1つに減らされた幾つかの改変された抗体分子が作製されている。これはまた、別のヒンジ領域またはエフェクターもしくはレポーター分子にヒンジ領域を付着させるための特異的な標的をも提供する（米国特許第5,677,425号）。抗体ヒンジ中におけるシステイン残基の数も増加している（米国特許第5,677,425号）。IgG1ヒンジ領域およびCH2ドメインがヒトIgG3ヒンジ領域によって置き換えられた他の突然変異抗体が構築されている。（WO97/11370）。これらの分子は、チオール基を介した多数のハプテンの置換のための11個のスルフィド基を含有する。

【0093】

Igタンパク質の軽鎖成分は、2つの別々の遺伝子座（Igκ（カッパ）およびIgλ（ラムダ））によってコードされる。κまたはλ軽鎖を含有する抗体の割合は、異なる種の間で著しく変わり、例えば、κ：λ比は、ヒトにおける60：40と比較してマウスにおいては95：5である。ヒトにおいて、ほとんど全てのλ産生細胞が、再編成された両κ対立遺伝子を有するが、κおよびλ産生細胞の割合は同様である（Hietterら（1981）Nature 290:368-72、US20040231012）。B細胞は、κ軽鎖またはλ軽鎖のいずれか（アイソタイプ排除と称される選択）によって表面免疫グロブリン（Ig）を発現する。軽鎖V-J再編成は、プレBIIから未成熟B細胞までの遷移において出現し、ここで膜Igμ（ミュー）に関連付けられた代理軽鎖がκまたはλ軽鎖によって置き換えられる（Osmondら（1998）Immunol. Today 19:65-68）。軽鎖再編成のタイミングが本質的に定義されるにもかかわらず、軽鎖遺伝子座再編成を活性化するプロセスは完全には理解されていない。カッパおよびλ再編成は独立した事象であり（Arakawaら（1996）Int. Immunol. 8:91-99）、その活性化は、それらのそれぞれのエンハンサーの強度の差に影響を受け得る。ヒトλ遺伝子座の接近性の調節において重要であると考えられる領域は、Cλ7の約10Kb下流において同定されている（GlozakおよびBlomberg（1996）Mol. Immunol. 33:427-38、AsenbauerおよびKlobeck（1996）Eur. J. Immunol. 26:142-50）。レポーター遺伝子アッセイにおける機能比較は、プレB細胞中におけるエンハンサー活性を大幅に減少させ得る元素によってフラックされたコアエンハンサー領域を同定した（GlozakおよびBlomberg（1996））。トランスフェクション研究は、κおよびλ3'エンハンサー領域が機能的に同等であると思われることを示したにもかかわらず、コアエンハンサーモチーフをフラックする他の（機能的）配列は著しく異なる。トランスジェニックマウス中におけるκ3'エンハンサーの標的欠失は、この領域がκ遺伝子座再編成および発現に必須ではないが、κ：λ比を確立するために必要であることを示した（Gormanら（1996）Immunity 5:241-52）。

【0094】

染色体22q11.2上におけるヒトIgλ遺伝子座は、大きさが1.1Mbであり、典型的に70Vλ遺伝子および7Jλ-Cλ遺伝子セグメントを含有する（Frippi

10

20

30

40

50

atら(1995) Hum. Mol. Genet. 4:983-91、Kawasakiら(1997) Genome Res. 7:260-61)。Vλ遺伝子の約半分は機能的であると考えられ、Jλ-Cλ1、2、3および7は活性である。Vλ遺伝子は、異なるV遺伝子ファミリー群を含む3つのクラスターにおいて構成される。10のVλ遺伝子ファミリーがあり、最も大きなVλIIIは23のメンバーによって表される。ヒト末梢血リンパ球において、ファミリーI、IIおよびIIIに由来するクラスターA中におけるほとんどのJ-C近位V遺伝子セグメントは優先的に再編成され、2a2Vλセグメントの寄与(Giudicelliら(1997) Nucl. Acids Res. 25:206-11.)は、異例に高い(Ignatovichら(1997) J. Mol. Biol. 268:69-77)。全てのλ遺伝子セグメントは、欠失の再編成を可能にする同じ極性を有する(CombratoおよびKlobeck(1991) Eur. J. Immunol. 21:1513-22)。Igλレパートリの配列多様性は、主にVλ-Jλの組み合わせによって提供される。VからJの接合部におけるN(非コード)ーまたはP(パリンδροーム)ーヌクレオチド付加による更なるCDR3多様性は、IgH再編成において見られるものほど広範囲にはわたらないが、マウスにおける場合よりもヒトにおいて更により頻繁に用いられると思われ(Fosterら(1997) Clin. Invest. 99:1614-27、Ignatovich、博士論文、University of Cambridge、1998、Bridgesら(1995) J. Clin. Invest. 96:831-41、Victorら(1994) J. Immunol. 152:3467-75)、ここでTdT(末端デオキシリボヌクレオチドトランスフェラーゼ)活性は軽鎖再編成時に下方制御される。幾つかのλ軽鎖配列のアラインメントは、以下で提供され、

【0095】

【化1】

QPKAXPXVTLFPPSSEELQANKATLVCLXSDFYPGAVTVAWKADXSPVKXGVETTXPSKQ

SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCXVTHEGSTVEKTVAPXECES; Xは、A、N、T、S、I、V、G、K、Q またはRである。

	1		60
hC11	(1)	QPKAN P TVTLFPPSSEELQANKATLVCL I SDFYPGAVTVAWKAD G SPVK A GVETT K PSKQ	
hC12	(1)	QPKA A P S VTLFPPSSEELQANKATLVCL I SDFYPGAVTVAWKAD S SPVK A GVETT T PSKQ	
hC13	(1)	QPKA A P S VTLFPPSSEELQANKATLVCL I SDFYPGAVTVAWKAD S SPVK A GVETT T PSKQ	
hC17	(1)	QPKA A P S VTLFPPSSEELQANKATLVCL V SDFYPGAVTVAWKAD G SPVK V GVETT K PSKQ	
	61		105
hC11	(61)	SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC Q VTHEGSTVEKTVAP T ECES	
hC12	(61)	SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC Q VTHEGSTVEKTVAP T ECES	
hC13	(61)	SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC Q VTHEGSTVEKTVAP T ECES	
hC17	(61)	SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC R VTHEGSTVEKTVAP A ECES	

のコンセンサス配列があることを示す。

【0096】

ヒト抗体カッパ鎖は、非変異体アミノ酸配列に基づいて4つのサブ群に分類されている(例えば、Kabatra(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (第4版)、The U. S. Department of Health and Human Services出版参照)。約80のヒトVK遺伝子があると思われるが、1つのサブ群IV VK遺伝子だけがヒトゲノムにおいて同定されている(Klobeckら(1985) Nucleic Acids Research、13:6516-6528参照)。Hum4VLのヌクレオチド配列は、Kabatra(1991)(前掲)において説明されている。「Kabata番号付与」、「Kabata定義」および「Kabata標識」という用語は、本明細書において交換可能に使用される。当技術分野において認められているこれらの用語は、抗体またはこの抗原結合部分の重鎖および軽鎖可変領域における他のアミノ酸残基よりも可変的な(すなわち、超可変的な)アミノ酸残基に番号付与する系を指す(Kabatra(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391、Kabata、

E. A. ら (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242)。重鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1に対するアミノ酸位置31から35、CDR2に対するアミノ酸位置50から65およびCDR3に対するアミノ酸位置95から102の範囲にわたる。軽鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1に対するアミノ酸位置24から34、CDR2に対するアミノ酸位置50から56およびCDR3に対するアミノ酸位置89から97の範囲にわたる。

【0097】

本明細書において使用される「CDR」という用語は、抗体可変配列の中における相補性決定領域を指す。重鎖および軽鎖の各可変領域において3つのCDRがあり、これらは、各可変領域に対してCDR1、CDR2およびCDR3と表される。これらのCDRの正確な境界は、異なる系に従って、異なって定義されてきた。Kabat (同上)によって記載されている系は、抗体のいずれの可変領域に対しても適用可能な明確な残基番号付与系を提供するだけでなく、3つのCDRを定義する厳密な残基境界を提供する。これらのCDRは、Kabat CDRと称され得る。Chothiaらは、Kabat CDRの中におけるある種のサブ部分が、アミノ酸配列のレベルにおいて大きな多様性を有するにもかかわらず、ほとんど同一のペプチド骨格立体構造をとることを見出した (Chothiaら (1987) Mol. Biol. 196:901-917、Chothiaら (1989) Nature 342:877-883)。これらのサブ部分は、L1、L2およびL3またはH1、H2およびH3と表されたが、ここで「L」および「H」は、それぞれ軽鎖領域および重鎖領域を表す。これらの領域は、Chothia CDRと称されてよく、そのChothia CDRは、Kabat CDRと重複する境界を有する。Kabat CDRと重複するCDRを定義する他の境界は、Padlan (1995) FASEB J. 9:133-139およびMacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5):732-45によって記載されている。更に他のCDR境界定義が、本明細書において記載されている系の内の1つに厳密に従わない可能性があるが、それでもなお、Kabat CDRと重複するが、これらは、残基または更にCDR全体の特定の残基または基が抗原結合に著しい影響を及ぼさないという予測または実験結果に鑑みて短縮または延長され得る。本明細書において使用される方法は、これらの系のいずれかに従って定義されたCDRを利用することができるが、ある種の実施形態は、KabatまたはChothiaによって定義されたCDRを使用する。

【0098】

本明細書において使用される「フレームワーク」または「フレームワーク配列」という用語は、CDRを差し引いた可変領域の残りの配列を指す。CDR配列の正確な定義は異なる系によって決定され得るので、フレームワーク配列の意味は、対応して異なる解釈に従う。6つのCDR (軽鎖のCDR-L1、-L2および-L3ならびに重鎖のCDR-H1、-H2および-H3) は、軽鎖および重鎖上のフレームワーク領域をも、各鎖上の4つのサブ領域 (FR1、FR2、FR3およびFR4) に分割し、CDR1はFR1とFR2の間に位置し、CDR2はFR2とFR3の間に、CDR3はFR3とFR4の間に位置する。他者によって表されるように、FR1、FR2、FR3またはFR4として特定のサブ領域を特定することなく、フレームワーク領域は、天然に存在する単一の免疫グロブリン鎖の可変領域の中における組み合わせられたFRを表す。本明細書において使用される場合、1つのFRは、4つのサブ領域の内の1つを表し、複数のFRは、フレームワーク領域を構成する4つのサブ領域の内の2つ以上を表す。

【0099】

「キレーター」という用語は、広く、金属イオンに結合する薬剤、または金属イオンと錯体を形成する薬剤を指す。一実施形態において、かかる結合または錯体形成は、金属キレーターの1個以上の原子を含む。結合および錯体形成は、結合 (例えば、共有、供与またはイオン) のいずれかの形および組み合わせであってよい。一実施形態において、キレ

ーターは、金属イオンに結合することによって、または金属イオンと錯体を形成することによって、金属イオンを隔離する。金属キレーターの誘導体、類似体および組み合わせのフォーマットは、当技術分野において公知であり、それらの非限定的な実施形態は、以下において考察される。

【0100】

「ストレスをかけた正常ロット」という用語は、金属の非存在下で上昇した温度（典型的には25℃または40℃）において恒温放置されたロットを意味する。例えば、ストレスをかけた正常ロットにおいて、ラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む分子（例えば、抗体）の切断は、ヒンジ領域において、例えば、重鎖領域配列 Ser-Cys-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cys にわたる多数のペプチド結合において起きる可能性がある。

10

【0101】

「金属を実質的に含まない」または「ラムダ軽鎖の切断をもたらさない製剤中の金属の濃度」という句は、製剤中に存在するラムダ軽鎖含有抗体の正常または許容し得るレベルの断片化または切断、例えば、対応するストレスをかけた正常ロットにおいて観察された切断レベル、例えば、約0.5%の断片化が観察されるように十分に低い製剤中の金属の濃度（例えば25℃または40℃の温度で、例えば約160ppb未満、好ましくは約110未満、より好ましくは約70ppb未満）を指す。例えば、製剤中の金属の濃度は、ラムダ軽鎖における約0.1%未満、0.2%未満、0.3%未満、0.4%未満または0.5%未満だけの断片化または切断（例えば、ラムダ鎖のヒンジ領域）が観察されるような濃度である。製剤中のラムダ軽鎖含有抗体の断片化または切断のレベルは、例えば、SEC、キャピラリー電気泳動および／または質量分析によって決定され得る。

20

【0102】

「対象」という用語は、生物、例えば、原核生物および真核生物を包含することが意図される。対象の例としては、哺乳動物、例えば、ヒト、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、マウス、ウサギ、ラットおよびトランスジェニック非ヒト動物が挙げられる。本発明の特定の実施形態において、対象はヒトである。

【0103】

「医薬製剤」という用語は、活性成分の生物学的活性を明らかに有効にし得るような形態における、および製剤が投与される対象に対して著しく有毒な更なる成分を含有しない調製物を指す。「医薬的に許容し得る」賦形剤（例えば、ビヒクル、添加剤）は、用いられる活性成分の有効量を提供するように、対象哺乳動物に適度に投与され得るものである。

30

【0104】

「安定な」製剤は、この製剤中の抗体が保存の際にその物理的安定性および／または化学的安定性および／または生物学的活性を本質的に保持するものである。タンパク質の安定性を測定するための様々な分析技術は、当技術分野において利用可能であり、例えば、Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee編、Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Pubs. (1991) および Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993) において概説されている。安定性は、選択された温度で、選択された時間、測定され得る。好ましくは、製剤は、2から8℃の間で24ヵ月間安定である。更に、製剤は、好ましくは、-20から-80℃の間で、少なくとも18ヵ月間、好ましくは24ヵ月間安定である。更に、製剤は、好ましくは、以下において「凍結融解サイクル」と称される製剤の凍結（例えば、-80℃に）および融解（例えば、25から37℃において）の後で安定である。好ましくは、製剤は、少なくとも5回の凍結融解サイクルの後で安定である。

40

【0105】

抗体は、色および／または清澄度の目視検査の際、または紫外線散乱もしくはサイズ排除クロマトグラフィーにより測定して、凝集、沈殿および／または変性の兆候を実質的に

50

示さない場合、医薬製剤において「その物理的安定性を保持する」。

【0106】

抗体は、所定の時間における化学的安定性が以下において定義されるように抗体がその生物学的活性をなお保持すると考えられるようなものである場合、医薬製剤において「その化学的安定性を保持する」。化学的安定性は、化学的に改変した形の抗体を検出および定量することによって評価され得る。化学的改変は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、SDS-PAGEおよび／またはマトリックス支援レーザー脱離イオン化／飛行時間質量分析(MALDI/TOF MS)を使用して評価され得るサイズ修飾(例えば、クリッピング)を含む。化学的改変の他の型としては、例えばイオン交換クロマトグラフィーによって評価され得る(例えばアミド分解の結果として起きる)荷電の改変が挙げられる。

10

【0107】

抗体は、医薬製剤において抗体がその意図された目的に対して生物学的に活性である場合、医薬製剤において「その生物学的活性を保持する」。例えば、医薬製剤における抗体の生物学的活性が、(例えば抗原結合アッセイにおいて決定される通りの)医薬製剤が調製された時に示された生物学的活性の約30%、約20%または約10%の範囲内(アッセイの誤差の範囲内)にある場合、生物学的活性は保持される。

【0108】

「等張」は、例えば、対象となる製剤がヒト血液と本質的に同じ浸透圧を有することを意味し得る。等張製剤は、一般に、約250から350mOsmの浸透圧を有する。等浸透圧は、例えば蒸気圧または水凍結型浸透圧計を使用して測定され得る。「等張化剤」は、製剤を等張にする化合物である。

20

【0109】

「ポリオール」は、多数のヒドロキシル基を有する物質であり、糖(還元糖および非還元糖)、糖アルコールおよび糖酸を包含する。本明細書において好ましいポリオールは、約600kD未満の(例えば、約120から約400kDの範囲内における)分子量を有する。「還元糖」は、金属イオンを還元し得るまたはタンパク質におけるリシンおよび他のアミノ基と共有結合的に反応し得るヘミアセタール基を含有するものであり、「非還元糖」は、還元糖のこれらの性質を有さないものである。還元糖の例は、フルクトース、マンノース、マルトース、ラクトース、アラビノース、キシロース、リボース、ラムノース、ガラクトースおよびグルコースである。非還元糖としては、スクロース、トレハロース、ソルボース、メレチトースおよびラフィノースが挙げられる。マンニトール、キシリトール、エリトリトール、トレイトール、ソルビトールおよびグリセロールは、糖アルコールの例である。糖酸に関して、これらは、L-グルコネートおよびこの金属塩を包含する。ポリオールは、等張化剤としての役割を果たすこともできる。本発明の一実施形態において、製剤の1種の成分は、約10から約100mg/ml(例えば1-10%)の濃度におけるマンニトールである。本発明の特定の一実施形態において、マンニトールの濃度は、30から50mg/ml(例えば3-5%)である。本発明の好ましい一実施形態において、マンニトールの濃度は、約40mg/ml(例えば4%)である。

30

【0110】

本明細書において使用される「緩衝液」は、その酸塩基コンジュゲート成分の作用によるpHの変化に耐える緩衝溶液である。本発明において使用される緩衝液は、約4.0から約4.5、約4.5から約5.0、約5.0から約5.5、約5.5から約6.0、約6.0から約6.5、約5.7から約6.3、約6.5から約7.0、約7.5から約8.0の範囲内におけるpHを有する。一実施形態において、本発明の緩衝液は、約5以下のpHを有する。一実施形態において、本発明の緩衝液は、約6のpHを有する。この範囲内にpHを制御する緩衝液の例としては、酢酸(例えば、酢酸ナトリウム)緩衝液、コハク酸(例えば、コハク酸ナトリウム)緩衝液、グルコン酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、メチオニン緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、イミダゾール緩衝液および他の有機酸緩衝液が挙げられる。本発明の一実施形態において、緩衝液系は、ヒスチジンを含む。本発

40

50

明の特定の一実施形態において、緩衝液系は、ヒスチジンおよびメチオニンを含む。一実施形態において、緩衝液系は、5-7（例えば、約5または約6）のpHを有して、1-50mMのヒスチジン（例えば、5-40mMの間、10-30mMの間または10-20mMの間）を含む。好ましい一実施形態において、本発明の緩衝液系は、5-7（例えば、約5または約6）のpHを有して、1-50mMのヒスチジン（例えば、5-40mMの間、10-30mMの間または10-20mMの間）および1-50mMのメチオニン（例えば、5-40mMの間、10-30mMの間または10-20mMの間）を含む。一実施形態において、緩衝液系は、約6のpHを有して、約10mMのヒスチジンを含む。一実施形態において、緩衝液系は、約5以下のpHを有して、約10mMのヒスチジンを含む。本発明の特に好ましい一実施形態において、緩衝液は、約6のpHを有して、約10mMのヒスチジンおよび約10mMのメチオニンを含む。本発明の別の好ましい一実施形態において、緩衝液は、約5以下のpHを有して、約10mMのヒスチジンおよび約10mMのメチオニンを含む。

【0111】

本発明の別の実施形態において、緩衝液系は、ヒスチジンおよびリン酸塩を含む。特定の一実施形態において、緩衝液系は、1-50mMの間（例えば、5-40mMの間、10-30mMの間または10-20mMの間）、好ましくは約10mMの濃度におけるヒスチジン、および1-60mMの間（例えば、10-50mMの間、20-40mMの間）、好ましくは30mMの濃度におけるリン酸塩（例えば、リン酸水素ナトリウム）を含む。好ましい一実施形態において、緩衝液系は、ヒスチジン、メチオニンおよびリン酸塩を含み、例えば、緩衝液系は、1-50mMの間（例えば、5-40mMの間、10-30mMの間または10-20mMの間）、好ましくは約10mMの濃度におけるヒスチジン、1-50mMの間（例えば、5-40mMの間、10-30mMの間または10-20mMの間）、好ましくは約10mMの濃度におけるメチオニン、および1-60mMの間（例えば、10-50mMの間、20-40mMの間または20-30mMの間）、好ましくは約30mMの濃度におけるリン酸塩を含む。

【0112】

別の実施形態において、緩衝液系は、ヒスチジンおよびクエン酸塩を含む。特定の一実施形態において、緩衝液系は、1-50mMの間（例えば、5-40mMの間、10-30mMの間または10-20mMの間）、好ましくは約10mMの濃度におけるヒスチジン、および1-60mMの間（例えば、10-50mMの間または20-40mMの間）、好ましくは約30mMの濃度におけるクエン酸塩を含む。好ましい一実施形態において、緩衝液系は、ヒスチジン、メチオニンおよびクエン酸塩を含み、例えば、緩衝液系は、1-50mMの間（例えば、5-40mMの間、10-30mMの間または10-20mMの間）、好ましくは約10mMの濃度におけるヒスチジン、1-50mMの間（例えば、5-40mMの間、10-30mMの間または10-20mMの間）、好ましくは約10mMの濃度におけるメチオニン、および1-60mMの間（例えば、10-50mMの間または20-40mMの間）、好ましくは約30mMの濃度におけるクエン酸塩を含む。

【0113】

更に別の実施形態において、緩衝液系は、イミダゾールを含む。一実施形態において、緩衝液系は、1-50mMの間、5-40mMの間、5-30mMの間、10-30mMの間、10-20mMの間、好ましくは例えば10mMの濃度におけるイミダゾールを含む。好ましい一実施形態において、緩衝液系は、イミダゾールおよびメチオニンを含み、例えば、1-50mMの間（例えば、5-40mMの間、5-30mMの間、10-30mMの間または10-20mMの間）、好ましくは10mMの濃度におけるイミダゾール、および1-50mMの間（例えば、5-40mMの間、10-30mMの間または10-20mMの間）、好ましくは約10mMの濃度におけるメチオニンを含む。

【0114】

なお別の実施形態において、緩衝液系は、リン酸塩およびクエン酸塩を含み、例えば

、1－50 mMの間（例えば、5－40 mMの間、5－30 mMの間、10－20 mMの間）、好ましくは10 mMの濃度におけるリン酸塩（例えばリン酸水素ナトリウム）、および1－50 mMの間（例えば、5－40 mMの間、5－30 mMの間、10－20 mMの間）、好ましくは10 mMの濃度におけるクエン酸塩（クエン酸）を含む。

【0115】

前述の緩衝液系のいずれかにおいて、pHは、好ましくは、約2から7の間、約3から7の間、約4から7の間、例えば、約5以下（例えば、約2から5の間、約2.5から5の間、約3から5の間、約3.5から5の間、約4.0から5の間または約4.5から5の間）または約6である。

【0116】

本発明の文脈における薬理学的意味において、抗体の「治療上有効量」または「有効量」は、障害の処置のために抗体が有効である障害の予防または処置において有効な量を指す。「障害」は、抗体による処置から利益を受けるあらゆる状態である。これは、対象を当該の障害にかかりやすくする素因になるそれらの病的状態が含まれる慢性および急性の障害または疾患を含む。

【0117】

「保存剤」は、製剤中の細菌作用を本質的に減少させるように製剤中に含まれ得る化合物であり、従って、例えば多回使用製剤の製造を容易にする。可能な保存剤の例としては、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム（アルキル基が長鎖化合物であるアルキルベンジルジメチルアンモニウムクロリドの混合物）および塩化ベンゼトニウムが挙げられる。保存剤の他の型としては、芳香族アルコール、例えば、フェノール、ブチルおよびベンジルアルコール、アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3－ペンタノールおよびm－クレゾールが挙げられる。

【0118】

「処置」は、治療上の処置および予防的または防止的対策の両方を指す。処置を必要とするそれらとしては、すでに障害を有するそれらならびに障害が予防されるべきそれらが挙げられる。

【0119】

本明細書において使用される「非経口投与」および「非経口的に投与される」の句は、通常は注射による腸内および局所投与以外の投与様式を意味し、限定されるものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、脊髄内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経皮気管内、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、髄腔内および胸骨内注射または注入を包含する。

【0120】

本明細書において使用される「全身投与」、「全身的に投与される」、「末梢投与」および「末梢的に投与される」という句は、患者の系に入り、従って代謝および他の同様のプロセスを受けるような、中枢神経系中への直接の投与以外の化合物、薬物または他の材料の投与、例えば皮下投与を意味する。

【0121】

「医薬的に許容し得る担体」という句は、認識されている技術であり、哺乳動物への投与に適切な医薬的に許容し得る材料、組成物またはビヒクルを包含する。担体としては、ある器官または身体の部分から別の器官または身体の部分への対象となる薬剤の運搬または輸送に関与する液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒または封入材料が挙げられる。各担体は、製剤の他の成分と適合性があり、患者に対して有害でないという意味において「許容し得る」必要がある。

【0122】

本明細書において使用される（本明細書においてhIL-12またはIL-12と略記される）「ヒトインターロイキン12」または「ヒトIL-12」という句は、主にマクロファージおよび樹状細胞によって分泌されたヒトサイトカインを包含する。この用語は

10

20

30

40

50

、両方がジスルフィド架橋によって一緒に連結された35kDサブユニット(p35)および40kDサブユニット(p40)を含むヘテロダイマータンパク質を含む。ヘテロダイマータンパク質は、「p70サブユニット」と称される。ヒトIL-12の構造は、更に、例えば、Kobayashiら(1989) J. Exp. Med. 170:827-845、Sederら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:10188-10192、Lingら(1995) J. Exp. Med. 154:116-127、Podlaskiら(1992) Arch. Biochem. Biophys. 294:230-237およびYoonら(2000) EMBO Journal 19(14):3530-3541において記載されている。ヒトIL-12という用語は、標準組換え発現方法によって調製され得る組換えヒトIL-12(rh IL-12)を包含することが意図される。

