

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6925337号  
(P6925337)

(45) 発行日 令和3年8月25日(2021.8.25)

(24) 登録日 令和3年8月5日(2021.8.5)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395	N
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00	
A 61 K 9/08	(2006.01)	A 61 K 9/08	
A 61 K 47/26	(2006.01)	A 61 K 47/26	
A 61 K 47/10	(2006.01)	A 61 K 47/10	

請求項の数 41 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-529213 (P2018-529213)  
 (86) (22) 出願日 平成28年12月5日 (2016.12.5)  
 (65) 公表番号 特表2018-536676 (P2018-536676A)  
 (43) 公表日 平成30年12月13日 (2018.12.13)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2016/002040  
 (87) 國際公開番号 WO2017/097407  
 (87) 國際公開日 平成29年6月15日 (2017.6.15)  
 審査請求日 令和1年12月5日 (2019.12.5)  
 (31) 優先権主張番号 15198233.7  
 (32) 優先日 平成27年12月7日 (2015.12.7)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591032596  
 メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング  
 Merck Patent Gesellschaft mit beschraenkter Haftung  
 ドイツ連邦共和国 テー-64293 ダルムシュタット フランクフルター シュトラーセ 250  
 Frankfurter Str. 25  
 O, D-64293 Darmstadt  
 , Federal Republic of Germany

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗P D-L1抗体アベルマブを含む水性医薬製剤

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(i) 抗体として 1 m g / m L から 3 0 m g / m L の濃度のアベルマブ；  
 (ii) 緩衝剤として 5 m M から 1 5 m M の濃度の酢酸塩またはヒスチジン；  
 (iii) 安定剤として 2 4 0 m M から 3 2 0 m M の濃度の D - マンニトールもしくはトレハロース、または 5 0 から 1 5 0 m M の濃度のアルギニン H C 1 と 2 5 m M から 7 5 m M の濃度のグルタミン酸の組合せ；  
 (iv) 界面活性剤として 0 . 2 5 m g / m L から 0 . 7 5 m g / m L の濃度のポロキサマ-188 もしくはポリソルベート 20、または界面活性剤なし；  
 を含み、抗酸化剤を含まず、さらに pH が 5 . 0 から 6 . 0 である、水性医薬抗体製剤。

## 【請求項2】

前記 pH が 5 . 0 から 5 . 6 である、請求項1に記載の製剤。

## 【請求項3】

アベルマブの濃度が約 1 0 m g / m L から約 2 0 m g / m L である、請求項1または2に記載の製剤。

## 【請求項4】

前記酢酸塩またはヒスチジンの濃度が約 1 0 m M である、請求項1～3に記載の製剤。

## 【請求項5】

前記 D - マンニトールもしくはトレハロースの濃度が約 2 8 0 m M である、またはアルギニン H C 1 とグルタミン酸の前記組合せの場合、アルギニン H C 1 の濃度が約 1 5 0 m

10

20

Mでありグルタミン酸の濃度が約50mMである、請求項1～3に記載の製剤。

【請求項6】

前記ポロキサマー188またはポリソルベート20の濃度が約0.5mg/mLである、請求項1～3に記載の製剤。

【請求項7】

前記pHが5.2(±0.1)から5.5(±0.1)である、請求項1～3に記載の製剤。

【請求項8】

約10mMの濃度の酢酸塩を含み、他の緩衝剤を含まない、請求項1～7のいずれか一項に記載の製剤。

10

【請求項9】

約280mMの濃度のD-マンニトールまたはトレハロースを含み、他の安定剤を含まない、請求項1～8のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項10】

約0.5mg/mLの濃度のポリソルベート20またはポロキサマー188を含み、他の界面活性剤を含まない、請求項1～9のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項11】

(i) 抗体として約10mg/mLの濃度のアベルマブ；

(ii) 緩衝剤として約10mMの濃度の酢酸塩；

(iii) 安定剤として約280mMの濃度のD-マンニトールまたはトレハロース；

20

(iv) 界面活性剤として約0.5mg/mLの濃度のポリソルベート20またはポロキサマー188；

を含み、抗酸化剤を含まず、さらにpHが5.5(±0.1)である、水性医薬抗体製剤。

。

【請求項12】

(i) 10mg/mLの濃度のアベルマブ；

(ii) 10mMの濃度の酢酸塩；

(iii) 280mMの濃度のD-マンニトールまたはトレハロース；

(iv) 0.5mg/mLの濃度のポリソルベート20またはポロキサマー188；

を含み、pHが5.5(±0.1)である、請求項9に記載の製剤。

30

【請求項13】

(i) 10mg/mLの濃度のアベルマブ；

(ii) 10mMの濃度の酢酸ナトリウム三水和物；

(iii) 280mMの濃度のD-マンニトールまたはトレハロース；

(iv) 0.5mg/mLの濃度のポリソルベート20またはポロキサマー188；

(v) pHを調整するためのHCl；

(vi) 溶媒としての水(注射用)；

からなり、pHが5.5(±0.1)である、水性医薬抗体製剤。

【請求項14】

(i) 10mg/mLの濃度のアベルマブ；

40

(ii) 10mMの濃度の酢酸ナトリウム三水和物；

(iii) 280mMの濃度のトレハロース二水和物；

(iv) 0.5mg/mLの濃度のポリソルベート20；

(v) pHを調整するためのHCl；

(vi) 希釈剤としての水(注射用)；

からなり、pHが5.5(±0.1)である、請求項13に記載の製剤。

【請求項15】

(i) 10mg/mLの濃度のアベルマブ；

(ii) 10mMの濃度の酢酸ナトリウム三水和物；

(iii) 280mMの濃度のD-マンニトール；

50

(i v) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 ;  
 (v) pH を調整するための HC 1 ;  
 (v i) 希釀剤としての水 (注射用) ;  
 からなり、pH が 5.5 (± 0.1) である、水性医薬抗体製剤。

## 【請求項 16】

(i) 抗体として約 20 mg / mL の濃度のアベルマブ ;  
 (i i) 緩衝剤として約 10 mM の濃度の酢酸塩 ;  
 (i i i) 安定剤として約 280 mM の濃度の D - マンニトールまたはトレハロース ;  
 (i v) 界面活性剤として約 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 またはポロキ  
 サマー 188 ;  
 を含み、pH が 5.2 (± 0.1) である、請求項 1 に記載の製剤。

10

## 【請求項 17】

(i) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ ;  
 (i i) 10 mM の濃度の酢酸塩 ;  
 (i i i) 280 mM の濃度の D - マンニトールまたはトレハロース ;  
 (i v) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 またはポロキサマー 188 ;  
 を含み、pH が 5.2 (± 0.1) である、請求項 16 に記載の製剤。

## 【請求項 18】

(i) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ ;  
 (i i) 10 mM の濃度の酢酸 ;  
 (i i i) 280 mM の濃度の D - マンニトールまたはトレハロース二水和物 ;  
 (i v) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 またはポロキサマー 188 ;  
 (v) pH を調整するための酢酸ナトリウム ;  
 (v i) 希釀剤としての水 (注射用) ;  
 からなり、pH が 5.2 (± 0.1) である、水性医薬抗体製剤。

20

## 【請求項 19】

(i) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ ;  
 (i i) 10 mM の濃度の酢酸 ;  
 (i i i) 280 mM の濃度の D - マンニトール ;  
 (i v) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 ;  
 (v) pH を調整するための酢酸ナトリウム ;  
 (v i) 希釀剤としての水 (注射用) ;  
 からなり、pH が 5.2 (± 0.1) である、請求項 18 に記載の製剤。

30

## 【請求項 20】

(i) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ ;  
 (i i) 10 mM の濃度の酢酸 ;  
 (i i i) 280 mM の濃度のトレハロース二水和物 ;  
 (i v) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 ;  
 (v) pH を調整するための酢酸ナトリウム ;  
 (v i) 希釀剤としての水 (注射用) ;  
 からなり、pH が 5.2 (± 0.1) である、請求項 18 に記載の製剤。

40

## 【請求項 21】

(i) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ ;  
 (i i) 10 mM の濃度の酢酸 ;  
 (i i i) 280 mM の濃度の D - マンニトール ;  
 (i v) 0.5 mg / mL の濃度のポロキサマー 188 ;  
 (v) pH を調整するための酢酸ナトリウム ;  
 (v i) 希釀剤としての水 (注射用) ;  
 からなり、pH が 5.2 (± 0.1) である、請求項 18 に記載の製剤。

## 【請求項 22】

50

- (i) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；
- (ii) 10 mM の濃度の酢酸；
- (iii) 280 mM の濃度のトレハロース二水和物；
- (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポロキサマー 188；
- (v) pH を調整するための酢酸ナトリウム；
- (vi) 希釀剤としての水（注射用）；

からなり、pH が 5.2 (± 0.1) である、請求項 18 に記載の製剤。

【請求項 23】

- (i) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；
- (ii) 10 mM の濃度の酢酸；
- (iii) 280 mM の濃度の D-マンニトール；
- (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20；
- (v) 7.5 mM の濃度の水酸化ナトリウム；
- (vi) 希釀剤としての水（注射用）；

からなり、pH が 5.2 (± 0.1) である、水性医薬抗体製剤。

【請求項 24】

- (i) 20 mg / mL のアベルマブ；
- (ii) 0.6 mg / mL の氷酢酸；
- (iii) 51 mg / mL の D-マンニトール；
- (iv) 0.5 mg / mL のポリソルベート 20；
- (v) 0.3 mg / mL の水酸化ナトリウム；
- (vi) 希釀剤としての水（注射用）；

