

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号  
特許第5410985号  
(P5410985)

(45) 発行日 平成26年2月5日(2014.2.5)

(24) 登録日 平成25年11月15日(2013.11.15)

|                          |                |   |
|--------------------------|----------------|---|
| (51) Int.Cl.             | F I            |   |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | M |
| A 6 1 P 31/14 (2006.01)  | A 6 1 K 39/395 | S |
| A 6 1 K 47/12 (2006.01)  | A 6 1 P 31/14  |   |
| A 6 1 K 47/02 (2006.01)  | A 6 1 K 47/12  |   |
| A 6 1 K 47/34 (2006.01)  | A 6 1 K 47/02  |   |

請求項の数 16 (全 26 頁) 最終頁に続く

|               |                               |           |                        |
|---------------|-------------------------------|-----------|------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2009-539730 (P2009-539730)  | (73) 特許権者 | 301055549              |
| (86) (22) 出願日 | 平成19年12月4日 (2007.12.4)        |           | クルセル ホランド ベー ヴェー       |
| (65) 公表番号     | 特表2010-511665 (P2010-511665A) |           | オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデ |
| (43) 公表日      | 平成22年4月15日 (2010.4.15)        |           | ン アルキメデスウェツハ 4         |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2007/063244             | (74) 代理人  | 100147485              |
| (87) 国際公開番号   | W02008/068246                 |           | 弁理士 杉村 憲司              |
| (87) 国際公開日    | 平成20年6月12日 (2008.6.12)        | (74) 代理人  | 100119530              |
| 審査請求日         | 平成22年11月25日 (2010.11.25)      |           | 弁理士 富田 和幸              |
| (31) 優先権主張番号  | 60/872, 892                   | (74) 代理人  | 100160749              |
| (32) 優先日      | 平成18年12月5日 (2006.12.5)        |           | 弁理士 飯野 陽一              |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       | (72) 発明者  | アレクザンダー ベルトールド ヘンドリ    |
| (31) 優先権主張番号  | 06125400.9                    |           | ク ベッカー                 |
| (32) 優先日      | 平成18年12月5日 (2006.12.5)        |           | オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ ライデ |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                    |           | ン アルキメデスウェツヒ 4         |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液体抗狂犬病抗体製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも12ヶ月の間2 から8 の間の温度で安定な二つの抗狂犬病モノクローナル抗体の製剤上の調剤物であって、

( i ) 配列番号1の重鎖および配列番号2の軽鎖を含む抗狂犬病ウイルスモノクローナル抗体CR57、またはそれと配列で少なくとも95%同一であり、CR57により認識される標的への結合についてCR57と競合すること、および狂犬病ウイルス中和活性を有することが可能である抗体と、

( i i ) 配列番号3の重鎖および配列番号4の軽鎖を含む抗狂犬病ウイルスモノクローナル抗体CR4098、またはそれと配列で少なくとも95%同一であり、CR4098により認識される標的への結合についてCR4098と競合すること、および狂犬病ウイルス中和活性を有することが可能である抗体と

を含み、  
調剤物は、10mMの濃度のクエン酸塩緩衝剤、150mMの濃度の塩化ナトリウム、および0.01から0.03%w/vまでの量のポリソルベート80を含む、製剤上の調剤物。

【請求項 2】

pHは5.5から6.5までに及び、請求項1に記載の調剤物。

【請求項 3】

調剤物の重量オスモル濃度は、250mosm/kgから350のmosm/kgまで

に及ぶ、請求項 1 または 2 に記載の調剤物。

【請求項 4】

二つの抗狂犬病ウイルスモノクローナル抗体はそれぞれ 0.1 mg/mL から 2.0 mg/mL までの量で存在する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の調剤物。

【請求項 5】

調剤物は、250 IU/mL から 1500 IU/mL までに及ぶ狂犬病ウイルス中和有効性を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の調剤物。

【請求項 6】

二つの抗体の比率は、5 : 1 および 1 : 5 の間である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の調剤物。

10

【請求項 7】

調剤物は滅菌されたもの（無菌）である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の調剤物。

【請求項 8】

調剤物はエンドトキシンを含まない、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の調剤物。

【請求項 9】

調剤物は  $40 \pm 2$  の温度および  $75 \pm 5\%$  の相対湿度で 2 週間貯蔵後に H P S E C で求めて少なくとも 95% の抗体モノマーの純度を有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の調剤物。

【請求項 10】

20

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の調剤物の有効量を、対象体への剤形の投与を介する対象体の曝露後の予防の処置のために含む、製剤上の単位剤形。

【請求項 11】

一つの調剤物での二つの抗狂犬病モノクローナル抗体の貯蔵を改善するための方法であって、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の製剤上の調剤物において抗体を調剤することを含む、方法。

【請求項 12】

調剤物は、2 から 40 までの温度で貯蔵される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

抗体の副産物形成の量を減ずる、請求項 11 または 12 に記載の方法。

30

【請求項 14】

抗体の 5% またはそれ未満しか、2 から 8 までの温度での貯蔵の 12 ヶ月間以内に H P S E C で測定されるような凝集体を形成しない、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

配列番号 1 の重鎖および配列番号 2 の軽鎖を含む抗狂犬病ウイルスモノクローナル抗体 C R 5 7、またはそれと配列で少なくとも 95% 同一であり、C R 5 7 により認識される標的への結合について C R 5 7 と競合すること、および狂犬病ウイルス中和活性を有することが可能である抗体の製剤上の調剤物であって、調剤物は 2 から 8 までの間の温度および - 60 および - 80 の間の温度で少なくとも 18 ヶ月の間安定であり、調剤物は、10 mM の濃度のクエン酸塩緩衝剤、150 mM の濃度の塩化ナトリウム、および 0.01 から 0.03 % w / v までの量のポリソルベート 80 を含む、調剤物。

40

【請求項 16】

配列番号 3 の重鎖および配列番号 4 の軽鎖を含む抗狂犬病ウイルスモノクローナル抗体 C R 4 0 9 8、またはそれと配列で少なくとも 95% 同一であり、C R 4 0 9 8 により認識される標的への結合について C R 4 0 9 8 と競合すること、および狂犬病ウイルス中和活性を有することが可能である抗体の製剤上の調剤物であって、調剤物は 2 から 8 までの間の温度および - 60 および - 80 の間の温度で少なくとも 18 ヶ月の間安定であり、調剤物は、10 mM の濃度のクエン酸塩緩衝剤、150 mM の濃度の塩化ナトリウム、および 0.01 から 0.03 % w / v までの量のポリソルベート 80 を含む、調剤物。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は薬剤に関する。特に、本発明は特定の抗狂犬病抗体の安定した製剤に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

過去10年間で、バイオテクノロジーの進歩は多数の異なった疾患および障害の診断、予防及び治療に用いる多様な抗体を識別、開発及び生産することを可能にした。かかる抗体の例は、国際公開WO 2005 / 118644号に開示された抗狂犬病ウイルス抗体である。かかる2つの抗体CR57およびCR4098を有する抗体カクテルが、特に好都合で、狂犬病発病後の予防に用いることができる。国際公開WO 2005 / 118644号では、これら抗体がPBSで調製、使用された。

10

## 【0003】

いずれのたんぱく質でも、結合親和性または中和活性のような抗体の生物学的活性は、たんぱく質の多数の官能基を劣化から保護しながら、無傷で残存するアミノ酸の少なくともコア配列の立体配座完全性に依存する。化学的および物理的不安定性は、それぞれ抗体の劣化に関与しうる。抗体が従来の有機および無機薬剤に較べてより大きく複雑であるため、かかる抗体の製剤は特別な問題をもたらす。抗体安定性はイオン強度、pH、温度、凍結／融解反復サイクル、抗体濃度およびせん断力のような因子により影響を受けうる。活性な抗体は、変質、凝集（可溶性および不溶性の両凝集体形成）、沈殿および吸着を含む物理的不安定性並びにごく僅かな例を挙げると、例えばラセミ化、ベータ放出又はジスルフィド交換、加水分解、アミド分解および酸化を含む化学的不安定性の結果として失われる場合がある。これら不安定性のすべてが、低下した生物学的活性、増加した毒性および／または増加した免疫原性を有する抗体副産物または誘導体の形成を潜在的にもたらすことができる。

20

## 【0004】

先行技術は、特定の抗体用の抗体製剤を作成するのに適当に使用できる多数の賦形剤の例を示す一方、特定の抗体が有しうる特定の不安定性の問題を打開するためにどの賦形剤を加えるべきか、どれだけの量を加えるべきか予測することは不可能である。さらに、特定の抗体を特定の製剤内で化学的および生物学的に安定して保持する抗体濃度、pH及び貯蔵温度のような最適状態を見出すことは困難である。変え得る全ての要因を考慮しても、単一モノクロナル抗体の製剤用に適当な賦形剤と最適状態を見つけることは課題を含む。明らかに、単一製剤において2つの異なるモノクロナル抗体の製剤用に適当な賦形剤と最適状態を発見することはさらに困難で問題を含む。特に、この技術は2つの異なる組み換え型モノクロナル抗体を含有する長期間安定した医薬品を提供しない。

30

## 【0005】

したがって、狂犬病ウイルスに対し単一モノクロナル抗体だけでなく、2つの異なる特定のモノクロナル抗体さえも長期間貯蔵において安定である製剤を発見する技術の必要が存在した。貯蔵安定性をまた、輸送中に作用するせん断力の場合で、かつ変性した気象条件下、特に高い温度と大気湿気で保持すべきである。さらに、製剤が所望の投与経路にふさわしく、十分に許容され、簡単な構造を有するべきである。

40

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明の目的は、かかる製剤を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明目的の必要条件を満たす製剤が、驚くべきことに2つの異なるモノクロナル抗体に加えて、クエン酸塩緩衝液、等張化剤及び界面活性剤とを備える水溶液の形態で発見

50

された。リン酸塩緩衝液は、驚くべきことに特定抗体の不安定性をもたらし、この不安定性が界面活性剤の添加によっても増加することを見出した。したがって、本発明は、特定の抗狂犬病抗体CR 5 7およびCR 4 0 9 8用の製剤、あるいはその機能的変異体を提供する。本発明はまた、CR 5 7およびCR 4 0 9 8の両方を備える抗体製剤、またはその機能的変異体に関連する。本製剤は、活性成分（単一抗体または複数の抗体）のほかに、クエン酸塩緩衝液、等張化剤および界面活性剤を含有する。本発明の製剤は、- 7 0 および 5 で少なくとも一年間安定である。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】は、 $40 \pm 2$  /  $75 \pm 5\%$  相対湿度下で0週間（白いカラム）、2週間（黒いカラム）および4週間（陰影のついたカラム）貯蔵後、HP-SECで測定した抗狂犬病ウイルス抗体CR 5 7のカクテルの安定性をそれぞれ示す。図の左から右に、クエン酸塩（20 mM、pH 6.0）；クエン酸塩（20 mM、pH 6.5）；リン酸塩（20 mM、pH 7.0）；及びリン酸塩（20 mM、0.01%のw/vポリソルベート80、pH 7.0）の緩衝液システムを試験した。