10

【0123】

本明細書において使用される(本明細書においてhIL-23またはIL-23と略記される)「ヒトインターロイキン23」または「ヒトIL-23」という句は、主にマクロファージおよび樹状細胞によって分泌されたヒトサイトカインを包含する。この用語は、両方がジスルフィド架橋によって一緒に連結された19kDサブユニット(p19)および40kDサブユニット(p40)を含むヘテロダイマータンパク質を含む。ヘテロダイマータンパク質は、「p40/p19」ヘテロダイマーと称される。ヒトIL-23の構造は、更に、例えば、Beyerら(2008) J. Mol. Biol. 382:942-955、Lupardusら(2008) J. Mol. Biol. 382:931-941において記載されている。ヒトIL-23という用語は、標準組換え発現方法によって調製され得る組換えヒトIL-23(rh IL-23)を包含することが意図される。

20

【0124】

本明細書において使用される「ヒトIL-12/IL-23のp40サブユニット」または「ヒトIL-12および/またはIL-23のp40サブユニット」または「p40サブユニット」は、ヒトIL-12およびヒトIL-23によって共有されたp40サブユニットを指すことが意図される。IL-12/IL-23のp40サブユニットの構造は、例えば、Yoonら(2000) EMBO Journal 19(14):3530-3541において記載されている。

30

【0125】

「活性」という用語は、例えば、抗原に対する抗体(例えば、IL-12および/またはIL-23抗原に結合する抗p40抗体)の結合特異性/親和性、および/または、抗体(例えば、ヒトIL-12および/またはヒトIL-23への結合がヒトIL-12および/またはヒトIL-23の生物学的活性を阻害する抗p40抗体)の中和力価、例えば、PHA芽球増殖の阻害またはヒトIL-12受容体結合アッセイにおける受容体結合の阻害(例えば、米国特許第6,914,128号の実施例3参照)等の活性を包含する。

【0126】

「表面プラズモン共鳴」という句は、例えば、BIAcoreシステム(Pharmacia Biosensor AB、Uppsala、SwedenおよびPiscataway、NJ)を用いて、バイオセンサマトリックスにおけるタンパク質濃度の変化の検出によってリアルタイムな生物特異的相互作用の分析を可能にする光学現象を包含する。更なる記載について、Jonsson, U. ら(1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26、Jonsson, U. ら(1991) Biotechniques 11:620-627、Johnsson, B. ら(1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131、およびJohnsson, B. ら(1991) Anal. Biochem. 198:268-277を参照されたい。

40

【0127】

本明細書において使用される「K_{off}」という用語は、抗体/抗原複合体からの抗体

50

の解離に対する解離速度定数を指すことが意図される。

【0128】

本明細書において使用される「 K_d 」という用語は、特定の抗体抗原相互作用の解離定数を指すことが意図される。

【0129】

I I. 本発明の組成物および方法

断片化をモニターするためにサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、質量分析 (MS) およびキャピラリー電気泳動 (CE) を使用して、ヒスチジンおよび金属 (鉄または銅のいずれか) の両方が一緒に作用してラムダ軽鎖含有分子を断片化する分解経路を見出した。鉄およびヒスチジンの両方は、 40°C において抗体分子のヒンジ領域における断片化の動態を増進するために必要である。鉄またはヒスチジンは、単独で、IgG 分子の断片化の動態の増進に対してほとんどまたは全く影響を及ぼさなかった。多くの異なる金属によって行われた金属スパイク研究は、抗体製剤中の鉄または銅の存在が用量依存的な様式における抗体の切断をもたらすことを示した。デスフェリオキサミン (鉄特異的キレーター) による鉄のキレート化は、この断片化を抑止した。ラムダ鎖またはカッパ鎖のいずれかを有する IgG 分子の検討は、この断片化機構がラムダ鎖を含有する分子に対して特異的であることを示す。カッパおよびラムダ軽鎖は、これらの C 末端領域が異なり、ラムダ軽鎖は、システイン残基の後に余分のセリン残基を有する。

【0130】

凝集物および断片をモニターするため、および上昇した温度における長期間の恒温放置の後で抗体の断片を分画するために、SEC を用いた。正確に断片を定量するためだけでなく、他の分解種をも定量するために、CE-SDS を用いた。ストレスをかけた正常ロットの MS スペクトルは、断片 2 (Fab + Fc) 上における主要な切断部位が重鎖の残基 C/D、D/K、K/T、T/H および H/T の間にあることを示した (図 4)。重鎖のセリン-217 とシステイン-218 残基 (S/C) の間における切断は、鉄およびヒスチジンを含有する製剤中で増大し、結果的に HC 断片 1-217 の上昇したレベルが MS スペクトルにおいて認められた (図 6)。ストレスをかけた正常ロットと同様に、システイン-218 から開始する対応する Fab + Fc 断片は見出されなかった。代わりに、アスパラギン酸から開始する Fab + Fc 断片 (C/D 間の切断) およびアスパラギン酸断片への 27Da の付加を示した種の上昇が観察された。遊離 LC (残基 1-217) は MS スペクトルにおいて観察されなかったが、グルタミン酸によって終止した断片 1-215 を与える残基 E/C の間で切断された LC の上昇したレベルが検出された。これらの結果は、鉄誘発切断が、HC および LC を一緒に保持するジスルフィド結合の周囲における残基に局在化したことを示す。

【0131】

金属イオンは、異なる方法においてタンパク質の酸化および分解を触媒することが公知である。これらの金属イオンは、(部位特異的な) システイン残基のチオール基と直接反応してラジカルを生成し、または酸素と反応して、スーパーオキシドラジカルアニオン、ヒドロキシルラジカルおよび過酸化水素等の多くの反応性酸素種を生成することができる (Li, S. ら (1995) Biotech. および Bioeng. 48:490-500、Li, S. ら (1993) Pharm. Res. 10 (11):1572-1579、Kocha, T. ら (1997) BBA 1337:319-326)。金属イオンおよび還元環境 (DTT、アスコルビン酸) の存在下で生成された反応性酸素種 (ROS) は、タンパク質骨格を切断する (Kim, R. ら (1985))。いかなる特定の理論によって束縛されることを望むものではないが、銅およびヒスチジンのキレートが様々な酸化を触媒する可能性がある。鉄およびヒスチジンのキレートが報告されている (Davison, A. J. (1968) J. Biol. Chem. 243 (22):6064-6067、Lavanant, H. ら (1999) Int. J. Mass Spectrom. 185/186/187:11-23)。ラムダ軽鎖は、カッパ鎖上において存在しない遊離セリン残基を有する。最近の報告は、C 末端セリン残基によって終止するペプチド

が、金属の存在下で効率的に加水分解されることを示している（Y a s h i r o , M . ら（2003）O r g . B i o m o l . C h e m . 1 : 6 2 9 - 6 3 2 ）。

【0132】

一実施形態において、濾過方法としては、透析濾過、限外濾過またはそれらの組み合わせが挙げられる。一実施形態において、緩衝液交換方法としては、透析が挙げられる。別の一実施形態において、緩衝液交換は、脱塩カラムの使用を含む。一実施形態において、クロマトグラフィー方法は、抗体を捕獲するためのプロテインAまたは弱カチオン交換クロマトグラフィー等のアフィニティークロマトグラフィーの使用を含む。

【0133】

一実施形態において、樹脂交換方法は、金属に結合して剥離させるためのC h e l e x - 1 0 0 の使用を含む。

【0134】

一実施形態において、L C、H C中のアミノ酸は、置換される、または金属およびヒスチジン関連切断を阻害するために欠失される。置換または欠失され得るアミノ酸は、ラムダ軽鎖上において存在するC末端セリン残基を含む。他の残基は、重鎖上におけるシステイン残基に隣接したセリン残基を含む。

【0135】

I I I . 本発明の製剤における使用に適した抗体

本発明は、約5から約7の間にp Hを有し、例えば2 - 8 °Cの温度で、または- 2 0 から- 1 8 0 °Cの間の温度で好ましくは少なくとも約2 4 ヶ月の増強した安定性を有するヒスチジン緩衝溶液中に抗体を含む製剤を提供する。本発明の別の一実施形態において、主張された製剤は、少なくとも5回の凍結融解サイクルの後で安定なままである。好ましい一実施形態において、製剤中の金属の量は、抗体の切断、例えば抗体のラムダ軽鎖の切断を防止するように十分に低い。好ましくは、主張された製剤は、金属を含まない。別の好ましい一実施形態において、製剤は、金属の存在下で、例えばラムダ軽鎖のヒンジ領域内において、抗体が切断されないまたはより低い程度で切断される金属キレーターを含む。なお別の一実施形態において、本発明の医薬製剤は、単回s c注射に適切である。

【0136】

製剤において使用され得る抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、組換え抗体、一本鎖抗体、ハイブリッド抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはこれらの断片が挙げられる。抗原に対する1または2つの結合部位および免疫グロブリンのF c部分を含有する抗体様分子も使用され得る。本発明の好ましい一実施形態において、製剤において使用された抗体は、ラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む。本発明の製剤において使用される好ましい抗体は、ヒト抗体である。好ましい一実施形態において、製剤は、単離されたヒト組換え抗体である抗体またはこの抗原結合部分を含有する。別の特定の一実施形態において、抗体は、ラムダ鎖含有抗体またはこの抗原結合部分である。

【0137】

本発明の一態様において、製剤は、ヒト抗体、例えば、I L - 1 2 / I L - 2 3 のp 4 0サブユニットのエピトープに結合するラムダ鎖を含むヒト抗体を含有する。一実施形態において、抗体は、p 4 0サブユニットがI L - 1 2 のp 3 5サブユニットに結合する場合、p 4 0サブユニットに結合する。一実施形態において、抗体は、p 4 0サブユニットがI L - 2 3 のp 1 9サブユニットに結合する場合、p 4 0サブユニットに結合する。一実施形態において、抗体はp 4 0サブユニットに結合するが、それは、そのサブユニットがI L - 1 2 のp 3 5サブユニットに結合する場合であり、更に、p 4 0サブユニットがI L - 2 3 のp 1 9サブユニットに結合する場合である。好ましい一実施形態において、抗体またはこの抗原結合部分は、その全体の内容が参照により本明細書に組み込まれている米国特許第6, 9 1 4, 1 2 8号において記載されているもの等の抗体である。例えば、好ましい一実施形態において、抗体は、米国特許第6, 9 1 4, 1 2 8号において記載されているようにY 6 1およびJ 6 9 5から成る群から選択される抗体が結合するI L - 1 2 のp 4 0サブユニットのエピトープに結合する。米国特許第6, 9 1 4, 1 2 8号に

において記載されているように、J 6 9 5 は、ヒト抗体の中でとりわけ好ましい。I L - 1 2 および／または I L - 2 3 に結合し、本発明の製剤において使用され得る他の抗体としては、その全体の内容が参照により本明細書に組み込まれている米国特許第 6, 9 0 2, 7 3 4 号において記載されているように、ヒト抗 I L - 1 2 抗体 C 3 4 0 が挙げられる。

【0138】

一実施形態において、本発明の製剤は、抗体の組み合わせ（2 種以上）または抗体の「カクテル」を含む。例えば、製剤は、抗体 J 6 9 5 および 1 種以上の更なる抗体を含むことができる。

【0139】

一態様において、本発明の製剤は、J 6 9 5 抗体および抗体部分、J 6 9 5 関連抗体および抗体部分、ならびに低解離速度および高中和能力を有する h I L - 1 2 / I L - 2 3 への高親和性結合等、J 6 9 5 と同等な性質を有する他のヒト抗体および抗体部分を含有する。例えば、本発明の一実施形態において、製剤は、表面プラズモン共鳴によって決定される通りの 1.34×10^{-10} M 以下の K_d または 1×10^{-3} s⁻¹ 以下の K_{off} 速度定数によってヒト I L - 1 2 / I L - 2 3 の p 4 0 サブユニットから解離するヒト抗体またはこの抗原結合部分を含有する。好ましくは、抗体またはこの抗原結合部分は、 1×10^{-4} s⁻¹ 以下の k_{off} 速度定数によって、より好ましくは 1×10^{-5} s⁻¹ 以下の k_{off} 速度定数によって、または 1×10^{-10} M 以下の K_d によって、より好ましくは 9.74×10^{-11} M 以下の K_d によって、ヒト I L - 1 2 / I L - 2 3 の p 4 0 サブユニットから解離する。

【0140】

I L - 1 2 / I L - 2 3 抗体の解離速度定数 (K_{off}) は、表面プラズモン共鳴によって決定され得る。一般に、表面プラズモン共鳴分析は、B I A c o r e システム (P h a r m a c i a B i o s e n s o r, P i s c a t a w a y, N J) を用いて表面プラズモン共鳴 (S P R) によってリガンド (バイオセンサマトリックス上に固定された組換えヒト I L - 1 2) と分析物 (溶液中の抗体) の間のリアルタイムな結合相互作用を測定する。表面プラズモン分析は、分析物 (バイオセンサマトリックス上の抗体) を固定し、リガンド (溶液中の組換え I L - 1 2 / I L - 2 3) を提示することによっても実施され得る (例えば、その内容が参照により本明細書において組み込まれている U S 6, 9 1 4, 1 2 8 の実施例 5 において記載されているアッセイを参照されたい。)。I L - 1 2 / I L - 2 3 抗体またはこの抗原結合部分の中和活性は、幾つかの適切なインビトロアッセイの内の 1 つ以上を用いて評価され得る (例えば、その内容が参照により本明細書に組み込まれている U S 6, 9 1 4, 1 2 8 の実施例 3 において記載されているアッセイを参照されたい。)。

【0141】

本発明の別の実施形態において、製剤は、ヒト I L - 1 2 / I L - 2 3 の p 4 0 サブユニットの生物学的活性を中和するヒト抗体またはこの抗原結合部分を含有する。一実施形態において、抗体またはこの抗原結合部分は、遊離 p 4 0、例えば、モノマー p 4 0 または p 4 0 ホモダイマー、例えば、2 つの同一の p 4 0 サブユニットを含有するダイマーの生物学的活性を中和する。好ましい実施形態において、抗体またはこの抗原結合部分は、p 4 0 サブユニットが I L - 1 2 の p 3 5 サブユニットに結合する場合および／または p 4 0 サブユニットが I L - 2 3 の p 1 9 サブユニットに結合する場合、p 4 0 サブユニットの生物学的活性を中和する。様々な実施形態において、抗体またはこの抗原結合部分は、 1×10^{-7} M 以下の $I C_{50}$ によって、好ましくは 1×10^{-8} M 以下の $I C_{50}$ によって、より好ましくは 1×10^{-9} M 以下の $I C_{50}$ によって、いっそうより好ましくは 1×10^{-10} M 以下の $I C_{50}$ によって、最も好ましくは 1×10^{-11} M 以下の $I C_{50}$ によって、インビトロ P H A アッセイにおいて、ヒト I L - 1 2 誘発フィトヘマグルチニン芽球増殖を阻害する。他の実施形態において、抗体またはこの抗原結合部分は、 1×10^{-10} M 以下の $I C_{50}$ によって、好ましくは 1×10^{-11} M 以下の $I C_{50}$ によって、より好ましくは 5×10^{-12} M 以下の $I C_{50}$ によって、ヒト I L - 1 2

誘発ヒト I F N γ 産生を阻害する。

【0142】

本発明の更に別の一実施形態において、製剤は、配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 および配列番号2のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を有するヒト抗体またはこの抗原結合部分を含有する。一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 および配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2 を更に有する。一実施形態において、ヒト抗体またはこの抗原結合部分は、配列番号5のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1 および配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1 を更に有する。特に好ましい一実施形態において、抗体またはこの抗原結合部分は、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。本発明の製剤の抗体またはこの抗原結合部分は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A および I g E 定常領域から成る群から選択される重鎖定常領域を含むことができる。好ましくは、抗体重鎖定常領域は、I g G 1 である。様々な実施形態において、抗体またはこの抗原結合部分は、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片または一本鎖 F v 断片である。

10

【0143】

ラムダ鎖含有抗体、例えば、本発明の製剤中に含まれ得るラムダ鎖含有抗体の例は、当技術分野において周知であり、本発明によって包含されると考えられる。ラムダ鎖含有抗体の例としては、その全体の内容が参照により本明細書に組み込まれている国際出願第 W O 2 0 0 7 / 1 4 9 0 3 2 号において記載されている通りの抗 I L - 1 7 抗体 A n t i b o d y 7 (C a m b r i d g e A n t i b o d y T e c h n o l o g y)、抗 I L - 1 2 / I L - 2 3 抗体 J 6 9 5 (A b b o t t L a b o r a t o r i e s)、抗 I L - 1 3 抗体 C A T - 3 5 4 (C a m b r i d g e A n t i b o d y T e c h n o l o g y)、抗ヒト C D 4 抗体 C E 9 y 4 P E (I D E C - 1 5 1、クレノリキシマブ) (B i o g e n I D E C / G l a x o S m i t h K l i n e)、抗ヒト C D 4 抗体 I D E C C E 9 . 1 / S B - 2 1 0 3 9 6 (ケリキシマブ) (B i o g e n I D E C)、抗ヒト C D 8 0 抗体 I D E C - 1 1 4 (ガリキシマブ) (B i o g e n I D E C)、抗狂犬病ウイルスタンパク質抗体 C R 4 0 9 8 (フォラヴィルマブ (f o r a v i r u m a b)) および抗ヒト T N F 関連アポトーシス誘発リガンド受容体 2 (T R A I L - 2) 抗体 H G S - E T R 2 (レクサツムマブ) (H u m a n G e n o m e S c i e n c e s , I n c .) が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0144】

I V . 製剤の調製

本発明は、当技術分野において認識されている製剤と比較して改善された性質を有する製剤（例えば、タンパク質製剤および／または抗体製剤）を特徴とする。例えば、本発明の製剤は、当技術分野において認識されている製剤と比較して改善された貯蔵寿命および／または安定性を有する。一実施形態において、本発明の製剤は、例えば液体状態または固体状態において、少なくとも 1 8 ヶ月の貯蔵寿命を有する。別の一実施形態において、本発明の製剤は、例えば液体状態または固体状態において少なくとも 2 4 ヶ月の貯蔵寿命を有する。好ましい一実施形態において、本発明の製剤は、2 - 8 °C の温度で少なくとも 2 4 ヶ月の貯蔵寿命を有する。好ましい一実施形態において、本発明の製剤は、約 - 2 0 から - 8 0 °C の間の温度で少なくとも 1 8 ヶ月または少なくとも 2 4 ヶ月の貯蔵寿命を有する。別の一実施形態において、本発明の製剤は、製剤の少なくとも 5 回の凍結融解サイクルの後で安定性を維持する。好ましい一態様において、本発明の製剤は、（製剤が、当技術分野において認識されている製剤と比較して、ラムダ軽鎖の断片化に対する増強された耐性、例えばラムダ軽鎖の減少した切断を提供する）分子、例えば、ラムダ軽鎖の少なくとも一部を含む抗体を含む。

40

【0145】

好ましい一態様において、本発明の製剤は、金属を実質的に含まない。好ましい一実施形態において、本発明の製剤は、F e 2 + および F e 3 + から成る群から選択される金属

50

を実質的に含まない。別の好ましい一実施形態において、本発明の製剤は、Cu²⁺およびCu¹⁺から成る群から選択される金属を実質的に含まない。好ましい一実施形態において、本発明の製剤は、ヒスチジンの存在下でラムダ鎖の切断を減少または防止するために十分に低い量の金属を含み、例えば、金属は、約5, 060 ppb未満、約1, 060 ppb未満、約560 ppb未満、約500 ppb未満、約450 ppb未満、約400 ppb未満、約350 ppb未満、約310 ppb未満、約300 ppb未満、約250 ppb未満、約200 ppb未満、約160 ppb未満、約150 ppb未満、約140 ppb未満、約130 ppb未満、約120 ppb未満、約110 ppb未満、約100 ppb未満、約90 ppb未満、約80 ppb未満、約70 ppb未満、約60 ppb未満、約50 ppb未満、約40 ppb未満、約30 ppb未満、約20 ppb未満、約10 ppb未満または約1 ppb未満の濃度で存在する。好ましい一実施形態において、金属は、約160 ppb未満の濃度で存在する。好ましい一実施形態において、金属は、約110 ppb未満の濃度で存在する。特に好ましい一実施形態では、金属は、約70 ppb未満の濃度、例えば約60 ppbの濃度で存在する。最大濃度は、上記の列挙された濃度（例えば、約65 ppb未満）の間にあり、本発明の一部であることが意図されもする。更に、上限および／または下限としての上記の列挙された値のいずれかの組み合わせを用いた値の範囲（例えば、約50 ppbから約70 ppbの間の濃度）も含まれることが意図される。

【0146】

好ましい一実施形態において、本発明の製剤は、濾過、緩衝液交換、クロマトグラフィーまたは樹脂交換等、金属を除去する少なくとも1つの手法に供した後で金属を実質的に含まない。本発明の製剤から金属を除去するために有用な手法は、当業者に公知であり、本明細書において、例えば以下の実施例において更に記載される。別の好ましい一実施形態において、本発明の製剤は、例えば、分子がヒンジ領域の中で切断されないように、または金属キレーターの非存在下で観察される切断のレベル未満のレベルにおいてヒンジ領域の中で切断されるように、金属キレーターを含む。本発明の製剤において、金属キレーターは、例えば、シデロホア、カリクセレン、アミノポリカルボン酸、ヒドロキシアミノカルボン酸、N-置換グリシン、2-（2-アミノ-2-オキソエチル）アミノエタンスルホン酸（BES）、二座、三座または六座鉄キレーター、銅キレーターならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせであってよい。一実施形態において、金属キレーターは、デスフェリオキサミンである。本発明の製剤において有用な金属キレーターは当業者に公知であり、非排他的な実施例が以下に記載される。

【0147】

本発明の製剤において有用な特定のシデロホアとしては、アエロバクチン、アグロバクチン、アゾトバクチン、バシリバクチン、N-（5-C₃-L（5アミノペンチル）ヒドロキシカルバモイル）-プロピオンアミド）ペンチル）-3（5-（N-ヒドロキシアセトアミド）-ペンチル）カルバモイル）-プロプリオンヒドロキサム酸（デフェロキサミン、デスフェリオキサミンまたはDFOもしくはDEF）、デスフェリチオシン、エンテロバクチン、エリスロバクチン、フェリクローム、フェリオキサミンB、フェリオキサミンE、フルビアバクチン、フサリニンC、ミコバクチン、パラバクチン、シュードバクチン、ビブリオバクチン、ブルニバクチン、イェルシニアバクチン、オルニバクチンならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0148】

本発明の製剤において有用なアミノポリカルボン酸としては、ニトリロ三酢酸（NTA）、トランス-ジアミノシクロヘキサン四酢酸（DCTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、N-2-アセトアミド-2-イミノ二酢酸（ADA）、アスパラギン酸、ビス（アミノエチル）グリコールエーテルN, N, N'-N'-四酢酸（EGTA）、グルタミン酸およびN, N'-ビス（2-ヒドロキシベンジル）エチレンジアミン-N, N'-二酢酸（HBED）ならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせが挙げられる

が、これらに限定されるものではない。

【0149】

本発明の製剤において有用なヒドロキシアミノカルボン酸としては、N-ヒドロキシエチルイミノ二酢酸 (HIMDA)、N, N-ビスヒドロキシエチルグリシン (ビシン) および N- (トリスヒドロキシメチルメチル) グリシン (トリシン) ならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。N-置換グリシン、例えば、グリシルグリシン、ならびにこれらの誘導体、類似体または組み合わせも本発明の製剤中の金属キレーターとして有用である。金属キレーター 2- (2-アミノ-2-オキソエチル) アミノエタンスルホン酸 (BES) ならびにこの誘導体、類似体および組み合わせも使用され得る。

10

【0150】

本発明の製剤において有用な特定のカリックスアレーンとしては、フェノールおよびアルデヒドのヒドロシアルキル化生成物に基づく大環状もしくは環状オリゴマー、またはこの誘導体、類似体および組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明において有用な特定の銅のキレーターとしては、トリエチレンテトラミン (トリエンチン)、テトラエチレンペンタミン (tetraethylenepentamine)、D-ペニシラミン、エチレンジアミン、ビスピリジン、フェナントロリン、バソフェナントロリン、ネオクプロイン、バトクプロインスルフォネート、クプリゾン、シス, シス-1, 3, 5-トリアミノシクロヘキサン (TACH)、Tachpyr ならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせが挙げられる。

20

【0151】

本発明の製剤において用いられ得る更なる金属キレーターとしては、クエン酸塩、ヒドロキシピリジン誘導体、ヒドラゾン誘導体およびヒドロキシフェニル誘導体またはニコチン誘導体、例えば、1, 2-ジメチル-3-ヒドロキシピリジン-4-オン (Deferriprone、DFPまたはFerriprox)、2-デオキシ-2- (N-カルバモイルメチル- [N'-2'-メチル-3'-ヒドロキシピリジン-4'-オン]) -D-グルコピラノース (Ferallex-G)、ピリドキサルイソニコチンヒドラゾン (PIH)、4, 5-ジヒドロ-2- (2, 4-ジヒドロキシフェニル) -4-メチルチアゾール-4-カルボン酸 (GT56-252)、4- [3, 5-ビス (2-ヒドロキシフェニル) - [1, 2, 4] トリアゾール-1-イル] 安息香酸 (ICL-670)、N, N'-ビス (o-ヒドロキシベンジル) エチレンジアミン-N, N'-二酢酸 (HBED)、5-クロロ-7-ヨードキノリン-8-オール (クリオキノール) ならびにこれらの誘導体、類似体および組み合わせが挙げられる。

30

【0152】

前述の金属キレーターのいずれかの内の2つ以上の組み合わせが、本発明の製剤において組み合わせて使用され得ることが認識される。例えば、本発明の特定の一実施形態において、製剤は、DTPAおよびDEFの組み合わせを含む。別の実施形態において、製剤は、EGTAおよびDEFの組み合わせを含む。