を組み合わせることによって作製される、請求項 23 に記載の製剤。

【請求項 25】

- (i) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；
- (ii) 0.6 mg / mL の濃度の酢酸；
- (iii) 51 mg / mL の濃度の D-マンニトール；
- (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20；
- (v) 0.3 mg / mL の濃度の水酸化ナトリウム；
- (vi) 希釀剤としての水（注射用）；

からなり、pH が 5.0 から 5.6 である、水性医薬抗体製剤。

【請求項 26】

有効成分として 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；ならびに賦形剤として氷酢酸、D-マンニトール、ポリソルベート 20、水酸化ナトリウム、および注射用の水からなり、pH が 5.0 から 5.6 である、水性医薬抗体製剤。

【請求項 27】

pH が 5.2 (± 0.1) である、請求項 26 に記載の製剤。

【請求項 28】

前記アベルマブが、（配列番号 1）または（配列番号 2）のいずれかの重鎖配列、（配列番号 3）の軽鎖配列を有し、Asn 300 にグリコシル化を有し、主なグリカン種として FA2 および FA2G1 を含み、合わせて全グリカン種の > 70 % を占める、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 29】

前記アベルマブのグリコシル化において、前記 FA2 が全グリカン種の 44 % ~ 54 % を占め、前記 FA2G1 が全グリカン種の 25 % ~ 41 % を占める、請求項 28 に記載の製剤。

【請求項 30】

前記アベルマブのグリコシル化において、前記 FA2 が全グリカン種の 47 % ~ 52 % を占め、前記 FA2G1 が全グリカン種の 29 % ~ 37 % を占める、請求項 29 に記載の製剤。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 1】

前記アベルマブのグリコシル化において、前記 F A 2 が全グリカン種の約 4 9 % を占め、前記 F A 2 G 1 が全グリカン種の約 3 0 % ~ 約 3 5 % を占める、請求項 2 8 に記載の製剤。

## 【請求項 3 2】

前記アベルマブのグリコシル化が、少ないグリカン種として全グリカン種の < 5 % を占める A 2 、全グリカン種の < 5 % を占める A 2 G 1 、全グリカン種の < 5 % を占める A 2 G 2 、全グリカン種の < 7 % を占める F A 2 G 2 をさらに含む、請求項 2 8 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の製剤。

## 【請求項 3 3】

10

前記アベルマブのグリコシル化において、前記 A 2 が全グリカン種の 3 % ~ 5 % を占め、前記 A 2 G 1 が全グリカン種の < 4 % を占め、前記 A 2 G 2 が全グリカン種の < 3 % を占め、前記 F A 2 G 2 が全グリカン種の 5 % ~ 6 % を占める、請求項 3 2 に記載の製剤。

## 【請求項 3 4】

前記アベルマブのグリコシル化において、前記 A 2 が全グリカン種の約 3 . 5 % ~ 約 4 . 5 % を占め、前記 A 2 G 1 が全グリカン種の約 0 . 5 % ~ 約 3 . 5 % を占め、前記 A 2 G 2 が全グリカン種の < 2 . 5 % を占め、前記 F A 2 G 2 が全グリカン種の約 5 . 5 % を占める、請求項 3 3 に記載の製剤。

## 【請求項 3 5】

前記アベルマブが(配列番号 2 )の重鎖配列を有する、請求項 2 8 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の製剤。

20

## 【請求項 3 6】

静脈内( I V )投与用である、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の製剤。

## 【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載の製剤を含有するバイアル。

## 【請求項 3 8】

2 0 m g / m L の濃度の溶液 1 0 m L 中にアベルマブ 2 0 0 m g を含有する、請求項 3 7 に記載のバイアル。

## 【請求項 3 9】

ガラスバイアルである、請求項 3 7 または 3 8 に記載のバイアル。

30

## 【請求項 4 0】

がんを処置するための、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の製剤。

## 【請求項 4 1】

前記がんが、非小細胞性肺がん、尿路上皮癌、膀胱がん、中皮腫、メルケル細胞癌、胃もしくは胃食道接合部がん、卵巣がん、乳がん、胸腺腫、胃腺癌、副腎皮質癌、頭頸部扁平上皮癌、腎細胞癌、メラノーマ、および/または古典的ホジキンリンパ腫から選択される、請求項 4 0 に記載の製剤。

## 【発明の詳細な説明】

40

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、新規の抗 P D - L 1 抗体製剤に関する。特に、本発明は抗 P D - L 1 抗体アベルマブの水性医薬製剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

プログラム死 1 ( P D - 1 )受容体ならびに P D - 1 リガンド 1 および 2 ( P D - L 1 、 P D - L 2 )は、免疫制御に重要な役割を果たす。活性化 T 細胞上に発現されると、 P D - 1 は、間質細胞、腫瘍細胞、またはその両方によって発現される P D - L 1 および P D - L 2 によって活性化され、 T 細胞死および局所免疫抑制を開始し ( Dong H, Zhu G, T

50

amada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999;5:1365-69 ; Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192:1027-34 ; Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8:793-800. [Erratum, *Nat Med* 2002;8:1039 ; Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM . Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012;24:207-12 )、腫瘍の発生および増殖のために免疫寛容な環境を提供する可能性がある。逆に、この相互作用の阻害により、非臨床動物モデルにおいて局所的なT細胞応答を増強し、抗腫瘍活性を媒介することができる (Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. *Nat Med* 2002; 8:793-800. [Erratum, *Nat Med* 2002;8:1039 ; Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12293-97 )。臨床現場において、PD-1とPD-L1の相互作用を遮断する抗体による処置は、進行性または転移性固形腫瘍を患う患者において客観的奏効率7%から38%をもたらし、忍容可能な安全性プロファイルを示すことが報告されている (Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (Anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013;369:134-44 ; Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2455-65 ; Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2443-54 ; Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515:563-67 )。明らかに、応答は、患者の大半において1年またはそれ以上の期間にわたり継続して現れた。 10 20

#### 【0003】

アベルマブ (MSB0010718Cとしても公知) は、イムノグロブリン (Ig) G1アイソタイプの完全ヒトモノクローナル抗体である。アベルマブはPD-L1に選択的に結合し、PD-L1とPD-1の相互作用を競合的に遮断する。 30

#### 【0004】

T細胞を標的とする抗PD-1抗体と比較して、アベルマブは腫瘍細胞を標的とするため副作用が少ないことが期待され、PD-L1の遮断はPD-L2 / PD-1経路はそのままであり末梢の自己寛容を促進するため、低リスクの自己免疫関連の安全性の問題を含む (Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L1 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001;2(3):261-68)。

#### 【0005】

アベルマブは現在、非小細胞性肺がん、尿路上皮癌、中皮腫、メルケル細胞癌、胃または胃食道接合部がん、卵巣がん、および乳がんを含む多くの癌種で臨床試験中である。 40

#### 【0006】

アベルマブのアミノ酸配列および配列変異体およびそれらの抗原結合断片は国際公開第2013079174号パンフレットに開示され、ここではアベルマブのアミノ酸配列を有する抗体はA09-246-2と呼ばれる。また、製造方法および特定の医薬品用途も開示されている。

アベルマブのさらなる医薬品用途は、国際公開第2016137985号パンフレット、PCT/IB2016/052748、PCT/US2016/037498、PCT/US2016/053939、米国特許出願公開第62/341,921号明細書に記載される。

国際公開第2013079174号パンフレットも、2.4節にアベルマブのアミノ酸配列を有する抗体のヒト水性製剤を記載する。この製剤は、10mg/mlの濃度の抗体、 50

抗酸化剤としてのメチオニンを含み、pHが5.5である。

IgG1型のアグリコシル抗体PD-L1の製剤試験は、国際公開第2015048520号パンフレットに記載され、ここではpHが5.8の製剤が臨床試験のために選択された。

**【発明の概要】**

**【課題を解決するための手段】**

**【0007】**

アベルマブは通常、静脈内注入によって患者に送達され、したがって水性剤形で提供されるため、本発明は、翻訳後修飾を伴うアベルマブの安定化に好適であり、国際公開第2013079174号パンフレットに開示されるように高濃度であるさらなる水性剤に10関する。

**【0008】**

図1a(配列番号1)は、宿主生物として使用したCHO細胞によって発現された場合の、アベルマブの全長重鎖配列を示す。しかしながら、抗体産生過程において、重鎖のC末端リジン(K)の切断が頻繁に観察される。Fc部分に局在して、この修飾は抗体-抗原結合に影響を及ぼさない。したがって、いくつかの実施形態では、アベルマブの重鎖配列のC末端リジン(K)は存在しない。C末端リジンがないアベルマブの重鎖配列を図1b(配列番号2)に示す。

図2(配列番号3)は、アベルマブの全長軽鎖配列を示す。

**【0009】**

関連性の高い翻訳後修飾はグリコシル化である。真核細胞生物の小胞体内で産生されるほとんどの可溶性タンパク質および膜結合タンパク質はグリコシル化を受け、グリコシルトランスフェラーゼと呼ばれる酵素は、タンパク質の特定のグリコシル化部位に1つまたはそれ以上の糖単位を結合する。最も頻繁には、結合点はNH<sub>2</sub>基またはOH基であり、N-結合グリコシル化またはO-結合グリコシル化をもたらす。

これは、真核生物宿主細胞において組換えにより産生される抗体などのタンパク質にもあてはまる。組換えIgG抗体は、CH2ドメインにおけるFc領域の特定のアスパラギン残基において保存されたN-結合グリコシル化部位を含有する。その可溶性および安定性、プロテアーゼ耐性、Fc受容体への結合、細胞輸送、ならびにin vivoでの循環半減期に影響を及ぼすなど、抗体におけるN-結合グリコシル化の多くの公知の身体機能がある(Hamm M. et al., Pharmaceuticals 2013, 6, 393-406)。IgG抗体N-グリカン構造は、b-D-N-アセチルグルコサミン(GLcNAc)、マンノース(Man)、ならびに頻繁にはガラクトース(Gal)およびフコース(Fuc)単位を含む、主に二分岐複合体型構造である。