10

【図2】は、 $40 \pm 2$  /  $75 \pm 5\%$  相対湿度下で0週間（白いカラム）、2週間（黒いカラム）および4週間（陰影のついたカラム）貯蔵後、HP-SECで測定した抗狂犬病ウイルス抗体CR 4 0 9 8のカクテルの安定性をそれぞれ示す。図の左から右に、クエン酸塩（20 mM、pH 6.0）；クエン酸塩（20 mM、pH 6.5）；リン酸塩（20 mM、pH 7.0）；及びリン酸塩（20 mM、0.01%のw/vポリソルベート80、pH 7.0）の緩衝液システムを試験した。

20

【図3】は、 $40 \pm 2$  /  $75 \pm 5\%$  相対湿度下で0週間（白いカラム）、2週間（黒いカラム）および4週間（陰影のついたカラム）貯蔵後、HP-SECで測定した抗狂犬病ウイルス抗体CR 5 7およびCR 4 0 9 8のカクテルの安定性をそれぞれ示す。図の左から右に、クエン酸塩（20 mM、pH 6.0）；クエン酸塩（20 mM、pH 6.5）；リン酸塩（20 mM、pH 7.0）；及びリン酸塩（20 mM、0.01%のw/vポリソルベート80、pH 7.0）の緩衝液システムを試験した。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明の製剤は、抗体CR 5 7（重鎖配列番号：1および軽鎖配列番号：2）および抗体CR 4 0 9 8（重鎖配列番号：3および軽鎖配列番号：4）の少なくとも一つ、好ましくは両方を備える。抗狂犬病ウイルスモノクローナル抗体CR 5 7およびCR 4 0 9 8の同定、単離、調製および特性解析は、ここに参照して援用する国際公開WO 2 0 0 5 / 1 1 8 6 4 4号に詳細に開示されている。これら抗体の機能的変異体は、その高い類似性に基づく類似した物理化学的特性を有し得るので、本発明の範囲内にも含まれる。機能的変異体は、本発明ではCR 5 9またはCR 4 0 9 8に対し少なくとも95%、好適には少なくとも97%、例えば少なくとも98%または99%同族であるアミノ酸配列を有する抗体として定義され、親分子（それぞれCR 5 9またはCR 4 0 9 8である親分子）により認識される標的と競合結合し、狂犬病ウイルス中和活性を有することが可能である。抗体の標的は抗原（本抗体にとって狂犬病ウイルス、特にそのGたんぱく質である）であり、さらにエピトープとして定義し得る。親分子の標的は国際公開WO 2 0 0 5 / 1 1 8 6 4 4号に開示され、標的との競合結合の決定を当業者に既知の常法により行うことができる。機能的変異体はヒト抗体であるのが好ましく、好適にはIgG1分子である。好ましい実施態様において、機能的変異体は親抗体と少なくとも95%、97%、98%または99%一致するアミノ酸配列である。ここで用いる用語「機能的変異体」は、親モノクローナル抗体のアミノ酸配列と比較して一つ以上のアミノ酸により変化するアミノ酸配列を備えるモノクローナル抗体を参照する。機能的変異体は、アミノ酸置換、追加および削除を含む貯蔵的な配列修飾を有する場合がある。アミノ酸修飾は、抗体をエンコード化する核酸における部位特異的突然変異誘発、分子クローニング、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発およびランダムPCR媒介突然変異誘発のような当業界で既知の標準的な技術によって導入することができ

30

40

50

る。貯蔵的なアミノ酸置換は、アミノ酸残基を類似した構造的又は化学的特性を有するアミノ酸残基で置換したものを含む。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当業界で定義された。これらファミリーには、塩基性側鎖（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばアスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、無極性側鎖（例えばグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分枝側鎖（例えばトレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン）を有するアミノ酸がある。上述したもの以外のアミノ酸残基ファミリーの分類も使用し得ることは当業者にとって明らかである。さらに、変異体は非貯蔵的なアミノ酸置換、例えば異なる構造的又は化学的特性を有するアミノ酸残基によるアミノ酸の置換を有する場合がある。類似した少数の変異体は、アミノ酸の削除、挿入または両方とも含みうる。免疫学的活性を無効にすることなくアミノ酸残基を置換、挿入又は削除し得ることを決定するガイダンスは、当業界で周知のコンピュータプログラムを用いて見出すことができる。とりわけ当業者に既知のギャップまたはベストフィットのようなコンピュータアルゴリズムを用いて、比較すべきアミノ酸配列を最適に整列し、また類似又は同一のアミノ酸残基を定義することができる。

#### 【0010】

機能的変異体は、親抗体と比較し同一または異なり、高いまたは低い結合親和性を有し得るが、まだ狂犬病ウイルスまたはそのフラグメントに特異的に結合することができ、また親抗体と同じ、高いまたは低い狂犬病ウイルス中和活性を有する場合がある。

#### 【0011】

特定の実施態様において、本発明に係る製剤は、カップ軽鎖を有する第一の抗狂犬病ウイルスモノクローナル抗体と、ラムダ軽鎖を有する第二の抗狂犬病ウイルスモノクローナル抗体とを備える。これは、特別な酵素免疫測定吸着法をカップおよびラムダ軽鎖のそれぞれに対し実行しえるので、各抗体に関する抗体濃度を容易に決定することができる。

#### 【0012】

ここで用いる用語“モノクローナル抗体”は、単一分子組成の抗体分子の調製を参照する。モノクローナル抗体は、特定のエピトープに対する単一結合特異性および親和性を示す。本発明に係わる製剤用の本発明のモノクローナル抗体（CR57およびCR4098並びにその機能的変異体）はヒト抗体であり、抗体のIgGクラス、好適にはIgG1にある。

#### 【0013】

モノクローナル抗体の産生方法は当業界で周知であり、例えば1988年にハーロウ氏およびレイン氏により編集された抗体：ラボラトリーマニュアル、コールド・スプリング・ハーバー研究所、ニューヨークに開示され、ここに参照のため援用する。

#### 【0014】

用語「特異的に結合」は、ある抗原およびそのフラグメントに対し免疫特異的に結合し、他の抗原に対し免疫特異的に結合しないことを意味する。ある抗原に対し免疫特異的に結合するモノクローナル抗体は、例えば当業界で既知の放射性免疫分析（RIA）、酵素免疫測定吸着法（ELISA）、BIACORE又は他の分析により決定されるようなより低い親和性を有する他のペプチドまたはポリペプチドと結合し得る。ある抗原に免疫特異的に結合するモノクローナル抗体またはそのフラグメントは関連抗原と交差反応性となることができる。好適には、ある抗原と免疫特異的に結合するモノクローナル抗体またはそのフラグメントは他の抗原と交差反応しない。

#### 【0015】

「薬学的に許容し得る賦形剤」は、好ましい又は便利な投与形態を調製するためのモノクローナル抗体のような活性分子と組み合わせるあらゆる不活性物質を意味する。「薬学的に許容し得る賦形剤」は、用いる投薬量および濃度で受容者に対し非毒性の賦形剤であり、モノクローナル抗体を備える製剤の他の成分と相溶性である。

## 【 0 0 1 6 】

用語「副成物」は、所定の製剤で治療／予防抗体の割合を損なうか、又は減ずる不所望な生成物を含む。典型的副成物は、例えばアミド分解又は加水分解による抗体の分解により生じた抗体の凝集体、抗体のフラグメントまたはその混合物を含む。一般に、凝集体は分子量がモノマ - 抗体より大きい複合体である。抗体分解生成物は、例えばアミド分解や加水分解により生じられた抗体のフラグメントを含む場合がある。一般に、分解生成物はモノマ - 抗体より分子量が小さい複合体である。IgG抗体の場合、かかる分解生成物は約150 kD未満である。

## 【 0 0 1 7 】

ここで用いる「安定な／安定化した」製剤は、その中の抗体が貯蔵中その物理的安定性／同一性／保全性および／または化学安定性／同一性／保全性および／または生物活性を本質的に保持する。たんに質安定性を測定するための様々な解析手法が当業界で入手し得、例えばヴィンセント・リ - 編、マルセル・デカ - 社、ニュ - ヨ - ク出版、ペプチドおよびたんに質薬物送達、第247～301頁(1991年)およびジョ - ンズ著、先端的な薬物送達総説、第29～90頁(1991年)を参照されたい。安定性は、所定の時間所定の温度及び他の貯蔵条件で測定することができる。安定性は、目視検査、SDS - PAGE、IEF、HPSEC、RFFITおよびカップ/ラムダELISAからなる群から選択した少なくとも一つの方法により決定してもよい。モノクローナル抗体は、色および／または明快さの目視検査中、又は紫外線散乱、SDS - PAGE、高圧排除クロマトグラフィー (HPSEC) により測定して凝集、沈殿および／または変性の徴候を示さない場合に、薬学的製剤において「物理的安定性を保持する」。好適には、本発明に係る製剤を用いる際、5%以下、通常4%以下、好ましくは3%以下、より好ましくは2%以下、特に1%以下の抗体が、HPSECまたは凝集形成の測定用の任意他の適した方法により測定して凝集体を形成する。例えば、抗体モノマ - が特定の製剤においてある貯蔵条件下所定の時間後にHPSECで測定して約90%以上、好ましくは約95%以上、特に98%以上の純度を有する場合、抗体が該特定の製剤において安定であると考えられる。その結果、CR57およびCR4098抗体は本発明の製剤において5±3で少なくとも18ヶ月間貯蔵で安定している。すなわち、HPSECクロマトグラムにおけるモノマーピークは、全ピークの合計面積の95%以上の面積からなる(表9において主なピーク面積が99%以上であること明らかである)。化学安定性は、タンパク質の化学変化した形態を検出、定量化することによって評価され得る。化学変化は、例えば(HP) SEC、SDS - PSGEおよび／またはマトリックス支援レーザー脱離イオン化／飛行時間型質量分析法(MALDI / TOF MS)を用いて評価し得るサイズ修正(例えばクリッピング)を含むことができる。化学変化の他のタイプは、例えばイオン交換クロマトグラフィにより評価し得る荷電変化(例えばアミド分解の結果として起こる)を含む。抗体は、該抗体の所定時間での生物活性が例えば抗原結合検定又はウイルス中和検定で決定して医薬製剤を調製する時間で示された生物活性の少なくとも約90%(検定の誤差内で)である場合、抗体は所定時間での医薬製剤において「その生物活性を保持する」。

## 【 0 0 1 8 】

本明細書で用いる「約」は、特記しない限り±10%を意味する。

## 【 0 0 1 9 】

第1形態において、本発明は、少なくとも好適には治療的有効量の活性成分と、少なくとも薬学的に許容し得る賦形剤とを備える医薬製剤を包含する。医薬製剤は、クエン酸塩緩衝液、等張化剤、界面活性剤、抗体が互いに異なる2つの抗狂犬病ウイルスモノクローナル抗体とを備えるのが好ましい。該製剤は例えば凍結または凍結乾燥した固体とすることができるが、好適には液体、例えば水溶液である。かかる製剤は、少なくとも2つの異なる抗狂犬病ウイルスモノクローナル抗体、特に(i) CR57(重鎖配列番号: 1および軽鎖配列番号: 2のアミノ酸配列を有する抗体)またはその機能的変異体、および(ii) CR4098(重鎖配列番号: 3および軽鎖配列番号: 4のアミノ酸配列を有する抗体)またはその機能的変異体とを備えることができる。