【0153】

好ましい一態様において、本発明の製剤は、例えば、約45mg/ml超のタンパク質濃度、約50mg/ml超のタンパク質濃度、約100mg/ml超のタンパク質濃度、約110mg/ml超のタンパク質濃度、約120mg/ml超のタンパク質濃度、約130mg/ml超のタンパク質濃度、約140mg/ml超のタンパク質濃度、約150mg/ml超のタンパク質濃度、約160mg/ml超のタンパク質濃度、約170mg/ml超のタンパク質濃度、約180mg/ml超のタンパク質濃度、約190mg/ml超のタンパク質濃度、約200mg/ml超のタンパク質濃度、約210mg/ml超のタンパク質濃度、約220mg/ml超のタンパク質濃度、約230mg/ml超のタンパク質濃度、約240mg/ml超のタンパク質濃度、約250mg/ml超のタンパク質濃度または約300mg/ml超のタンパク質濃度が含まれる高タンパク濃度を含む。本発明の好ましい一実施形態において、タンパク質は、ラムダ軽鎖の少なくとも部分を

40

50

含む。本発明の好ましい一実施形態において、タンパク質は、抗体、例えば、ラムダ軽鎖の少なくとも部分を含む抗体である。本発明の好ましい一実施形態において、抗体は、I 1-12/I L-23のp 40サブユニットに結合する。別の好ましい一実施形態において、抗体は、例えばその全体の内容が参照により本明細書に組み込まれている米国特許第6, 914, 128号において記載されているように、J 695である。

【0154】

対象となる抗体の調製は、当技術分野において公知の標準法に従って実施される。本発明の好ましい一実施形態において、製剤において使用された抗体は、例えばC H O細胞等の細胞において発現させられ、クロマトグラフィー段階の標準系列によって精製される。更に好ましい一実施形態において、抗体は、I L-12/I L-23のp 40サブユニットに特異的であり、その全体の内容が参照により本明細書に組み込まれている米国特許第6, 914, 128号において記載されている方法に従って調製される。

【0155】

対象となる抗体の調製後、抗体を含む医薬製剤が調製される。製剤中に存在する抗体の治療上有効量は、例えば、所望の用量体積および（1つ以上の）投与様式を考慮に入れることによって決定される。本発明の一実施形態において、製剤中の抗体の濃度は、液体製剤1 mlにつき約0.1から約250 mgの間の抗体である。本発明の一実施形態において、製剤中の抗体の濃度は、液体製剤1 mlにつき約1から約200 mgの間の抗体である。様々な実施形態において、製剤中の抗体の濃度は、1 mlにつき約30から約140 mgの間、約40から約120 mg/mlの間、約50から約110 mg/mlの間または約60から約100 mg/mlの間である。製剤は、15 mg/ml超の大きな抗体用量にとりわけ適切である。様々な実施形態において、製剤中の抗体の濃度は、1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240または250 mg/mlである。好ましい一実施形態において、抗体の濃度は50 mg/mlである。別の好ましい一実施形態において、抗体の濃度は100 mg/mlである。好ましい一実施形態において、抗体の濃度は、少なくとも約100 mg/ml、少なくとも約110 mg/mlまたは少なくとも約120 mg/mlである。

【0156】

本発明の様々な実施形態において、製剤中の抗体の濃度は、約0.1-250 mg/ml、0.5-220 mg/ml、1-210 mg/ml、約5-200 mg/ml、約10-195 mg/ml、約15-190 mg/ml、約20-185 mg/ml、約25-180 mg/ml、約30-175 mg/ml、約35-170 mg/ml、約40-165 mg/ml、約45-160 mg/ml、約50-155 mg/ml、約55-150 mg/ml、約60-145 mg/ml、約65-140 mg/ml、約70-135 mg/ml、約75-130 mg/ml、約80-125 mg/ml、約85-120 mg/ml、約90-115 mg/ml、約95-110 mg/ml、約95-105 mg/mlまたは約100 mg/mlである。範囲は、上記の列挙された濃度（例えば、約31-174 mg/ml）の間にあり、本発明の一部であることが意図されもする。例えば、上限および/または下限としての上記の列挙された値のいずれかの組み合わせを用いた値の範囲が含まれることが意図される。

【0157】

一実施形態において、本発明は、ポリオール、界面活性剤および約5から7のp Hを有する緩衝液系と組み合わせて活性成分、好ましくは抗体から構成される改善された安定性または延長された貯蔵寿命を有する製剤を提供する。一実施形態において、製剤は、安定剤を更に含む。一実施形態において、前記製剤は、金属を含まない。好ましい一実施形態において、延長された貯蔵寿命の改善された安定性を有する製剤は、活性成分、好ましくは抗体、ならびにマンニトール、ヒスチジン、メチオニン、ポリソルベート80、塩化水素酸および水を含む。更なる一実施形態において、本発明の製剤は、液体状態において約2から8℃の間で少なくとも約24ヵ月の延長された貯蔵寿命を有する。本発明の製剤の

凍結を、その貯蔵寿命を更に延長するために用いることもできる。更なる一実施形態において、本発明の製剤は、製剤の少なくとも5回の凍結融解サイクルの後で安定性を維持する。

【0158】

水性の製剤は、pH緩衝溶液中で抗体を含んで調製される。本発明の緩衝液は、約4から約8、好ましくは約4.5から約7.5、より好ましくは約5から約7、より好ましくは約5.5から約6.5、の範囲にわたるpHを有し、最も好ましくは約6.0から約6.2のpHを有する。特に好ましい一実施形態において、緩衝液は、約6のpHを有する。別の好ましい一実施形態において、緩衝液は、例えば2.5から5.0、3.0から5.0、3.5から5.0、4.0から5.0および4.5から5.0等の約5以下のpHを有する。上記の列挙されたpHのもの間にある範囲も本発明の一部であることが意図される。例えば、上限および／または下限としての上記の列挙された値のいずれかの組み合わせを用いた値の範囲が含まれることが意図される。この範囲内にpHを制御する緩衝液の例としては、酢酸塩（例えば、酢酸ナトリウム）、コハク酸塩（例えば、コハク酸ナトリウム）、グルコン酸塩、ヒスチジン、クエン酸塩、リン酸塩、イミダゾールおよび他の有機酸緩衝液が挙げられる。本発明の好ましい一実施形態において、製剤は、ヒスチジンを含む緩衝液系を含有する。本発明の好ましい一実施形態において、緩衝液は、ヒスチジン、例えば、L-ヒスチジンである。好ましい実施形態において、本発明の製剤は、約1-100mMのヒスチジン、好ましくは約5-50mMのヒスチジン、最も好ましくは10mMのヒスチジンを含む緩衝液系を含む。別の一実施形態において、製剤は、ヒスチジンおよびクエン酸塩を含む緩衝液系、またはヒスチジンおよびリン酸塩を含む緩衝液系を含む。更に別の一実施形態において、製剤は、イミダゾールを含む緩衝液系を含む。更に別の一実施形態において、製剤は、クエン酸塩およびホスホン酸塩（phosphate）を含む緩衝液系を含む。当業者は、例えば、1-300mM、最適には液体剤形に対して150mMの濃度で溶液の毒性を修飾するために塩化ナトリウムを使用することができることを認識する。

【0159】

等張化剤（tonicifier）としての役割を果たし、抗体を安定させ得るポリオールも製剤中に含まれる。ポリオールは、製剤の所望の等浸透圧によって変わり得る量において製剤に加えられる。好ましくは、水性製剤は等張性である。加えられるポリオールの量は、ポリオールの分子量によって変わり得る。例えば、二糖（例えば、トレハロース）と比較して、より少ない量の単糖（例えば、マンニトール）を加えることができる。本発明の好ましい一実施形態において、等張化剤としての製剤においてすなわち使用されるポリオールは、マンニトールである。好ましい一実施形態において、組成物は、約10から約100mg/ml、または約20から約80、約20から約70、約30から約60、約30から約50mg/mlのマンニトール、例えば、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90および約100mg/mlのマンニトールを含む。好ましい一実施形態において、製剤は、（約4%のマンニトールに対応する）約40mg/mlのマンニトールを含む。好ましい一実施形態において、組成物は、約1%から約10%の間のマンニトール、より好ましくは約2%から約6%の間のマンニトール、最も好ましくは約4%のマンニトールを含む。本発明の別の一実施形態において、ポリオールソルビトールは、製剤中に含まれる。

【0160】

また、本明細書において記載されている抗体製剤に安定剤または抗酸化剤を加えることもできる。安定剤は、液体剤形および凍結乾燥剤形の両方において使用され得る。本発明の製剤は、安定剤としてメチオニン（例えば、L-メチオニン）を含むことができる。例えば、酸化することによって、メチオニンは、製剤中に存在する他の緩衝液の安定効果を強化するように作用することができる。しかし、本発明のある種の実施形態において、ある種の状況下において、メチオニンは、安定剤としてではなく、緩衝液系の一部として製剤中に存在し、例えば、メチオニンは、安定剤としての役割を果たすことに不十分な量に

において製剤中に存在することができる。本発明の製剤において有用な他の安定剤は当業者に公知であり、グリシンおよびアルギニンを含むが、これらに限定されるものではない。凍結乾燥剤形に対して、凍結保護剤、主にスクロース（例えば、1-10%のスクロース、最適には0.5-1.0%のスクロース）が含まれ得る。他の適切な凍結保護剤（cryoprotectant）としては、トレハロースおよびラクトースが挙げられる。

【0161】

洗浄剤または界面活性剤も抗体製剤に加えられる。例示的な洗浄剤としては、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート20、80等）またはポロキサマー（例えば、ポロキサマー188）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。加えられる洗浄剤の量は、製剤化された抗体の凝集を減少させ、および／または製剤中の微粒子の形成を最小限にし、および／または吸着を減少させるようなものである。本発明の好ましい一実施形態において、製剤は、ポリソルベートである界面活性剤を含む。本発明の別の好ましい一実施形態において、製剤は、洗浄剤ポリソルベート80またはTween 80を含有する。Tween 80は、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレエートを記載するために使用される用語である（Fiedler, Lexikon der Hefstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 第4版、1996参照）。好ましい一実施形態において、製剤は、0.001から約0.1%の間のポリソルベート80、または約0.005から0.05%の間のポリソルベート80、例えば、約0.001、約0.005、約0.01、約0.05または約0.1%のポリソルベート80を含有する。好ましい一実施形態において、約0.01%のポリソルベート80が、本発明の製剤中に見出される。

【0162】

本明細書における実施例において記載されるように、製剤成分の幾つかは、抗体分子の安定性に負の影響を及ぼすことなく、例えば、抗体分子の断片化を促進または増加させることなく、製剤中に含まれ得、または存在し得る。例えば、界面活性剤、例えば、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート80）またはポロキサマー（例えば、ポロキサマー188）は、抗体の断片化を促進または増加させることなく製剤に加えられる。ポリオール、例えば、マンニトールは、抗体の断片化を促進または増加させることなく製剤に加えられる。アミノ酸、例えば、アルギニンも、抗体の断片化を促進または増加させることなく製剤に加えられる。有機系緩衝液、例えば、酢酸塩は、抗体の断片化を促進または増加させることなく製剤に加えられる。従って、酢酸塩（酢酸）を使用して、例えば、抗体分子の安定性に負の影響を及ぼすことなく製剤のpHを低下させることができる。更に、製剤のイオン強度は、抗体分子の安定性（例えば、断片化）に影響を及ぼさないので、例えばNaCl等の塩を製剤に加えることができる。

【0163】

本発明の好ましい一実施形態において、製剤は、以下で表1において示される成分を含有する容器中の1.0mLの溶液である。別の一実施形態において、製剤は、容器中の0.8mLの溶液である。

【0164】

10

20

30

40

【表 1】

表 1：注射用 J 6 9 5 製剤の 1. 0 m L 溶液¹⁾

成分名	量	機能
活性物質：		
抗体（J 6 9 5） ²⁾	5 0. 0 または 1 0 0. 0 m g	活性物質
賦形剤：		
マンニトール	4 0 m g	等張化剤
ポリソルベート 8 0	0. 1 0 m g	洗浄剤／界面活性剤
ヒスチジン	1. 5 5 m g	緩衝液
メチオニン	1. 4 9 m g	緩衝液
注射用水	1 m l まで	溶媒
塩化水素酸	十分量	6. 0 への p H 調整

¹⁾ 溶液の密度：1. 0 3 9 8 g / m L

²⁾ 濃縮物として使用される

【0 1 6 5】

一実施形態において、製剤は、上で確認した薬剤（すなわち、抗体、ポリオール／等張化剤、界面活性剤および緩衝液）を含有し、ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、クロロブタノールおよびベンゼトニウム C l 等の 1 種以上の保存剤を本質的に含まない。別の実施形態において、保存剤は、特に製剤が多回用量製剤である場合、製剤中に含まれ得る。1 種以上の他の医薬的に許容し得る担体、賦形剤または安定剤、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 第 1 6 版、Osol, A. 編（1 9 8 0）において記載されているものは、製剤の所望の特徴に著しい悪影響を与えないならば、製剤中に含まれ得る。許容し得る担体、賦形剤または安定剤は、用いられる用量および濃度でレシピエントに対して無毒性であり、更なる緩衝剤、共溶媒、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）、キレート剤（例えば、E D T A）、金属錯体（例えば、Z n-タンパク質錯体）、生分解性ポリマー（例えば、ポリエステル）および／または塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）を包含する。

【0 1 6 6】

本発明の組成物は、様々な形態においてあってよい。これらとしては、例えば、液体、半固体および固体剤形、例えば、液体溶液（例えば、注射用および注入用溶液）、分散液または懸濁液、錠剤、丸剤、粉剤、リポソームおよび坐剤が挙げられる。好ましい形態は、意図された投与様式および医療適用に依存する。典型的な好ましい組成物は、他の抗体によるヒトの受動免疫化のために使用されるものと類似の組成物等、注射用または注入用溶液の形態においてある。好ましい投与様式は、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。好ましい一実施形態において、抗体は、静脈内注入または注射によって投与される。別の好ましい一実施形態において、抗体は、筋肉内または皮下注射によって投与される。従って、好ましくは、抗体は、注射用溶液として調製される。注射用溶液は、フリントもしくはアンバーバイアル、アンプルまたはプレフィルドシリンジ中の液体または凍結乾燥剤形から構成され得る。本発明の好ましい一実施形態において、抗体を含む安定な製剤が、プレフィルドシリンジ中で調製される。

【0 1 6 7】

本明細書における製剤は、処置される特定の適応症の必要に応じて1種以上の他の治療剤と併用してもよく、製剤の抗体に悪影響を与えない相補的活性を有するものが好ましい。かかる治療剤は、意図された目的に有効な量における併用において適切に存在する。かかる併用治療は、有利には、投与された治療剤のより低い用量を利用することができ（例えば、相乗的治療効果は、併用治療を用いることを通じて達成され得、次に、より低い用量の抗体の使用によって所望の治療効果を達成することができる。）、従って、様々な単剤治療に伴って生じ得る毒性または合併症が回避される。本発明の好ましい一実施形態において、IL-12/IL-23のp40サブユニットに結合する抗体は、IL-12/IL-23のp40サブユニットの活性が有害である障害を処置するのに有用な1種以上の更なる治療剤と共製剤化および／または同時投与される。例えば、本発明の製剤の抗体または抗体部分は、他の標的に結合する1種以上の更なる抗体（例えば、他のサイトカイン（例えば、IL-17）に結合する抗体または細胞表面分子に結合する抗体）と共製剤化および／または同時投与され得る。更に、本発明の製剤の抗体は、前述の治療剤の内の2種以上と併用され得る。本発明の製剤と併用され得る更なる治療剤は、米国特許第6,914,128号（例えば、第76欄第10行から第78欄第53行）において更に記載されている。米国特許第6,914,128号の全体の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0168】

インビボにおける投与に使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、製剤の調製の前または後における無菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。

20

【0169】

V. 製剤の投与

本発明の製剤は、その全体の内容が参照により本明細書に組み込まれている米国特許第6,914,128号に記載されているものと類似の適応症において使用され得、それらの適応症は、以下において更に詳述される。

【0170】

本発明の一態様において、本発明の安定な製剤は、IL-12および／またはIL-23に結合する（例えば、IL-12および／またはIL-23のp40サブユニットに結合する）ならびにIL-12および／またはIL-23の活性を阻害する（例えば、IL-12および／またはIL-23のp40サブユニットの活性を阻害する）抗体を含む。本明細書において使用される「IL-12および／またはIL-23活性阻害製剤」という用語は、IL-12および／またはIL-23に結合する（例えば、IL-12および／またはIL-23のp40サブユニットに結合する）ならびにIL-12および／またはIL-23の活性を阻害する（例えば、IL-12および／またはIL-23のp40サブユニットの活性を阻害する）抗体を含む製剤を包含することが意図される。

30

【0171】

製剤の「有効量」という用語は、IL-12および／またはIL-23活性を阻害するために（例えば、IL-12/IL-23のp40サブユニットの活性を阻害するために）、例えば、有害なIL-12および／またはIL-23活性関連状態の様々な形態的および身体的症状を予防するために必要なまたは十分な量である。別の一実施形態において、製剤の有効量は、所望の結果を達成するために必要な量である。一例において、製剤の有効量は、有害なIL-12および／またはIL-23活性（例えば、IL-12/IL-23のp40サブユニットの有害な活性）を阻害するために十分な量である。別の一例において、製剤の有効量は、表1において記載されるように、50mg/mlまたは100mg/mlの抗体（例えば、40mgまたは80mgの抗体）を含有する製剤0.8mLである。別の一例において、製剤の有効量は、表1において記載されるように、50mg/mlまたは100mg/mlの抗体（例えば、50mgまたは100mgの抗体）を含有する製剤1.0mLである。有効量は、対象のサイズおよび体重、または疾患の型等の因子に応じて変わり得る。例えば、IL-12および／またはIL-23活性阻害製剤の選択は、「有効量」を構成するものに影響を及ぼす可能性がある。当業者であれば、上

40

50

述の因子を検討し、過度の実験を行うことなく I L - 1 2 および／または I L - 2 3 活性阻害製剤の有効量に関する決定を為すことができる。

【0172】

投与レジメンは、有効量を構成するものに影響を及ぼす可能性がある。I L - 1 2 および／または I L - 2 3 活性阻害製剤は、有害な I L - 1 2 および／または I L - 2 3 活性の発現の前または後に対象に投与され得る。更に、幾つかの分割された用量ならびに時間をずらせた用量を毎日もしくは逐次的に投与することができ、または用量を、連続的に注入することができ、もしくはボラス注射することができる。更に、I L - 1 2 および／または I L - 2 3 活性阻害製剤の用量は、治療状況または予防状況の緊急性によって示されるように比例的に増加または減少させることができる。

10

【0173】

「処置される」、「処置する」または「処置」という用語は、処置される状態、障害または疾患に伴うまたは起因する少なくとも1つの症状の軽減または緩和を包含する。例えば、処置は、障害の1つもしくは複数の症状の軽減または障害の完全な根絶であり得る。

【0174】

本発明の医薬製剤中の活性成分（抗体）の実際の用量レベルは、患者に対して毒性となることなく特定の患者、組成物および投与様式に対する所望の治療応答を達成するために有効な活性成分の量を得るように変わり得る。

【0175】

選択された用量レベルは、製剤中に見出された抗体の活性、投与経路、投与時間、用いられる特定の化合物の排泄率、処置期間、用いられる特定の化合物と併用する他の薬物、化合物および／または材料、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、一般健康状態および以前の病歴ならびに医療分野において周知の因子等の様々な因子に依存する。

20

【0176】

当技術分野における通常の知識を有する医師または獣医師は、本発明の医薬組成物の必要な有効量を容易に決定および処方することができる。例えば、医師または獣医師は、医薬製剤において用いられる本発明の化合物の用量を、所望の治療効果を達成するために必要なレベルよりも低いレベルから開始し、所望の効果が達成されるまで用量を漸増させることができる。

【0177】

一般に、本発明の製剤の適切な1日用量は、治療効果を生じるために有効な最低用量である製剤のその量である。かかる有効量は、一般に上記の因子に依存する。本発明の製剤の有効量は、I L - 1 2 および／または I L - 2 3 活性が有害である障害に罹患している対象における I L - 1 2 および／または I L - 2 3 活性（例えば、I L - 1 2 / I L - 2 3 の p 4 0 サブユニットの活性）を阻害する量である。好ましい一実施形態において、製剤は、1回の注射につき活性成分（抗体）の 4 0 m g、5 0 m g、8 0 または 1 0 0 m g の有効用量を提供する。別の一実施形態において、製剤は、抗体の約 0. 1 から 2 5 0 m g の範囲にわたる有効用量を提供する。所望により、医薬製剤の有効1日用量は、1日を通して適切な間隔において、場合によって単位用量形態において別々に投与される 2、3、4、5、6 回以上に分けた用量として投与され得る。

30

40

【0178】

本発明の一実施形態において、製剤中の抗体の用量は、約 1 から約 2 0 0 m g の間である。一実施形態において、製剤中の抗体の用量は、約 3 0 から約 1 4 0 m g の間、約 4 0 から約 1 2 0 m g の間、約 5 0 から約 1 1 0 m g の間、約 6 0 から約 1 0 0 m g の間または約 7 0 から約 9 0 m g の間である。更なる一実施形態において、組成物は、例えば、約 1、1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、1 1 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、1 6 0、1 7 0、1 8 0、1 9 0、2 0 0、2 1 0、2 2 0、2 3 0、2 4 0 または 2 5 0 m g において I L - 1 2 および／または I L - 2 3 に結合する（例えば、I L - 1 2 および／または I L - 2 3（例えば、J 6 9 5）の p 4 0 サブユニットに結合する）抗体用量またはこの抗原結合断片を含む。

50

【0179】

上記の列挙された用量の間にある範囲（例えば、約2－139mg）も本発明の部分であることが意図される。例えば、上限および／または下限としての上記の列挙された値のいずれかの組み合わせを用いた値の範囲が含まれることが意図される。

【0180】

用量の値が緩和すべき状態の重症度と共に変わり得るという点に留意する必要がある。任意の特定の対象のための特定の用量レジメンは、個体の必要性および組成物の投与者または投与監理者の専門的判断に従って経時的に調整されるべきであり、本明細書において記載されるその用量範囲は例示に過ぎず、主張された組成物の範囲または実施を限定することが意図されないことを更に理解するべきである。

10

【0181】

本発明は、一実施形態において、IL-12および／またはIL-23活性が有害である障害に罹患している対象においてIL-12および／またはIL-23活性（例えば、IL-12および／またはIL-23のp40サブユニットの活性）を阻害するために使用される延長された貯蔵寿命を有する医薬製剤を提供し、対象におけるIL-12および／またはIL-23活性が阻害されるように本発明の抗体または抗体部分を対象に投与することを含む。好ましくは、IL-12および／またはIL-23はヒトIL-12および／またはIL-23であり、対象はヒト対象である。別の場合、対象は、本発明の抗体が交差反応するIL-12および／またはIL-23を発現する哺乳動物であり得る。また更に、対象は、（例えば、IL-12および／またはIL-23の投与によって、またはIL-12および／またはIL-23導入遺伝子の発現によって）IL-12および／またはIL-23が導入された哺乳動物であり得る。本発明の製剤は、（以下で更に考察される）治療目的のためにヒト対象に投与され得る。本発明の一実施形態において、液体医薬製剤は、容易に投与可能（administable）であり、例えば患者によって自己投与される製剤を包含する。好ましい一実施形態において、本発明の製剤は、sc注射を通じて投与され、単回使用が好ましい。更に、本発明の製剤は、獣医学的目的のためにまたはヒト疾患の動物モデルとして抗体が交差反応するIL-12および／またはIL-23を発現する非ヒト哺乳動物（例えば、霊長類、ブタまたはマウス）に投与され得る。後者に関して、かかる動物モデルは、本発明の抗体の治療有効性を評価するため（例えば、用量および投与時間経過の試験）に有用であり得る。

20

30

【0182】

本明細書において使用される「IL-12および／またはIL-23のp40サブユニットの活性が有害である障害」または「IL-12および／またはIL-23活性が有害である障害」という用語は、障害に罹患している対象におけるIL-12および／またはIL-23（例えば、このp40サブユニット）の存在が、障害の病態生理の原因であるもしくは障害の増悪に寄与する因子であることが示されたまたは推測される疾患および他の障害を包含することが意図される。従って、IL-12および／またはIL-23活性が有害である障害は、IL-12および／またはIL-23活性の阻害（例えば、IL-12および／またはIL-23のp40サブユニットの活性の阻害）が障害の症状および／または進行を緩和させると予想される障害である。かかる障害は、例えば、（例えば上記の通りの抗p40IL-12および／またはIL-23抗体を使用して検出され得る）障害に罹患している対象の生物学的液中のIL-12および／またはIL-23の濃度の増加、例えば、IL-12および／またはIL-23のp40サブユニットの濃度の増加（例えば、対象の血清、血漿、滑液等におけるIL-12および／またはIL-23の濃度、例えば、IL-12および／またはIL-23のp40サブユニットの濃度の増加）によって証明され得る。

40

【0183】

IL-12および／またはIL-23活性（例えば、IL-12および／またはIL-23のp40サブユニットの活性）が有害である障害の多くの例がある。かかる障害の例は、参照により本明細書に組み込まれている米国出願第60/126,603号において

50

記載されている。IL-12および／またはIL-23活性（例えば、IL-12および／またはIL-23のp40サブユニットの活性）が有害である障害の例は、その全体の内容が参照により本明細書に組み込まれている米国特許第6,914,128号（例えば、第81欄第9行目から第82欄第59行目）においても記載されている。

【0184】

特定の障害の処置におけるIL-12および／またはIL-23（例えば、IL-12および／またはIL-23のp40サブユニット）に結合する抗体を含む本発明の製剤の使用は、以下で更に考察される。