**【0010】**

アベルマブにおける単一のグリコシル化部位はAsn300であり、両重鎖のCH2ドメインに位置する。グリコシル化の詳細は実施例1に記載する。

**【0011】**

グリコシル化が抗体の可溶性および安定性に影響を及ぼすため、抗体の、安定で薬学的に好適な製剤を開発する場合、このパラメーターを考慮に入れることは賢明である。

**【0012】**

驚くべきことに、本特許出願の発明者らによって、5.2まで低いpH値で、抗酸化剤を含まない多くの水性製剤において、そのアミノ酸配列およびその翻訳後修飾によって完全に特性評価されたアベルマブを安定化することが可能なことが見出された。

**【図面の簡単な説明】**

**【0013】**

【図1】図1a:アベルマブの重鎖配列(配列番号1)、図1b:C末端Kを欠損している、アベルマブの重鎖配列(配列番号2)

【図2】アベルマブの軽鎖配列(配列番号3)

10

20

30

40

50

【図3】アベルマブの二次構造

【図4】アベルマブグリカンの2AB HILIC-UPLCクロマトグラム

【図5】図4のピークの番号付け

【図6】DoE2製剤のSE-HPLCによる総凝集(40)

【図7】DoE2製剤のSE-HPLCによる総凝集(25)

【図8】DoE2製剤のバイオアナライザーによる断片(40)

【図9】DoE2製剤のバイオアナライザーによる断片(25)

【図10】DoE2の酸性クラスターおよび主要ピーク存在量(25)

【図11】2~8での長期安定性LMW(%)

【図12】2~8での長期安定性サブビジブル粒子 10 μm

10

【図13】2~8での長期安定性サブビジブル粒子 25 μm

【図14】2~8での長期安定性酸性クラスター(%)

【図15】2~8での長期安定性主要ピーク(%)

【図16】2~8での長期安定性塩基性クラスター(%)

【図17】25での長期安定性LMW(%)

【図18】25での長期安定性サブビジブル粒子 10 μm

【図19】25での長期安定性サブビジブル粒子 25 μm

【図20】25での長期安定性酸性クラスター(%)

【図21】25での長期安定性主要ピーク(%)

【図22】25での長期安定性塩基性クラスター(%)

20

【図23】40での長期安定性LMW(%)

【図24】40での長期安定性サブビジブル粒子 10 μm

【図25】40での長期安定性サブビジブル粒子 25 μm

【図26】40での長期安定性酸性クラスター(%)

【図27】40での長期安定性主要ピーク(%)

【図28】40での長期安定性塩基性クラスター(%)

【発明を実施するための形態】

【0014】

定義

特に明記しない限り、本明細書および特許請求の範囲で使用した以下の用語は下記に記載した以下の意味を有する。

30

【0015】

本明細書で参照する「アベルマブ」は、国際公開第2013079174号パンフレットにそのアミノ酸配列を定義され、本特許出願にそのアミノ酸配列およびその翻訳後修飾を定義されたIgG1型の抗PD-L1抗体を含む。本明細書で参照する「アベルマブ」は、例えば国際公開第2013079174号パンフレットに開示されたアミノ酸配列と少なくとも75%、好適には少なくとも80%、好適には少なくとも85%、好適には少なくとも90%、好適には少なくとも95%、好適には少なくとも96%、好適には少なくとも97%、好適には少なくとも98%、または最も好適には少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を共有するバイオシミラーを含み得る。代わりにまたはさらに、本明細書で参照する「アベルマブ」は、本明細書で開示したものと翻訳後修飾、特にグリコシル化パターンが異なるバイオシミラーを含み得る。

40

【0016】

用語「バイオシミラー」（後発生物製剤としても公知）は当技術分野で周知であり、原薬がアベルマブのバイオシミラーであると考えられる場合に、当業者は容易に認識するであろう。用語「バイオシミラー」は、通常、事前に販売承認を公式に認可された「革新的バイオ医薬品」（原薬が生物によって產生される、または生物由来である、または組換えDNAもしくは制御された遺伝子発現方法による「生物製剤」）の後続版（通常異なる供給源由来）を記載するために使用される。生物製剤は分子の複雑性が高く、通常製造工程の変化に感受性であるため（例えば、異なる細胞系をそれらの生産に使用した場合）、な

50

らびに後続の後発製造が通常発案者の分子クローン、細胞バンク、発酵および精製工程に関するノウハウ、または有効な原薬自体（革新者の市販の製剤のみ）にアクセスを持たないため、いずれの「バイオシミラー」も革新的な製剤と全く同じではないようである。本明細書において、用語「緩衝液」または「緩衝溶液」は、通常、酸（通常弱酸、例えば酢酸、クエン酸、ヒスチジンのイミダゾリウム形態）およびその共役塩基（例えば、酢酸塩またはクエン酸塩、例えば酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、またはヒスチジン）の混合物、または代わりに塩基（通常弱塩基、例えばヒスチジン）およびその共役酸（例えばプロトン化ヒスチジン塩）の混合物を含む水性溶液を指す。「緩衝溶液」のpHは、「緩衝剤」によって付与された「緩衝効果」により少量の強酸または強塩基の添加時に非常にわずかに変化する。

10

#### 【0017】

本明細書において、「緩衝系」は1つもしくはそれ以上の緩衝剤および/またはその共役酸/塩基を含み、より好適には1つまたはそれ以上の緩衝剤およびその共役酸/塩基を含み、最も好適には1つのみの緩衝剤およびその共役酸/塩基を含む。特に明記しない限り、「緩衝系」に関して本明細書で規定した任意の濃度（すなわち、緩衝液濃度）は、好適には緩衝剤および/またはその共役酸/塩基を合わせた濃度を指す。言い換えると、「緩衝系」に関して本明細書で規定した濃度は、好適には全ての関連する緩衝種（すなわち、例えばクエン酸塩/クエン酸など互いに動的平衡状態にある種）を合わせた濃度を指す。したがって、ヒスチジン緩衝系の所与の濃度は、通常ヒスチジンおよびヒスチジンのイミダゾリウム形態を合わせた濃度を指す。しかしながら、ヒスチジンの場合、そのような濃度は通常、ヒスチジンまたはその塩の入力量を参照することにより算出しやすい。関連する緩衝系を含む組成物の全体のpHは、通常、各関連緩衝種の平衡濃度（すなわち、緩衝剤とその共役酸/塩基とのバランス）を反映する。

20

#### 【0018】

本明細書において、用語「緩衝剤」は、緩衝液または緩衝溶液の酸または塩基成分（通常弱酸または弱塩基）を指す。緩衝剤は、所与の溶液のpHをあらかじめ決定した値にまたはあらかじめ決定した値付近に維持するのに役立ち、緩衝剤は通常、あらかじめ決定した値を補足するために選択される。緩衝剤は好適には、特に適切な量（あらかじめ決定した所望のpHによる）のその相当する「共役酸/塩基」と混合される（好適にはプロトン交換できる）場合、または必要量のその相当する「共役酸/塩基」がin situで形成される場合-これは必要なpHに達するまで強酸または強塩基を添加することにより達成され得る-、所望の緩衝効果を生じる単一の化合物である。例えば、酢酸ナトリウム緩衝系では、酢酸ナトリウム（塩基性）の溶液から始め、次いで例えば塩酸によって酸性化され、または酢酸（酸性）の溶液に水酸化ナトリウムもしくは酢酸ナトリウムを所望のpHに達するまで添加することができる。

30

#### 【0019】

通常、「安定剤」は、特に冷凍および/または凍結乾燥および/または保管中（特にストレスに曝露された時）に、バイオ医薬品の構造的完全性の維持を容易にする成分を指す。この安定化効果は様々な理由から生じるが、典型的にはそのような安定剤は、タンパク質変性を軽減するオスモライトとして作用し得る。本明細書で使用する場合、安定剤はアミノ酸（すなわちペプチドまたはタンパク質の一部ではない遊離アミノ酸-例えばグリシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、リジン）および糖ポリオール（例えばマンニトール、ソルビトール）などの糖安定剤、および/または二糖類（例えばトレハロース、スクロース、マルトース、ラクトース）である。

40

#### 【0020】

本発明による緩衝剤、抗酸化剤、または界面活性剤として使用される薬剤は、とりわけそれらが安定化作用を示し得る場合でも、本明細書で使用する用語「安定剤」の意味から除外される。

#### 【0021】

本明細書において、用語「界面活性剤」は、表面活性剤、好ましくは非イオン性界面活

50

性剤を指す。本明細書で使用する界面活性剤の例としては、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート 20（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）、商標名 Tween 20 としても公知）；ポロキサマー（例えばポロキサマー 188、両側にポリオキシエチレン（ポリ（酸化エチレン））の2つの親水性鎖があるポリオキシプロピレン（ポリ（酸化プロピレン））の中心疎水性鎖からなる非イオン性トリプロックコポリマー、商標名 Lutrol F 68 としても公知）を含む。本明細書において、用語「安定な」は通常、保存 / 保管中の成分、典型的には有効成分またはそれらの組成物の物理的安定性および / または化学的安定性および / または生物学的安定性を指す。

#### 【0022】

本発明により緩衝剤、抗酸化剤、または安定剤として使用される薬剤は、とりわけそれらが界面活性作用を示し得る場合でも、本明細書で使用する用語「界面活性剤」の意味から除外される。 10