## 【 0 0 2 0 】

特定の実施態様において、本発明に係る製剤は約 250 IU/ml から約 1500 IU/ml、例えば約 300 IU/ml から約 1400 IU/ml、通常約 380 IU/ml から約 1500 IU/ml の範囲の狂犬病ウイルス中和能力を有する。狂犬病ウイルス中和を測ることは当業者の可能な範囲である。中和は、例えばジュネーブの世界保健機構、F.X.メスリン、M.M.カプランおよびH.コプロスキー編(1996)、第4版、第15~17章、狂犬病の実験室技術に記載されているように測定することができる。活性を中和するのに適当な既知検定はRFFIT検定である。

#### 【0021】

ある実施態様において、 $5 \pm 3$  で12ヶ月の貯蔵後の本発明の製剤の狂犬病ウイルス中和能力は、貯蔵前の本発明の製剤の狂犬病ウイルス中和能力の少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好適には少なくとも98%、特に100%である。ある実施態様において、 $25 \pm 2$  で3ヶ月の貯蔵後の本発明の製剤の狂犬病ウイルス中和能力は、貯蔵前の本発明の製剤の狂犬病ウイルス中和能力の少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好適には少なくとも98%、特に100%である。

#### 【0022】

本発明に係る製剤は、安定化剤としても既知の界面活性剤を含む。界面活性剤にはポリソルベートがあるがこれに限定するものでない。当業者は、他の界面活性剤、例えば非イオンまたはイオン洗剤が、薬学的に許容し得る、すなわちヒトへの投与に適している限り界面活性剤として使用することができることに気づいている。好適な実施態様において、本発明は、界面活性剤がポリソルベート20、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート65、ポリソルベート80のようなポリソルベートであり、ポリソルベート80が好ましい本発明に係る製剤を提供する。ある実施態様において、ポリソルベート80は製剤中に約0.0005%w/vから約0.05%w/v、好ましくは約0.005%w/vから約0.03%w/v、より好ましくは約0.008%w/vから約0.015%w/vの分量で存在する。好適な実施態様において、ポリソルベート80は約0.01%w/vの分量で存在する。

#### 【0023】

ある特定の実施態様において、本発明は、クエン酸塩緩衝液、例えば無水クエン酸ナトリウム(2.5mg/ml)/クエン酸一水和物(0.3mg/ml)緩衝液が約5mMから約25mM、好ましくは約7mMから約20mM、より好ましくは約8mMから約15mM、特に約9mMから約12mMの濃度で存在する本発明に係る製剤を提供する。好適な実施態様において、クエン酸塩緩衝液は、約10mMの濃度で存在する。

#### 【0024】

ある特定の実施態様において、本発明は、pHが約5.2から約6.8、通常約5.5から約6.5、好ましくは約5.7から約6.3、より好ましくは約5.8から約6.2、特に約5.9から約6.1の範囲である本発明に係る製剤に関するものである。好適な実施態様において、pHは約6.0である。

#### 【0025】

特定の非限定的な実施態様において、等張化剤は塩化ナトリウムである。他の塩、例えば砂糖等も、当業者に既知のように薬学的に許容し得る限り、等張化剤として用いることができる。本発明のある特定の実施態様において、等張化剤は約50mMから約250mM、通常約75mMから約225mM、好ましくは約100mMから約200mM、より好ましくは約125mMから約175mMの濃度で存在する。好適な実施態様において、等張化剤は約150mMの濃度で存在する。ある特定の実施態様において、本発明に係る製剤の重量オスモル濃度は約250mOsm/kgから約350mOsm/kg、好ましくは約270mOsm/kgから約330/kg、より好ましくは約280mOsm/kgから約320mOsm/kg、特に約290mOsm/kgから約310mOsm/kgの範囲である。好適な実施態様において、重量オスモル濃度は約300mOsm/kgである。換言すれば、当該製剤は実質的に等張性である、すなわちヒト血液と実質的に同

10

20

30

40

50

じ浸透圧を有するのが好ましい。等張性は、例えば蒸気圧または製氷式浸透圧計を用いて測定することができる。本発明の製剤の重量オスモル濃度は、例えば一つ以上の等張化剤によって調節することができる。

【0026】

本発明の製剤における各抗体の濃度は、約0.1 mg/mlから2.0 mg/ml、通常約0.1 mg/mlから1 mg/mlであるのが好ましい。ある特定の非限定的な実施態様において、各抗体の濃度は0.15 (±20%) mg/mlである。他の非限定的な実施態様において、各抗体は0.3 (±20%) mg/ml (すなわち、2つの抗体に対して合計0.6 mg/ml)の濃度で存在する。

【0027】

ある特定の実施態様において、二つの抗体の(タンパク質)比率は5:1から1:5、好ましくは2:1から1:2、特に約1:1である。

【0028】

さらに、本発明に係る製剤は、限定されないがアミノ酸とその塩類、砂糖、たんぱく質、希釈剤、可溶化剤、pH調整剤、緩和剤、追加緩衝液、他の無機および有機塩、抗酸化剤等を含む他の賦形剤を備えることができる。しかし、本発明の製剤はクエン酸塩緩衝液、等張化剤および界面活性剤は別にして他の賦形剤を含まないのが好ましい。

【0029】

本発明に係る製剤において、抗狂犬病ウイルスモノクロ-ナル抗体CR57およびCR4098は、約2 から約8 で少なくとも1年間、通常少なくとも約18ヶ月間安定である。好適には、かかる抗体が約2 から約8 で少なくとも2年間、より好適には3年間安定である。

【0030】

さらに、抗狂犬病ウイルスモノクロ-ナル抗体は、本発明に係る製剤において $25 \pm 2$ で少なくとも約2ヵ月間安定である。加えて、抗狂犬病ウイルスモノクロ-ナル抗体は、本発明に係る製剤において $40 \pm 2$ で少なくとも2週間安定である。

【0031】

ある特定の実施態様において、当該製剤は筋肉注射での投与、経皮投与、傷への局所的皮下注射での投与またはこれらの組合せに適している。したがって、製剤は無菌であるのが好ましい。製剤を無菌にする方法は当業界で周知であり、例えば無菌ろ過膜によるろ過、または抗体を除いた製剤の成分を約120 で約30分間高压滅菌することを含む。

【0032】

好適な実施態様において、製剤は実質上エンドトキシンを含まない。エンドトキシンは、患者への非経口投与により高熱反応をもたらす得るグラム陰性バクテリアの外側の細胞壁に付随する約10 kDaの低分子量複合体である。したがって、FDAは静脈内薬物適応の単一1時間期において体重1キログラムにつき5 EUの服用を上限とした(例えば、米国薬局方協会(USP)、薬局方フォ-ラム第26巻(1)、第223頁、2000年を参照)。ある特定の実施態様において、製剤は1ミリリットルにつき約5.0 エンドトキシン単位(EU/ml)未満のエンドトキシン濃度(約5.0 EU/ml 未満の濃度をここではエンドトキシンを実質上含まないとする)、好ましくは約2.5 EU/ml 未満、より好ましくは約1.0 EU/ml 未満、さらに好適には約0.5 EU/ml 未満、特に約0.30 EU/ml 未満の濃度を有する。ある特定の実施態様において、製剤は約0.001 EU/ml から約5.0 EU/ml の範囲のエンドトキシン濃度を有する。エンドトキシン測定方法は当業者に既知であり、限定するものではないが、ゲルクロット検定、濁度(分光光度)検定、発色検定を含む。

【0033】

「汚染後予防」(PEP)が、おそらく狂犬病にかかった動物に触れる人に対して示される。可能な汚染は、動物咬傷を含む咬合汚染(すなわち歯が肌を貫通する)、および非咬合汚染を含む。本発明に係る製剤を、狂犬病ウイルス感染症の予防および/または治療、例えば汚染後予防に使用するのに必要なものに投与することができる。本発明の製剤を、

10

20

30

40

50



狂犬病ウイルスの診断、予防および／または治療に有用な他の分子とともに使用することができる。例えば、製剤を狂犬病ウイルスに対するワクチンと同時に投与することができる。あるいはまた、ワクチンを本発明の製剤の投与前後に投与してもよい。ワクチンとともに本発明の製剤の投与が汚染後予防に適している。狂犬病ワクチンには限定しないが、精製ニワトリ胚細胞（PCEC）ワクチン（RabAvert、Rabipur）、ヒト2倍体細胞ワクチン（HDCV；Imovaxワクチン）、又は狂犬病吸着ワクチン（RVA）がある。本発明の製剤の単一丸塊を投与するのが好ましい。汚染後予防の投与計画は、狂犬病ウイルス対し予防接種しなかった個々体の汚染後0、3、7、14、28日に狂犬病ワクチンを三角筋に筋肉注射で5回投与する。本発明に係る製剤は、汚染後0日目、さもなければできるだけ限り早く傷およびその周りにワクチンから離れた部位で筋肉注射される量を保持したまま投与されなければならない。予防接種をしていない人は抗狂犬病ウイルス抗体を投与するよう勧められる。抗体又は複数の抗体の治療に有効な量を投与し、該量が狂犬病のPEPに対し有効、または少なくとも部分的に有効である。すなわち、狂犬病ウイルスを中和する。

#### 【0034】

他の形態において、本発明は、被験者への投与により該被験者の汚染後予防治療用の本発明に係る製剤の有効量を備えた医薬品単位服用形態を付与する。好適な実施態様において、被験者はヒトである。ヒトは大人または幼児とすることができる。ここで用いる用語「医薬品単位服用形態」は、治療すべき被験者に対し単一投与量として適した物理的に不連続な単位を意味し、各単位が所望の治療的／予防的効果を生むように計算した所定量の活性化化合物を所要の医薬担体、希釈剤又は賦形剤と共に含む。

#### 【0035】

医薬品単位服用形態は、製剤を備える容器とすることができる。適当な容器としては、限定するものではないが、密閉アンプル、バイアル、ビン、注射器および試験管がある。かかる容器は、ガラスまたはプラスチックのような様々な材料から形成することができる。減菌点検口を有する場合がある（例えば、容器は皮下注射針により貫通し得るストッパを有するバイアルとすることができる）。好適な実施態様において、容器はバイアルである。かかるバイアルは約0.3 mlから約3 mlの容積を有するのが好ましい。バイアルは、約0.1 mgから約2.0 mgの量の抗狂犬病ウイルス抗体を含有するのが好ましい。ある実施態様において、バイアルは、一バイアル当たり合計750～2000 IUの狂犬病ウイルス中和モノクロナル抗体を含有する。このタイプのバイアルを大人への投与用に適切に用いることができる一方、一バイアル当たり合計250～750 IUの狂犬病ウイルス中和モノクロナル抗体を含有するバイアルを幼児への投与用に適切に用いることができる。本抗体は、通常本発明の製剤において治療に有効な量で処方される。投与計画を調整して最適な所望の応答（例えば治療的な応答）を提供することができる。適当な投薬量範囲は、例えば約20 IU/体重1 kgのような体重1 kg当たり10～30 IUとすることができる。