【0185】

A. 関節リウマチ

インターロイキン-12およびインターロイキン-23は、関節リウマチ等の炎症性疾患の役割を果たすことに関連づけられている。関節リウマチ患者に由来する滑液中で誘導性IL-12p40メッセージが検出されており、関節リウマチを有する患者に由来する滑液中にIL-12が存在することが示されている（例えば、Moritaら（1998）Arthritis and Rheumatism 41:306-314参照）。関節リウマチ滑膜の下内層中にIL-12陽性細胞が存在することが見出されている。関節リウマチに対するコラーゲン誘導関節炎（CIA）マウスモデルにおいて、関節炎の前における抗IL-12mAb（ラット抗マウスIL-12モノクローナル抗体、C17.15）によるマウスの処置は、発症を非常に抑制し、疾患の発現率および重症度を低下させた。関節炎の発症後における早期の抗IL-12mAbによる処置は重症度を低下させたが、疾患の発症後における抗IL-12mAbによるマウスの遅い処置は、疾患重症度に対して最小限の影響を及ぼした。IL-23のp19サブユニットまたはIL-12/23のp40サブユニットを欠失している遺伝子標的マウスを使用して、コラーゲン誘導関節炎の発生にIL-23が重要であることが示された（Murphyら（2003）J. Exp. Med. 198（12）:1951-1957）。

【0186】

従って、本発明のヒト抗体および抗体部分は、例えば、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、ライム関節炎、リウマチ性脊椎炎、骨関節炎および痛風性関節炎を処置するために使用され得る。典型的には、抗体または抗体部分は、全身的に投与されるが、ある種の障害については、抗体または抗体部分の局所投与が有益であり得る。本発明の抗体または抗体部分はまた、自己免疫疾患の処置において有用な1種以上の更なる治療剤と共に投与することもできる。

【0187】

B. クロウン病

インターロイキン-12およびインターロイキン-23は、炎症性腸疾患（例えば、クロウン病および潰瘍性大腸炎）においても役割を果たす。IFN-γおよびIL-12の増加した発現が、クロウン病を有する患者の腸粘膜中で起こる（例えば、Faisら（1994）J. Interferon Res. 14:235-238、Parronchiら（1997）Amer. J. Pathol. 150:823-832、Monteleoneら（1997）Gastroenterology 112:1169-1178、Berrebiら（1998）Amer. J. Pathol. 152:667-672参照）。抗IL-12抗体は、大腸炎のマウスモデル（例えば、TNBS誘導性大腸炎IL-2ノックアウトマウスおよび最近ではIL-10ノックアウトマウス）において、疾患を抑制することが示されている。IL-23の増加した発現もまた、クロウン病を有する患者において観察されており、炎症性腸疾患（例えば、TNBS誘導性大腸炎）のマウスモデルおよびRAG1ノックアウトマウスにおいて観察されている。IL-23は、T細胞媒介性大腸炎に対して本質的であることが示され、大腸炎のマウスモデルにおいて、例えば、IL-10ノックアウトマウスにおいて、IL-17およびIL-6依存性機構を通じて炎症を促進することが示されている（例えば、Zhangらによる総説（2007）Intern. Immunopharmacology 7:409-416参照

）。従って、本発明の抗体および抗体部分は、炎症性腸疾患の処置において使用され得る。

【0188】

C. 多発性硬化症

インターロイキン-12およびインターロイキン-23は、多発性硬化症の主要な媒介物質として関連づけられている。誘導性IL-12 p40メッセージまたはIL-12自体の発現は、多発性硬化症を有する患者の病変において実証され得る（Windhagenら（1995）J. Exp. Med. 182:1985-1996、Drulovicら（1997）J. Neurol. Sci. 147:145-150）。多発性硬化症を有する慢性の進行性患者は、IL-12の上昇した循環レベルを有する。多発性硬化症を有する患者に由来するT細胞および抗原提示細胞（APC）による検討は、Th1型免疫応答につながる進行性多発性硬化症の基礎として自己永続的な一連の免疫相互作用を明らかにした。T細胞からのIFN- γ の増加した分泌は、APCによる増加したIL-12産生につながり、増加したIL-12産生は、Th1型免疫活性化および疾患の慢性状態につながるサイクルを永続させた（Balashovら（1997）Proc. Natl. Acad. Sci. 94:599-603）。多発性硬化症におけるIL-12およびIL-23の役割は、多発性硬化症のマウスおよびラット実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）モデルを使用して検討されてきた。マウスにおける多発性硬化症の再発寛解型EAEモデルにおいて、抗IL-12 mAbによる前処置は、麻痺を遅延させ、臨床スコアを低下させ、麻痺のピーク時または後続の寛解期の間における抗IL-12 mAbによる処置は、臨床スコアを低下させた。また、EAEマウスモデルにおいて、IL-23のp19サブユニットに対する抗体による処置は、EAEの誘導を予防し、確立された疾患を逆転させた（Chenら 2006 J. Clinical Investigation 116（5）:1317-1326）。IL-23を欠失している遺伝子標的マウスを使用して、脳の自己免疫性炎症に対してIL-23が重要であることが示された（Cuara（2003）Nature 421:7440748）。IL-12/IL-23のp40サブユニットに対する抗体は、多発性硬化症の非ヒト霊長類モデル（例えば、コモンマーモセットにおけるEAE）において有益な活性を有することが示された（Hartら 2008 Neurodegenerative Dis. 5:38-52）。（また、Granらによる総説、2004 Crit. Rev. Immunol. 24:111-128、McKenzieら 2006 Trends Immunol 27:17-23も参照されたい。）従って、本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、ヒトにおける多発性硬化症に伴う症状を緩和させる役目をすることができる。

【0189】

D. インスリン依存性糖尿病

インターロイキン-12は、インスリン依存性糖尿病（IDDM）の重要な媒介物質として関連づけられた。IL-12の投与によって、NODマウスにおいてIDDMが誘導され、抗IL-12抗体は、IDDMの養子移入モデルにおいて保護的であった。早期発症型IDDM患者は、多少の残存する膵島細胞機能が維持されているいわゆる「ハネムーン期間」を経験する場合が多い。これらの残存する膵島細胞は、インスリンを産生し、投与されたインスリンよりも良好に血中グルコースレベルを調節する。これらの早期発症型患者の抗IL-12抗体による処置は、膵島細胞の更なる破壊を予防することができ、これによってインスリンの内生源を維持することができる。ストレプトゾトシンの分割した糖尿病誘発性の多回低用量と共に同時投与した場合にIL-23がマウスにおける糖尿病を誘導したという観察に基づいて、IL-23は、糖尿病を悪化させることに関連づけられてきた（例えば、Cookによる総説 2006 Rev. Diabet. Stud. 3（2）:72-75参照）。従って、本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、糖尿病に伴う症状を緩和させる役目をするすることができる。

【0190】

E. 乾癬

インターロイキン-12およびインターロイキン-23は、乾癬の主要な媒介物質として関連づけられている。乾癬は、TH1型サイトカイン発現プロファイルを伴う急性および慢性の皮膚病変を伴う（Hamidら（1996）J. Allergy Clin. Immunol. 1:225-231、Turkaraら（1995）Mol. Med. 1:690-699）。マウスにおいて、IL-12/IL-23のp40サブユニットの過剰発現および組換えIL-23の注射の両方は、炎症性皮膚疾患をもたらし、マウス乾癬モデルへの抗IL-12p40抗体の投与は、乾癬病変を消失させた。罹病したヒト皮膚試料中で、IL-12p35およびp40mRNAが検出された。他の研究において、IL-12/IL-23のp40サブユニットおよびIL-23のp19サブユニットの両方の増加した発現がヒト乾癬病変において観察され、IL-12およびIL-23の減少した発現が乾癬治療後に観察された。IL-12のp40サブユニットにおける遺伝子多型は、乾癬に対する増加した感受性に結びつけられている（例えば、Tortoraによる総説（2007）J. Am. Acad. Dermatol. 57（6）:1059-1068、Fitchら（2007）Current Rheumatology Reports 9:461-467参照）。IL-12およびIL-23は、乾癬性関節炎における重要な因子としても同定されている（例えば、Hueberらによる総説 2007 Immunology Letters 114:59-65参照）。従って、本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、乾癬等の慢性的皮膚障害ならびに乾癬性関節炎を緩和させる役目をする事ができる。

10

【0191】

20

F. 他の障害

インターロイキン12および／またはインターロイキン23は、免疫および炎症性の要素を含む様々な疾患に伴う病状において重要な役割を果たす。これらの疾患としては、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性エリテマトーデス、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー疾患、乾癬、皮膚炎強皮症、アトピー性皮膚炎、移植片対宿主疾患、臓器移植拒絶反応、臓器移植に伴う急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、グレーブス病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ヴェゲナー肉芽腫症、ヘノッホーシェーンライン紫斑（Henoch-Schoenlein purpura）、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染症、寄生虫症、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、卒中、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病（散発性）、多内分泌腺機能低下症候群I型および多内分泌腺機能低下症候群II型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節症（seronegative arthropathy）、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸炎性関節症、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニアおよびサルモネラ関連関節症、脊椎関節症（spondyloarthritis）、アテローム性疾患／動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、リニアIgA病、自己免疫性溶血性貧血、クームス試験陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎／ローヤルフリー病、慢性皮膚粘膜カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、原因不明の自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全関連疾患、C型肝炎、分類不能型免疫不全（分類不能型低γグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巢機能不全、早期卵巢機能不全、線維性肺疾患、原因不明の線維性肺肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織病関連間質性肺疾患、混合性結合組織病関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性エリテマトーデス関連肺疾患、皮膚筋炎／多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患、ヘモジデリン沈着症関連肺疾患、薬剤誘発性間質性肺疾患、放射線性線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球

30

40

50

性浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、痛風性関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性またはルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫性媒介低血糖、黒色表皮腫を伴うB型インスリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に伴う急性免疫疾患、臓器移植に伴う慢性免疫疾患、骨関節症、原発性硬化性胆管炎、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎疾患NOS、糸球体疾患、腎臓の顕微鏡的血管炎（vasculitis）、ライム病、円板状エリテマトーデス、男性不妊症（特発性またはNOS）、精子自己免疫、多発性硬化症（全亜型）、インスリン依存性糖尿病、交感性眼炎、結合組織病に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺病変、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫性自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎および尋常性白斑が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明のヒト抗体および抗体部分は、自己免疫疾患、特に、リウマチ性脊椎炎、アレルギー、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜炎等の炎症を伴う自己免疫疾患を処置するために使用され得る。

10

【0192】

本発明の実施は、以下の実施例からなおより完全に理解されるが、それらの実施例は、例示目的だけのために本明細書において示され、いかなる形であれ本発明を限定すると解釈されるべきではない。

20

【0193】

本出願にわたって引用され得る全ての引用文献（参考文献、特許、特許出願およびウェブサイト等）の内容は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。本発明の実施は、特に明記しない限り、当技術分野において周知のタンパク質分析の慣用の技術を用いる。

【0194】

例示

実施例1は、例えば実施例2-6において使用されるように、本発明の実施において使用される方法および材料を提供する。実施例2は、例示的な液体J695抗体製剤の調製を記載する。実施例3は、-80℃から25℃の間で繰り返された凍結融解サイクルの間における液体J695製剤の安定性を実証する実験を提供する。実施例4は、凍結状態における様々な温度における長期保存の間における液体J695製剤の安定性を実証する実験を提供する。実施例5は、-80℃から37℃の間で繰り返された凍結融解サイクルの間における液体J695製剤の安定性を実証する実験を提供する。実施例6は、様々な温度における加速および長期保存の間における液体J695製剤の安定性を実証する実験を提供する。実施例7は、例えば実施例8-9において使用されるように、本発明の実施において使用される方法および材料を提供する。実施例8は、ヒスチジンおよび金属（例えば、銅または鉄）の存在下におけるラムダ軽鎖を含有する抗体の切断の実証を提供する。実施例9は、抗体製剤および溶液成分の様々なパラメータに関する抗体の断片化およびその防止を実証する。これらのパラメータとしては、溶液pH、抗体濃度、製剤のイオン強度、製剤緩衝液の型および濃度、界面活性剤ならびに安定化賦形剤が挙げられるが、これらに限定されるものではない。実施例10は、鉄の様々なレベルおよび異なる温度におけるJ695（100および2mg/mL）の断片化を示す。

30

40

【0195】

実施例1：J695の安定性をモニターするために使用された分析方法

実施例1.1：カチオン交換HPLC

弱カチオン交換高速液体クロマトグラフィーを使用してJ695薬物物質の同一性および純度を決定するためにカチオン交換HPLCを使用した（SPD UV/VIS Detectorまたは同等物を有するShimadzu 10AD HPLC）。電荷に基づいて弱カチオン交換静止相（Dionex ProPac WCX-10、4mm×250mm、Dionex Corporation、Sunnyvale、CA）上にお

50

いて種を解像した。1 mg/mLの濃度で100マイクロリットルを注入し、1.0 mL/分の流速において、リン酸緩衝液系中で増加する塩（塩化ナトリウム）および減少するpHの勾配を利用して試料成分を解像した（移動相A：10 mMリン酸二ナトリウム、pH 7.5、移動相B：20 mMリン酸二ナトリウム、20 mM酢酸ナトリウム、400 mM塩化ナトリウム、pH 5.0）。カラム温度を分析にわたって25℃において維持し、注入前に試料を2-8℃において維持した。参照標準材料に対して試料についての（280ナノメートルにおける吸光度（absorbance）を介して検出した）対象となるメインピークの相対保持時間を比較することによってピークの同一性を決定した。試験試料クロマトグラムについての異質性プロファイルを参照標準クロマトグラフィープロファイルと比較した。試料の主要なアイソフォーム領域、酸性領域および塩基性領域におけるピーク面積の合計を各々報告した。特に異なって述べない限り、全ての試薬は、JTBaker（Phillipsburg NJ）から購入した。

10

【0196】

実施例1.2：J695結合ELISA

結合ELISAを用いて、IL-12に対する抗IL-12抗体J695試料の相対結合能力を参照標準の相対結合能力と比較して測定した。このアッセイにおいて、2-8℃における終夜の恒温放置を通じてrhIL-12タンパク質（ABC）を96ウェルマイクロタイタープレート（VWR International、West Chester、PA）に結合させた。標準物質および試料をPBS中の50%のSuperblockブロッキング緩衝液（Pierce Biotechnology Inc、Rockford、IL）および0.05%のSurfactant-20（Pierce Biotechnology Inc、Rockford、IL）により50%の1×PBS中で160 ng/mLから0.625 ng/mLに連続的に希釈し、96ウェルマイクロタイタープレートのrhIL-12被覆ウェル中にロードした。次いで、捕獲したJ695を、ヤギ抗ヒトIgG-HRP（Pierce Biotechnology Inc、Rockford、IL）によって認識した。比色読み出しのための基質としてTMB Substrateキット（Pierce Biotechnology Inc、Rockford、IL）を使用した。相対結合能力のパーセントを、標準物質および試料に対する4パラメータ曲線適合からの「C」値の比として計算した。

20

【0197】

実施例1.3：サイズ排除HPLC

サイズ排除HPLCを用いてJ695の純度を決定した（SPD UV/VIS Detectorまたは同等物を有するShimadzu 10AD HPLC）。10マイクロリットルの（2-8℃において維持した）2.0 mg/mLタンパク質溶液をカラム上に注入し、分析のための十分なシグナルを得た。Superdexゲル濾過カラム（GE Healthcare Bio-Sciences Corp、Piscataway、NJ）または同等の静止相および移動相に対する211 mM Na₂SO₄/92 mM Na₂HPO₄、pH 7.0を使用して、種を毎分0.75 mLの流速において無勾配に分離した。分析の間、カラム温度を周囲温度で維持した。試験試料を繰り返して注入し、モノマーJ695および他の種を214 nmにおける吸光度によって検出した。J695抗体の面積を、緩衝液関連ピークを除外した214 nmの吸光度の試料中の成分の全面積と比較することによって純度を決定した。その方法は、高分子量凝集物および完全J695由来の抗体断片を解像することができた。

40

【0198】

実施例1.4：コロイド青色染色還元および非還元SDS PAGEゲル

コロイド青色染色還元および非還元SDS PAGEゲルを用いてJ695の純度を決定した。還元および非還元条件下で、それぞれ、加えたメルカプトエタノールを有するまたは有さない試料緩衝液（2×トリス-グリシンSDS、Invitrogen Corp. Carlsbad、CA）を使用することによって試料を調製した。最初に、試料および標準物質を、それぞれ還元または非還元ゲルに対して0.4 mg/mLおよび0.1

50

mg/mLに、MilliQ水中で希釈した。試料を試料緩衝液によって1:1に希釈し、タンパク質に結合し、変性させるSDSと共に約60℃において約30分間加熱した。タンパク質に結合するSDSの量は、その分子サイズに正比例した。分子量マーカ(Mark 12、非染色MW Markers、Invitrogen Corp. Carlsbad、CA)、試験試料および標準物質(還元および非還元)を12%(還元)および8-16%(非還元)のトリス-グリシン商業的ゲル(Invitrogen Corp. Carlsbad、CA)の別々のレーン上にロードした。タンパク質種の分離を、1×トリス-グリシンランニング緩衝液中で、最初の30分間は60Vの定常電圧を用いて完了し、次いで染料前部がゲルの底部に達するまで125Vとした。タンパク質をコロイド青色染色(Invitrogen Corp. Carlsbad、CA)によって検出した。非還元ゲル中の純度プロファイルをJ695参照標準に対する試験試料の純度プロファイルと比較することによって純度の質的評価を達成した。走査デンストメトリー(Phoretix 1Dデンストメトリーソフトウェアまたは同等物を有するUMAXスキャナ)を使用して、還元条件下におけるゲル走行上において検出した重鎖および軽鎖の合計から試料の純度パーセントを決定した。

10

【0199】

実施例1.5:タンパク質濃度(A_{280})

分光光度測定によりJ695薬物物質のタンパク質濃度を測定した。試料を3通りにおいて希釈して、0.3から1.5AUの間の A_{280} におけるOD値を得た。水中の希釈物を、重量測定的に(重量によって)Mettler Toledo Analytical天秤を使用して調製した。分光光度計(Beckman DU800または同等物)は、280nmにおいて無効になった。各試料および対照の吸光度を280nmにおいて読み取り、得られた値を希釈について補正し、タンパク質濃度に達する吸光係数によって分割した。J695について、AU/mg/mLにおける吸光係数の値は、1.42であった。

20

【0200】

実施例1.6:J695バイオアッセイ

J695細胞に基づくバイオアッセイによって、参照標準と比較したJ695試料の相対活性を測定した。NK-92細胞を定義濃度のIL-12によって刺激し、可変濃度の抗IL-12抗体J695と混合した。恒温放置期間の間、NK-92細胞は、溶液中のIL-12の量に比例してインターフェロンガンマ(IFN- γ)を分泌した。商業的に入手可能なELISAキットを使用してIFN- γ の量を定量した。非線形回帰を用いて、試料および参照標準のIC₅₀値を計算した。個々の試料の活性を参照標準の活性(平均IC₅₀値)の割合として表した。

30

【0201】

実施例2:J695製剤の調製

以下のプロトコールに従って医薬製剤を製造した。

【0202】

製剤において使用した材料は、マンニトール、ヒスチジン、メチオニン、ポリソルベート80、注射用水および(pHを調整するための10%溶液として使用した)塩化水素酸、ならびにタンパク質濃縮物(すなわち、抗体濃縮物)を含んだ。

40

【0203】

実施例2.1:10Lの緩衝液の調製(10.133kgと同等一溶液の密度:1.0133g/mL)

成分を以下のように秤量した(400.00gのマンニトール、15.50gのヒスチジン、14.90gのメチオニン、1.00gのポリソルベート80および9.701gの注射用水)。

【0204】

54.80gの塩化水素酸(37%)と145.20gの注射用水とを組み合わせることによって10%の塩酸溶液を調製した。

50

【0205】

以下の予め秤量した（上記の）成分（マンニトール、ヒスチジン、メチオニンおよびポリソルベート80）を約90%の注射用水中に溶解することによって緩衝液を調製した。緩衝液成分の添加の順序は、緩衝液の質に影響を及ぼさなかった。

【0206】

緩衝液成分の全てを加えた後、溶液のpHを10%の塩化水素酸によって約pH6に調整し、最終重量の水を加えた。

【0207】

実施例2：2：10Lの製剤の調製（10.398kgと同等）

融解し、場合によってプールした抗体濃縮物に、実施例2.1において調製した緩衝溶液を以下の方法において加えた。J695抗体濃縮物を、医薬製剤の調製前に水浴中で融解した。約125mgタンパク質/mLタンパク質濃縮物を有する約1.0kgのタンパク質と同等である約8.37kgの抗体濃縮物を使用した。濃縮物の密度は、約1.0467g/mLであった。バルク溶液の最終重量に達するまで攪拌しながら緩衝液を加えた。

10

【0208】

その成分の全てを含有する最終製剤を、滅菌レセプタクル中に2つの0.22μm滅菌膜フィルター（親水性ポリフッ化ビニリデン、0.22μm孔径）を通して濾過した。使用した濾過培地を、窒素を使用して濾過滅菌した。滅菌後、バイアルまたはプレフィルドシリンジのいずれかにおける使用のために製剤を包装した。

20

【0209】

当業者は、列挙された成分の当技術分野において認識された分子量を用いて、本明細書において列挙される重量量および／または重量体積比をモルおよび／またはモル濃度に転化させることができることを理解する。本明細書において例示される重量量（例えば、gまたはkg）は、列挙される体積（例えば、緩衝液または医薬製剤）に対するものである。当業者は、異なる製剤体積が望まれる場合に重量量を比例して調整することができることを理解する。例えば、32L、20L、5Lまたは1Lの製剤は、それぞれ例示された重量量の320%、200%、50%または10%を含む。

【0210】

実施例3：繰り返された凍結融解研究（−80℃／25℃）の間の安定化された液体J695製剤の物理化学的分析

30

J695抗体に対する製剤緩衝液を選択した後、薬物物質を最終製品と同じマトリックスにおいて製剤化した。タンパク質製剤の第1の目標は、医薬的タンパク質薬物の許容し得る貯蔵寿命を保証するように長期間にわたってそのネイティブで医薬的に活性な形態における所定のタンパク質の安定性を維持することである。典型的には、長い貯蔵寿命は、凍結形態（例えば、−80℃）におけるタンパク質を保存することによって、またはタンパク質を凍結乾燥プロセスに供することによって、すなわち、凍結乾燥形態におけるタンパク質を保存し、使用の直前にそれを再構成することによって達成される。しかし、凍結融解プロセスがタンパク質の安定性に影響を及ぼす場合が多く、このことは、凍結形態における医薬的タンパク質の保存でさえ、凍結融解段階による安定性の喪失を伴う可能性があることを意味することは、当業者に周知である。また、凍結乾燥の第1のプロセス段階は、タンパク質の安定性に負に影響を及ぼし得る凍結をも含む。タンパク質の不安定性の現象に直面するリスクがタンパク質濃度の増加と共に増加することは周知であるので、高タンパク質濃度におけるタンパク質の安定性を維持する製剤化条件を達成することは、困難な課題である。

40

【0211】

薬物物質を凍結状態と液体状態との間で最高5回繰り返すことによって、138mg/mLのタンパク質濃度におけるJ695抗体の凍結融解挙動を評価した。温度が制御された−80℃の冷凍庫によって凍結を実施し、25℃の温度に制御された水浴によって融解を実施した。約30mLのJ695溶液を、この実験のための30mLのPETG容器中

50

に充填した。表 2 は、試験間隔および実施した凍結融解サイクルの回数についての概要を提供する。この研究に対する J 6 9 5 抗体の所望の質および安定性を定義する基準を表 3 に列挙する。

【 0 2 1 2 】

【表 2】

表 2：試験間隔：適用した凍結（－ 8 0℃）および融解（ 2 5℃水浴）
サイクルの回数

	試験間隔：凍結融解サイクルの回数および 試験のための試料要件			
<u>ストレス試験のた めの保存温度</u>	T ₀	1	3	5
<u>－ 8 0℃／ 2 5℃ サイクル研究</u>	2 *	1 *	1 *	2 *

*数字は、取り出され、試験された容器の数を定義する

【 0 2 1 3 】

この研究に対する J 6 9 5 抗体の所望の質および安定性を定義する基準は、表 3 において列挙したものと同一である。

【 0 2 1 4 】

10

20

【表 3】

表 3：様々なストレス研究に対する J 6 9 5 抗体の所望の質および安定性を定義するパラメータ

試験	検査仕様
清澄度	$\leq$ E P 参照懸濁液 I V
色	$\leq$ 参照溶液 B Y 4
p H	5. 5－6. 5
活性 E L I S A	7 0 %－1 3 0 %の相対結合能力パーセント
S E C H P L C	純度： $\geq$ 9 8. 0 %モノマー $\leq$ 2 %凝集物
C E X－H P L C	主なクロマトグラフィーパターンが参照材料 のクロマトグラフィーパターンに適合する 主要なアイソフォームの合計 $\geq$ 8 5 % 酸性領域の合計 $\leq$ 1 5 % 塩基性領域の合計 $\leq$ 1 0 %
S D S－P A G E (コロイド、還元)	主なバンドパターンが参照標準のバンドパタ ーンに適合する 純度：重鎖＋軽鎖の合計 $\geq$ 9 7 %
S D S－P A G E (コロイド、非還元)	主なバンドパターンが参照標準のバンドパタ ーンに適合する
* エンドトキシン	$\leq$ 0. 2 E U / m g
* 生物汚染度	$\leq$ 1 C F U / m L

*これらの試験は、研究のゼロ時点および終了時に実施した。

【 0 2 1 5 】

J 6 9 5 を約 6 (6. 2) の p H で少なくとも 1 1 0 m g / m L において製剤化する 5 回の凍結融解サイクルの効果を評価する実験の結果を表 4 において報告する。表 4 は、J 6 9 5 抗体が、実施例 2 において記載したように本発明の医薬組成物において製剤化される場合、化学的性質（カチオン交換 H P L C、サイズ排除 H P L C、色、p H）、生理化学的性質（清澄度、還元および非還元 S D S P A G E）または生物学的活性（活性 E L I S A アッセイ）に対していかなる有害な影響も及ぼすことなく、少なくとも 5 回繰り返した凍結融解サイクルに供され得ることを示す。