#### 【0023】

本明細書において、用語「抗酸化剤」はバイオ医薬品の酸化を防ぎまたは減少し、製剤中で安定化され得る薬剤を指す。抗酸化剤は、ラジカルスカベンジャー（例えば、アスコルビン酸、BHT、亜硫酸ナトリウム、p-アミノ安息香酸、グルタチオン、または没食子酸プロピル）、キレート剤（例えば EDTA またはクエン酸）、または連鎖停止剤（例えばメチオニンまたはN-アセチルシステイン）を含む。

本発明により緩衝剤、安定剤、または界面活性剤として使用される薬剤は、とりわけそれらが抗酸化作用を示し得る場合でも、本明細書で使用した用語「抗酸化剤」の意味から除外される。 20

#### 【0024】

「希釈剤」は、例えば重量百分率が合計 100 % になるように任意の液体医薬組成物の成分のバランスを構成する薬剤である。本明細書において、液体医薬組成物は、本明細書で使用する「希釈剤」が水、好ましくは注射用の水（WFI）であるため、水性医薬組成物である。

#### 【0025】

本明細書において、用語「粒子径」または「孔径」はそれぞれ、所与の粒子または孔の最長寸法の長さを指す。両径はレーザー粒子径分析器および / または電子顕微鏡（例えば、トンネル電子顕微鏡、TEM または走査電子顕微鏡、SEM）を使用して測定し得る。 30 粒子数（任意の所与の径に関して）は、サブビジブル粒子の粒子数に関する実施例に概説した手順および装置を使用して得ることができる。

#### 【0026】

本明細書において、用語「約」は、本技術分野において当業者に公知のそれぞれの値の通常のエラー範囲を指す。本明細書において「約」を付した値またはパラメーターへの言及は、その値またはパラメーター自体を対象とする実施形態を含む（および記載する）。分からぬ場合、または特定の値もしくはパラメーターのエラー範囲に関して当技術分野において認識される共通の理解がない場合、「約」はこの値またはパラメーターの ± 5 % を意味する。

#### 【0027】

本明細書において、グリカン種に関連する用語「パーセントを占める」は、異なる種の数を直接指す。例えば、用語「前記 FA2G1 は、全グリカン種の 25 % ~ 41 % を占める」は、100 個の重鎖を有する分析した 50 個の抗体分子において、25 ~ 41 個の重鎖が FA2G1 グリコシル化パターンを示すことを意味する。 40

#### 【0028】

「処置する」または「処置」への言及は、病状の確立された症状の予防および軽減を含むと考えられる。したがって、状態、障害、または病状を「処置する」またはそれらの「処置」は以下を含む：（1）状態、障害、または病状に苦しんでいるまたは罹患しやすいが、状態、障害、または病状の臨床症状または無症候性症状はいまだ経験していないまたは表していないヒトで発症する状態、障害、または病状の臨床症状の出現を予防するまた 50

は遅らせること、(2)状態、障害、または病状を阻害する、すなわち疾患の発生またはその再発(維持処置の場合)または少なくとも1つの臨床症状もしくはその無症候性症状を抑止する、軽減する、または遅らせること、あるいは(3)疾患を緩和するまたは減弱する、すなわち状態、障害、もしくは病状、または少なくとも1つのその臨床症状もしくは無症候性症状の退縮を引き起こすこと。

【0029】

水性抗P D - L 1 抗体製剤

第1の態様では、本発明は、

- (i) 抗体として1mg/mlから30mg/mlの濃度のアベルマブ；
  - (ii) 緩衝剤として5mMから15mMの濃度の酢酸塩またはヒスチジン；
  - (iii) 安定剤として240mMから320mMの濃度のD-マンニトールもしくはトレハロース、または50から150mMの濃度のアルギニンHC1と25mMから75mMの濃度のグルタミン酸の組合せ；
  - (iv) 界面活性剤として0.25mg/mlから0.75mg/mlの濃度のポロキサマー-188もしくはポリソルベート20、または界面活性剤なし；
- を含み、メチオニンを含まず、さらにpHが5.0から6.0、好ましくは5.0から5.6である、新規の水性医薬抗体製剤を提供する。

【0030】

好ましい実施形態では、製剤は抗酸化剤を含まない。

【0031】

一実施形態では、前記製剤中のアベルマブの濃度は約10mg/mlから約20mg/mlである。

別の実施形態では、前記製剤中の酢酸塩またはヒスチジンの濃度は約10mMである。

さらに別の実施形態では、前記製剤中のD-マンニトールもしくはトレハロースの濃度は約280mMである、またはアルギニンHC1とグルタミン酸の組合せの場合、アルギニンHC1の濃度は約150mMでありグルタミン酸の濃度は約50mMである。

さらに別の実施形態では、前記製剤中のポロキサマー-188またはポリソルベート20の濃度は約0.5mg/mlである。

さらに別の実施形態では、前記製剤のpHは5.2(±0.1)から5.5(±0.1)である。

好ましい実施形態では、前記製剤は約10mMの濃度の酢酸塩を含み、他の緩衝剤を含まない。

別の好ましい実施形態では、前記製剤は約280mMの濃度のD-マンニトールまたはトレハロースを含み、他の安定剤を含まない。

さらに別の好ましい実施形態では、前記製剤は約0.5mg/mlの濃度のポリソルベート20またはポロキサマー-188を含み、他の界面活性剤を含まない。

【0032】

一実施形態では、前記製剤は：

- (i) 抗体として約10mg/mlの濃度のアベルマブ；
  - (ii) 緩衝剤として約10mMの濃度の酢酸塩；
  - (iii) 安定剤として約280mMの濃度のD-マンニトールまたはトレハロース；
  - (iv) 界面活性剤として約0.5mg/mlの濃度のポリソルベート20またはポロキサマー-188；
- を含み、メチオニンを含まず、pHが約5.5である。

【0033】

好ましい実施形態では、前記製剤は：

- (i) 10mg/mlの濃度のアベルマブ；
- (ii) 10mMの濃度の酢酸塩；
- (iii) 280mMの濃度のD-マンニトールまたはトレハロース；
- (iv) 0.5mg/mlの濃度のポリソルベート20またはポロキサマー-188；

を含み、pHが5.5(±0.1)である。

【0034】

好ましい実施形態では、前記製剤は：

- (i) 10 mg / mL の濃度のアベルマブ；
- (ii) 10 mM の濃度の酢酸ナトリウム三水和物；
- (iii) 280 mM の濃度のD-マンニトールまたはトレハロース；
- (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート20またはポロキサマー188；
- (v) pHを調整するためのHCl；
- (vi) 溶媒としての水(注射用)；

からなり、pHが5.5(±0.1)である。

10

【0035】

好ましい実施形態では、前記製剤は：

- (i) 10 mg / mL の濃度のアベルマブ；
- (ii) 10 mM の濃度の酢酸ナトリウム三水和物；
- (iii) 280 mM の濃度のトレハロースニ水和物；
- (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート20；
- (v) pHを調整するためのHCl；
- (vi) 希釀剤としての水(注射用)；

からなり、pHが5.5(±0.1)である。

【0036】

より好ましい実施形態では、前記製剤は：

- (i) 10 mg / mL の濃度のアベルマブ；
- (ii) 10 mM の濃度の酢酸ナトリウム三水和物；
- (iii) 280 mM の濃度のD-マンニトール；
- (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート20；
- (v) pHを調整するためのHCl；
- (vi) 希釀剤としての水(注射用)；

からなり、pHが5.5(±0.1)である。

【0037】

別の実施形態では、前記製剤は：

- (i) 抗体として約20 mg / mL の濃度のアベルマブ；
- (ii) 緩衝剤として約10 mM の濃度の酢酸塩；
- (iii) 安定剤として約280 mM の濃度のD-マンニトールまたはトレハロース；
- (iv) 界面活性剤として約0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート20またはポロキサマー188；

を含み、メチオニンを含まず、pHが5.2(±0.1)である。

30

【0038】

好ましい実施形態では、前記製剤は：

- (i) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；
- (ii) 10 mM の濃度の酢酸塩；
- (iii) 280 mM の濃度のD-マンニトールまたはトレハロース；
- (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート20またはポロキサマー188；

を含み、pHが5.5(±0.1)である。

40

【0039】

好ましい実施形態では、前記製剤は：

- (i) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；
- (ii) 10 mM の濃度の酢酸；
- (iii) 280 mM の濃度のD-マンニトールまたはトレハロースニ水和物；
- (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート20またはポロキサマー188；
- (v) pHを調整するための酢酸ナトリウム；

50

(v i) 希釀剤としての水(注射用)；  
を含み、pHが5.2(±0.1)である。

【0040】

より好ましい実施形態では、前記製剤は：  
(i) 20mg/mLの濃度のアベルマブ；  
(i i) 10mMの濃度の酢酸；  
(i i i) 280mMの濃度のD-マンニトール；  
(i v) 0.5mg/mLの濃度のポリソルベート20；  
(v) pHを調整するための酢酸ナトリウム；  
(v i) 希釀剤としての水(注射用)；  
からなり、pHが5.2(±0.1)である。

【0041】

より好ましい実施形態では、前記製剤は：  
(i) 20mg/mLの濃度のアベルマブ；  
(i i) 10mMの濃度の酢酸；  
(i i i) 280mMの濃度のトレハロース二水和物；  
(i v) 0.5mg/mLの濃度のポリソルベート20；  
(v) pHを調整するための酢酸ナトリウム；  
(v i) 希釀剤としての水(注射用)；  
からなり、pHが5.2(±0.1)である。

【0042】

より好ましい実施形態では、前記製剤は：  
(i) 20mg/mLの濃度のアベルマブ；  
(i i) 10mMの濃度の酢酸；  
(i i i) 280mMの濃度のD-マンニトール；  
(i v) 0.5mg/mLの濃度のポロキサマー188；  
(v) pHを調整するための酢酸ナトリウム；  
(v i) 希釀剤としての水(注射用)；  
からなり、pHが5.2(±0.1)である。