#### 【0036】

医薬品単位服用形態は、さらに使用説明書を備えるキットで存在することができる。該キットは、薬学的に許容し得る賦形剤を備えるより多くの容器をさらに備え、フィルタ、針、注射器を含む商業的および使用者見地から望ましい他の材料を含むことができる。かかるキットに付随する取扱説明書は、治療、予防又は診断生産物のコマーシャル・パッケージに通常含まれる説明書とすることができ、これは例えばかかる治療、予防又は診断生産物の使用に関連する兆候、用法、投薬量、製造法、管理、非適応および／または警告についての情報を含む。ある特定の実施態様において、キットは約5 IU/kgから約40 IU/kg、例えば20 IU/kgの投薬量を達成するのに必要な最適容量を用いるための取扱説明書を備える。

#### 【0037】

さらに、本発明は、2つの抗狂犬病ウイルスモノクロナル抗体を本発明に係る液体の薬学的製剤において処方することにより該抗体（CR57およびCR4098またはその機能的変異体）の貯蔵を一つ、例えば単一の製剤において改善する方法に関する。該製剤を約

2 から約 40 の温度、例えば約 2 から 8 の間で貯蔵することができる。しかしながら、製剤を 2 以下の温度、例えば約 - 20 、 - 70 等で貯蔵してもよい。本発明に係る特定の製剤において抗体を貯蔵することによって、抗体の副産物形成の量を減ずる。実用的な理由から、個々の抗体 CR57 および CR4098 を混合する前に、これらを例えば - 70 ± 10 で凍結貯蔵することが好ましく、一方最終生産物 (CR57 および CR4098 のカクテル) を 5 ± 3 で液体状で貯蔵するのが好ましい。

#### 【0038】

更なる形態において、本発明はまた、単一の抗狂犬病ウイルスモノクローナル抗体、すなわち CR57 若しくは CR4098 またはその一つの機能的変異体を備える液体の薬学的製剤に関する。かかる製剤は、上述したような全ての特性および賦形剤を備えるのが好ましい。従って、好適な実施態様において、かかる製剤はクエン酸塩緩衝液 (5 ~ 25 mM) を含み、5.5 から 6.5、例えば 6.0 の pH を有するか；等張化剤 (例えば塩化ナトリウム、50 ~ 250 mM、例えば約 150 mM) を含むか；界面活性剤、例えばポリソルベート 80 (0.0005% ~ 0.05%、例えば約 0.01%) を備え、好適には実質上等張性で、無菌で、実質上エンドトキシンを含んでいない。二つの異なる抗狂犬病ウイルスモノクローナル抗体を備える製剤に関し上述したものと異なりうる特性および賦形剤は以下に記載する。

#### 【0039】

ある特定の実施態様において、本発明に係る製剤は単一の抗狂犬病モノクローナル抗体を約 0.1 mg/ml から約 6.0 mg/ml、通常約 1.0 mg/ml から約 4.0 mg/ml、例えば約 2.0 mg/ml から約 3.0 mg/ml の量で備えることができる。特定の実施態様において、製剤は約 300 IU/mg から約 1600 IU/mg、例えば約 500 IU/mg から約 1250 IU/mg の狂犬病ウイルス中和能力を有する。上記のような単一抗体を備える製剤を互いに組み合わせ/混合して 2 つの抗体、すなわち抗体カクテルを備える本発明の製剤を得ることができる。

#### 【実施例】

#### 【0040】

本発明を説明するために以下の例を提供する。これら例は、どんな形であれ本発明の範囲を制限することを意図しない。一般に、本発明の実行は、特に明記しない限り、例えばサンプロック、フリッチュおよびマニアティスの分子クローニング：コールド・スプリング・ハバ・研究所出版、1989年；抗体工学プロトコル（分子生物学における方法）、第51巻、ポール編、フマナ出版、1996年；抗体工学：実践的なアプローチ（実践的なアプローチシリーズ、169）、マッカファティ等編、フマナ出版、1996年；抗体：研究所マニュアル、ハロおよびレン著、コールド・スプリング・ハバ・研究所出版、1999年；分子生物学の現在のプロトコル、オスベル等編、ジョン・ワイリ & ソンズ、1992年に記述されたような抗体テクノロジーおよびポリペプチド製剤の標準技術のような化学、分子生物学、組み換え DNA 技術、免疫学の従来技術を用いる。

#### 【0041】

CR57 および CR4098 抗体のアミノ酸配列を表 10 に示す。これら中和抗狂犬病ウイルス抗体の識別、クローニング、調製および特性解析は、国際公開 WO 2005 / 118644 号に詳細に開示されている。抗体を基本的に類似した方法で大規模に製造した。抗狂犬病ウイルス抗体を安定して発現する PER.C6 細胞の出発培養液を融解し、細胞を培養し、そして培地を拡大、使用してバイオリアクタ - を接種した。該バイオリアクタ - をまずバッチモード、続いて流加モードで操作した。各抗体を含む媒体を採取し、遠心分離によって浄化し、さらなる後処理プロセスの前にろ過した。後処理精製プロセスは、標準的なクロマトグラフィおよびろ過工程からなり、続いてポリソルベート 80 のない処方緩衝液に対する緩衝液交換と、所望抗体濃度を得るための濃縮とを行った。ポリソルベート 80 の添加とろ過の後、得られた薬物 (抗体 CR57 または抗体 CR4098) を更に使用するまで - 80 で貯蔵した。製剤品の製造のために、前記薬物を処方緩衝液で希釈し、抗体

濃度を測定し、両方の抗体希釈液を最終充填の前に混合し、ろ過した。

【 0 0 4 2 】

安定性研究のために、薬物（単一抗体）と製剤品（抗体のカクテル）の種々の製剤を調製し、分析した。かかる種々の製剤のサンプルを、当業界で周知の様々な分析法を用いて異なる時点と温度で分析した。

【 0 0 4 3 】

HPSEC、SDS - PAGE（還元および非還元）、たんぱく質濃度（A280）、IEF、外観、pHおよび重量オスモル濃度を用いてCR57抗体、CR4098抗体およびその混合抗体に対する種々の処方緩衝液の安定化効果を評価した。

【 0 0 4 4 】

HPSECを用いて凝集またはタンパク質分解による抗体の分解生成物の存在を評価した。SDS - PAGEを用いて無傷の抗体の完全性と、不純物および潜在的分解産物の存在を評価した。たんぱく質濃度を測定して製剤のたんぱく質濃度の保持を許容範囲内で評価した。IEFを用いて製剤中に存在し得る抗体イソ型の存在および完全性を評価し、またアミド分解またはシアル酸の欠如により生じ得る変化を評価するために長期間にわたって観測した。製剤の外観は、明快さ、色および微粒子の存在に対する目視検査に基づき行われた。pHを測定して製剤のpHの維持を約5.5から約6.5の許容範囲内で評価した。重量オスモル濃度を測定して製剤の重量オスモル濃度の維持を約250 mOsm/kgから約350 mOsm/kgの許容範囲内で評価した。

【 0 0 4 5 】

第一の研究では、異なる緩衝液システムを試験した。そのために、クエン酸塩緩衝液中で処方した抗狂犬病ウイルス抗体製剤を、リン酸塩緩衝液中で処方した抗狂犬病ウイルス抗体製剤と比較した。20 mMのクエン酸塩緩衝液（pH 6.0）または20 mMのクエン酸塩緩衝液（pH 6.5）にCR57（0.1 mg/ml）、CR4098（0.15 mg/ml）又はCR57（0.1 mg/ml）およびCR4098（0.15 mg/ml）の混合物/カクテル（1:1.5混合物）のいずれかを備える製剤は、HPSEC分析で示されるように、 $5 \pm 3$  /大気相対湿度、 $25 \pm 2$  / $60 \pm 5$  %相対湿度および $40 \pm 2$  / $75 \pm 5$  %相対湿度で4週間までの貯蔵に対し安定していた。かかる製剤のすべてが、HPSECで求められて96%以上の抗体モノマー純度（面積%）を有した（図1～3参照）。20 mMのリン酸塩緩衝液（pH 7.0）にCR57（0.1 mg/ml）、CR4098（0.15 mg/ml）、又はCR57（0.1 mg/ml）およびCR4098（0.15 mg/ml）の混合物（1:1.5混合物）のいずれかを備える製剤は、 $40 \pm 2$  / $75 \pm 5$  %相対湿度で4週間までの貯蔵に対し、同一期間および温度条件下のクエン酸塩緩衝液中の製剤と比較して著しく低い抗体モノマー純度を有した（図1～3参照）。ポリソルベート80（0.01% w/v）をリン酸塩緩衝液に添加した場合、抗体モノマー純度が、 $40 \pm 2$  / $75 \pm 5$  %相対湿度で4週間までの貯蔵に対しCR4098では約70%、またCR57および混合物では約85%の値まで減少した（図1～3参照）。かかる結果は、個々の抗体並びに抗体の混合物の安定性がリン酸塩緩衝液と比較してクエン酸塩緩衝液で優れていることを明白に示す。リン酸塩緩衝液では、抗体が断片化により分解される。抗体は、pH 6.0およびpH 6.5のクエン酸塩緩衝液を備える製剤において等しく安定であった。さらに、リン酸塩緩衝液におけるポリソルベート80の添加が追加の抗体不純物をもたらすと結論づけた。HPSECでの結果は、IEFおよびSDS - PAGE（還元および非還元）を含む他の分析法により確かめられた（データでは示されていない）。かかる研究に基づき、クエン酸塩を緩衝液システムとして用いた。

【 0 0 4 6 】

製剤の最適界面活性剤濃度を決定するために、異なるポリソルベート80濃度を有するクエン酸塩系製剤を分析した（表1参照）。製剤を以下の通りに調製した。抗体CR57およびCR4098（薬物）を基本的には上述したように調製した。これらを0.1 μmフィルターでろ過した。たんぱく質濃度は、A280たんぱく質濃度決定により測定してろ過の前後で同一であった。CR57の濃度は2.5 mg/mlであり、CR4098の濃度は1