【 0 2 1 6 】

【表 4】

表 4 : 実施例 2 において記載したように製剤中で 138 mg/mL において製剤化された J 6 9 5 抗体の凍結融解研究の試験結果

試験基準	比較した安定性 パラメータ	貯蔵寿命仕様	凍結融解 サイクルの 回数	データ
色	<または=参照溶液 B Y 6	<または= E P 参 照溶液 B 7	初期試験	≤ B Y 5
			1	≤ B Y 5
			3	≤ B Y 5
			5	≤ B Y 5
清澄度	参照と比較した報告 値	<または= E P 参 照懸濁液 I V	初期試験	≤ I I
	溶液/懸濁液		1	≤ I I
			3	≤ I I
			5	≤ I I
p H	5. 5 から 6. 5	5. 0 から 5. 4	初期試験	6. 2
			1	6. 2
			3	6. 2
			5	6. 2
活性 E L I S A	>または= 7 0 % の 観察されたタンパク 質濃度	6 5 % から 1 3 0 %	初期試験	8 9
(Q C A - 2 6 0)			1	9 3
			3	9 9
			5	1 0 1
S E C H P L C	純度: >または= 9 0 . 0 %	純度モノマー>ま たは= 9 9 %	初期試験	9 9. 5
			1	9 9. 4
			3	9 9. 4
			5	9 9. 4
C E X - H P L C	主なクロマトグラフ ィー	リシン変異体>ま たは= 8 0 %	初期試験	適合
	パターンが参照のパ ターンに適合する		1	適合
			3	適合

10

20

30

40

試験基準	比較した安定性 パラメータ	貯蔵寿命仕様	凍結融解 サイクルの 回数	データ
			5	適合
CEX-HP LC	ピーク1相対保持時 間	第1の酸性領域： ＜または＝6%	初期試験	1.00
	0.95-1.05		1	1.00
			3	1.00
			5	1.00
SDS-PAGE	主なバンド形成	該当せず	初期試験	適合
コロイド青色 染色	パターンがそのパタ ーンに適合する		1	適合
還元	参照標準		3	適合
			5	適合
SDS-PAGE	主なバンド形成	該当せず	初期試験	適合
コロイド青色 染色	パターンがそのパタ ーンに適合する		1	適合
非還元	参照標準		3	適合
			5	適合
生物汚染度	＜または＝1CFU /mL	＜または＝1CF U/mL	初期試験	0
			1	NP
			3	NP
			5	0
エンドトキシ ン	＜または＝0.2EU /mg	＜または＝0.2 EU/mg	初期試験	＜0.1
			1	NP
			3	NP
			5	＜0.1

10

20

30

【0217】

実施例4：凍結状態における様々な温度における長期保存の間における安定化された液体J695製剤の物理化学的分析

最終医療品の貯蔵寿命ならびに医療品製造戦略、ロジスティックスおよび最終医療品の出荷を満たすために、バルクタンパク質（すなわち、薬物物質、活性医薬成分、API）を、より長い期間、凍結状態において医薬タンパク質の安定性を維持する製剤において製剤化する。理想的には、タンパク質製剤は、バルクタンパク質製造および医療品充填／仕上げの間におけるバルクタンパク質の保存場所の柔軟性を満たすために、凍結状態において様々な温度で、例えば－80℃、－40℃および－20℃で安定性を維持する。当業者は、これが非常に困難な課題であることを認める。

40

【0218】

121mg/mLのタンパク質濃度におけるJ695抗体の保存安定性を、制御温度条件において長期間の間、－20℃および－80℃の範囲内の様々な温度で評価した。定義された保存期間の後、バルクタンパク質を解凍し、J695の安定性に対する保存時間および保存温度の影響を評価した。約1600mLのJ695溶液を、この実験のための2

50

Lのポリエチレンテレフタレートコポリエステル（PETG）容器中で各々充填した。表4は、試験間隔およびこの実験において適用したJ695抗体のそれぞれの保存温度についての概要を提供する。J695を約6（6.2）のpHで少なくとも110mg/mLにおいて製剤化する保存時間および保存温度の効果を評価する実験の結果を表5において報告する。

【0219】

【表5】

表5：試験間隔：安定性実験の間で適用した保存温度および試料取り出しポイント

	試験間隔（月）								
保存温度 （公称）	0	0.25	0.50	1	3	6	9	12	18
−80℃	2**	1	1	1	1	1	1	2	1
−40℃*	NP	NP	NP	NP	1	NP	1	NP	1
−35℃*	NP	NP	NP	NP	1	NP	1	NP	1
−30℃*	NP	NP	NP	NP	1	NP	1	NP	1
−25℃*	NP	NP	NP	NP	1	NP	1	NP	1
−20℃*	NP	NP	NP	NP	1	NP	1	NP	1

*数字は、取り出され、試験された容器の数を定義する

NP＝実施せず

【0220】

表6は、J695抗体が、物理的および化学的安定性に対する有害な影響を及ぼすことなく−20℃から−80℃の間の様々な温度で少なくとも18ヵ月間保存に供することができることを実証する。例えば、18ヵ月の保存時間にわたって、J695抗体試料は、凍結抗体溶液を保存した全ての温度に対して少なくとも98%のモノマーレベルを示した。同様に、活性ELISAのデータは、凍結J695抗体溶液を保存した温度とは関係なく、試験したJ695抗体試料が高活性を示すことを実証した。カチオン交換HPLCによってモニターしたJ695の化学的安定性に関して、データは、J695抗体の化学的安定性が、−20℃から−80℃の間の温度で凍結形態において保存した場合に少なくとも18ヵ月にわたって影響を受けないことを実証した。要約すると、データは、実施例2において記載されるように医薬組成物において製剤化する場合、化学的性質（カチオン交換HPLC、サイズ排除HPLC、色、pH）、生理化学的性質（清澄度、還元および非還元SDS PAGE）または生物学的性質（活性ELISAアッセイ、生物汚染度、エンドトキシンレベル）に対する負の影響を及ぼすことなく、−20℃から−80℃の範囲の中の様々な温度で少なくとも18ヵ月間、J695抗体を保存に供することができることを実証する。

【0221】

【表 6】

表 6：実施例 2 において記載されるように 121mg/mL において製剤化した J695 抗体の様々な保存温度を用いた安定性研究の試験結果

試験基準	検査仕様	安定性 基準	試験期間 (月)	保存条件 -80℃	保存条件 -40℃	保存条件 -35℃	保存条件 -30℃	保存条件 -25℃	保存条件 -20℃
色	＜または＝参照溶 液 BY 6	＜または＝E P 参 照溶液 B 7	初期試験						
			0. 2 5	＜または＝ BY 6	NP	NP	NP	NP	NP
			0. 5	＜または＝ BY 6	NP	NP	NP	NP	NP
			1	＜または＝ BY 6	NP	NP	NP	NP	NP
			3	＜または＝ BY 6	＜または＝ BY 6	＜または＝ BY 6	＜または＝ BY 6	＜または＝ BY 6	＜または＝ BY 6
			6	＜または＝ BY 6	NP	NP	NP	NP	NP
			9	＜または＝ BY 6	＜または＝ BY 6	＜または＝ BY 6	＜または＝ BY 6	＜または＝ BY 6	＜または＝ BY 6
			1 2	＜または＝ BY 5	NP	NP	NP	NP	NP
			1 8	＜または＝ BY 5	＜または＝ BY 5	＜または＝ BY 5	＜または＝ BY 5	＜または＝ BY 5	＜または＝ BY 5
清澄度	参照と比較した報 告値	＜または＝E P 参 照懸濁液 I V	初期試験	＜または＝ I I					
	溶液／懸濁液		0. 2 5	＜または＝ I I	NP	NP	NP	NP	NP
			0. 5	＜または＝ I I	NP	NP	NP	NP	NP

10

20

30

40

			1	＜または＝ I I	NP	NP	NP	NP	NP
			3	＜または＝ I I	NP	NP	NP	NP	＜または＝ I I
			6	＜または＝ I I	NP	NP	NP	NP	NP
			9	＜または＝ I I	NP	NP	NP	NP	＜または＝ I I I
			12	＜または＝ I I	NP	NP	NP	NP	NP
			18	＜または＝ I I	NP	NP	NP	NP	＜または＝ I I I
pH	5.5から 6.5	5.0から 6.4	初期試験	6.3					
			0.25	6.3	NP	NP	NP	NP	NP
			0.5	6.3	NP	NP	NP	NP	NP
			1	6.3	NP	NP	NP	NP	NP
			3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3
			6	6.3	NP	NP	NP	NP	NP
			9	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3
			12	6.2	NP	NP	NP	NP	NP
			18	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.2

試験基準	安定性	試験期間	保存条件	保存条件	保存条件	保存条件	保存条件	保存条件
検査仕様	基準	(月)	-80℃	-40℃	-35℃	-30℃	-25℃	保存条件
活性EL	75%から	初期試験	99					-20℃
ISA	125% タンパク質濃度	0.25	96	NP	NP	NP	NP	NP

10

20

30

40

			0. 5	95	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			1	106	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			3	92	92	121	91	92	93	93
			6	87	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			9	99	100	110	102	98	105	105
			12	101	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			18	93	94	94	97	98	96	96
SEC	純度：＞または＝	純度モノマー＞	初期試験	99. 4						
HPLC	90. 0%	または＝99%	0. 25	99. 4	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			0. 5	99. 4	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			1	99. 5	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			3	99. 4	99. 3	99. 4	99. 2	98. 9	98. 5	98. 5
			6	99. 4	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			9	99. 4	99. 4	99. 4	99. 4	98. 2	99	99
			12	99. 4	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			18	99. 4	99. 3	99. 3	99. 3	98. 3	98. 5	98. 5
CX- HPLC	主なクロマトグラ フィー	リシン変異体＞	初期試験	適合						
	パターンがそのパ ターンに適合する	または＝80%	0. 25	適合	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	参照標準		0. 5	適合	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			1	適合	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			3	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合
			6	適合	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			9	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合
			12	適合	NP	NP	NP	NP	NP	NP
			18	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合
CX- HPLC	ピーク1相対保持	第1の酸性領域：	初期試験	1. 00						

10

20

30

40

HPLC	時間	＜または＝6%							
	0.98- 1.05		0.25	1.00	NP	NP	NP	NP	NP
			0.5	1.00	NP	NP	NP	NP	NP
			1	1.00	NP	NP	NP	NP	NP
			3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
			6	1.00	NP	NP	NP	NP	NP
			9	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
			12	1.00	NP	NP	NP	NP	NP
			18	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.01

試験基準	検査仕様	安定性	試験期間	保存条件	保存条件	保存条件	保存条件	保存条件	保存条件
SDS-PAGE	主なバンドパターン	基準	(月)	-80℃	-40℃	-35℃	-30℃	-25℃	-20℃
コロイド 青色染色 (還元)	参照標準に適合	清澄度：＞または ＝98%	初期試験	適合					
			0.25	適合	NP	NP	NP	NP	NP
			0.5	適合	NP	NP	NP	NP	NP
			1	適合	NP	NP	NP	NP	NP
			3	適合	適合	適合	適合	適合	適合
			6	適合	NP	NP	NP	NP	NP
			9	適合	適合	適合	適合	適合	適合
			12	適合	NP	NP	NP	NP	NP
			18	適合	適合	適合	適合	適合	適合
SDS-PAGE	主なバンドパターン	＞200kDaの (1つまたは複数 の)バンド：＜ま たは＝3%	初期試験	適合					

10

20

30

40

コロイド 青色染色 非還元	参照標準に適合		0. 25	適合	NP	NP	NP	NP	NP
			0. 5	適合	NP	NP	NP	NP	NP
			1	適合	NP	NP	NP	NP	NP
			3	適合	適合	適合	適合	適合	適合
			6	適合	NP	NP	NP	NP	NP
			9	適合	適合	適合	適合	適合	適合
			12	適合	NP	NP	NP	NP	NP
			18	適合	適合	適合	適合	適合	適合
生物汚染 度	＜または＝1CF U/ml		初期試験	0					
			6	NP					
			12	0	実施	実施	実施	実施	実施
			60	実施	実施	実施	実施	実施	実施
エンドト キシン	＜または＝0. 2 EU/mg		初期試験	＜0. 1					
			6	NP					
			12	＜0. 1	実施	実施	実施	実施	実施
			60	実施	実施	実施	実施	実施	実施

実施例 5：繰り返した凍結融解研究（ -80°C ／ 37°C ）の間の安定化された液体 J 6 9 5 製剤の物理化学的分析

J 6 9 5 抗体に対する製剤緩衝液を選択した後、薬物物質を最終製品と同じマトリックスにおいて製剤化した。

【0223】

（実施例 2 において記載されるように製剤化した）2つの異なる薬物物質バッチを凍結状態から液体状態に 5 回繰り返すことによって少なくとも 100 mg/mL のタンパク質濃度における J 6 9 5 抗体薬物物質の凍結融解挙動を評価した。この目的のために、実施例 2 において記載される通りの製剤中の約 1.6 L の J 6 9 5 を含有する 2 L の PETG ボトルを使用した。

10

【0224】

表 7 は、 -80°C から開始する製剤緩衝液中の 5 回の凍結融解サイクルの効果を評価する実験の結果を示す。溶液を、 37°C に調整した水浴中で解凍し、試料試験のために完全な融解を行った直後に除去した。

【0225】

【表 7】

表 7：実施例 2 *において記載したように製剤化された J 6 9 5 抗体の凍結融解研究の試験結果

試験基準	初期値		1×凍結融解		2×凍結融解		3×凍結融解		4×凍結融解		5×凍結融解	
バッチ番号	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
清澄度 NTU	0.07	0.72	0.14	0.78	0.03	0.82	0.64	0.63	0.78	0.89	0.56	0.71
P C S Z - 平均 [nm]	0.06	0.55	0.07	0.57	0.06	0.54	0.07	0.54	0.08	0.55	0.06	0.52
肉眼不可視粒子/1.0mL												
> 1 μm	44	9	39	06	4	7	2	6	6	2	8	07
> 10 μm												
> 25 μm												
サイズ排除 HPLC												
凝集物 [%]	0.44	0.69	0.44	0.72	0.44	0.73	0.47	0.75	0.49	0.77	0.50	0.82
モノマー [%]	9.42	9.12	9.42	9.09	9.42	9.08	9.40	9.08	9.35	9.05	9.35	9.02
断片 [%]	0.14	0.19	0.14	0.19	0.14	0.19	0.12	0.18	0.16	0.18	0.15	0.17

【0226】

表 7 は、清澄度測定、P C S、肉眼不可視粒子測定およびサイズ排除 H P L C によってモニターされる通りの物理化学的性質に対するいかなる有害な影響も及ぼすことなく、製剤緩衝液中の J 6 9 5 抗体薬物物質を少なくとも 5 回凍結融解することができることを示す。

【0227】

例えば、一連の 5 回の凍結融解サイクルにわたって、試験した全ての J 6 9 5 抗体試料は、少なくとも 98 % のモノマーレベルを示した。一般に、抗体溶液の凍結融解処理は、凝集物の増加および肉眼不可視粒子の数の上昇に反映されるタンパク質の不安定性を誘導するその高リスクが知られている。実施例 2 において記載されるように医薬組成物において製剤化した場合、一連の 5 回の凍結融解処理サイクルにわたって、事実上、凝集物レベルの変化はモニターされず（1 % を下回る試験した全ての試料に対するレベル）、断片レ

ベルの変化はモニターされず（0.5%をはるかに下回る全ての試料に対するレベル）、および肉眼不可視粒子の数の変化はモニターされなかった（凍結融解研究の全体にわたって事実上変化しないデータ）。

【0228】

実施例6：加速および長期保存の間における安定化された液体J695製剤の物理化学的分析

100mg/mLのタンパク質濃度におけるJ695抗体の保存安定性を、J695医療品を制御温度条件において保存した場合に様々な温度で長期間評価した。定義された保存期間の後、試料を取り出し、J695の安定性に対する保存時間および保存温度の影響を評価した。

10

【0229】

約1mLのJ695溶液を、この実験のための1mLガラスシリンジ中に各々充填した（第1のパッキング：SF1F007A：Fluorotecピストンストップ4023/50と組み合わせたSCFシリンジ（Becton Dickinson））。表8は、試験間隔およびJ695抗体のそれぞれの保存温度についての概要を提供する。

【0230】

【表8】

表8：試験間隔：100mg/mLのJ695医療品の安定性実験の間で適用した保存温度および試料取り出しポイント

20

保存条件	試験間隔（月）					
	0	1.5	3	6	12	24
+5°C	X	X	X	X	X	X
25°C/60% RII		X	X	X	—	—
40°C/75% RII		X	X	X	—	—

Xは、J695試料を取り出し、分析した時点定義する。

30

【0231】

液体医療品の安定性を評価するために使用した分析試験は、開発された方法または薬局方の方法のいずれかであった。それらの方法を、J695液体医療品の試験のために上記のように適用し、引用した薬局方において記載されているように実施した。

【0232】

J695を約6のpHで100mg/mLにおいて製剤化した保存時間および保存温度の効果を評価する実験の結果を表9において報告する。表9は、J695抗体が、物理的および化学的安定性に対する有害な影響を及ぼすことなく2°Cから8°Cの間の温度範囲において少なくとも24ヵ月間保存に供することができることを実証する。例えば、24ヵ月の保存時間にわたって、試験した全てのJ695抗体試料は、清澄度、色、外観、肉眼不可視粒子レベルおよびpHに関して事実上不変のままだった。更に、少なくとも24ヵ月の期間にわたって、100mg/mLにおいて実施例2において記載されるように製剤化したJ695は、少なくとも98%のモノマーレベルを示し、断片レベルは0.5%を十分に下回った。加速保存条件においてさえ、J695は高度に安定であり、モノマーレベルは、6ヵ月間の40°Cにおける保存の後でさえ90%を超えた。

40

【0233】

化学的安定性に関して、100mg/mLにおける実施例2において記載されるように組成物において製剤化したJ695抗体は、2-8°Cにおいて少なくとも24ヵ月間、少なくとも80%の主要アイソフォームレベルを示し、塩基性検体レベルは10%を十分に

50

下回り、酸性検体レベルは20%を十分に下回った。加速保存条件においてさえ、J695は高度に安定であり、25℃における6ヵ月間の保存の後でさえ、凍結抗体溶液を保存した全ての温度に対して、主要アイソフォームレベルは80%を超え、塩基性検体レベルは10%を十分に下回り、酸性検体レベルは20%を十分に下回った。

【0234】

要約すると、データは、実施例2において記載されるように医薬組成物において製剤化する場合、化学的性質（カチオン交換HPLC、サイズ排除HPLC、色、pH）、生理化学的性質（清澄度、肉眼不可視粒子レベル、サイズ排除HPLC）または他の性質（活性ELISAアッセイ、タンパク質濃度）に対する負の影響を及ぼすことなく、2℃から8℃において少なくとも24ヵ月間、J695抗体を保存に供することができることを実証する。

10

【0235】

【表 9】

表 9：実施例 2 において記載されるように製剤化した J 6 9 5 抗体の加速および長期安定性研究の試験結果

試験基準	質パラメータ	試験期間 [月]	保存条件 [°C/%RH]		
			+5	+25/ 60	40/ 75
外観	無色からわずかに黄色の溶液	初期	適合		
		1. 5	適合	適合	適合
		3	適合	適合	適合
		6	適合	適合	適合
		12	適合	—	—
		24	適合	—	—
清澄度	参照懸濁液 I V より乳白色でない; ≤RS I V	初期	<RS I I I		
		1. 5	=RS I I	<RS I I I	<RS I I I
		3	=RS I I	<RS I I I	<RS I I I
		6	=RS I I	=RS I I	=RS I I I
		12	=RS I I	—	—
		24	<RS I I	—	—
色(目視比較対 色対照溶液、E P)	参照溶液 B Y 4 より強い色では ない; ≤B Y 4	初期	≤B Y 6		
		1. 5	≤B Y 6	≤B Y 6	≤B Y 6
		3	≤B Y 6	≤B Y 6	≤B Y 6
		6	≤B Y 6	≤B Y 6	≤B Y 5
		12	≤B Y 6	—	—
		24	≤B Y 6	—	—
PH	5. 5から6. 5	初期	6. 2		
		1. 5	6. 1	6. 1	6. 1
		3	6. 2	6. 2	6. 2
		6	6. 2	6. 2	6. 2
		12	6. 2	—	—
		24	6. 2	—	—

10

20

30

40

試験基準	質パラメータ	試験期間 [月]	保存条件 [°C/%RH]		
			+5	+25/ 60	40/ 75
粒子汚染(可視粒子) (German Drug Codexによる視覚的スコア)	報告結果 (視覚的スコア)	初期	0		
		1.5	0.2	0	0
		3	0	0	0.3
		6	0	0.2	0
		12	0.1	—	—
		24	3.1	—	—
粒子汚染(肉眼不可視粒子)	$\geq 10 \mu\text{m} : \leq 6000$ 粒子/シリンジ $\geq 25 \mu\text{m} : \leq 600$ 粒子/シリンジ	初期 $\geq 10 \mu\text{m}$ $\geq 25 \mu\text{m}$	75 7		
		1.5 $\geq 10 \mu\text{m}$ $\geq 25 \mu\text{m}$	68 12	158 7	147 7
		3 $\geq 10 \mu\text{m}$ $\geq 25 \mu\text{m}$	88 8	107 6	117 15
		6 $\geq 10 \mu\text{m}$ $\geq 25 \mu\text{m}$	169 39	168 36	454 56
		12 $\geq 10 \mu\text{m}$ $\geq 25 \mu\text{m}$	112 16	—	—
		24 $\geq 10 \mu\text{m}$ $\geq 25 \mu\text{m}$	39 9	—	—
サイズ排除HPLC	モノマー: $\geq 90\%$ 凝集物: $\leq 5\%$	初期 A ¹ M F	0.9 99.0 0.1		
		1.5 A M F	1.0 98.9 0.1	1.3 98.5 0.2	2.3 96.8 0.9
		3 A M	1.0 98.8	1.5 98.1	3.1 95.1

10

20

30

40

試験基準	質パラメータ	試験期間 [月]	保存条件 [°C/%RH]		
			+5	+25/ 60	40/ 75
		F	0. 2	0. 4	1. 8
		6 A	1. 1	1. 8	4. 4
		M	98. 7	97. 6	92. 3
		F	0. 2	0. 6	3. 3
		12 A	1. 1	—	—
		M	98. 6		
		F	0. 3		
		24 A	1. 4	—	—
		M	98. 4		
		F	0. 2		
カチオン交換 HPLC	主なクロマトグラフィーパターンが参照材料のクロマトグラフィーパターンに適合する。 主要アイソフォーム $\geq 80\%$ 塩基性種 $\leq 10\%$ 酸性種 $\leq 20\%$	初期	参照に適合 88. 5 0. 5 11. 1		
		1. 5	適合 88. 0 0. 6 11. 4	適合 86. 6 0. 6 12. 8	適合せず 79. 6 0. 7 19. 8
		3	適合 87. 7 0. 7 11. 6	適合 85. 2 0. 8 14. 0	適合せず 73. 3 0. 9 25. 8
		6	適合 88. 0 0. 6 11. 4	適合 83. 5 0. 7 15. 8	適合せず 64. 1 1. 0 34. 9
		12	適合 87. 5 0. 5 12. 0	—	—
		24	適合 89. 4 0. 1 10. 4	—	—
生物学的活性 ELISA	70—143%	初期	94		
		1. 5	108	101	90
		3	95	94	71

10

20

30

40

試験基準	質パラメータ	試験期間 [月]	保存条件 [°C/%RH]		
			+5	+25/ 60	40/ 75
		6	87	83	63
タンパク質濃度(OD280 nm)	90-110の mg/mL	初期	95		
		1.5	96	96	93
		3	97	96	98
		6	98	98	99
		12	99		
		24	98		

1 A:凝集物; M:モノマー; F:断片

【0236】

実施例7:切断研究のための方法および材料

実施例7.1:材料

メチオニン、ヒスチジン、アルギニン、マンニトール、ポリソルベート80、ポロキサマー188、塩化ナトリウム、リン酸塩、酢酸塩、デスフェリオキサミン、EDTA、クエン酸ナトリウム、トリス塩酸塩、デスフェリチオシン、スーパーオキシドジスムターゼおよび最高グレードのブチルヒドロキシトルエンをSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。N-グリカナーゼをProzyme (San Leandro, CA) から購入した。硫酸鉄(II)-7H₂O、硫酸マグネシウム、硫酸ニッケル(II)、硫酸コバルト(II)および硫酸マンガン(II)をSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。塩化第二鉄-6H₂OをMallinckrodt (Phillipsburg, NJ, USA) から購入した。硫酸第二銅-5H₂OをEMD Chemicals (Gibbstown, NJ, USA) から購入した。硫酸亜鉛-7H₂OをJT Baker (Phillipsburg, NJ, USA) から購入した。C18トラップをMichrom BioResources (Auburn, CA, USA) から購入し、キャピラリー(裸の非被覆キャピラリー(50 μm id、全長30 cm))およびSDS MW試料緩衝液をBeckman Coulter (Fullerton, CA, USA) から購入した。

【0237】

実施例7.2:方法

実施例7.2.1:抗体の脱グリコシル化

質量スペクトルを単純化するためにN-グリカナーゼを使用して酵素的に試料を脱グリコシル化した。約30 μlの各試料(濃度約1 mg/mL)を2 μlの10% w/w n-オクチルグルコシドに加え、2 μlのN-グリカナーゼおよび試料を37°Cにおいて19時間恒温放置した。