【0043】

より好ましい実施形態では、前記製剤は：  
(i) 20mg/mLの濃度のアベルマブ；  
(i i) 10mMの濃度の酢酸；  
(i i i) 280mMの濃度のトレハロース二水和物；  
(i v) 0.5mg/mLの濃度のポロキサマー188；  
(v) pHを調整するための酢酸ナトリウム；  
(v i) 希釀剤としての水(注射用)；  
からなり、pHが5.2(±0.1)である。

【0044】

好ましい実施形態では、前記製剤は：  
(i) 20mg/mLの濃度のアベルマブ；  
(i i) 10mM(0.6mg/mL)の濃度の酢酸；  
(i i i) 280mM(51mg/mL)の濃度のD-マンニトール；  
(i v) 0.5mg/mLの濃度のポリソルベート20；  
(v) 7.5mM(0.3mg/mL)の濃度の水酸化ナトリウム；  
(v i) 希釀剤としての水(注射用)；  
からなり、pHが5.0から5.6、好ましくは5.2(±0.1)である。

【0045】

好ましい実施形態では、後者の製剤は：  
(i) 20mg/mLのアベルマブ；

10

20

30

40

50

(i i) 0.6 mg / mL の冰酢酸；  
 (i i i) 51 mg / mL のD-マンニトール；  
 (i v) 0.5 mg / mL のポリソルベート20；  
 (v) 0.3 mg / mL の水酸化ナトリウム；  
 (v i) 希釀剤としての水（注射用）；

を組み合わせることによって作製され、所望の容積の製剤を得る。

【0046】

さらなる実施形態では、本発明は、そのpHが水酸化ナトリウムで調整される水性医薬抗体製剤に関する。したがって、製剤は、有効成分として20 mg / mL の濃度のアベルマブ；ならびに賦形剤として冰酢酸、D-マンニトール、ポリソルベート20、水酸化ナトリウム、および注射用の水からなり、pHが5.0から5.6、好ましくは5.2（±0.1）である。  
 10

【0047】

好ましい実施形態では、製剤は270 mOsm / kg と330 mOsm / kg の間のオスモル濃度を有する。

【0048】

一実施形態では、上記の製剤中の前記アベルマブは、図1a（配列番号1）または図1b（配列番号2）のいずれかの重鎖配列、図2（配列番号3）の軽鎖配列を有し、Asn 300にグリコシル化を有し、主なグリカン種（main glycan species）としてFA2およびFA2G1を含み、合わせて全グリカン種の>70%を占める。  
 20

好ましい実施形態では、アベルマブのグリコシル化において、前記FA2は全グリカン種の44%～54%を占め、前記FA2G1は全グリカン種の25%～41%を占める。

好ましい実施形態では、アベルマブのグリコシル化において、前記FA2は全グリカン種の47%～52%を占め、前記FA2G1は全グリカン種の29%～37%を占める。

好ましい実施形態では、アベルマブのグリコシル化において、前記FA2は全グリカン種の約49%を占め、前記FA2G1は全グリカン種の約30%～約35%を占める。

好ましい実施形態では、アベルマブのグリコシル化は、少ないグリカン種（minor glycan species）として全グリカン種の<5%を占めるA2、全グリカン種の<5%を占めるA2G1、全グリカン種の<5%を占めるA2G2、全グリカン種の<7%を占めるFA2G2をさらに含む。  
 30

好ましい実施形態では、アベルマブのグリコシル化において、前記A2は全グリカン種の3%～5%を占め、前記A2G1は全グリカン種の<4%を占め、前記A2G2は全グリカン種の<3%を占め、前記FA2G2は全グリカン種の<5%～6%を占める。

好ましい実施形態では、アベルマブのグリコシル化において、前記A2は全グリカン種の約3.5%～約4.5%を占め、前記A2G1は全グリカン種の約0.5%～約3.5%を占め、前記A2G2は全グリカン種の<2.5%を占め、前記FA2G2は全グリカン種の約5.5%を占める。

【0049】

一実施形態では、上記の製剤中の前記アベルマブは、図1b（配列番号2）の重鎖配列を有する。  
 40

【0050】

一実施形態では、上記のアベルマブ製剤は静脈内（IV）投与用である。

【0051】

薬物送達デバイス

第2の態様では、本発明は、本明細書に定義した液体医薬組成物を含む薬物送達デバイスを提供する。好適には、薬物送達デバイスは、医薬組成物が内部に存在するチャンバーを含む。好適には薬物送達デバイスは無菌である。

【0052】

薬物送達デバイスは、バイアル、アンプル、シリンジ、注射ペン（例えば、基本的にはシリンジを含む）、またはi.v.（静脈内）バッグであり得る。  
 50

水性医薬製剤は、非経口的に投与され、好ましくは皮下注射、筋肉内注射、i.v. 注射、またはi.v. 注入による。投与の最も好ましい方法はi.v. 注入である。

好ましい実施形態では、薬物送達デバイスは上記の製剤を含有するバイアルである。

より好ましい実施形態では、前記バイアルは、20 mg / mL の濃度の溶液 10 mL 中にアベルマブ 200 mg を含有する。

さらにより好ましい実施形態では、バイアルはガラスバイアルである。

### 【0053】

#### 医学的処置

第3の態様では、本発明は、上記の製剤を患者に投与するステップを含む、がんを処置する方法を提供する。

一実施形態では、処置するがんは、非小細胞性肺がん、尿路上皮癌、膀胱がん、中皮腫、メルケル細胞癌、胃もしくは胃食道接合部がん、卵巣がん、乳がん、胸腺腫、胃腺癌、副腎皮質癌、頭頸部扁平上皮癌、腎細胞癌、メラノーマ、および/または古典的ホジキンリンパ腫から選択される。

### 【0054】

#### 略語

A N O V A 分散分析

C D 円偏光二色性

C E キャピラリー電気泳動

D o E 実験デザイン

D P 製剤

D S 原薬

D S F 示差走査型蛍光定量

D T T ジチオトレイトル

E S I エレクトロスプレイイオン化

H I L I C 親水性相互作用液体クロマトグラフィー

H M W 高分子量

H P L C 高速液体クロマトグラフィー

i C E 毛管等電点電気泳動

L C 液体クロマトグラフィー

L M W 低分子量

M A L D I マトリックス支援レーザー脱離イオン化法

M S 質量分析

N T U ネフェロ分析濁度ユニット

O D 吸光度

P B S ポリ緩衝食塩水

P E S ポリエチレンスルホン

P V D F フッ化ポリビニリデン

S D S - P A G E ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動

S E サイズ排除

T O F 飛行時間型

U P L C 超高速液体クロマトグラフィー

R H 残留湿度

U V 紫外線

### 【実施例】

### 【0055】

#### 安定性の測定に使用する方法

試験した抗体製剤の安定性を評価し、最適な候補を選択するため、以下の手順に従って安定性のパラメーターとして熱ストレス、機械的ストレス、光暴露、オスモル濃度、濁度、タンパク質含量、総凝集、断片化、pH、アイソフォーム、円偏光二色性、サブビジブ

10

20

30

40

50

ル粒子、および生物活性を測定した。

【0056】

熱ストレス：

40において：元のバイアル容器内の試料を40±2(RH75%±5%)の温度の恒温キャビネット中でインキュベートし、あらかじめ決定した時点で取り出した。

25において：元のバイアル容器内の試料を25±2(RH60%±5%)の温度の恒温キャビネット中でインキュベートし、あらかじめ決定した時点で取り出した。

【0057】

機械的ストレス：

元のバイアル容器内の試料を、24時間まで300rpm(室温)に維持したオービタル振盪機上に置いた。 10

【0058】

光暴露：

元のバイアル容器内の試料を、サンテスト機の照射量を765W/m<sup>2</sup>(放射波長320nmと800nmの間)に調節し7時間光源に曝露した。

【0059】

オスモル濃度：

正常なヒトの血漿は、約280mOsm/kgのオスモル濃度を有する(Medical Physiology - Principles for Clinical Medicine. Edited by Rodney A. Rhoades PhD, David R. Bell PhD)。一般に、300mOsm/kgに近いオスモル濃度の溶液が、非経口製剤を開発する際に目標とされる。許容可能範囲(製品仕様通り)は250~400mOsm/kgである。 20

ここで、オスモル濃度は溶質添加後の水溶液の凝固点降下を測定する凝固点降下法によって測定した。溶質の量、したがって観察されたオスモル濃度値は、調合した溶液の観察された凝固点降下と比例している。

【0060】

濁度：

溶液の濁度は、散乱光または減衰光を測定できる比濁計によって測定した(Hach Lange Model 2100AN)。小容量キュベット中の約3mLの溶液を870±30nmの発光ダイオード(LED)アセンブリーによって照射した。検出器は散乱光をモニターし、公知の濁度の一連の標準との比較により溶液の濁度(NTU)を提供了。 30

【0061】

タンパク質含量：

タンパク質含量は、1cm光路長の石英キュベット内で280nmおよび320nmでの溶液(適当な緩衝液によってタンパク質濃度~0.5mg/mLに希釈した)の吸光度によって測定した。モル吸光係数を1.46cm<sup>2</sup>/mgと仮定して、式：(A280-A320)/(1.46cm<sup>2</sup>/mg×1cm)を適用してタンパク質濃度を得た。

【0062】

総凝集：

凝集の量は、S E - H P L C法によって測定した。20μLの試料容積(試料はPBSにより約0.5mLに希釈した)を、流速0.35mL/分(移動相は、pH6.3±0.1で50mMリン酸ナトリウム+0.4過塩素酸ナトリウム)で22±5の温度に維持したT S K gel Super SW3000 4.6mm×30cm(cod. 18675)に注入した。UVは214nmで検出した。 40