10

20

30

40

50

、 $0\text{ mg/ml}$ であった。次に、 $10\text{ mM}$ のクエン酸塩 ( $\text{pH } 6.0$ ) と  $50\text{ mM}$ の塩化ナトリウムとを含有する緩衝液と、 $10\text{ mM}$ のクエン酸塩 ( $\text{pH } 6.0$ )、 $50\text{ mM}$ の塩化ナトリウムと  $5\%$ のポリソルベ - ト  $80$  を含有する緩衝液を調製した。製剤を表  $2$  に記載されたように調製した。最終的な容量を  $10\text{ mM}$ のクエン酸塩 ( $\text{pH } 6.0$ ) および  $50\text{ mM}$ の塩化ナトリウムを含有する緩衝液で得た。すべての製剤の重量オスモル濃度を求め、塩化ナトリウムを添加して製剤を約  $300\text{ mOsm/kg}$  の重量オスモル濃度にした。すなわち、製剤中の最終的な塩化ナトリウム濃度は  $150\text{ mM}$  である。最後に、すべての製剤を  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  フィルタ - でろ過し、外観試験、振動研究および  $\text{pH}$  分析を除くすべての試験に関しては  $2\text{ ml}$  のエッペンドルフ・カップに充填 ( $400\text{ }\mu\text{l}$ ) し、これを用いて  $20\text{ mm}$  ストッパーで覆い、アルミニウムキャップで封鎖した  $5\text{ ml}$  注射バイアル ( $2\text{ ml}$  のサンプル入り) を作成した。製剤を安定性キャビネット内に  $5 \pm 3$  / 環境相対湿度、 $25 \pm 2$  /  $60 \pm 5\%$  相対湿度又は  $40 \pm 2$  /  $75 \pm 5\%$  相対湿度で貯蔵した。指示された時点で、2つのサンプルを取り出し、表  $3$  に示すようなスケジュールに従って in mon oplo で分析した。

【0047】

上述したように、短パン質濃度は  $A280$  たんぱく質濃度決定でより測定しての前後で同一であった。

【0048】

HPSEC 分析の結果を表  $4$  に示す。たんぱく質成分の分離は、該たんぱく質成分の迅速な分析と高解像度を可能にし、優れた再現性を有するイソクラテック溶離法を用いる HPSEC  $C$  により行った。結果は、 $t = 0$  週のすべての製剤が HPSEC により求めて  $98 \sim 100\%$  純度を有することを示す。すべての製剤は、 $5 \pm 3$  / 大気相対湿度 (すなわち  $2$  から  $8$  / 大気相対湿度) で  $t = 13$  週 (および  $t = 0$  週と  $t = 13$  週との間の全中間時点) で  $t = 0$  週に匹敵し得る純度を示し、この温度で少なくとも  $13$  週間安定性を示した。製剤  $2$  のみの純度が  $t = 8$  と  $t = 13$  週でちょうど  $98\%$  以下であった。さらに、 $25 \pm 2$  /  $60 \pm 5\%$  相対湿度で、全製剤がすべての時点で  $95\%$  以上の純度を示し、これは抗体もこの温度で少なくとも  $13$  週間安定であることを示すと表  $4$  から結論付けた。 $40 \pm 2$  /  $75 \pm 5\%$  相対湿度のより高い温度で、すべての製剤が最初の  $2$  週で  $95\%$  以上の純度を示し、抗体がこの高温度で少なくとも  $2$  週間安定なことを示した。2週を越えた全時点では、すべての製剤が約  $90\%$  を超える純度を示し、抗体がこの高温度で少なくとも  $13$  週間比較

【0049】

SDS - PAGE 分析結果は、HPSEC で観測されたデータと一致していた。非還元および還元 SDS - PAGE 分析に基づいて、 $5 \pm 3$  / 大気相対湿度および  $25 \pm 2$  /  $60 \pm 5\%$  相対湿度で貯蔵された製剤が、参照標準物と比較してすべての時点で相当な劣化の兆候を示さないが、わずかな劣化が  $40 \pm 2$  /  $75 \pm 5\%$  相対湿度で貯蔵された製剤の異なる時点において

【0050】

SDS - PAGE による抗体サンプルの識別は抗体の完全性のみを確かめるが、その初期状態又は変性状態を示さない。IEF は抗体の  $\text{pI}$  を示し、また抗体の配座微小異型遺伝子性を示すのにも有用である。SDS - PAGE と IEF の組合せは、抗体構造と特性のわずかな違いを検出するための強力な道具である。IEF の結果に基づいて、すべての製剤に対する顕著な相違が異なるポリソルベ - ト  $80$  濃度の間で全く観察されなかった (データでは示されていない)。製剤を  $40 \pm 2$  /  $75 \pm 5\%$  相対湿度で貯蔵したとき、軽微な分解 (最もアミド分解による) が  $t = 6$  週の時点で観察された。

## 【0051】

5 ± 3 /大気相対湿度、25 ± 2 /60 ± 5%相対湿度および40 ± 2 /75 ± 5%相対湿度で貯蔵された全ての製剤の明確さおよび色の目視検査は、これら製剤がt = 13週まで事実上粒子がなく、より高温で貯蔵した際に粒子を含有する製剤の量がわずかに増加したことが観察されたことを示した。CR57およびCR4098と、0.01%(w/v)のポリソルベ-ト80とを備える製剤は、CR57およびCR4098と、0.03%(w/v)のポリソルベ-ト80とを備える製剤と比較して、より少ない粒子を含有した。振動研究は、外観に関してそれぞれの製剤間に相違がないことを示した。すべての製剤のpH値は、指示された温度と時間での貯蔵の間実質上変化しなかった。

## 【0052】

すべての製剤の重量オスモル濃度値は、25 ± 2 /60 ± 5%相対湿度および40 ± 2 /75 ± 5%相対湿度で貯蔵した際の安定性研究の間極めてわずかな増加を示した。0.03%(w/v)のポリソルベ-ト80を具える製剤と、0.01%(w/v)のポリソルベ-ト80を備える製剤との間で顕著な相違はなかった。

## 【0053】

全体として、かかる研究による結果は、単一の抗狂犬病ウイルス抗体並びに抗狂犬病ウイルス抗体の混合物/カクテルが0.01%(w/v)のポリソルベ-ト80を備えたクエン酸塩系の製剤において5 ± 3 /大気相対湿度、25 ± 2 /60 ± 5%相対湿度および40 ± 2 /75 ± 5%相対湿度で13週後に最高の安定性を有することを示す。

## 【0054】

更なる研究では、クエン酸塩(10 mM、pH 6.0)、塩化ナトリウム(150 mM)、0.01%(w/v)のポリソルベ-ト80および単一の抗体CR57(1.2 mg/ml)またはCR4098(1.2 mg/ml)を備える製剤を、下記の2つの温度、5 ± 3 および-70 ± 10 °Cで貯蔵した際に研究した。製剤をIEF、SDS-PAGE(還元および非還元)およびHPSEC分析用に1.2 mlのチューブに充填(250 µl)した。pHおよび外観分析のために、2 mlの製剤で満した2 mlのチューブを用いた。これら製剤を5 ± 3 °Cまたは-70 ± 10 °Cで安定性キャビネット内に貯蔵した。指示された時点(1、2、3ヵ月)で、サンプルを取り出し、分析した。かかる研究の結果は、表5と表6で見ることができる。

## 【0055】

前記両温度でのCR57およびCR4098製剤のSDS-PAGE分析(還元および非還元)は、追加の分解バンドがt = 0週と比較して観察されないで、抗体の完全性が少なくとも3ヶ月間無傷のまま保持していることを示す。これらの結果は、5 ± 3 /大気相対湿度または-70 ± 10 °Cで3ヵ月後の抗体構造と凝集レベルがそれぞれt = 0ヶ月のものと異なることを示すIEF分析およびHPSEC分析により確認された。加えて、たんぱく質濃度とpHは有意に時間とともに変化しなかった。各製剤の目視検査は無色透明の液体を示し、実質的に粒子がないことを示した。

## 【0056】

-70 ± 10 °Cで1ヶ月または3ヶ月貯蔵後の追加凍結/融解サイクルを施した製剤の分析は、上述した検定、すなわちSDS-PAGE(還元および非還元)、HPSEC、IEF、外観、OD280およびpHに基づきt = 0ヶ月と比較しても相違がないことを示した(データでは示されてない)。

## 【0057】

要約すると、かかる結果は、クエン酸塩緩衝液(10 mM、pH 6.0)、ポリソルベ-ト80(0.01%w/v)および塩化ナトリウム(150 mM)を備えた製剤における抗体CR57および抗体CR4098が5 ± 3 /大気相対湿度および-70 ± 10 °Cで安定なことを示し、それによって前述した結果を確認した。加えて、抗体サンプルの-70 ± 10 °Cでの長期貯蔵(t = 1ヶ月またはt = 3ヶ月)後の追加凍結/融解サイクルは、抗体CR57または抗体4098の安定性に影響をあたえない。

## 【0058】

類似の安定性研究において、クエン酸塩（10 mM、pH 6.0）、塩化ナトリウム（150 mM）、0.01%（w/v）のポリソルベート80および単一の抗体CR57（2.47 mg/ml）またはCR4098（2.48 mg/ml）を備える製剤を、2つの異なる温度、すなわち $5 \pm 3$  および $-70 \pm 10$  で3ヵ月以上の長期間貯蔵して研究した。かかる製剤を0.22  $\mu$ mフィルターでろ過し、ポリプロピレン・チューブ（4 ml）に充填した。加えて、たんぱく質含有量（各抗体0.3 mg/mlで、0.6 mg/mlの全体的なたんぱく質濃度）に基づく1:1比率のCR57およびCR4098の組合せを、2つの異なる温度、すなわち $5 \pm 3$  および $-70 \pm 10$  で6ヵ月までの間貯蔵して研究した。抗体カクテル/混合物を備えた製剤を0.22  $\mu$ mフィルターでろ過し、ガラスバイアル（2.6 ml）に充填した。かかる製剤を、以下の分析法：SDS-PAGE（還元および非還元）、IEF、HPSEC、RFFIT、外観、pHを用いて試験した（表7および表8参照）。CR57/CR4098組合せを有する製剤もまた、カップ/ラムダELISAおよび重量オスモル濃度によって試験した（表9参照）。さらに、単一抗体または抗体カクテルを備えた製剤のエンドトキシンレベルを $t = 0$ ヶ月で求めた。エンドトキシンレベルは、ゲル塊技術を用いるリムルム変異体細胞溶解物（LAL）検定で評価された。CR57を備えた製剤は0.30 EU/ml以下、CR4098を備えた製剤は0.30 EU/ml以下、両抗体のカクテルを備えた製剤は0.24 EU/ml以下である。製剤を $-70 \pm 10$ 、 $5 \pm 3$ 、 $25 \pm 2$  又は $40 \pm 2$  で指示された期間安定性キャビネット内に貯蔵した。

10

**【0059】**

単一抗体を含有する製剤を6ヵ月間にわたって分析し、 $t = 0$ ヶ月で得た初期の結果と比較した。 $-70 \pm 10$  および $5 \pm 3$  で1、2、3および6ヶ月間貯蔵したCR57およびCR4098製剤のIEFおよびSDS-PAGEのバンドパターンは、それぞれ $t = 0$ ヶ月におけるCR57およびCR4098製剤のバンドパターンに匹敵した（表7および表8参照）。追加のバンドは検出されていない。 $-70 \pm 10$  および $5 \pm 3$  で6ヵ月間貯蔵した両抗体のHPSECパターンは、 $t = 0$ ヶ月の貯蔵したものによく匹敵した。「95%以上の主ピーク面積」の標的仕様がすべてのケースで満たされた。二量体ピークが1%未満（表面積）に留まり、分解ピークは試験したサンプルのすべてで検出されなかった。