【0238】

実施例7.2.2:サイズ排除クロマトグラフィー

以下に記載する2つの方法のいずれかを用いてSECを実施した。(a)抗体断片および凝集物をモノマーから分離するためにPharmacia Superdex 200 (10/300 GL) カラム(GE Healthcare, Piscataway, NJ)を使用した。211 mMのNa₂SO₄を92 mMのNa₂HPO₄(pH 7.0)と共に使用してアイソクラチック条件下において分離を行った。214 nmおよび0.5 mL/分において維持した流速において検出を実施した。典型的には、約100 μlの1 mg/mL溶液(100 μgロード)をカラム上に注入した。10 kD Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device (Millip

ore、USA) を使用して、カラムから分画した材料を 50 mM の重炭酸アンモニウム中に濃縮および交換した。典型的には、より小さい注入体積 (20 μ l の 1 mg/ml、20 μ g ロード) を用いること以外は同じ方法を用いて、分画した材料を SEC カラム上に再注入した。(b) 抗体の凝集物および断片をモニターするために、代わりに TSK Gel G3000 SWXL (Tosoh Bioscience) を使用した。21 mM の Na_2SO_4 を 92 mM の Na_2HPO_4 (pH 7.0) と共に使用してアイソクラチック条件下において分離を行った。214 nm および 0.25 mL/分において維持した流速において検出を実施した。典型的には、約 10 μ l の 2 mg/ml 溶液 (20 μ g ロード) をカラム上に注入した。

【0239】

実施例 7. 2. 3: 質量分析

Agilent 1100 キャピラリー HPLC システム (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) に連結した API QSTAR パルスー QTOF 質量分析計 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 上において試料を分析した。試料を質量分析計内に導入し、Michrom BioResources (Auburn, CA, USA) からの C18 マイクロトラップを使用して脱塩した。試料を最初の 5 分間は水性条件 (0.02% TFA、水中の 0.08% ギ酸) 下でロードして塩を除去し、次いで有機条件 (0.02% TFA、アセトニトリル中の 0.08% ギ酸) 下で溶出させた。1 mg/mL (10 μ g のロードに対して 10 μ l の注入) のおよその濃度で試料を走行させた。質量スペクトルを単純化するのを助けるために、試料を室温において 50 mM のジチオトレイトール (DTT) によって 30 分間処置し、ジスルフィド結合を減少させ、軽鎖および重鎖成分を放出させた。別の場合、試料を非還元において走行させ、脱グリコシル化して質量スペクトルを単純化した。30 μ l (およその濃度 = 1 mg/mL) の各試料に 2 μ l の 10% w/w n -オクチルグルコシドおよび 2 μ l の N -グリカナーゼ (Prozyme) を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ において 19 時間恒温放置した。4500 のキャピラリー電圧、非還元試料に対して 1500–3500、還元試料に対して 500 から 2500 の m/z 走査範囲によって正イオンモードにおいて走行するように質量分析計を設定した。レニン基質ペプチド (Sigma Catalog No. R-8129) を用いて計器をチューンし、キャリブレーションした。BioAnalyst ソフトウェアバージョン 1.1 を使用して ESI 質量スペクトルのデコンボリューションを実施した。

【0240】

実施例 7. 2. 4: キャピラリー電気泳動

全ての研究を ProteomeLab PA800 CE システムまたは PACE MDQ システム (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA) 上において実施し、検出を 214 nm において実施した。0.2 ミクロンの検出器窓を有する 50 μ m $\text{id} \times$ 全長 30 cm の寸法 (Beckman Coulter 部品番号 338451) による分離のために裸の非被覆キャピラリーを使用した。非還元条件下で試料調製を実施した。約 100 μ g の試料を 0.5 mL バイアルに加え、適切な体積の Milli-Q 水を加えて 100 μ l の最終体積を得た。次いで 5 μ l の 500 mM ヨードアセトアミドを加え、その後 50 μ l の 50 mM 酢酸 (pH 4) 1% SDS 緩衝液を加えて 1 mg/mL の終濃度とした。試料を十分に混合し、60 $^{\circ}\text{C}$ において 10 分間恒温放置した。最後に試料をオートサンプリングバイアルに移し、分析を待つ 10 $^{\circ}\text{C}$ のオートサンプリング内に置いた。キャピラリーの走行前調整のための方法パラメータは、70 psi において 3 分間の (逆流を使用する) 塩基性洗浄処理 (0.1 N 水酸化ナトリウム)、その後の 70 psi において 3 分間の酸性洗浄処理 (0.1 N 塩化水素酸)、その後の 70 psi において 1 分間の水洗浄処理 (Milli-Q 水)、その後の 70 psi において 10 分間の SDS-Gel 充填 (SDS MW Gel Buffer, Beckman Catalog No. 391163)、その後の Milli-Q 水浸漬を行ってキャピラリーを洗浄することであった。試料を 15 kV において 10 秒間動電学的に注入し、その後 M

i l l i - Q 水浸漬を行ってキャピラリーを洗浄した。電圧分離は、15 kVにおいて35分間だった。キャピラリー温度は20-25℃であり、試料保存温度は10℃であった。

【0241】

実施例7. 2. 5: ICP-MS

試料を、低解像度ICP-MSのためにQTI-Intertek (Whitehouse, NJ, USA) に、高解像度ICP-MSのためにAQura GmbH (Rodenbacher Chaussee 4, D-63457 Hanau, Germany) に提出した。低解像度ICP-MSのために、Perkin Elmer Elan ICP-MS分光計を使用した。一方、高解像度のために、HR-ICP-MS Thermo Element XRを使用した。

10

【0242】

実施例7. 2. 6: 濾過

実施例7. 2. 6. 1: 限外濾過(UF)は、静水圧によって半透膜に対して液体を押しやる一種の膜濾過である。抗体が保持されるが、一方で水および鉄塩等の低分子量の溶質が膜を通過する。Milliporeの指示書に従って、Millipore 30K Pellicon 2再生セルロース膜を設置した。製造業者のトルク仕様を維持し、適切な圧力計、管およびポンプと共にUFシステムをセットアップした。次いで、適切にバルブを開いて限外濾過を開始した。入口(フィード)圧および出口圧を規定の範囲内に維持し、透過流量および圧力を厳密にモニターした。15-30分間毎にデータを記録した。限外濾過が完了した後、最終重量を記録し、濃度をA₂₈₀によって決定した。

20

【0243】

実施例7. 2. 6. 2: 透析濾過(DF)は、一定体積を維持するためにフィルターを通して失われた溶液の量を置き換えるために緩衝液を加える濾過操作(通常はUF)と共に実施されるタンジェント流濾過プロセスである。DFは、金属を除去して、元の溶液を新しい緩衝液と置き換えるために使用される。膜(Millipore指示書につきMillipore 30K Pellicon 2 Regenerated Cellulose Membranes)の表面に沿って接線方向に液をポンピングする。定常圧力を印加して、一部の液を、膜を通して濾液側面に押しやる。UFにおけるように、IgG分子は、あまりに大きいので膜細孔を通過することができず、上流側の側面上に保持される。保持された成分は、膜の表面において集積しない。代わりに、それらの成分は、タンジェント流によって押し流される。少なくとも8の透析濾過容量を用いて鉄を除去する。

30

【0244】

実施例8: 断片化分析

実施例8. 1: ヒンジ領域におけるIgG分子(J695)の断片化

SECは、クロマトグラムにおけるモノマーのピークの低下および更なるピークの出現をモニターするために一般的に用いられる。図2は、40℃における約6ヵ月間の保存後のモノクローナル抗体の典型的なSECプロファイルを示す。4つの画分(画分1-4)を回収し、続いてSDS-PAGE、MSおよびCE-SDSによって分析した。画分1および2は、それぞれ凝集物およびモノマー抗体を表す。画分3は、Fabアーム(Fab + Fcまたは断片2)の喪失によって形成された100 kDaの種ならびに重鎖(HC)と軽鎖(LC)の間のチオエーテル結合から構成された低い割合の非還元性(NR)種を含有する(Tous, G. I. ら(2005) Anal. Chem. 77 (9): 2675-82)。画分4は、Fabアームを含有する(Cordoba, A. J. ら(2005) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 818 (2): 115-21)。

40

【0245】

還元条件下(図3、レーン1および2)におけるSDS-PAGEによる凝集物およびモノマーの分析は、100 kDaの見掛けの質量を有するHC、LCおよびNR種を示した。非還元性である高次凝集物は、画分1において見出され、画分2において小さい程度

50

に見出される。還元条件（レーン 3）下における画分 3 の分析は、H C、L C、N R 種および重鎖（H C－F c）の F c 断片を示した。画分 4（レーン 4）の分析は、L C および H C（H C－F a b）の F a b 断片を示した。

【0246】

画分 3 および 4 を E S I / L C－M S によっても分析した。図 4 は、画分 3 の脱グリコシル化の後で得られたスペクトルを示す。F a b アームの喪失をもたらした I g G 分子の重鎖のヒンジ領域において多数の切断部位を観察した（表 9 にまとめたピーク a－e）。切断の主要な部位は、残基 H i s－222 と T h r－223（H / T）の間のピーク a ならびに残基 C y s－218 と A s p－219（C / D）の間のピーク e において観察される。軽微な切断部位は、T / H、K / T および D / K の間で見出される。S e r－217 と C y s－218（S / C）の間の切断部位は見出されず、C o h e n ら（2007）J．A m．C h e m．S o c．129（22）：6976－7 によって以前により高い p H 8 において報告された H C 上におけるアスパラギン酸残基への 70 D a の付加も見出されなかった。

【0247】

図 5 は、対応する F a b 種を含有した画分 4 から得られた M S スペクトルを示す（表 10 にまとめたピーク f－j）。

【0248】

【表 10】

表 10：SECによる分離後の異なる断片のESI/LC-MSスペクトルの概要

ピーク	残基	Theo. グル タミン	Theo. ピロ グルタミン酸	観察された 質量	切断部位
a	HC: 223 -444	96804.1	96770.1	96781.0	H/T
b	HC: 222 -444	96941.2	96907.2	96914.0	T/H
c	HC: 221 -444	97042.3	97008.3	97022.1	K/T
d	HC: 220 -444	97170.5	97136.5	97157.3	D/K
e	HC: 219 -444	97285.6	97251.6	97268.0	C/D
f	HC: 1-2 18	—	46377.9	46380.2	C/D
g	HC: 1-2 19	—	46493.0	46492.9	D/K
h	HC: 1-2 20	—	46621.1	46623.2	K/T
i	HC: 1-2 21	—	46722.2	46725.0	T/H
j	HC: 1-2 22	—	46859.4	46861.0	H/T
k	LC: 1-2 15		22927.5	22927.9	E/C
l	HC: 1-2 17		23159.0	23159.3	S/C

10

20

30

【0249】

切断の主要な部位は、C/D残基間のピーク（f）およびH/T残基間のピーク（j）においても見られる。D/KおよびT/Hの間の軽微な切断部位は、断片2のスペクトルと比較した場合におけるK/T間の高次の切断と共に見出される。また、画分4における遊離軽鎖断片（ピーク（k）-残基1-215）および重鎖断片（ピーク（l）-残基1-217）の存在も図6（表10にまとめられたピークkおよびl）において示される。上記したように、断片218-444を含有する対応する断片2種も、Cohenら（2007）J. Am. Chem. Soc. 129（22）6976-7によって報告される通りのAsp-219残基への70Daの付加も見られなかった。

40

【0250】

画分3および4をCE-SDSによっても分析した。図7は、画分3および断片2種の移動位置の電気泳動図を示す（Fabアームの喪失）。完全抗体の電気泳動図において観察されるように、断片2は、主要なモノマーピークならびに他のピークから十分に解像され、このことによって、従って、後続の分析のためのこの断片のレベルの正確な評価が提供された。画分4は、完全FabならびにLCおよびHC断片を示した。

【0251】

50

実施例 8. 2-鉄または銅の存在は、ヒスチジンの存在下で用量依存的方法において Ig G 分子の切断を引き起こした

一実施形態において、鉄およびヒスチジンが製剤中に存在する場合、40℃におけるラムダ軽鎖含有抗 IL-12 抗体 J695 ロット 1 の恒温放置は、ヒンジ領域における抗体の断片化を増進する（表 11）。

【0252】

【表 11】

表 11：SEC による分析は、40℃における J695 ロット 1 中における増強された断片化および凝集を示した

	時点	モノマーのパーセント	凝集物のパーセント	断片のパーセント
Mab-ロット 1	初期	99.4	0.43	0.17
正常ロット	初期	99.5±0.05	0.4±0.07	0.1±0.01
5℃				
Mab-ロット 1	1M	99.2	0.58	0.20
正常ロット	1M	99.5±0.05	0.5±0.06	0.1±0.01
25℃				
Mab-ロット 1	1M	98.6	1.09	0.31
正常ロット	1M	99.0±0.08	0.8±0.08	0.2±0.01
40℃				
Mab-ロット 1	1M	93.1	2.22	4.73
正常ロット	1M	98.1±0.1	1.4±0.08	0.5±0.04

【0253】

40℃において、J695（ロット 1）中における断片化のレベルは、5つの正常ロットから得られた平均 0.5%と比較した場合、4.73%と高かった。CE-SDS を用いて、断片 2（Fab+Fc）のレベルが正確に推定され、J695 ロット 1 において 3 倍高いことが示された（表 12）。

【0254】

【表 12】

表 12：異なる分解種の CE-SDS による分析

	LC/HC断片		HC/FAB		断片 2	
	正常ロット	Mab-ロット 1	正常ロット	Mab-ロット 1	正常ロット	Mab-ロット 1
40℃	0.45	1.11	0.58	0.86	1.59	4.20
25℃	0.16	0.33	0.30	0.33	0.84	1.05
5℃	0.17	0.28	0.28	0.24	0.74	0.69

【0255】

他の分解種を CE-SDS によって定量し、Fab 断片のレベルは上昇した。断片（LC/HC 断片）のレベルは、同様に有意に上昇した。

【0256】

行われた多くの研究は、J695 ロット 1 における増加した断片化の理由としてプロテアーゼ活性を支持しなかった。例えばプロテアーゼ阻害剤のカクテルによる恒温放置は断片化のレベルを低下させず、モノクローナル抗体を除去した後の二次元ゲル電気泳動およ

び宿主細胞タンパク質の同定も、プロテアーゼの汚染の証拠を示さなかった（結果は示さない。）。

【0257】

断片化の正常レベルは、40℃における10,000のMWCO膜を使用してクエン酸に対する透析後に回復したが（図8）、このことは、金属がJ695ロット1の増強された断片化に関与することを示唆する。続いて多くの実験を実施して、断片化における金属の役割を評価した。J695ロット1ならびに他のロットを、ICP-MSによって64の異なる元素の存在について分析した。これらの研究は、高解像度ICP-MSを用いて5つの正常ロットと比較した場合にJ695ロット1が10倍の鉄のレベル（500 ppb）を有したことを実証した（表13）。

10

【0258】

【表13】

表13：高解像度ICP-MSによる鉄レベルの分析

鉄 (ppb)	
Mab-ロット#1	500
他のロット	63±10

【0259】

20

抗体試料を異なるレベルの金属塩（2.5、10および50 ppm）によって正常ロット中にスパイクし、40℃において恒温放置した。図9に示すように、鉄または銅のいずれかの酸化状態を有する製剤は、断片化（断片2）の用量依存的増加を示した。試験した他の金属は、断片化に対して影響を及ぼさなかった。500 ppbのスパイクされた鉄（2.5 ppmの鉄塩）によって観察された断片化のレベルは、J695ロット1に対して観察されたレベルと同様であった。表14は、CE-SDSによって分析した通りの異なる金属によって誘導された抗体の分解プロファイルをまとめたものである。抗体試料を、分析前の1ヵ月間、40℃において保存した。Fab、遊離LC/HC断片および断片2（Fab+Fc）のレベルは、鉄または銅の存在下で全て上昇し、他の金属の存在下で変化しなかった。

30

【0260】

【表 1 4】

表 1 4 : 異なる金属による断片化プロファイルのCE-SDSによる分析

	LC/HC断片	HC/FAB	断片 2
2. 5 ppm			
Fe 3+	1. 40	0. 72	3. 02
Fe 2+	1. 41	0. 72	3. 07
Cu 2+	1. 26	0. 72	3. 04
Zn 2+	0. 62	0. 60	1. 54
Mg 2+	0. 65	0. 60	1. 58
Ni 2+	0. 68	0. 62	1. 54
Co 2+	0. 65	0. 59	1. 54
Mn 2+	0. 65	0. 62	1. 66
10 ppm			
Fe 3+	1. 96	0. 82	4. 20
Fe 2+	2. 45	0. 92	5. 20
Cu 2+	2. 08	1. 00	4. 78
Zn 2+	0. 66	0. 61	1. 59
Mg 2+	0. 69	0. 61	1. 66
Ni 2+	0. 68	0. 59	1. 52
Co 2+	0. 68	0. 60	1. 52
Mn 2+	0. 78	0. 62	1. 86
50 ppm			
Fe 3+	2. 22	0. 92	4. 50
Fe 2+	2. 67	1. 06	5. 28
Cu 2+	2. 56	1. 21	5. 37
Zn 2+	0. 59	0. 59	1. 56
Mg 2+	0. 66	0. 60	1. 58
Ni 2+	0. 58	0. 62	1. 50
Co 2+	0. 53	0. 34	1. 00
Mn 2+	0. 76	0. 63	1. 72

10

20

30

【0 2 6 1】

40

実施例 8. 3 : デスフェリオキサミン (鉄特異的キレーター) による鉄のキレート化、抑止された断片化

J 6 9 5 ロット 1 を 1 mM のデスフェリオキサミン (鉄特異的キレーター) を用いて恒温放置した。40℃において1ヵ月の恒温放置後、正常レベルの断片化を観察した (図 10)。鉄 (500 ppb) によって正常抗体ロットをスパイクすることによって断片レベルの上昇が示され、これはデスフェリオキサミンによる前保温によって正常レベルに回復した (図 10)。

【0 2 6 2】

実施例 8. 4 : ヒスチジンおよび鉄の両方によって触媒された断片化の増強

ヒスチジンからの金属誘導断片化に対する寄与を検討した (図 11)。モノクロールナル

50

抗体の正常ロットを水に対して透析した。鉄単独（50 ppm）またはヒスチジン単独（10 mM）を加え、または6.0の一定のpHにおける異なる濃度のヒスチジン（2、5および10 mM）と共に鉄（50 ppm）をモノクローナル抗体に加え、40℃において1週間恒温放置した。図11に示すように、ヒスチジンの存在も鉄単独も、対照レベルを超えた抗体断片化の有意な増加をもたらさなかった。しかし、鉄およびヒスチジンによって一緒に抗体を恒温放置した場合、断片化の用量依存的増加が観察され、このことは、製剤に加えたヒスチジンのレベルが鉄誘導断片化において有意な役割を果たす可能性があることを示した。

【0263】

実施例8.5：ストレスをかけた正常ロットおよびJ695ロット1中における金属触媒断片化の間のMSスペクトルの比較は異なる切断プロファイルを示す

図12は、断片2（Fab+Fc）の脱グリコシル化の後のMSスペクトルの比較を示す。ヒンジ領域配列SCDKTHTC中におけるCys-218とAsp-219（C/D）の間の切断はJ695ロット1において有意に上昇したが、一方で分子上の他の切断部位における切断は増加しなかった。しかし、Fab種の分析（図13）は、J695ロット1中におけるこの切断部位（残基1-218）における対応するFab断片のレベルがストレスをかけた正常ロットと同等であるが、一方でSer-217とCys-218（S/C）の間で切断された遊離HC断片が有意に上昇して残基1-217からHC断片が得られた（図14）ことを示した。Cohenら（（2007）J. Am. Chem. Soc. 129（22）6976-7）は、S/C結合間の切断がβ-除去機構を介して起きることを最近実証した。この機構はより高いpH（pH8）において優勢であり、この機構の前にLC-HCジスルフィド結合の破壊およびデヒドロアラニン残基の後続の加水分解が起こり、これらは、セリンアミドによって終止するFab断片（1Da質量の付加）およびピルボイル基を有するC末端Fc断片（アスパラギン酸残基への70Da質量の付加）をもたらす。結果は、残基C/D間の切断部位の増加およびアスパラギン酸残基への27Daの付加（表14におけるピークC）を示し、加水分解の異なる機構を示唆した。J695ロット1中におけるE/C（残基1-215）間で切断された遊離軽鎖の上昇したレベル（図14）が観察された。表15は、異なるMSスペクトルの比較のために得たデータをまとめたものである。

【0264】

【表15】

表15：異なる断片のESI/LC-MSスペクトルの概要

ピーク	残基	Theo. グル タミン	Theo. ピロ グルタミン酸	観察された質量	切断部 位
A	HC: 223-444	96804.1	96770.1	96777.0	H/T
B	HC: 219-444	97285.6	97251.6	97257.3	C/D
C	HC: 219-444			97284.2	C/D
D	HC: 1-218	46377.9		46377.7	C/D
E	HC: 1-219	46493.0		46494.4	D/K
F	HC: 1-220	46621.1		46623.6	K/T
G	HC: 1-222	46859.4		46859.4	H/T
H	LC: 1-215	22927.5		22926.7	E/C
I	HC: 1-217	23159.0		23159.5	S/C

【0265】

実施例8.6：切断機構は、ラムダ鎖を含有する分子に特異的である

カッパまたはラムダ軽鎖を有する抗体分子の加水分解を触媒する鉄およびヒスチジンの能力を検討した。ラムダLCを有する2個のIgG分子は鉄およびヒスチジンによって切

断されたが、カップ LC を有する IgG 分子は切断されなかった (図 15)。図 16 は、その周りにおいて IgG 分子の加水分解が観察される残基の配列を示す。

【0266】

実施例 9：加速安定性研究

一実施形態において、鉄およびヒスチジンが製剤中に存在する場合、40℃におけるラムダ軽鎖含有抗 IL-12 抗体 J695 の恒温放置は、ヒンジ領域における抗体の断片化を増進する。従って、これらの研究のための 40℃の恒温放置温度を選択した。温度それ自体によって誘導された抗体の断片化と鉄およびヒスチジンの存在によって誘導された断片化との間を明らかに区別するために、陽性対照（すなわち、鉄およびヒスチジンを含有する抗体製剤）が参照製剤（すなわち、ヒスチジンを含有するが鉄を欠いたそれぞれの製剤）によって消去されるように全ての加速安定性研究を設計し、実施した。

10

【0267】

実施例 9.1 から 9.15 において列挙した実験において試験した全ての様々な J695 製剤を滅菌非発熱性ポリプロピレン低温貯蔵バイアル中に充填し、40℃において最高 3 ヶ月間恒温放置した。所定の時点において（すなわち、40℃/75%RH における保存の T1 月の後および T3 月の後の T0 において）、全ての製剤の試料を取り出し、様々な製剤中における抗体断片化の程度を 7.2.2 において記載されるように SEC によって決定した。

【0268】

実施例 9.1：溶液 pH 5 における鉄の存在下における J695 の断片化

20

以下の組成において 2 mg/mL、pH 5.0 において抗体 J695 を製剤化した。

- a) 10 mM のメチオニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、ならびに
- b) 10 mM のメチオニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80 および 0.5 ppm の鉄。

【0269】

更に、以下の組成において 100 mg/mL、pH 5.0 において抗体 J695 を製剤化した。

- c) 10 mM のメチオニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、ならびに
- d) 10 mM のメチオニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5 ppm の鉄。

30

【0270】

これらの研究の結果を表 15.1 において列挙する。それらの結果によって、J695 製剤中における鉄およびヒスチジンの存在が、2 mg/mL における対照（すなわち、製剤を欠いた鉄）と比較して J695 断片化を促進することが実証される。しかし、それらの結果によって、pH 5 への低下が J695 を鉄-ヒスチジン媒介断片化から保護したことも実証される。断片化のこの低下は、pH 6.0 または pH 7.0 において観察されなかった（例えば、以下の表 15.2 および表 15.3 参照）。

【0271】

40

【表 16】

表 15. 1 : 加速安定性研究の間の異なる製剤による J 6 9 5 の断片レベル。

製剤組成	T 0、5℃	T 1月、 40℃	T 3月、 40℃
pH5、2mg/mLのJ695、10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80	3.9	4.5	11.4
pH5、2mg/mLのJ695、10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、0.5ppmの鉄	4.3	6.1	18.9
pH5、100mg/mLのJ695、10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80	3.2	5.6	14.1
pH5、100mg/mLのJ695、10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、0.5ppmの鉄	3.2	5.8	14.8

【0272】

実施例 9. 2 : 溶液 pH 6 における鉄の存在下における J 6 9 5 の断片化

以下の組成において 2 mg/mL、pH 6. 0 において抗体 J 6 9 5 を製剤化した。

- a) 10 mM のメチオニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、
- b) 10 mM のメチオニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80 および 0.5 ppm の鉄、ならびに
- c) 10 mM のメチオニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80 および 2.5 ppm の鉄。

【0273】

更に、以下の組成において 100 mg/mL、pH 6. 0 において抗体 J 6 9 5 を製剤化した。

- d) 10 mM のメチオニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、
- e) 10 mM のメチオニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5 ppm の鉄、ならびに
- f) 10 mM のメチオニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、2.5 ppm の鉄。

【0274】

これらの研究の結果を表 15. 2 において列挙する。それらの結果によって、J 6 9 5 製剤中における鉄およびヒスチジンの存在が、2 mg/mL および 100 mg/mL の両方の J 6 9 5 における対照（すなわち、鉄を欠いた製剤）と比較して実質的な J 6 9 5 断片化につながることを実証される。それらの結果によって、鉄レベルの増加が J 6 9 5 断片レベルの増加をもたらすことが更に実証される。

【0275】

10

20

30

40

50

【表 17】

表 15. 2 : 加速安定性研究の間の異なる製剤による J 6 9 5 の断片レベル。

製剤組成	T 0、5℃	T 1月、 40℃	T 3月、 40℃
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80	3.3	4.2	11.0
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5ppm の鉄	3.5	14.0	27.9
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、2.5ppm の鉄	3.5	15.0	28.6
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80	3.1	3.9	10.8
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5ppm の鉄	3.6	7.2	18.4
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、2.5ppm の鉄	3.1	9.3	23.7