【0063】

断片化：

低分子種(または断片)は、バイオアナライザーによって測定した。試料は1.25~3.75mg/mLの間の範囲の濃度で分析する(精製水によって作製した希釈物)。3μLの各希釈試料を、2μLの相当する試料緩衝液(試験が還元条件下で行われる場合、

D T T を添加 ) および 1  $\mu$  L の 6 0 mM マレイミド溶液と混合した。試料は 7 0 で 5 分間加熱し、次いで 8 4  $\mu$  L の精製水を添加し、溶液をボルテックスして、スピンドウンした。6  $\mu$  L をチップ上に載せた ( 0 . 2 5 ~ 0 . 7 5  $\mu$  g のタンパク質 ) 。チップを A g i l e n t 2 1 0 0 バイオアナライザーに置き、続けて 5 分以内に分析を開始した。

#### 【 0 0 6 4 】

アイソフォーム :

アイソフォーム分布を i C E によって測定した。F c コートしたキャピラリーカートリッジ ( 内径 1 0 0 mm 、長さ 5 0 mm ) を使用した。分離は、陰極溶液として 0 . 1 % メチルセルロース中 1 0 0 mM NaOH 溶液、陽極溶液として 0 . 1 % メチルセルロース中 8 0 mM o - リン酸を使用して行った。試料は 8 0  $\mu$  L のマスター ミックス溶液 ( 7 0 0  $\mu$  L の 0 . 1 % メチルセルロース、1 0  $\mu$  L の Pharmalyte 5 ~ 8 、7 0  $\mu$  L の Pharmalyte 8 ~ 1 0 . 5 、1 0  $\mu$  L の 7 . 6 5 p 1 マーカー、および 1 0  $\mu$  L の 9 . 7 7 p 1 マーカーを混合して得た ) から調製を始め、好適な容積の洗浄したアベルマブ試料 ( 製剤成分を取り除く洗浄後、2 0 0  $\mu$  g のタンパク質に相当する ) を添加した。相当する量の精製水 ( 1 2 0  $\mu$  L - 先のステップで添加した洗浄したアベルマブ試料の容積 ) を添加した。分離は、プレフォーカス時間およびフォーカス時間をそれぞれ 1 分および 1 5 分、プレフォーカス電圧およびフォーカス電圧をそれぞれ 1 5 0 0 V および 3 0 0 0 V に設定して 2 8 0 nm の検出波長で行った。試料は 1 0 0 0 m B a r の圧力で注入した。

#### 【 0 0 6 5 】

p H : 従来の電位差測定によって測定した。

#### 【 0 0 6 6 】

円偏光二色性 ( C D ) :

アベルマブの三次構造の調査は、近 U V 範囲付近 ( 3 2 0 ~ 2 5 0 nm ) において J a s c o ( m o d . J 8 1 0 ) の C D 分光偏光計測装置を使用して行った。試料は、精製水でタンパク質濃度 1 . 5 mg / mL に希釈し、1 cm 光路長の石英キュベットに充填し、室温、走査速度 2 0 nm / 分、データ間隔 0 . 5 nm 、時間積分 8 秒、および標準的な感度で分析した。

#### 【 0 0 6 7 】

サブビジブル粒子 :

サブビジブル粒子は、P a m a s S V S S - C パーティクルカウンターを使用する光オプスキュレーション法の技術により数えた。試料は精製水によって 5 倍に希釈し、試験するために少なくとも 2 5 mL の最終容積を得た。

#### 【 0 0 6 8 】

生物活性 :

実施例 5 に記載の長期安定性試験に関して、生物活性をさらなる安定性パラメーターとして測定した。

使用した方法は、H E K 2 9 3 細胞系 ( P D - L 1 を永続的にトランスフェクトした h P D L 1 ) に存在するその抗原 P D - L 1 に用量依存的な方法で結合する、E L I S A プレートで吸収されるアベルマブの能力に基づく。使用した投与量は 4 0 0 、 2 0 0 、 1 0 0 、 5 0 、 2 5 、 1 2 . 5 、 6 . 2 5 、および 3 . 1 2 ng / mL であった。得られたデータから、E C <sub>50</sub> 値を算出した。試料の生物活性 ( 効力 ) は、標準に対する試料の生理活性の割合として表され、以下のように算出される : 効力 ( 試料 ) [ % ] = ( E C <sub>50</sub> ( 試料 ) / E C <sub>50</sub> ( 標準 ) ) \* 1 0 0 . 7 。

#### 【 0 0 6 9 】

製造方法

本発明は、本明細書に定義した水性医薬製剤を製造する方法も提供する。本方法は、好適には、適切だと思われる任意の特定の順番で、水性医薬製剤を形成するために必要な任意の関連する成分と一緒に混合するステップを含む。当業者は、水性医薬製剤 ( 特に、シリンジによる注射または i . v . 注入のためのもの ) を形成するための当技術分野で周知

10

20

30

40

50

の実施例または技術を参照することができる。

【0070】

本方法は、まずアベルマブを除くいくつかのまたは全ての成分（任意選択により、いくつかのまたは全ての希釈物を含む）の予混合物（または予溶液）を調製するステップを含み、次いでアベルマブはそれ自体（任意選択により、いくつかの希釈物を含むまたはいくつかの希釈物にあらかじめ溶解する）、予混合物（または予溶液）と混合されて水性医薬製剤を得る、または次いで最終成分が添加される組成物を得て最終水性医薬製剤を供給する。好ましくは、本方法は、緩衝系、好適には本明細書に定義した緩衝剤を含む緩衝系を形成するステップを含む。緩衝系は、好適には、アベルマブの添加前の予混合物において形成される。緩衝系は、緩衝剤（既製で供給される）とその共役酸／塩基（好適には、所望のpHを提供するのに適切な相対量 - これは当業者によって理論的にまたは実験的に決定され得る）を単に混合することにより形成され得る。酢酸塩緩衝系の場合、これは例えば酢酸ナトリウムとHClを混合すること、または酢酸とNaOHもしくは酢酸塩を混合することを意味する。最終水性医薬製剤の予混合物のいずれかのpHは、必要量の塩基もしくは酸、または緩衝剤もしくは共役酸／塩基を添加することによって賢明に調整され得る。

10

【0071】

特定の実施形態では、緩衝剤および／または緩衝系は別々の混合物としてあらかじめ形成され、緩衝系は、緩衝液交換（例えば、関連濃度またはオスモル濃度に達するまで透析濾過を使用する）によって水性医薬製剤（緩衝剤および／または緩衝系を除くいくつかのまたは全ての成分を含み、好適にはアベルマブを含み、アベルマブのみの可能性もある）の前駆体へと移される。その後必要であれば、最終液体医薬組成物を產生するためにさらなる賦形剤が添加され得る。pHは全ての成分が存在すると、または全ての成分が存在する前に調整され得る。

20

【0072】

いずれかの、いくつかの、または全ての成分は、あらかじめ溶解される、または他の成分と混合する前に希釈剤とあらかじめ混合される。

最終水性医薬製剤は濾過され、好適には粒子状物質を除去され得る。好適には、濾過は1μmのまたは1μm未満のサイズのフィルター、好適には0.22μmのフィルターを通す。好適には、濾過はPESフィルターまたはPVDFフィルターのいずれかを通し、好適には0.22μmのPESフィルターによる。

30

【0073】

当業者は、抗体原薬が静脈内に投与され得るようにどのように水性医薬製剤がIV溶液を調製するために使用され得るかを周知している。

IV溶液の調製は、典型的にはプラスチックシリンジ（PP）および針によって生理食塩水バッグ（例えば、0.9%または0.45%生理食塩水）から吸引される特定の量の溶液からなり、水性医薬製剤と置き換えられる。置き換えられる溶液の量は患者の体重に依存する。

【実施例1】

【0074】

アベルマブの構造

40

1.1 一次構造

アベルマブは2つの重鎖分子および2つの軽鎖分子を有するIgGである。2つの鎖のアミノ酸配列は、それぞれ図1a（配列番号1）/1b（配列番号2）および2（配列番号3）に示す。

【0075】

1.2 二次構造

LC-MSおよびMS/MS法は、分子の完全な鎖およびタンパク質への翻訳後修飾の存在を確認するために使用された。アベルマブ分子サブユニットの二次構造は図3に示す。

50

## 【0076】

トリプシン消化によって得られたペプチドのUPLC-Q-TOF質量分析によって確認されたように、ジスルフィド結合Cys21-Cys96、Cys21-Cys90、Cys147-Cys203、Cys138-Cys197、Cys215-Cys223、Cys229-Cys229、Cys232-Cys232、Cys264-Cys324およびCys370-Cys428は、9つの典型的なIgG結合パターンを形成する。

## 【0077】

## 1.3 グリコシル化

分子は、重鎖のAsn300に1つのN-グリコシル化部位を含有する。ペプチドマッピングによって決定したように、MALDI-TOFによって同定された主な構造は、0個(G0F)、1個(G1F)、または2個のガラクトース(G2F)残基を有する複雑な二分岐型のコアフコシル化オリゴサッカライドであった。主な種はG0FおよびG1Fである。2-アミノベンズアミドによって蛍光標識したアベルマブグリカンを、HILIC-UPLC-ESI-Q-TOFによって分析した。図4は、見出されたグリカン種のUPLCプロファイルを示す。