20

**【0060】**

これら3つの方法で得た結果に基づき、CR57およびCR4098両方の分解が $-70 \pm 10$  および $5 \pm 3$  で6ヵ月間の貯蔵中指定の製剤において起こらないという結論を下した。

30

**【0061】**

さらに、CR57およびCR4098のたんぱく質含有量およびpHは、 $-70 \pm 10$  および $5 \pm 3$  で6ヵ月の試験期間にわたる製剤において安定であった。有効性の分析（RFFIT検定）は、両抗体に関する有効性値が両試験条件（すなわち、 $-70 \pm 10$  および $5 \pm 3$ ）下での $t = 0$ ヶ月および $t = 1$ ヶ月の時点と比較し、2、3および6ヶ月時点で増加したことを示した。この有効性の明らかな増加は、検定における肯定的な言及として用いた不安定SRIF対照サンプルによりもたらされた（メスリン、カプランおよびコブロスキー編、狂犬病の研究所技術（1996）、第4版、第15～17章、世界保健機構、ジュネーブを参照）。この作用は、結果を50%中和終点力価（データでは示されていない）として表現することによって排除された。これらの結果に基づき、CR57およびCR4098は安定な終点力価を示し、従って指示された製剤において両貯蔵条件で少なくとも6ヶ月間まで安定した有効性を示すと結論付けた。

40

**【0062】**

要約すると、前記結果に基づき、CR57およびCR4098は、クエン酸塩（10 mM、pH 6.0）、塩化ナトリウム（150 mM）および0.01%（w/v）のポリソルベート80を備えた製剤において $-70 \pm 10$  の実際の貯蔵条件で少なくとも6ヵ月間並びに $5 \pm 3$  の促進条件で少なくとも6ヵ月間安定であると考えられる。

**【0063】**

安定性を長期間の貯蔵後分析した。SDS-PAGE（NR+R）、IEF、HP-SEC、RFFITおよびOD

50

280で得た安定性結果に基づき、CR57およびCR4098は、クエン酸塩(10 mM、pH 6.0)、塩化ナトリウム(150 mM)および0.01%(w/v)のポリソルベ-ト80を備えた製剤において $-70 \pm 10$ の貯蔵条件で少なくとも18ヵ月間並びに $5 \pm 3$ の促進条件で少なくとも12ヶ月間(同様の結果が9ヶ月間後に観測された、データでは示されていない)安定であると結論付けた。

【0064】

CR57およびCR4098のカクテルを含有する製剤を6ヵ月間にわたって分析し、 $t = 0$ ヶ月で得た初期の結果と比較した。6ヵ月後、 $5 \pm 3$  および  $25 \pm 2$  で貯蔵したカクテルの外観は標的仕様内に留まる、すなわちカクテル/混合物が無色透明の液体で、実際に粒子が含まれていなかった(表9参照)。さらに、抗体カクテルは、 $40 \pm 2$  で3ヵ月間まで貯蔵した際に標的仕様内に留まることが観察された。

10

【0065】

pHと重量オスモル濃度を、 $5 \pm 3$  および  $25 \pm 2$  で  $t = 0$  ヶ月と  $t = 6$  ヶ月、また  $40 \pm 2$  での研究に対しては1ヶ月および3ヶ月の時点でモニタ - した。

【0066】

さらに、抗体カクテルは、 $5 \pm 3$  および  $25 \pm 2$  で6ヵ月間まで安定した有効性を示した(表9参照)。わずかに低い有効性値が、 $40 \pm 2$  で3ヵ月間後に得られた。すべてのデータは、約380~約1350 IU/mlの標的仕様内にあった。

【0067】

OD280で求めた抗体カクテルに存在する全たんぱく質の量は、 $40 \pm 2$  で3ヵ月、また  $5 \pm 3$  および  $25 \pm 2$  で6ヶ月の試験時点にわたり安定であった。

20

【0068】

IgGカップおよびラムダELISA結果(すなわち、抗体カクテル内の両抗体の比率として表わす)は、 $5 \pm 3$  および  $25 \pm 2$  で6ヵ月間まで、また  $40 \pm 2$  で3ヵ月間まで標的仕様内に留まった。これらの結果に基づき、抗体カクテル中のCR57およびCR4098含有量が $5 \pm 3$  および  $25 \pm 2$  で6ヵ月間、また  $40 \pm 2$  で3ヵ月間にわたって変化しないと結論付けた。 $5 \pm 3$  で6ヵ月間貯蔵した抗体カクテルのIEFジェルパターンは $t = 0$  ヶ月のものに匹敵した(表9参照)。追加のバンドが $25 \pm 2$  で貯蔵したサンプルの3ヶ月および6ヵ月後に観察され、またいくつかの追加バンドが $40 \pm 2$  で貯蔵したサンプルの1ヶ月および3ヵ月後に観察された(表9参照)。より高い貯蔵温度で得られたこれら追加バンドは分解の最初の徴候であるかもしれない。

30

【0069】

$5 \pm 3$  で貯蔵した6ヵ月後の抗体カクテルのSDS - PAGE(還元および非還元)バンドパターンは $t = 0$  ヶ月でのバンドパターンに匹敵した(表9参照)。追加のバンドは検出されなかった。 $25 \pm 2$  で3ヵ月間まで貯蔵した抗体カクテルは、還元SDS - PAGE条件下で $t = 0$  ヶ月のバンドパターンと一致するバンドパターンを示した。非還元条件下では、約43 kDaのサイズを有する弱いバンドが $25 \pm 2$  で3ヵ月間の貯蔵後に観察された。 $25 \pm 2$  で6ヶ月間の貯蔵後、還元および非還元のSDS - PAGE分析は40 kDaまでの弱いバンドを示した。同様の結果が、 $40 \pm 2$  で貯蔵した抗体カクテルに対するSDS - PAGE分析(還元および非還元)により得られた。さらに、10~15 kDaのサイズを有するより小さいバンドが、この貯蔵条件下で検出された。これらの結果に基づき、 $25 \pm 2$  および  $40 \pm 2$  で貯蔵したCR57およびCR4098の重鎖および/または軽鎖のいくつかの分解が時間とともに生じ得ると結論した。

40

【0070】

$5 \pm 3$  および  $25 \pm 2$  で6ヵ月間まで貯蔵した抗体カクテルのHPSECパターンは、 $t = 0$  ヶ月のパターンによく匹敵する。「95%以上の主ピーク面積」の標的仕様がすべてのケースで満たされた(表9参照)。二量体ピークは1%未満(表面積)に留まり、分解ピークは試験したサンプルの全てで検出されなかった。 $40 \pm 2$  で貯蔵した抗体カクテルは、前記2つの低温度で貯蔵した抗体カクテルと比較し、3ヵ月後のわずかな分解並びにわずかに増加した二量体ピーク(2.6%(表面積))とを示した。しかしながら、

50

40 ± 2 でさえ、「95%以上の主ピーク面積」の標的仕様が、試験したすべての貯蔵時間で満たされた(表9参照)。

【0071】

三つの後者の方法で得た結果に基づき、抗体カクテルにおける抗体の著しい分解は、5 ± 3 または 25 ± 2 で6ヶ月間の貯蔵中に起こらないが、わずかな凝集および分解が40 ± 2 で3ヶ月間までの貯蔵後に観察されたと結論した。

【0072】

要約すると、抗体カクテルは5 ± 3 および 25 ± 2 の貯蔵条件で少なくとも6ヶ月間、また40 ± 2 の貯蔵条件で少なくとも3ヶ月間安定であると結論した。

【0073】

SDS - PAGE (NR+R)、IEF、HP - SEC、RFFIT、カップノラムダELISAで得た12ヵ月後の結果(類似した結果が9ヵ月後に得られ、データでは示されていない)に基づき、抗体カクテルが5 ± 3 の貯蔵条件で少なくとも12ヶ月間安定であると結論した。

【0074】

分析検定(SDS - PAGE、IEF、HP - SEC、ELISA; データでは示されていない)で得た18ヵ月後の結果に基づき、抗体カクテルが5 ± 3 の貯蔵条件で少なくとも18ヶ月間安定であると結論した。

【0075】

【表1】

表1:抗体製剤の組成

| 番号 | 抗体                                      | クエン酸塩<br>緩衝液<br>(mM) | NaCl<br>(mM) | ポリソルベート80<br>(%w/v) | pH  |
|----|---|----------------------|--------------|---------------------|-----|
| 1  | 0.3 mg/ml CR57                          | 10                   | 150          | 0.01                | 6.0 |
| 2  | 0.3 mg/ml CR57                          | 10                   | 150          | 0.03                | 6.0 |
| 3  | 0.3 mg/ml CR4098                        | 10                   | 150          | 0.01                | 6.0 |
| 4  | 0.3 mg/ml CR4098                        | 10                   | 150          | 0.03                | 6.0 |
| 5  | 0.3 mg/ml CR57<br>+<br>0.3 mg/ml CR4098 | 10                   | 150          | 0.01                | 6.0 |
| 6  | 0.3 mg/ml CR57<br>+<br>0.3 mg/ml CR4098 | 10                   | 150          | 0.03                | 6.0 |

【0076】

【表2】

表2:製剤の調製

| 番号 | 抗体 CR57 (2.5<br>mg/ml)<br>(ml) | 抗体 CR4098 (1.0<br>mg/ml)<br>(ml) | 5% w/v<br>ポリソルベート80<br>(ml) | 最終容量<br>(ml) |
|----|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|--------------|
| 1  | 4.20                           | 0.00                             | 0.70                        | 35.00        |
| 2  | 4.20                           | 0.00                             | 2.10                        | 35.00        |
| 3  | 0.00                           | 10.50                            | 0.70                        | 35.00        |
| 4  | 0.00                           | 10.50                            | 2.10                        | 35.00        |
| 5  | 4.20                           | 10.50                            | 0.70                        | 35.00        |
| 6  | 4.20                           | 10.50                            | 2.10                        | 35.00        |



【 0 0 7 7 】

【 表 3 】

表3:指示された方法による指示時点での種々の製剤サンプルの分析

| 時点<br>(週) | 5±3°C/ 大気相対湿度 | 25±2°C/60±5%<br>相対湿度 | 40±2°C/75±5%<br>相対湿度 |
|-----------|---------------|----------------------|----------------------|
| 0         | A-G           | A-G                  | A-G                  |
| 2         | B,E           | B,E                  | B,E                  |
| 6         | B-E           | B-E                  | B-E                  |
| 8         | B-E           | B-E                  | B-E                  |
| 13        | C-E           | C-E                  | C-E                  |

A: タンパク質濃度 (A280)

B: HPSEC

C: SDS-PAGE (還元および非還元)