【0276】

実施例 9. 3 : 溶液 pH 7 における鉄の存在下における J 6 9 5 の断片化

以下の組成において 2mg/mL、pH 7.0 において抗体 J 6 9 5 を製剤化した。

- a) 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、ならびに
- b) 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80 および 0.5ppm の鉄。

【0277】

更に、以下の組成において 100mg/mL、pH 7.0 において抗体 J 6 9 5 を製剤化した。

- c) 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、および
- d) 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5ppm の鉄。

【0278】

10

20

30

40

50

これらの研究の結果を表15.3において列挙する。それらの結果によって、J695製剤中における鉄およびヒスチジンの存在が、幅広いタンパク質濃度範囲（すなわち、2 mg/mLから100 mg/mLまで）にわたって対照（すなわち、鉄を欠いた製剤）と比較してJ695断片化を助長することが実証される。それらの結果によって、鉄-ヒスチジン媒介断片化の帰結としてのJ695の断片化が製剤のpHに依存することが更に実証される。表15.3において示されるように、6.0を上回るpHを有する製剤（表15.3）は、より断片化の傾向がある。100 mg/mLおよびpH7.0において断片化は横ばいになるが、一方で2 mg/mLにおいて、断片化はpH7.0において増加し続ける。

【0279】

【表18】

表15.3：加速安定性研究の間の異なる製剤によるJ695の断片レベル。

製剤組成	T0、5℃	T1月、40℃	T3月、40℃
pH7、2mg/mLのJ695、10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80	3.5	6.1	15.4
pH7、2mg/mLのJ695、10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、0.5ppmの鉄	3.2	25.6	49.8
pH7、100mg/mLのJ695、10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80	3.3	4.9	13.9
pH7、100mg/mLのJ695、10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、0.5ppmの鉄	2.9	10.6	24.0

【0280】

実施例9.4：様々なイオン強度の条件におけるJ695の断片化

以下の組成において2 mg/mL、pH6.0において抗体J695を製剤化した。

- 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、
- 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80および0.5 ppmの鉄、
- 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80および150 mMのNaCl、ならびに
- 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、0.5 ppmの鉄および150 mMのNaCl。

【0281】

更に、上記で列挙した組成（a）から（d）において100mg/mL、pH6.0においてJ695を製剤化した。

【0282】

これらの研究の結果を表15.4において列挙する。それらの結果によって、J695製剤中における鉄およびヒスチジンの存在が、2mg/mLおよび100mg/mLの両方のJ695における対照（すなわち、鉄を欠いた製剤）と比較して実質的なJ695断片化につながる実証される。それらの結果によって、イオン強度がJ695の鉄－ヒスチジン媒介断片化に影響を及ぼさないことが更に実証される。

【0283】

【表 19】

表 15. 4 : 加速安定性研究の間の異なる製剤による J 6 9 5 の断片レベル。

製剤組成	T 0、5℃	T 1月、 40℃	T 3月、 40℃
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80	3.3	4.2	11.0
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5ppm の鉄	3.5	14.0	27.9
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80	3.1	3.9	10.8
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5ppm の鉄	3.6	7.2	18.4
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、150mM の NaCl	2.9	4.9	13.5
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5ppm の鉄、150mM の NaCl	2.6	9.6	20.2
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、150mM の NaCl	2.7	4.2	11.9
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5ppm の鉄、150mM の NaCl	2.6	6.7	18.0

【0284】

実施例 9. 5 : 溶液 pH 6 において鉄およびヒスチジンの存在下でアルギニン緩衝液において製剤化した J 6 9 5 の断片化

以下の組成において 2mg/mL、pH 6.0 において抗体 J 6 9 5 を製剤化した。

a) 30mM のアルギニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0

10

20

30

40

50

- ． 0.1% (m/v) のポリソルベート 80、ならびに
 b) 30 mM のアルギニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80 および 0.5 ppm の鉄。

【0285】

更に、以下の組成において 100 mg/mL、pH 6.0 において J 695 を製剤化した。

- c) 30 mM のアルギニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、および
 d) 30 mM のアルギニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5 ppm の鉄。

【0286】

これらの研究の結果を表 15.5 において列挙する。それらの結果によって、J 695 製剤中における鉄およびヒスチジンの存在が、対照（すなわち、鉄を欠いた製剤）と比較して J 695 の断片化をもたらし、アルギニン等の他の有機およびアミノ酸系緩衝液の存在が、タンパク質濃度（例えば、2 mg/mL または 100 mg/mL）に関係なく J 695 の鉄-ヒスチジン媒介断片化に対して影響を及ぼさないことが実証される。

【0287】

【表 20】

表 15.5：加速安定性研究の間の J 695 製剤の断片レベル。

製剤組成	T 0、5℃	T 1月、40℃	T 3月、40℃
pH 6、2 mg/mL の J 695、30 mM のアルギニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80	3.2	7.1	15.0
pH 6、2 mg/mL の J 695、30 mM のアルギニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5 ppm の鉄	3.3	10.3	23.2
pH 6、100 mg/mL の J 695、30 mM のアルギニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80	2.2	4.7	13.8
pH 6、100 mg/mL の J 695、30 mM のアルギニン、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL マンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5 ppm の鉄	2.5	7.7	20.5

【0288】

実施例 9.6：溶液 pH 6 において鉄およびヒスチジンの存在下でリン酸緩衝液において製剤化した J 695 の断片化

以下の組成において 2 mg/mL、pH 6.0 濃度で抗体 J 695 を製剤化した。

- a) 30 mM のリン酸塩、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、ならびに
 b) 30 mM のリン酸塩、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.

0.1% (m/v) のポリソルベート 80 および 0.5 ppm の鉄。

【0289】

更に、以下の組成において 100 mg/mL、pH 6.0 において抗体 J 695 を製剤化した。

c) 30 mM のリン酸塩、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、および

d) 30 mM のリン酸塩、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5 ppm の鉄。

【0290】

これらの研究の結果を表 15.6 において列挙する。それらの結果によって、J 695 製剤中における鉄およびヒスチジンの存在が 2 mg/mL および 100 mg/mL の両方において J 695 断片化をもたらさないことが実証される。それらの結果によって、抗体製剤中におけるリン酸塩の使用が、タンパク質濃度（例えば、2 mg/mL または 100 mg/mL）に関係なく抗体の鉄-ヒスチジン媒介断片化を減少させることが更に実証される。

【0291】

【表 21】

表 15.6：加速安定性研究の間の異なる製剤による J 695 の断片レベル。

製剤組成	T 0、5°C	T 1月、40°C	T 3月、40°C
pH 6、2 mg/mL の J 695、30 mM のリン酸塩、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80	2.5	9.3	20.5
pH 6、2 mg/mL の J 695、30 mM のリン酸塩、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5 ppm の鉄	2.2	9.3	21.8
pH 6、100 mg/mL の J 695、30 mM のリン酸塩、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80	2.0	4.4	12.6
pH 6、100 mg/mL の J 695、30 mM のリン酸塩、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5 ppm の鉄	2.1	4.8	13.6

【0292】

実施例 9.7：溶液 pH 6 における鉄およびヒスチジンの存在下における酢酸緩衝液において製剤化した J 695 の断片化

以下の組成において 2 mg/mL、pH 6.0 において抗体 J 695 を製剤化した。

a) 30 mM の酢酸塩、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、ならびに

b) 30 mM の酢酸塩、10 mM のヒスチジン、40 mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80 および 0.5 ppm の鉄。

【0293】

更に、以下の組成において 100 mg/mL、pH 6.0 において J 695 を製剤化し

た。

c) 30 mMの酢酸塩、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、および

d) 30 mMの酢酸塩、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、0.5 ppmの鉄。

【0294】

実施例9.1において概説されるように、様々な温度における恒温放置、試料の取り出しおよび得られた4個の製剤中における断片化の分析を実施した。

【0295】

これらの研究の結果を表15.7において提供する。それらの結果によって、J695製剤中における鉄およびヒスチジンの存在が、対照（すなわち、鉄を欠いた製剤）と比較してJ695の断片化をもたらし、酢酸等の他の有機系緩衝液の存在が、タンパク質濃度（例えば、2 mg/mLまたは100 mg/mL）に関係なくJ695の鉄-ヒスチジン媒介断片化に対して影響を及ぼさないことが実証される。

【0296】

【表22】

表15.7：加速安定性研究の間の異なる製剤によるJ695の断片レベル。

製剤組成	T 0、5℃	T 1月、40℃	T 3月、40℃
pH6、2mg/mLのJ695、30mMの酢酸塩、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80	2.4	5.7	17.2
pH6、2mg/mLのJ695、30mMの酢酸塩、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、0.5 ppmの鉄	2.4	12.5	26.4
pH6、100mg/mLのJ695、30mMの酢酸塩、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80	1.9	5.1	14.7
pH6、100mg/mLのJ695、30mMの酢酸塩、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、0.5 ppmの鉄	2.0	7.6	20.7

【0297】

実施例9.8：ポリソルベート80の存在下におけるJ695の断片化

以下の組成において2 mg/mL、pH6においてJ695を製剤化した。

a) 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール

b) 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトールおよび0.5 ppmの鉄

c) 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80

d) 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80および0.5 ppmの鉄

更に、上記で列挙した組成（a）から（d）において100mg/mL、pH6.0においてJ695を製剤化した。この実験の結果を表15.9において提供し、以下において実施例9.9において考察する。

【0298】

実施例9.9：ポロキサマー188の存在下におけるJ695の断片化

以下の組成において2mg/mL、pH6.0においてJ695を製剤化した。

- a) 10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマニトール、
- b) 10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマニトールおよび0.5ppmの鉄、
- c) 10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマニトール、0.1%（m/v）のポロキサマー188、ならびに
- d) 10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマニトール、0.1%（m/v）のポロキサマー188および0.5ppmの鉄。

10

【0299】

更に、上記で列挙した組成（a）から（d）において100mg/mL、pH6.0においてJ695を製剤化した。

【0300】

実施例9.8および9.9において記載される実験の結果を表15.9において提供する。それらの結果によって、J695製剤中における鉄およびヒスチジンの存在が、対照（すなわち、鉄を欠いた製剤）と比較してJ695の断片化をもたらし、ポリソルベート80またはポロキサマー188等の界面活性剤の有無が、タンパク質濃度（例えば、2mg/mLまたは100mg/mL）ならびに界面活性剤の型および濃度に関係なくJ695の鉄-ヒスチジン媒介断片化に対して影響を及ぼさないことが実証される。

20

【0301】

【表 2 3】

表 15. 9 : 加速安定性研究の間の異なる製剤による J 6 9 5 の断片レベル。

製剤組成	T 0、5℃	T 1月、 40℃	T 3月、 40℃
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール	2. 1	4. 8	13. 4
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0. 5ppm の鉄	2. 1	9. 7	26. 2
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール	1. 9	5. 2	14. 4
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0. 5ppm の鉄	2. 3	7. 8	21. 7
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、1mg/mL のポロキサマー 188	2. 0	4. 7	13. 0
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0. 5ppm の鉄、1mg/mL のポロキサマー 188	2. 1	9. 0	24. 4
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、1mg/mL のポロキサマー 188	2. 0	5. 1	15. 0
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0. 5ppm の鉄、1mg/mL のポロキサマー 188	2. 1	8. 0	21. 4

【0 3 0 2】

実施例 9. 10 : マンニトールの存在下における J 6 9 5 の断片化

以下の組成において 2mg/mL、pH 6. 0 において J 6 9 5 を製剤化した。

- a) 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、0. 01% (m/v) のポリソルベート 80、
- b) 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、0. 01% (m/v) のポリソルベート 80 および 0. 5ppm の鉄、
- c) 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、150mg/mL のマンニトール、0. 01% (m/v) のポリソルベート 80、ならびに
- d) 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、150mg/mL のマンニトール、

0.01% (m/v) のポリソルベート 80 および 0.5 ppm の鉄。

【0303】

更に、上記で列挙した組成 (a) から (d) において 100 mg/mL、pH 6.0 において J 695 を製剤化した。実施例 9.1 において概説されるように、様々な温度における恒温放置、試料の取り出しおよび得られた 8 個の製剤中における J 695 の断片化の分析を実施した。

【0304】

これらの研究の結果を表 15.10 において列挙する。それらの結果によって、J 695 製剤中における鉄およびヒスチジンの存在が、対照（すなわち、鉄を欠いた製剤）と比較して J 695 の断片化をもたらし、この断片化プロセスが、糖および糖アルコール、例えばマンニトールの様々な濃度（例えば、0 および 150 mg/mL）ならびにタンパク質濃度（例えば、2 mg/mL および 100 mg/mL の J 695）によって影響を受けないことが実証される。

【0305】

【表 2 4】

表 15. 10 : 加速安定性研究の間の異なる製剤による J 6 9 5 の断片レベル。

製剤組成	T 0、5℃	T 1月、 40℃	T 3月、 40℃
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、0mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80	2.1	4.9	15.8
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、0mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80、0.5ppm の鉄	2.0	13.9	30.0
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、150mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80	2.0	4.6	14.0
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、150mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80、0.5ppm の鉄	2.0	13.5	29.1
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、0mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80	1.8	5.1	14.7
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、0mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80、0.5ppm の鉄	1.8	8.2	22.0
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、150mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80	1.8	4.4	12.8
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、150mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80、0.5ppm の鉄	1.8	7.6	21.5

【0306】

実施例 9. 11 : デスフェリオキサミンの存在下における J 6 9 5 の断片化

以下の組成において 2mg/mL、pH 6.0 において J 6 9 5 を製剤化した。

【0307】

- a) 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、
 b) 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80 ならびに 0.5 および 2.5ppm の鉄、

c) 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80および1 mMのデスフェリオキサミン、ならびに

d) 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、0.5および2.5 ppmの鉄ならびに1 mMのデスフェリオキサミン。

【0308】

更に、上記で列挙した組成 (a) から (d) において100 mg/mL、pH 6.0においてJ 695を製剤化した。実施例9.1において概説されるように、様々な温度における恒温放置、試料の取り出しおよび得られた12個の製剤中におけるJ 695の断片化の分析を実施した。

10

【0309】

これらの研究の主要な結果を表15.11において列挙する。それらの結果によって、J 695製剤中におけるデスフェリオキサミンの存在が、対照（すなわち、デスフェリオキサミンを欠いた製剤）と比較してJ 695の安定性に対して負の影響を及ぼさないことが実証される。それらの結果によって、デスフェリオキサミンが、幅広い鉄濃度にわたって、および幅広いタンパク質濃度にわたって（例えば、2 mg/mLおよび100 mg/mLのJ 695において）J 695製剤中におけるヒスチジン-鉄媒介断片化を減少させることが更に実証される。

【0310】

20

【表 25】

表 15. 11 : 加速安定性研究の間の異なる製剤による J 6 9 5 の断片レベル。

製剤組成	T 0、5℃	T 1月、 40℃	T 3月、 40℃
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80、1mM のデスフェリオキサミン	1. 8	4. 7	12. 0
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80、1mM のデスフェリオキサミン、0.5ppm の鉄	1. 9	4. 7	12. 2
pH 6、2mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80、1mM のデスフェリオキサミン、2.5ppm の鉄	1. 8	4. 6	12. 3
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80、1mM のデスフェリオキサミン	1. 8	4. 7	12. 3
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80、1mM のデスフェリオキサミン、0.5ppm の鉄	1. 6	4. 9	12. 4
pH 6、100mg/mL の J 6 9 5、10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.1mg/mL のポリソルベート 80、1mM のデスフェリオキサミン、2.5ppm の鉄	1. 7	4. 9	12. 6

【0311】

実施例 9. 12 : クエン酸塩の存在下における J 6 9 5 の断片化

以下の組成において 2mg/mL、pH 6. 0 において J 6 9 5 を製剤化した。

- 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、
- 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80 および 0.5ppm の鉄、
- 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80 および 30mM のクエン酸塩、ならびに
- 10mM のメチオニン、10mM のヒスチジン、40mg/mL のマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート 80、0.5ppm の鉄および 30mM のクエン酸

塩。

【0312】

更に、上記で列挙した組成（a）から（d）において100mg/mL、pH6.0においてJ695を製剤化した。実施例9.1において概説されるように、様々な温度における恒温放置、試料の取り出しおよび得られた8個の製剤中におけるJ695の断片化の分析を実施した。

【0313】

これらの研究の主要な結果を表15.12において列挙する。それらの結果によって、J695製剤中におけるクエン酸塩の存在が、対照（すなわち、クエン酸塩を欠いた製剤）と比較してJ695の安定性に対して負の影響を及ぼさないことが実証される。それらの結果によって、クエン酸塩が、幅広いタンパク質濃度（例えば、2mg/mLおよび100mg/mLのJ695）にわたってJ695製剤中におけるヒスチジン-鉄媒介断片化を減少させることが更に実証される。

【0314】

【表26】

表15.12：加速安定性研究の間の異なる製剤によるJ695の断片レベル。

製剤組成	T0、5℃	T1月、40℃	T3月、40℃
pH6、2mg/mLのJ695、10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.1mg/mLのポリソルベート80、30mMのクエン酸塩	1.8	4.4	12.5
pH6、2mg/mLのJ695、10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.1mg/mLのポリソルベート80、30mMのクエン酸塩、0.5ppmの鉄	1.7	4.6	12.5
pH6、100mg/mLのJ695、10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.1mg/mLのポリソルベート80、30mMのクエン酸塩	1.6	4.6	13.1
pH6、100mg/mLのJ695、10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.1mg/mLのポリソルベート80、30mMのクエン酸塩、0.5ppmの鉄	1.7	4.9	13.0

【0315】

実施例9.13：デスフェリチオシンの存在下でJ695の断片化

以下の組成において2mg/mL、pH6.0においてJ695を製剤化する。

- 10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01%（m/v）のポリソルベート80、
- 10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01%（m/v）のポリソルベート80および0.5ppmの鉄、
- 10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01%（m/v）のポリソルベート80および0.1mMのデスフェリチオシン、なら

びに

d) 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、0.5 ppmの鉄および0.1 mMのデスフェリチオシン。

【0316】

更に、上記で列挙した組成(a)から(d)において100 mg/mL、pH 6.0においてJ695を製剤化する。実施例9.1において概説されるように、様々な温度における恒温放置、試料の取り出しおよび得られた8個の製剤中におけるJ695の断片化の分析を実施する。

【0317】

10

実施例9.14：ヒンジ領域における残基の突然変異

以下の組成において2 mg/mL、pH 6においてヒンジ領域において突然変異した特異的残基を有するJ695を製剤化する。

a) 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80、ならびに

b) 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v) のポリソルベート80および0.5 ppmの鉄。

【0318】

更に、上記で列挙した組成(a)から(b)において100 mg/mLにおいてJ695を製剤化する。実施例9.1において概説されるように、様々な温度における恒温放置、試料の取り出しおよび得られた4個の製剤中におけるJ695の断片化の分析を実施する。

20

【0319】

実施例9.15：製剤からのヒスチジンの除去

以下の組成において17 mg/mL、pH 6.0においてJ695を製剤化した。

a) 10 mMのメチオニン、10 mMのイミダゾール、40 mg/mLのマンニトール、ならびに

b) 10 mMのメチオニン、10 mMのイミダゾール、40 mg/mLのマンニトールおよび100 ppmの硫酸鉄(II)。

【0320】

30

組成物の恒温放置を40℃において2週間実施し、実施例7.2.4において記載されるように非還元CE-SDSによって分析を行った。これらの研究の主要な結果を以下の表15.13において列挙する。それらの結果によって、ヒスチジンの除去およびイミダゾールによる置き換えが、鉄の存在下でJ695の断片化をもたらさないことが実証される。これらの結果によって、ヒスチジンの除去が、鉄の存在下でJ695の断片化を阻害または防止することが実証される。

【0321】

【表 2 7】

表 15. 13 : 製剤中におけるヒスチジンによらない、および加速安定性研究後の J 6 9 5 の断片レベル。上記の a) および b) において規定されるように 17 mg/mL、pH 6. 0 において J 6 9 5 を製剤化した。

	LC およ び他	HC/F AB	(HCL C)	断片 2	(2) H C (1) LC	完全
10 mM のメチオニン、10 mM のイミダゾール、40 mg/mL のマンニトール	1. 16	0. 46	0. 21	1. 29	3. 24	93. 65
10 mM のメチオニン、10 mM のイミダゾール、40 mg/mL のマンニトールおよび 100 ppm の硫酸鉄 (II)	0. 95	0. 49	0. 42	1. 25	3. 14	93. 76

10

20

【0322】

実施例 9. 16 : 限外濾過／透析濾過を介したまたは透析による鉄分の除去

鉄を含有する J 6 9 5 (500 ppm) および対照としての鉄を有さない J 6 9 5 (60 ppm) を、製剤緩衝液 (10 mM のヒスチジン、10 mM のメチオニン、4 % のマンニトール、pH 6. 0) またはクエン酸／リン酸緩衝液 (10 mM のリン酸水素ナトリウム、10 mM のクエン酸、pH = 6. 0) のいずれかの中に透析した。次いで、試料を 40 °C において 1 ヶ月間恒温放置した。存在する断片の量を決定するために恒温放置の後の非還元 CE-SDS によって試料を分析した。

30

【0323】

結果を以下の表 15. 14 において提供する。それらの結果によって、製剤緩衝液またはクエン酸／リン酸緩衝液に対する透析が断片化の減少をもたらすことが実証される。クエン酸／リン酸緩衝液中への透析は、製剤緩衝液に対する透析と比較して断片化のより大きな低下をもたらしたが、このことは、鉄の結合およびタンパク質からの鉄の剥離におけるクエン酸塩／リン酸塩の可能な役割を示した。

【0324】

【表 28】

表15. 14：透析および加速安定性研究の後のJ695の断片レベル。

	LCおよび他	HC / FAB	(HC LC)	断片2	(2) HC (1) LC	完全
40℃で1ヵ月後における60ppmの鉄を有するJ695	0.62	0.6	0.23	1.51	2.55	94.48
40℃で1ヵ月後における500ppmの鉄を有するJ695	1.65	0.91	0.3	3.41	3.97	89.66
40℃で1ヵ月後における500ppmの鉄を有するJ695およびクエン酸緩衝液による透析	0.57	0.6	0.21	1.45	2.69	94.48
40℃で1ヵ月後における500ppmの鉄を有するJ695および製剤緩衝液による透析	1.02	0.78	0.22	2.1	3.21	92.66

【0325】

実施例10：鉄の様々なレベルおよび異なる温度におけるJ695の断片化

SECによる分析によって、鉄レベルの増加と共に25℃および40℃におけるJ695における増強された断片化が示された。最高10,000ppbまでスパイクされた鉄の影響が、5℃における6ヵ月の保存後に観察されなかった。

【0326】

実施例10.1：鉄の様々なレベルおよび異なる温度におけるJ695（100mg/mL）の断片化

J695抗体に対する製剤緩衝液を選択した後、最終製品と同じマトリックスにおいて薬物物質を製剤化した。タンパク質製剤の主要な目標は、医薬的タンパク質薬物の許容し得る貯蔵寿命を保証するように長期間にわたってそのネイティブで医薬的に活性な形態における所定のタンパク質の安定性を維持することである。J695プレフィルドシリンジ（PFS）のための推奨された保存温度は2-8℃であり、J695の様々なロットにおいて測定した正常鉄レベルは約60ppbであった（表16）。最高6ヵ月間5℃の推奨保存温度ならびに25℃および40℃の上昇した温度でPFSを保存した後における断片化に対する異なるレベルの鉄をスパイクする影響を評価した。

【0327】

抗体（J695）を、以下の公称組成においてpH6.0において維持して、プレフィルドシリンジ（PFS）中における100mg/mLにおいて製剤化した。

1. 10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01%（m/v）のポリソルベート80
2. 10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01%（m/v）のポリソルベート80および硫酸鉄（II）としての10ppbの鉄
3. 10mMのメチオニン、10mMのヒスチジン、40mg/mLのマンニトール、0.01%（m/v）のポリソルベート80および硫酸鉄（II）としての50ppbの鉄

4. 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v)のポリソルベート80および硫酸鉄(II)としての100 ppbの鉄

5. 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v)のポリソルベート80および硫酸鉄(II)としての250 ppbの鉄

6. 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v)のポリソルベート80および硫酸鉄(II)としての500 ppbの鉄

7. 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v)のポリソルベート80および硫酸鉄(II)としての1 ppmの鉄

8. 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v)のポリソルベート80および硫酸鉄(II)としての5 ppmの鉄

9. 10 mMのメチオニン、10 mMのヒスチジン、40 mg/mLのマンニトール、0.01% (m/v)のポリソルベート80および硫酸鉄(II)としての10 ppmの鉄

得られた製剤をプレフィルドシリンジ(PFS)中に充填し、5、25および40℃において最高6ヵ月間恒温放置した。所定の時点において、全ての製剤の試料を取り出し、様々な製剤中における抗体の断片化の程度をSECによって決定した。表16に示すように、推奨保存条件において6ヵ月後に観察した断片化に対する(最高10,000 ppbまでスパイクした)鉄の影響はなかった。これらの研究は、推奨保存条件において、J695製剤が、医薬的タンパク質薬物の許容し得る貯蔵寿命を提供するように長期間にわたってそのネイティブで医薬的に活性な形態における所定のタンパク質の安定性を維持したことを示す。

【0328】

J695プレフィルドシリンジ中に異なるレベルの鉄をスパイクし、25℃および40℃において保存することによる上昇した温度における断片化に対する影響も評価した。表16に示すように、(60 ppbの正常Feレベル+スパイク実験のために加えた100 ppbに相当する)約160 ppbを上回って鉄をスパイクすることは、SECによって評価されるように25℃および40℃における増加した断片化につながる。