## 【0078】

## 【表1-1】

表1:2AB HILIC-UPLCクロマトグラムのピーク同定

10

20

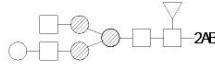
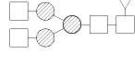
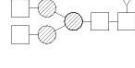
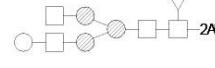
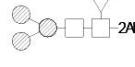
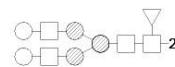
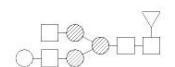
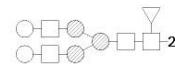
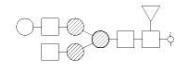
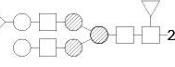
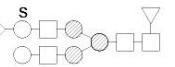
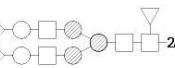
30

40

ピーク	RT (分)	測定 MW	予測 MW	同定	オックスフォード 命名法	同定方法
1a	5.99	1380.52 (M+H)	1380.54 (M+H)		FA1	MSにより手動で同定
2	6.01	1437.54	1437.56		A2	MSにより手動で同定
3	7.02	1583.74 (M+H)	1583.62 (M+H)		FA2	GlycoworkBenchによるMSインソースフラグメンテーション
4	7.77	1355.57 (M+H)	1355.51 (M+H)		M5	MSにより手動で同定
5	8.16	1599.77 (M+H)	1599.62 (M+H)		A2G1	MSにより手動で同定
6	9.82	1744.79	1744.67		FA2G1	GlycoworkBenchによるMSインソースフラグメンテーション
		1462.90	1462.54		FA2 遊離末端	MSによって同定されたGlycoworkBench

## 【0079】

【表1-2】

7	10.07	1744.80	1744.67		FA2G1	GlycoworkBenchによるMS インソースフラグメンテーション
		1462.91	1462.54		FA2 遊離末端	MS によって同定されたGlycoworkBench
8	10.44	1462.90	1462.54		FA2 遊離末端	MS によって同定されたGlycoworkBench
		1744.79	1744.67		FA2G1	MS により手動で同定
9	12.15	1177.50 (M+H)	1177.46 (M+H)		FM3	MS によって同定されたGlycoworkBench
10	16.66	イオン化 なし	イオン化 なし			
11	13.42	1906.33	1906.72		FA2G2	GlycoworkBenchによるMS インソースフラグメンテーション
		1624.71	1624.59		FA2G1 遊離末端	MS によって同定されたGlycoworkBench
12	13.71	954.40 (M+2H)/2	954.36 (M+2H)/2		FA2G2	MS により手動で同定
		1626.69	1626.61		FA2G1 還元末端	MS によって同定されたGlycoworkBench
13	17.46	1099.97 (M+2H)/2	1099.91 (M+2H)/2		FA2G2S	GlycoworkBenchによるMS インソースフラグメンテーション
14	18.54	1079.91 (M+2H)/2	1079.86 (M+2H)/2		FA2G2S 遊離末端+S (推定-少量)	MS により手動で同定
15	21.04	2489.05	2488.91		FA2G2S2	MS により手動で同定

幾何学形状は、以下の分子実体に相当するグリカン構成要素を表す。



Man:マンノース、Fuc:フコース、Gal:ガラクトース、GalNAc:N-アセチルガラクトースアミン、

NANA:シアル酸、NGNA:N-グリコリルノイラミン酸

### 【0080】

使用したグリカンの命名法は、Harvey et al. (Proteomics 2009, 9, 3796-3801) によって提案されたOxford Notationに従った。フコースを含有する種において

10

20

30

40

50

て ( F A 2 、 F A 2 G 1 、 F A 2 G 2 ) 、 F u c - G 1 c N A c 連結は 1 ~ 6 である。末端 G 1 c N A c を有する種において、 G 1 c N A c - M a n 連結は 1 ~ 2 である。ガラクトースを含有する種において、 G a l - G 1 c N A c 連結は 1 ~ 4 である。

【 0 0 8 1 】

報告したクロマトグラフプロファイルは統合され、表 2 a に示すようにアベルマップのグリカン種分布をもたらした。

【 0 0 8 2 】

【表 2 】

表 2a

A2	FA2	A2G1	FA2G1	A2G2	FA2G2	M5**
3.6	48.7	3.4	35.6	2.3	5.4	1.0

10

\*\* おそらくマンノース 5 、二分岐モノ-ガラクトシル化種と共に溶出

【 0 0 8 3 】

グリカンマッピング分析により、ペプチドマッピングによって行った同定 ( 2 つの主なグリカン種の同定が可能 ) を確認し、さらにグリカン分析に特異的なこの方法によって、  
二次および少ない種も特性評価された。

20

【 0 0 8 4 】

別の測定において、以下のグリカン種分布が観察された。

【 0 0 8 5 】

【表 3 】

表 2b:

A2	FA2	A2G1	FA2G1	A2G2	FA2G2
4.0	50.2	1.0	30.0	0.1	5.6

30

【実施例 2 】

【 0 0 8 6 】

D o E 1 スクリーニング

1 0 m g / m L のアベルマップでの D o E 1 をスクリーニングする第一の実験デザインは、様々な緩衝液型 / p H 、賦形剤、界面活性剤型、および関連濃度などのいくつかの因子の影響を評価した。試験は、タンパク質の安定性を最大にし得る最適な条件の選択をもたらした。

【 0 0 8 7 】

D o E 1 スクリーニングにおいて、以下の因子を調査の考慮に入れた：

40

- 緩衝液型および p H : p H 範囲 5 . 0 ~ 6 . 0 で評価される酢酸塩、クエン酸、およびヒスチジン緩衝液。
- 賦形剤 : 糖 / ポリオールまたはアミノ酸が製剤中に調合するのに好ましいかどうかに関する指標を与えるために 3 つの異なる賦形剤が考えられた。
- 界面活性剤型および濃度 : 様々な濃度 ( 0 ~ 1 m g / m L ) で評価される 2 つの代替の界面活性剤 ( T w e e n 2 0 およびポロキサマー 1 8 8 ) 。

試験は 1 0 m g / m L のタンパク質濃度で充填量 8 m L ( 8 0 m g / バイアル ) により、 D I N 6 R バイアル ( S c h o t t ) 中で行った。

表 3 は調査した D o E 1 製剤の選択を例示する。

D o E 1 は、作製される好適な緩衝液 / p H 、賦形剤型および界面活性剤型の選択を可

50

能にし、続く実施例3に記載のD o E 2試験のために使用された。

【0088】

【表4-1】

表3: DoE1スクリーニング製剤

ID	アベルマブ (mg/mL)	pH	緩衝液 (10 mM)	賦形剤	界面活性剤	界面活性剤濃度 (mg/mL)
DoE1-1	10	5.00	酢酸塩	マンニトール(51mg/mL <sup>1</sup> )	ポロキサマー188	0.5
DoE1-2	10	5.00	酢酸塩	トレハロース二水和物(106mg/mL <sup>1</sup> )	Tween 20	0.5
DoE1-3	10	5.00	クエン酸塩	マンニトール(51mg/mL <sup>1</sup> )	ポロキサマー188	0.2
DoE1-4	10	5.25	酢酸塩	トレハロース二水和物(106mg/mL <sup>1</sup> )	Tween 20	0.2
DoE1-5	10	5.25	酢酸塩	アルギニン HCl (21.1mg/mL <sup>2</sup> )+ グルタミン酸 (7.4mg/mL <sup>3</sup> )	ポロキサマー188	0.2
DoE1-6	10	5.25	クエン酸塩	アルギニン HCl (21.1mg/mL <sup>2</sup> )+ グルタミン酸 (7.4mg/mL <sup>3</sup> )	-	-
DoE1-7	10	5.25	クエン酸塩	マンニトール(51mg/mL <sup>1</sup> )	Tween 20	0.2
DoE1-8	10	5.50	酢酸塩	マンニトール(51mg/mL <sup>1</sup> )	Tween 20	0.5
DoE1-9	10	5.50	酢酸塩	トレハロース二水和物(106mg/mL <sup>1</sup> )	-	-
DoE1-10	10	5.50	クエン酸塩	トレハロース二水和物(106mg/mL <sup>1</sup> )	ポロキサマー188	1
DoE1-11	10	5.50	クエン酸塩	アルギニン HCl (21.1mg/mL <sup>2</sup> )+ グルタミン酸 (7.4mg/mL <sup>3</sup> )	Tween 20	0.2
DoE1-12	10	5.75	クエン酸塩	トレハロース二水和物(106mg/mL)	Tween 20	1
DoE1-13	10	5.75	クエン酸塩	マンニトール(51mg/mL)	-	-
DoE1-14	10	5.75	ヒスチジン	アルギニン HCl (21.1mg/mL)+ グルタミン酸 (7.4mg/mL)	ポロキサマー188	0.5
DoE1-15	10	5.75	ヒスチジン	マンニトール(51mg/mL)	Tween 20	1
DoE1-16	10	6.00	クエン酸塩	アルギニン HCl (21.1mg/mL)+ グルタミン酸 (7.4mg/mL)	Tween 20	1
DoE1-17	10	6.00	クエン酸塩	トレハロース二水和物(106mg/mL)	ポロキサマー188	0.2

【0089】

【表4-2】

DoE1-18	10	6.00	ヒスチジン	アルギニンHCl(21.1mg/mL)+グルタミン酸(7.4mg/mL)	ポロキサマー188	1
DoE1-19	10	6.00	ヒスチジン	トレハロース二水和物(106mg/mL)	ポロキサマー188	0.5
参照 <sup>4</sup>	10	5.50	酢酸塩	マンニトール(51mg/mL)/L-メチオニン(0.21mg/mL)	Tween 20	0.5

10

- (1) 280 mM に相当  
 (2) 150 mM に相当  
 (3) 50 mM に相当  
 (4) 国際公開第 2013079174 号パンフレットに開示の製剤