D: IEF

E: 外観

F: pH

G: 重量オスモル濃度

10

【 0 0 7 8 】

20

【表 4】

表4:HPSECで求めた抗体モノマー(面積%)の純度

| 番号 | 温度                   | t=0 週 | t=2 週 | t=6 週 | t=8 週 | t=13 週 |
|----|----------------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1  | 5±3°C/ 大気<br>相対湿度    | 98.9  | ND    | 98.7  | 98.5  | 98.6   |
|    | 25±2°C/60±5%<br>相対湿度 | 98.9  | ND    | 98.4  | 98.2  | 96.7   |
|    | 40±2°C/75±5%<br>相対湿度 | 98.9  | 98.0  | 93.7  | 94.3  | 90.4   |
| 2  | 5±3°C/ 大気<br>相対湿度    | 98.3  | ND    | 98.2  | 96.9  | 97.6   |
|    | 25±2°C/60±5%<br>相対湿度 | 98.3  | ND    | 97.5  | 96.9  | 95.4   |
|    | 40±2°C/75±5%<br>相対湿度 | 98.3  | 97.5  | 93.4  | 94.1  | 89.9   |
| 3  | 5±3°C/ 大気<br>相対湿度    | 100   | ND    | 100   | 100   | 99.9   |
|    | 25±2°C/60±5%<br>相対湿度 | 100   | ND    | 99.4  | 99.5  | 97.9   |
|    | 40±2°C/75±5%<br>相対湿度 | 100   | 99.4  | 92.3  | 94.2  | 91.8   |
| 4  | 5±3°C/ 大気<br>相対湿度    | 98.6  | ND    | 99.1  | 97.9  | 98.6   |
|    | 25±2°C/60±5%<br>相対湿度 | 98.6  | ND    | 98.5  | 97.8  | 96.8   |
|    | 40±2°C/75±5%<br>相対湿度 | 98.6  | 98.5  | 91.9  | 94.4  | 91.6   |
| 5  | 5±3°C/ 大気<br>相対湿度    | 99.4  | ND    | 99.2  | 99.3  | 99.2   |
|    | 25±2°C/60±5%<br>相対湿度 | 99.4  | ND    | 98.4  | 98.7  | 97.4   |
|    | 40±2°C/75±5%<br>相対湿度 | 99.4  | 98.4  | 91.6  | 93.6  | 89.5   |
| 6  | 5±3°C/ 大気<br>相対湿度    | 99.3  | ND    | 99.1  | 98.8  | 99.0   |
|    | 25±2°C/60±5%<br>相対湿度 | 99.3  | ND    | 98.1  | 98.3  | 96.9   |
|    | 40±2°C/75±5%<br>相対湿度 | 99.3  | 98.4  | 91.6  | 93.8  | 90.6   |

ND: 測定せず

【表 5】

表5: 指示された方法による指示時点での種々の製剤サンプルの分析

| 抗体<br>(貯蔵温度)         | 還元<br>SDS-PAGE |   |   |   | 非還元<br>SDS-PAGE |   |   |   | HPSEC<br>モノマー% |      |      |      | IEF |   |   |   |
|----------------------|----------------|---|---|---|-----------------|---|---|---|----------------|------|------|------|-----|---|---|---|
|                      | 0              | 1 | 2 | 3 | 0               | 1 | 2 | 3 | 0              | 1    | 2    | 3    | 0   | 1 | 2 | 3 |
| ヶ月                   |                |   |   |   |                 |   |   |   |                |      |      |      |     |   |   |   |
| CR57<br>(5±3°C)      | -              | - | - | - | -               | - | - | - | 98.9           | 98.5 | 98.2 | 98.3 | -   | - | - | - |
| CR57<br>(-70±10°C)   | -              | - | - | - | -               | - | - | - | 98.9           | 98.5 | 98.3 | 98.4 | -   | - | - | - |
| CR4098<br>(5±3°C)    | -              | - | - | - | -               | - | - | - | 99.7           | 99.4 | 99.2 | 99.6 | -   | - | - | - |
| CR4098<br>(-70±10°C) | -              | - | - | - | -               | - | - | - | 99.7           | 98.9 | 99.5 | 99.6 | -   | - | - | - |

-: 予期せぬバンドの検出なし

【 0 0 8 0 】

【表 6】

表6: 指示された方法による指示時点での種々の製剤サンプルの分析

| 抗体<br>(貯蔵温度)         | A280<br>mg/ml<br>(%A320/A280) |               |               |               | 外観 |   |   |   | pH  |    |    |     |
|----------------------|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|----|---|---|---|-----|----|----|-----|
|                      | 0                             | 1             | 2             | 3             | 0  | 1 | 2 | 3 | 0   | 1  | 2  | 3   |
| ヶ月                   |                               |               |               |               |    |   |   |   |     |    |    |     |
| CR57<br>(5±3°C)      | 1.33<br>0.40%                 | 1.40<br>0.74% | 1.40<br>1.01% | 1.42<br>0.59% | +  | + | + | + | 6.0 | ND | ND | 5.9 |
| CR57<br>(-70±10°C)   | 1.33<br>0.40%                 | 1.34<br>1.42% | 1.34<br>0.60% | 1.34<br>0.62% | +  | + | + | + | 6.0 | ND | ND | 6.0 |
| CR4098<br>(5±3°C)    | 1.21<br>0.67%                 | 1.22<br>1.02% | 1.31<br>1.21% | 1.29<br>0.98% | +  | + | + | + | 6.1 | ND | ND | 6.1 |
| CR4098<br>(-70±10°C) | 1.21<br>0.67%                 | 1.21<br>1.49% | 1.20<br>1.37% | 1.24<br>0.97% | +  | + | + | + | 6.1 | ND | ND | 6.1 |

+: 許可(無色透明、また実質的に粒子なし)

ND: 測定せず

【 0 0 8 1 】

【表 7】

表7:CR57の安定性試験

| 試験              | 標的仕様                        | 貯蔵条件 | t=0  | 1ヶ月  | 3ヶ月  | 6ヶ月  | 12ヶ月 | 18ヶ月 |
|-----------------|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| pH              | 6±0.5                       | -70℃ | 6.1  | ND   | ND   | 6.1  | 6.0  | 6.1  |
|                 |                             | 5℃   | ND   | ND   | ND   | 6.1  | 6.0  | ND   |
| 外観              | 無色透明な液体、実質的に粒子なし            | -70℃ | +    | +    | +    | +    | +    | +    |
|                 |                             | 5℃   | +    | +    | +    | +    | +    | ND   |
| OD280による量       | 1-5 mg/ml                   | -70℃ | 2.47 | 2.57 | 2.47 | 2.57 | 2.55 | 2.48 |
|                 |                             | 5℃   | ND   | 2.55 | 2.27 | 2.68 | 2.59 | ND   |
| 非還元<br>SDS-PAGE | バンドパターンはWS#で確認し、追加の不純物バンドなし | -70℃ | +    | +    | +    | +    | +    | +    |
|                 |                             | 5℃   | ND   | +    | +    | +    | +    | ND   |
| 還元<br>SDS-PAGE  | バンドパターンはWS#で確認し、追加の不純物バンドなし | -70℃ | +    | +    | +    | +    | +    | +    |
|                 |                             | 5℃   | ND   | +    | +    | +    | +    | ND   |
| IEF             | バンドパターンはWS#で確認(報告すべき追加バンド)  | -70℃ | +    | +    | +    | +    | +    | +    |
|                 |                             | 5℃   | ND   | +    | +    | +    | +    | ND   |
| HP-SEC          | 95%以上の主ピーク(面積%)             | -70℃ | 99.5 | 99.7 | 99.4 | 99.7 | 99.8 | 99.7 |
|                 |                             | 5℃   | ND   | 99.6 | 99.4 | 99.6 | 99.4 | ND   |
| 有効性             | 500-1250 IU/mg              | -70℃ | 937  | 974  | 1581 | 2130 | 927  | 1440 |
|                 |                             | 5℃   | ND   | 922  | 1523 | 1629 | 1054 | ND   |

ND: 測定せず

#: CR57 加工標準 (WS) and CR4098 WS

+ 標的仕様を確認

【表 8】

表8:CR4098の安定性試験

| 試験              | 標的仕様                                    | 貯蔵条件 | 0<br>ヶ月 | 1<br>ヶ月 | 3<br>ヶ月 | 6<br>ヶ月 | 12<br>ヶ月 | 18<br>ヶ月 |
|-----------------|---|------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|
| pH              | 6±0.5                                   | -70℃ | 6.1     | ND      | ND      | 6.1     | 6.0      | 6.1      |
|                 |   | 5℃   | ND      | ND      | ND      | 6.1     | 6.0      | ND       |
| 外観              | 無色透明な<br>液体、実質的に<br>粒子なし                | -70℃ | +       | +       | +       | +       | +        | +        |
|                 |   | 5℃   | +       | +       | +       | +       | +        | ND       |
| OD280<br>による量   | 1-5 mg/ml                               | -70℃ | 2.48    | 2.58    | 2.49    | 2.57    | 2.56     | 2.41     |
|                 |   | 5℃   | ND      | 2.65    | 2.52    | 3.03    | 2.76     | ND       |
| 非還元<br>SDS-PAGE | バンドパターン<br>はWS#で確認し、<br>追加の不純物<br>バンドなし | -70℃ | +       | +       | +       | +       | +        | +        |
|                 |   | 5℃   | ND      | +       | +       | +       | +        | ND       |
| 還元<br>SDS-PAGE  | バンドパターン<br>はWS#で確認し、<br>追加の不純物<br>バンドなし | -70℃ | +       | +       | +       | +       | +        | +        |
|                 |   | 5℃   | ND      | +       | +       | +       | +        | ND       |
| IEF             | バンドパターン<br>はWS#で確認<br>(報告すべき追加<br>バンド)  | -70℃ | +       | +       | +       | +       | +        | +        |
|                 |   | 5℃   | ND      | +       | +       | +       | +        | ND       |
| HP-SEC          | 95%以上の<br>主ピーク<br>(面積%)                 | -70℃ | 99.6    | 99.7    | 99.7    | 99.8    | 99.7     | 99.7     |
|                 |   | 5℃   | ND      | 99.7    | 99.5    | 99.5    | 99.3     | ND       |
| 有効性             | 500-1250<br>IU/mg                       | -70℃ | 924     | 971     | 1698    | 1695    | 991      | 1093     |
|                 |   | 5℃   | ND      | 897     | 1434    | 1645    | 1093     | ND       |