【0329】

10

20

30

【表 29】

表 16

保存 (月)	特性	温度		
		5℃	25℃	40℃
10ppbのスパイキング				
0	断片	1.7	該当せず	該当せず
1	断片	1.4	1.6	3.6
3	断片	1.4	2.2	7.7
6	断片	1.2	3.1	13.2
50ppbのスパイキング				
0	断片	1.8	該当せず	該当せず
1	断片	1.3	1.6	4.1
3	断片	1.4	2.4	8.8
6	断片	1.3	3.4	14.6
100ppbのスパイキング				
0	断片	1.7	該当せず	該当せず
1	断片	1.3	1.5	4.7
3	断片	1.4	2.6	10.2
6	断片	1.4	3.8	16.3
250ppbのスパイキング				
0	断片	1.6	該当せず	該当せず
1	断片	1.2	1.8	6.7
3	断片	1.4	3.6	13.9
6	断片	1.4	5.3	20.5
500ppbのスパイキング				
0	断片	1.7	該当せず	該当せず
1	断片	1.1	2.2	8.4
3	断片	1.5	4.7	17.6
6	断片	1.7	7.5	25.0
1,000ppbのスパイキング				
0	断片	1.7	該当せず	該当せず
1	断片	2.7	3.8	12.0
3	断片	1.2	4.5	19.1
6	断片	1.3	8.2	27.8
5,000ppbのスパイキング				
0	断片	1.9	該当せず	該当せず
1	断片	4.3	4.6	13.5
3	断片	1.2	5.4	21.2
6	断片	1.5	10.1	30.9
10,000ppbのスパイキング				
0	断片	1.9	該当せず	該当せず
1	断片	4.2	4.8	13.3
3	断片	1.3	5.7	21.3
6	断片	1.6	10.3	30.0

【0330】

実施例 10. 2 : 鉄の様々なレベルおよび異なる温度における J 6 9 5 (2 m g / m L) の断片化

更に、上記で列挙した通りの公称組成 (1) から (9) において 2 m g / m L 、 p H 6 . 0 において J 6 9 5 を製剤化する。得られた 9 個の製剤を滅菌非発熱性ポリプロピレン低温貯蔵バイアル中に充填し、 5 ℃、 2 5 ℃ および 4 0 ℃ において最高 6 ヶ月間恒温放置する。更に、 9 個の全ての製剤を 2 - 8 ℃ の推奨保存温度で最高 1 2 ヶ月間保存する。所定の時点において、全ての製剤の試料を取り出し、様々な製剤中における抗体の断片化の程度を S E C によって決定する。

【0331】

10

20

30

40

50

参照による組込み

本出願にわたって引用され得る全ての引用文献（参考文献、特許、特許出願およびウェブサイト等）の内容は、そこで引用された参考文献であるように、それらの全体において参照により本明細書に明示的に組み込まれる。本発明の実施は、特に明記しない限り、当技術分野において周知のタンパク質製剤の慣用の技術を用いる。

【0332】

均等物

本発明は、この精神または本質的特徴から逸脱することなく、他の特定の形態において実施され得る。従って、前述の実施形態は、本明細書において記載される本発明を限定するものではなく、全ての点において例示的であると考えられるべきである。従って、本発明の範囲は、前述の記載によってではなく、添付の特許請求の範囲によって示され、従って、請求項の均等物の意味および範囲の中にある全ての変化は、本明細書において包含されることが意図される。

10

【図 1】

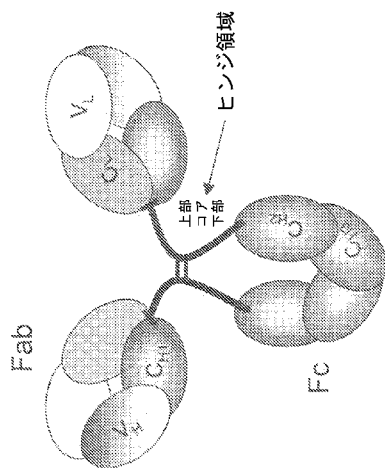


Figure 1

【図 2】

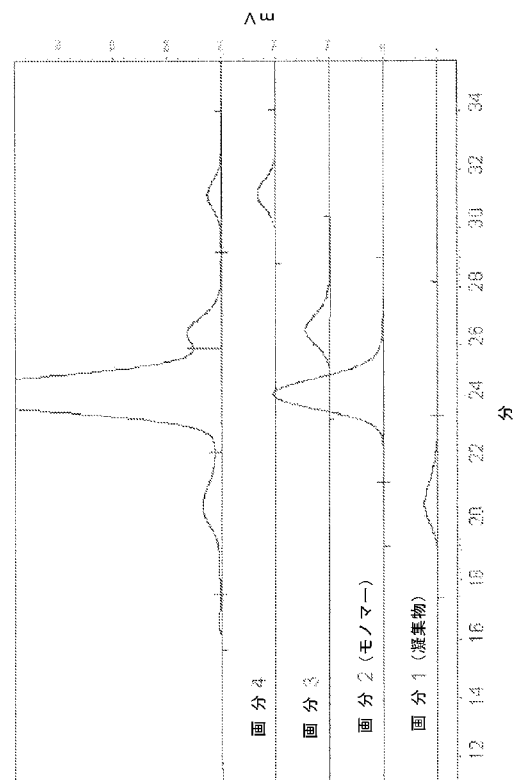
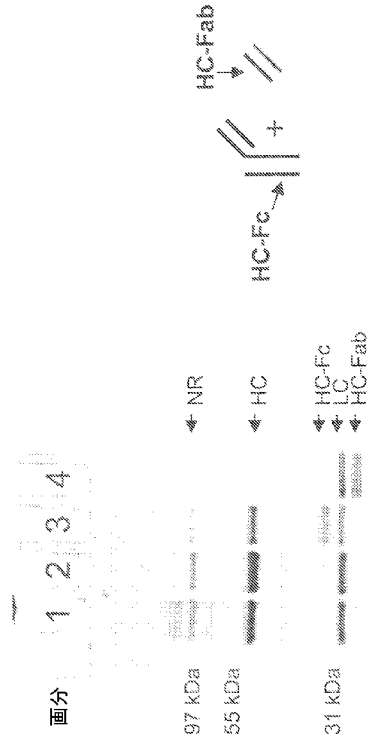


Figure 2

【図 3】



【図 4】

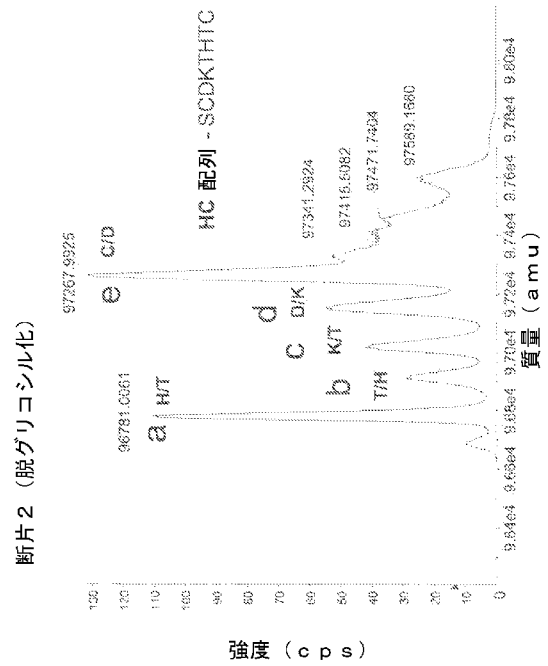


Figure 4

【図 5】

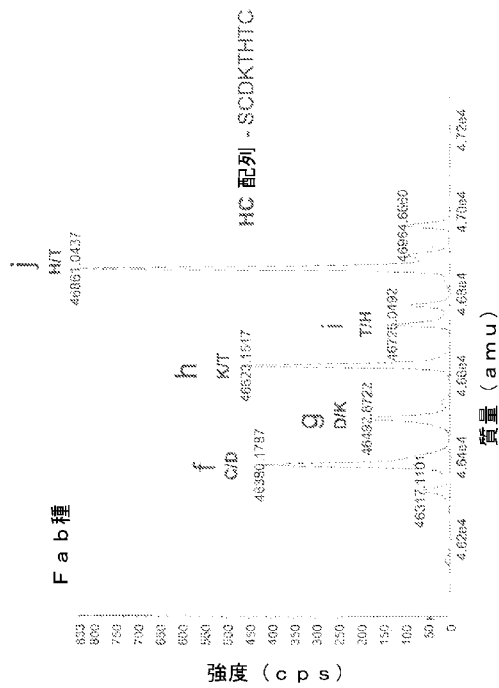


Figure 5

【図 6】

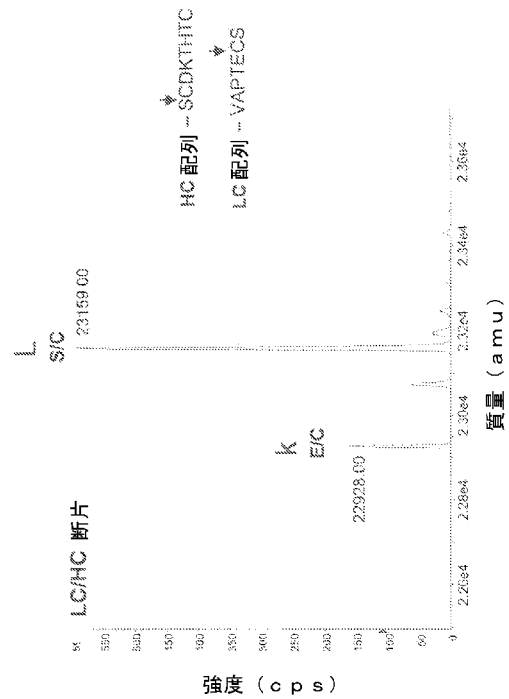


Figure 6

【図 7】

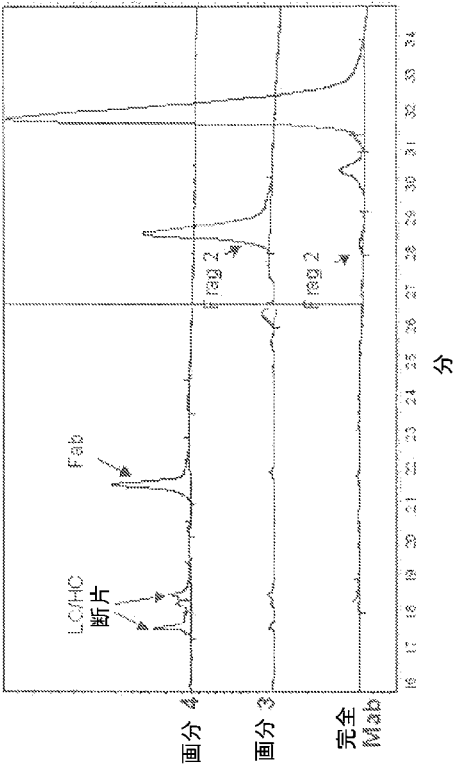


Figure 7

【図 8】

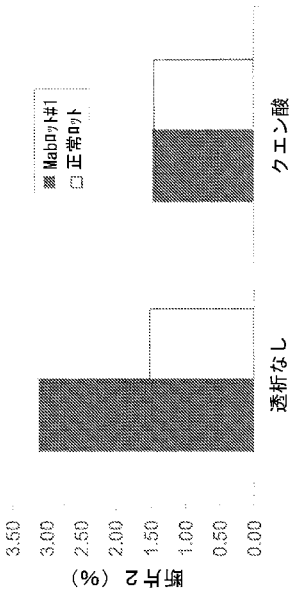


Figure 8

【図 9】

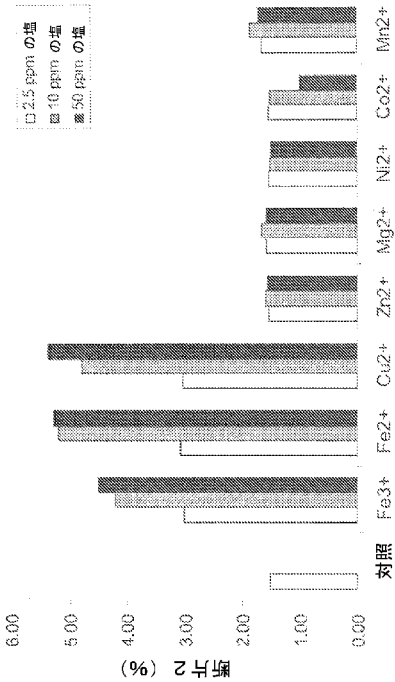


Figure 9

【図 10】

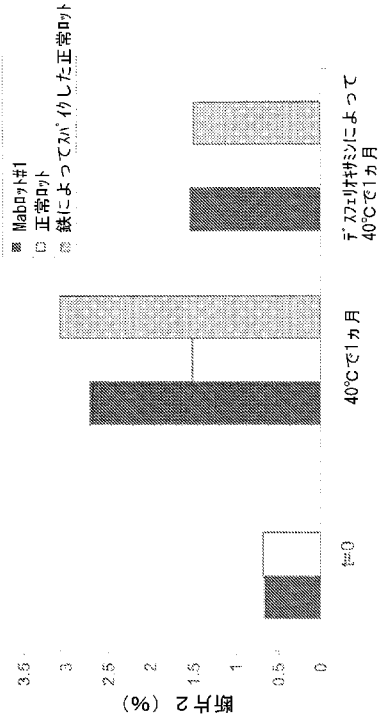


Figure 10

【図 1 1】

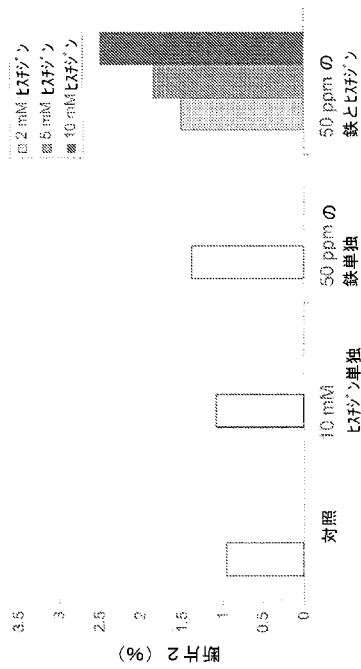


Figure 11

【図 1 2】

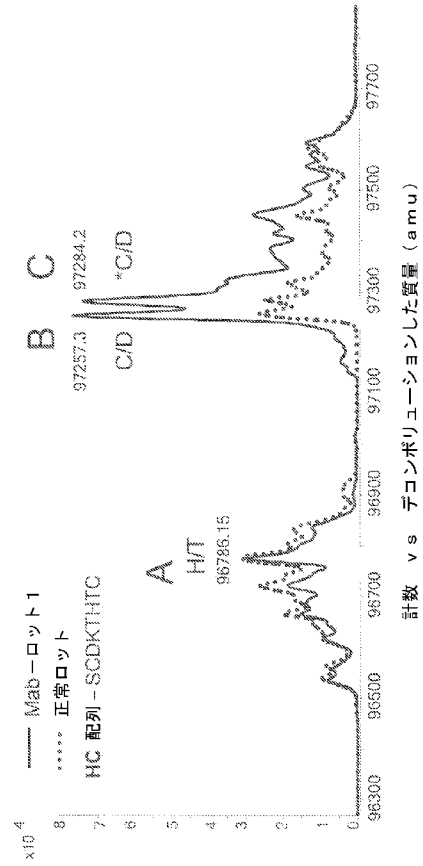


Figure 12

【図 1 3】

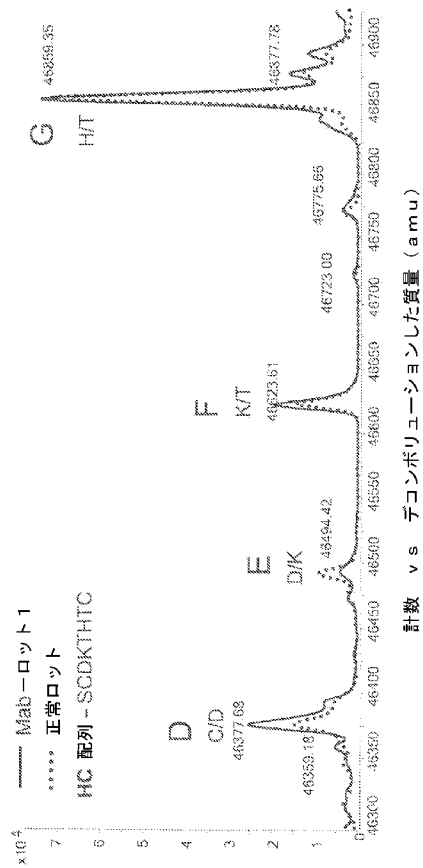


Figure 13

【図 1 4】

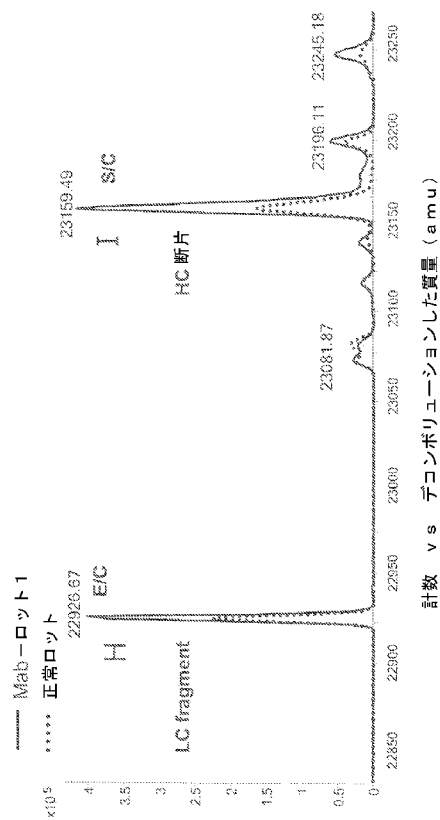


Figure 14

【図 1 5】

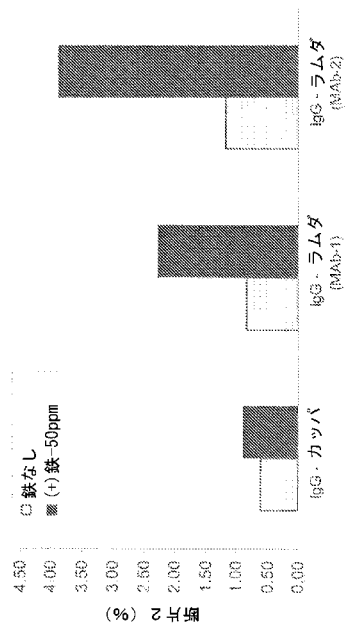


Figure 15

【図 1 6】

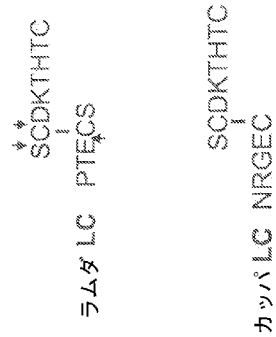


Figure 16

【配列表】

2012510468000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

2009/065714.25.03.2010

PCT/US 09/65714

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/50 (2010.01) USPC - 530/387.1, 436/547 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) USPC- 530/387.1, 436/547		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 530/387.1, 436/547 (text search-see search terms below)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patents/Scholar Search Terms Used: immunoglobulin, lambda light chain, stable, cleavage, histidine, metal chelator, hinge		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2007/0020255 A1 (Ueno et al.) 25 January 2007 (25.01.2007) para [0010], [0012], [0037], [0039], [0040], [0059], [0063], [0070], [0071]	1-75, 83-96, 110-126
Y	US 7,060,268 B2 (Andya et al.) 13 June 2006 (13.06.2006) col 2, ln 64 to col 3, ln 3, col 3, ln 20-30, ln 47-65, col 4, ln 45-64, col 9, ln 3-27, col 15, ln 40-60, col 16, ln 20-65	1-75, 84-96, 110-144
Y	US 2008/0071063 A1 (Allan et al.) 20 March 2008 (20.03.2008) para [0009], [0144]	29-31, 74, 75, 122-124, 127-144
Y	US 5,792,838 A (Smith et al.) 11 August 1998 (11.08.1998) col 2, ln 58-67, col 3, ln 1-11, ln 20-43, col 4, ln 20-29, col 5, ln 1-27, ln 55-64, col 8, ln 56-85	1-53, 57-61, 83, 110-134, 138, 140-142
Y	Smith et al. "Specific cleavage of immunoglobulin G by copper ions" Int J Peptide Protein Res 1996 vol 48 pg 48-55; abstract, pg 50, Table 1	18, 19, 55, 56, 85, 86, 112
Y	US 2005/0276823 A1 (Cini et al.) 15 December 2005 (15.12.2005) para [0005], [0006], [0009], [0023]	38, 39, 42-47, 88
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 February 2010 (19.02.2010)		Date of mailing of the international search report 25 MAR 2010
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. 571-273-3204		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

2009/065714 25.03.2010

PCT/US 09/65714

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 76-82, 97-109
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

2009/065714 25.03.2010

International Application No.

PCT/US 09/65714

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/0156835 A1 (Imoto et al.) 12 August 2004 (12.08.2004) para [0009], [0025]	83
Y	US 2007/0172475 A1 (Matheus et al.) 26 July 2007 (26.07.2007) para [0012]	4
Y	US 2004/0191285 A1 (Schenerman et al.) 30 September 2004 (30.09.2004) para [0008], [0085]	7, 8, 12, 13, 15
Y	Cordoba et al. "Non-enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution" J Chromatography B 2005 vol 818 pg 115-121; abstract, pg 118, Table 2	16, 17
Y	US 6,342,634 B2 (Nicholson et al.) 29 January 2002 (29.01.2002) col 1, ln 9-30	48
Y	US 2005/0158364 A1 (Cooper) 21 July 2005 (21.07.2005) para [0021], [0062]	49, 50

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395		V	
A 6 1 K 47/20 (2006.01)	A 6 1 K 39/395		H	
A 6 1 K 47/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/395		D	
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/395		N	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/20			
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/16			
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/10			
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/26			
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/34			
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/02			
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/00			
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00			
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/10			
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06			
	A 6 1 P 37/00			
	A 6 1 P 29/00			
	C 0 7 K 16/00			

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

(72)発明者 ラジエイエフスキ、チエスワフ・ハ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01581、ウエストボロー、ブロッサム・コート・3

(72)発明者 フラウンホーファー、ボルフガング

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01545、シユルーズベリー、ジョン・ストリート・5

(72)発明者 ウォーン、ニコラス・ダブリュ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01810、アンドーバー、ファルウツド・ドライブ・27

(72)発明者 カンター、アンジェラ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01463、ベツパーエル、サウス・ロード・118

Fターム(参考) 4C076 DD15 DD37 DD43 DD49 DD51 DD53 DD57 DD60 DD66 EE23

FF65

4C085 AA13 AA14 BB17 DD15 DD32 DD37 EE07

4H045 AA50 DA75 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	稳定的抗体组合物和稳定其的方法		
公开(公告)号	JP2012510468A	公开(公告)日	2012-05-10
申请号	JP2011538673	申请日	2009-11-24
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	コレイアアイバンアール ラジエイエフスキチエスワフハ フラウンホーフアーボルフガング ウオーンニコラスダブリユ カンターアンジエラ		
发明人	コレイア,アイバン・アール ラジエイエフスキ,チエスワフ・ハ フラウンホーフアー,ボルフガング ウオーン,ニコラス・ダブリユ カンター,アンジエラ		
IPC分类号	A61K47/02 G01N33/531 A61K47/18 A61K47/12 A61K47/22 A61K39/395 A61K47/20 A61K47/16 A61K47/10 A61K47/26 A61K47/34 A61P19/02 A61P1/00 A61P25/00 A61P3/10 A61P17/06 A61P37/00 A61P29/00 C07K16/00		
CPC分类号	A61K9/0019 A61K39/39591 A61K47/183 A61K47/20 A61K47/22 A61K47/26 A61P1/00 A61P3/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 C07K16/065 C07K16 /244 C07K2317/21 C07K2317/41 C07K2317/52 C07K2317/55 A61K9/00 A61K31/4172 A61K39/395 A61K47/50 A61K39/3955 A61K2039/505 C07K2317/76 C07K2317/94		
FI分类号	A61K47/02.ZNA G01N33/531.A A61K47/18 A61K47/12 A61K47/22 A61K39/395.V A61K39/395.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61K47/20 A61K47/16 A61K47/10 A61K47/26 A61K47/34 A61P19/02 A61P1/00 A61P25/00 A61P3/10 A61P17/06 A61P37/00 A61P29/00 C07K16/00		
F-TERM分类号	4C076/DD15 4C076/DD37 4C076/DD43 4C076/DD49 4C076/DD51 4C076/DD53 4C076/DD57 4C076 /DD60 4C076/DD66 4C076/EE23 4C076/FF65 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/DD15 4C085/DD32 4C085/DD37 4C085/EE07 4H045/AA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045 /FA74		
优先权	61/118528 2008-11-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于抑制包含λ轻链的免疫球蛋白分级的组合物和方法，基于以下观察：在组氨酸存在下，铁导致由于切割中的裂解而含有λ轻链的重组完全人IgG分子的片段化增加。铰链区域。本发明进一步提供一种水性药物制剂，其包含结合IL-12 / IL-23的p40亚基的抗体或其抗原结合部分和包含组氨酸的缓冲系统，其中所述制剂具有增强的稳定性，包括增强的抗性。碎片。

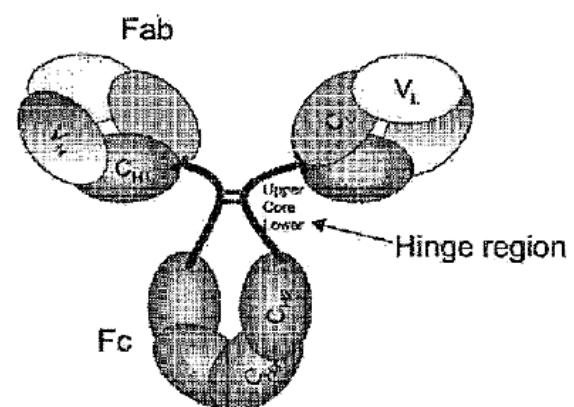


Figure 1