ND: 測定せず

#: CR57 加工標準 (WS) and CR4098 WS

+: 標的仕様を確認

【 0 0 8 3 】

【表 9】

表9:抗体カクテルの安定性試験

| 試験                    | 標的仕様                                    | 貯蔵条件 | t=0<br>ヶ月 | 1<br>ヶ月        | 2<br>ヶ月 | 3<br>ヶ月                 | 6<br>ヶ月        | 12<br>ヶ月 |
|-----------------------|---|------|-----------|----------------|---------|-------------------------|----------------|----------|
| 重量<br>オスモル<br>濃度      | 300 ± 50<br>mオスモル/kg                    | 5°C  | 307       | ND             | ND      | ND                      | 310            | 315      |
|                       |   | 25°C | ND        | ND             | ND      | ND                      | 314            | ND       |
|                       |   | 40°C | ND        | 308            | ND      | 312                     | ND             | ND       |
| pH                    | 6 ± 0.5                                 | 5°C  | 5.7       | ND             | ND      | ND                      | 5.7            | 5.7      |
|                       |   | 25°C | ND        | ND             | ND      | ND                      | 5.7            | ND       |
|                       |   | 40°C | ND        | 5.7            | ND      | 5.8                     | ND             | ND       |
| 外観                    | 無色透明な<br>液体、実質的に<br>粒子なし                | 5°C  | +         | +              | +       | +                       | +              | +        |
|                       |   | 25°C | ND        | +              | +       | + <sup>1</sup>          | +              | ND       |
|                       |   | 40°C | ND        | +              | ND      | +                       | ND             | ND       |
| OD280<br>による量         | 0.48-0.72<br>mg/ml                      | 5°C  | 0.60      | 0.60           | 0.60    | 0.61                    | 0.60           | 0.61     |
|                       |   | 25°C | ND        | 0.61           | 0.60    | 0.60                    | 0.60           | ND       |
|                       |   | 40°C | ND        | 0.62           | ND      | 0.60                    | ND             | ND       |
| CR57/<br>CR4098<br>の比 | 0.6-1.4                                 | 5°C  | 0.9       | 0.8            | 0.9     | 0.9                     | 0.9            | 1.0      |
|                       |   | 25°C | ND        | 0.8            | 0.9     | 0.9                     | 0.9            | ND       |
|                       |   | 40°C | ND        | 0.8            | ND      | 0.9                     | ND             | ND       |
| 非還元<br>SDS-<br>PAGE   | バンドパターン<br>はWS#で確認し、<br>追加の不純物<br>バンドなし | 5°C  | +         | +              | +       | +                       | +              | +        |
|                       |   | 25°C | ND        | +              | +       | + <sup>2</sup>          | + <sup>4</sup> | ND       |
|                       |   | 40°C | ND        | + <sup>2</sup> | ND      | + <sup>3</sup>          | ND             | ND       |
| 還元<br>SDS-<br>PAGE    | バンドパターン<br>はWS#で確認し、<br>追加の不純物<br>バンドなし | 5°C  | +         | +              | +       | +                       | +              | +        |
|                       |   | 25°C | ND        | +              | +       | +                       | + <sup>4</sup> | ND       |
|                       |   | 40°C | ND        | + <sup>2</sup> | ND      | + <sup>5</sup>          | ND             | ND       |
| HP-SEC                | 95%以上の<br>主ピーク<br>(面積%)                 | 5°C  | 99.6      | 100            | 99.5    | 99.5                    | 99.9           | 99.2     |
|                       |   | 25°C | ND        | 99.6           | 99.5    | 99.5                    | 99.4           | ND       |
|                       |   | 40°C | ND        | 99.0           | ND      | 95.1<br>(2.6%の<br>ピーク度) | ND             | ND       |
| IEF                   | バンドパターン<br>はWS#で確認<br>(報告すべき追加<br>バンド)  | 5°C  | +         | +              | +       | +                       | +              | +        |
|                       |   | 25°C | ND        | +              | +       | + <sup>6</sup>          | + <sup>7</sup> | ND       |
|                       |   | 40°C | ND        | + <sup>8</sup> | ND      | + <sup>9</sup>          | ND             | ND       |
| 有効性                   | 380-1350<br>IU/ml                       | 5°C  | 1006      | 933            | 1089    | 1401                    | 999            | 830      |
|                       |   | 25°C | ND        | 937            | 1015    | 1001                    | 847            | ND       |
|                       |   | 40°C | ND        | 807            | ND      | 621                     | ND             | ND       |
| 無菌                    | 適合                                      | 5°C  | +         | ND             | ND      | ND                      | ND             | +        |

ND: 測定せず

#: 加工標準(WS)、CR57およびCR4098の抗体カクテル

+: 標的仕様を確認

【 0 0 8 4 】

+ 1 : 無色透明な液体、&gt; 1 0 粒子 / m l

10

20

30

40

50

+ 2 : バンドパターンはW S # に匹敵し、約 4 3 k D a のサイズを有する弱い追加の不純物バンドを含む

+ 3 : バンドパターンはW S # に匹敵し、約 1 0 , 1 5 および 4 3 k D a のサイズを有する弱い追加の不純物バンドを含む

+ 4 : 逸脱、弱いバンドが 4 3 k D a の周りに出現

+ 5 : バンドパターンはW S # に匹敵し、約 1 0 k D a , 1 5 k D a および 2 5 - 5 0 k D a のサイズを有する弱い追加の不純物バンドを含む

10

+ 6 : バンドパターンはW S # で確認、8 . 0 - 8 . 5 p I - 面積にバンドのより高い汚染強度

+ 7 : 逸脱、弱いバンドが p I 7 . 5 以下に出現、8 . 0 - 8 . 5 p I - 面積に異なる汚染強度

+ 8 : バンドパターンはW S # で確認、弱い追加バンド ( p I 7 . 2 , 7 . 3 , 8 . 6 )

20

+ 9 : バンドパターンはW S # で確認、弱い追加バンド ( p I 範囲 6 . 3 - 7 . 4 および p I 8 . 6 )

【 0 0 8 5 】

【表 10】

表10 CR57 および CR4098 の配列

## A. CR57

## 重鎖 (配列番号:1)

|   |     |    |
|---|-----|----|
| QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFN RYTVNWVRQA PGQGLEWMGG IIPIFGTANY | 60  | 10 |
| AQRFGQRLTI TADESTSTAY MELSSLRSD TAVYFCAREN LDNSGTYYYF SGWFDPWGQG  | 120 |    |
| TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF | 180 |    |
| PAVLQSSGLY SLSSVVTVP SSGTQTQYIC NVNKKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP  | 240 |    |
| APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK | 300 |    |
| PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT | 360 |    |
| LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD DGSFFLYSKL   | 420 |    |
| TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK                           | 457 |    |

## 軽鎖 (配列番号:2)

|   |     |    |
|---|-----|----|
| QSALTQPRSV SGSPGQSVTI SCTGTSSDIG GYNFVSWYQQ HPGKAPKLM YDATKRPSGV  | 60  | 20 |
| PDRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC CSYAGDYTPG VVFGGGTKLT VLGQPKAAPS | 120 |    |
| VTLFPPSSEE LQANKATLVC LISDFYPGAV TVAWKADSSP VKAGVETTF SKQSNNKYAA  | 180 |    |
| SSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQ VTHEGSTVEK TVAPTECS                         | 218 |    |

## B. CR4098

## 重鎖 (配列番号:3)

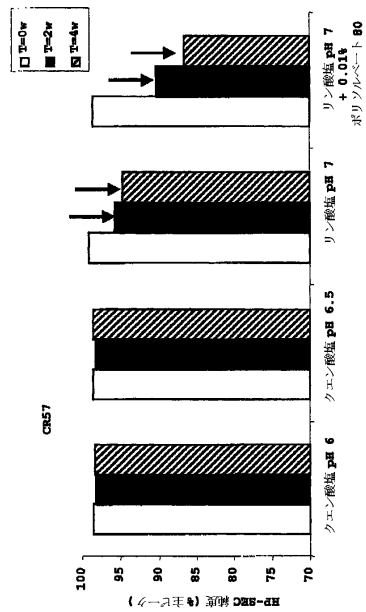
|   |     |    |
|---|-----|----|
| QVQLVESGGG AVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMEWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSDFY  | 60  | 30 |
| ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKVA VAGTHFDYWG QGTLVTVSSA | 120 |    |
| STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVLQSSG  | 180 |    |
| LYSLSSVTV PSSLGTQTY ICNVNKKPSN TKVDKRVKPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP   | 240 |    |
| SVFLFPPKPK DTLMSRTPE VTCVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREQYNS    | 300 |    |
| TYRVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPOV YTLFPPSREEM | 360 |    |
| TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVLD DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ | 420 |    |
| QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK                                   | 449 |    |

## 軽鎖 (配列番号:4)

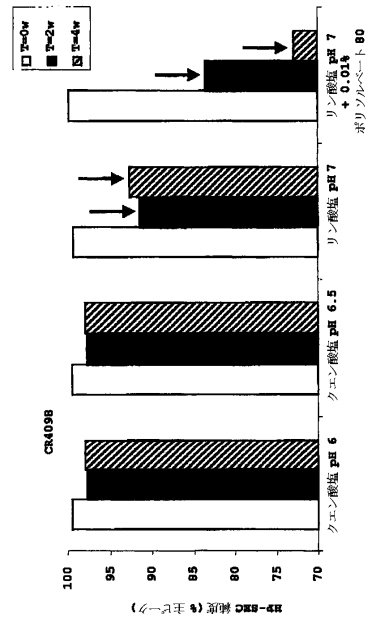
|  |     |    |
|--|-----|----|
| DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIR NDLGWYQKPK GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS | 60  | 30 |
| RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ LNSYPPTFGG GTKVEIKTVA APSVFIFPPS  | 120 |    |
| DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL  | 180 |    |
| SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC                               | 213 |    |



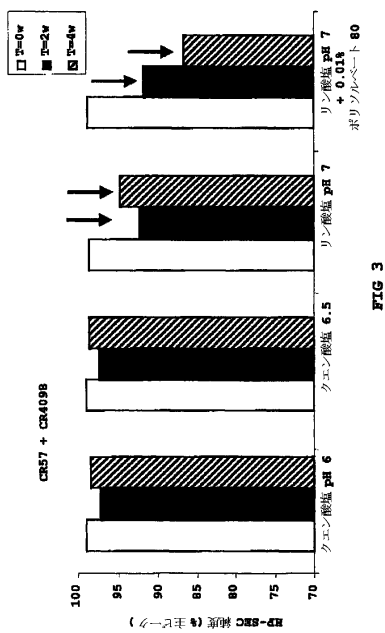
【図 1】



【図 2】



【図 3】



## フロントページの続き

|             |       |           |                     |
|-------------|-------|-----------|---------------------|
| (51)Int.Cl. |       | F I       |                     |
| A 6 1 K     | 9/08  | (2006.01) | A 6 1 K 47/34       |
| C 0 7 K     | 16/08 | (2006.01) | A 6 1 K 9/08        |
| C 1 2 P     | 21/08 | (2006.01) | C 0 7 K 16/08 Z N A |
|             |       |           | C 1 2 P 21/08       |

(72)発明者 ウィレム エフベルト マリッセン  
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ ライデン アルキメデスウェッヒ 4

審査官 渡邊 倫子

(56)参考文献 国際公開第05 / 1 1 8 6 4 4 (WO , A 1 )  
 国際公開第05 / 0 6 3 2 9 1 (WO , A 1 )  
 国際公開第05 / 0 3 5 5 7 4 (WO , A 1 )  
 国際公開第05 / 0 3 5 5 7 3 (WO , A 1 )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
 A 6 1 K 3 9 / 3 9 5  
 A 6 1 K 9 / 0 8  
 A 6 1 K 4 7 / 0 0  
 C 0 7 K 1 6 / 0 8  
 C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 P u b M e d