## 【0090】

## 2.1 製造

20

あらかじめ配合した原薬(DS)(10(±1)mg/mLアベルマブ、1.36mg/mL酢酸ナトリウム三水和物、51mg/mL D-マンニトール、0.21mg/mL L-メチオニン、塩酸によりpH 5.5に調整)は、3倍容積交換が達成されるまで、3つの緩衝液：10 mM酢酸ナトリウムpH 5.0、10 mMクエン酸ナトリウムpH 5.0および10 mMヒスチジンpH 5.75中でタンジェント流濾過(10 kDaの排除限界でPellicon XL Biomax Cassettesを使用)によって緩衝液交換した。各ステップにおいて、DS溶液を適当な緩衝液によって5倍希釈した。交換したDS材料における最終目標タンパク質濃度は、>10 mg/mLであった。次いで、必要な賦形剤を適当な緩衝液交換DS材料に添加し、表3に列挙したDP組成物を得るためにpHおよび最終溶液重量を目標に調整した。

30

交換したDS溶液への成分の添加の順番は、以下の通りであった：

D-マンニトールまたはトレハロース二水和物またはアルギニンHCl+グルタミン酸を交換したDS溶液に添加し、完全に溶解するまで攪拌し、L-メチオニンを添加し完全に溶解するまで攪拌し(参照のためのみ)、ポロキサマー188またはポリソルベート20(50mg/mL保存溶液)を添加し、完全に溶解するまで攪拌し、pHを調べて水酸化ナトリウムで目標に調整した。

## 【0091】

製剤(DP)溶液をDIN6Rバイアル(Schott)に充填した(8mL)。DS透析濾過工程中の目視検査により、クエン酸ナトリウム緩衝液は、通常、より高い白濁を生じ、一方で交換が酢酸ナトリウム緩衝液およびヒスチジン緩衝液中で行われる場合、明らかに透明な溶液が得られることが明らかになった。

40

## 【0092】

表4では、緩衝液交換時の3つのDS材料のタンパク質回収、オスモル濃度(Osmomat 030/D, Gonotec)および濁度を測定するために行われた実験の結果を示す。十分なタンパク質回収(>89%)および最終オスモル濃度値(<61mOsm/kg)を得た。濁度分析により、クエン酸ナトリウムで交換されたDSのより高い白濁を確認した。

## 【0093】

## 【表 5】

表 4: 緩衝液交換後の DS 材料において実施した回収(OD による)、オスモル濃度、および濁度実験の結果

緩衝液	回収 (%)	オスモル濃度 (mOsm/kg)	濁度 (NTU)
酢酸塩	96	29	3
クエン酸塩	89	38	30
ヒスチジン	93	61	6

10

## 【0094】

## 2.2. オスモル濃度

D o E 1 スクリーニングに適当な D P 製剤のオスモル濃度値は、 2 9 9 ~ 3 9 6 m O s m / k g の範囲に含まれ、ほとんどの製剤は約 3 6 0 m O s m / k g 未満のオスモル濃度を有した。

測定は、時間 0、製造の完了時に行った。

20

## 【0095】

得られた値は、目標と一致した（許容可能範囲 2 5 0 ~ 4 0 0 m O s m / K g ）。トレハロース二水和物を含有する溶液は、この成分の凝固点および続くオスモル濃度の（明らかに）増加への効果により、より高い値（4 0 0 m O s m / k g 付近）を示した。

## 【0096】

## 2.3 熱ストレス

## 2.3.1 タンパク質含量

OD 測定によって測定されたように、時間 0 の含量値は理論値（1 0 m g / m L ）と一致した。4 0 で 1 ヶ月後、著しい変化は観察されなかった。

## 【0097】

30

## 2.3.2 総凝集

D o E 1 製剤の総凝集を時間 0、4 0 での保管の 2 および 4 週間後に S E - H P L C によって測定した。

4 0 での熱ストレス時の凝集に関して統計的に有意な変化は強調されず、したがって試験した異なるマトリックスが凝集パターンの不变の / 無視できる変化をもたらすことを示した。

## 【0098】

## 2.3.3 断片化

D o E 1 製剤において、時間 0、4 0 での保管の 2 および 4 週間後にバイオアナライザ（2 1 0 0 B i o a n a l y z e r, A g i l e n t ）によって断片化を測定した。

40

データは、以下を示した：

- pH は、4 0 でのタンパク質断片化に重要な因子である。p H > 5 . 7 5 では、断片化は著しく増加する傾向がある（最も典型的には、クエン酸およびヒスチジン緩衝液中、D o E 1 - 1 3 から D o E 1 - 1 9 の製剤において）。

- 最も少ない断片化の変化を示す製剤は pH 範囲 5 . 0 ~ 5 . 7 5 、好ましくは D - マンニトールまたはトレハロース二水和物いずれかの存在下のもの（D o E 1 - 2 - 8 - 9 - 1 0 - 1 2 ）である。

- 製剤 D o E 1 - 7 (p H 5 . 2 5 のクエン酸緩衝液、D - マンニトールおよび T w e e n 2 0 の存在下) は 2 倍のピークと一致する異常なプロファイルを示した（濁度 / 白

50

濁の増加を伴う製造中にすでに強調されたものに加えて、いくつかの事象は、断片化において緩衝剤としてのクエン酸塩の使用と関連し得た)。

【0099】

2.3.4 濁度

D o E 1 製剤における比濁計による濁度を、時間 0、40 での保管の 2 および 4 週間後に測定した。

白濁 / 強白濁は pH 緩衝剤としてクエン酸塩を含有する全ての D P 製剤において一貫して観察された。

酢酸ナトリウムおよびヒスチジン中の全ての製剤は透明 / わずかに白濁であり、40 での保管の 1 カ月にわたり著しい変化は見られなかったことが見出された。 10

【0100】

2.3.5 pH

pH の変化は観察されなかった。

【0101】

2.4 機械的ストレス

D o E 1 製剤はバイアル中 300 rpm (室温) で 24 時間オービタル振盪に供した。ストレスの終了時、試料の凝集および白濁を試験した。

【0102】

2.4.1 総凝集

総凝集は機械的ストレス後 S E - H P L C によって測定し、時間 0 の結果と比較した。無視できる変化が観察された。 20

【0103】

2.4.2 濁度

D o E 1 製剤の濁度は、機械的ストレス後に比濁計 (2100AN IS、Hach Lange) によって測定し、時間 0 の結果と比較した。データはANOVA によって評価し、界面活性剤の存在による適度に有意な効果 ( $0.01 < p \text{ 値} < 0.05$ ) が観察された。Tween 20 またはポロキサマー 188 のいずれかが、機械的ストレス後の濁度変化を最小限にするのに役立ち得る。

【0104】

2.5 光暴露

D o E 1 製剤を  $765 \text{ W/m}^2$  での 7 時間照射に供した (Suntest CPS、Atlas)。光ストレス終了時に、試料の凝集、白濁、pH およびアイソフォームプロファイルを試験した。 30

【0105】

2.5.1 総凝集

S E - H P L C (Alliance、Waters) を使用してわずかな変化が観察され、クエン酸ナトリウム緩衝液を使用した場合 ( $p \text{ 値} < 0.01$ )、最も頻繁であった。

酢酸ナトリウムおよびヒスチジンは、凝集変化を最小限にするために好みの緩衝液である。

【0106】

2.5.2 濁度

比濁計によって測定されたように、最も明らかな濁度の増加は、典型的には pH 値  $> 5.75$  (D o E 1 - 13 および D o E 1 - 16 および D o E 1 - 17) のクエン酸緩衝液で見出された。

【0107】

2.5.3 pH

変化は観察されなかった。

【0108】

2.6 D o E 1 : 結果

熱ストレス、機械的ストレス、および光ストレスの枠内で得られたデータは、ストレス 50

に対する最大のタンパク質耐性を提供する条件を決定するために評価した。

分析の結果は表 5 に報告する。

【 0 1 0 9 】

【表 6 】

表 5: タンパク質濃度 10mg/mL で非常に安定化したアベルマブ製剤の成分

ID#	緩衝液	pH	賦形剤	界面活性剤	
推定	10 mM 酢酸塩	5.20	トレハロース ニ水和物(280 mM)	Tween 20 (0.5mg/mL)	10
DoE1-4	10 mM 酢酸塩	5.25	トレハロース ニ水和物(280 mM)	Tween 20 (0.2mg/mL)	

【 0 1 1 0 】

推定の製剤は緑で強調し (ID # = 推定)、試験したセットの最も類似の製剤は DoE 20 1 - 4 であることも報告する。これらのデータは、酢酸塩緩衝液 pH 5.0 ~ 5.5 がタンパク質の安定性を改善すること、および Tween 20 またはポロキサマー 188 のいずれかなど、0.2 mg / mL よりも高い濃度の界面活性剤の存在も、製剤におけるタンパク質の安定性の改善に重要であることを実証する。

【実施例 3】

【 0 1 1 1 】

第二の DoE スクリーニング「DoE 2」は、DoE 1 完了時に選択された製剤の微調整、同時にタンパク質濃度を 20 mg / mL に増加することを目指す。

【 0 1 1 2 】

この第二の製剤スクリーニングにより、10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.2 の存在下で、賦形剤 (D - マンニトール、トレハロースニ水和物) および界面活性剤 (界面活性剤なし、0.5 mg / mL のポロキサマー 188 またはポリソルベート 20) が異なるタンパク質濃度 20 mg / mL の 6 つの製剤を、熱ストレス (40 で 1 カ月、25 および 2 ~ 8 で 8 週間) および機械的振盪 (300 rpm、室温で 24 時間) 後に試験した。適当な組成物を表 6 に列挙する。

【 0 1 1 3 】

【表7】

表6: DoE2スクリーニング製剤(タンパク質濃度=20mg/mL)

ID	アベルマブ (mg/mL)	緩衝液	賦形剤	界面活性剤
DoE2 - 1	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	マンニトール(51mg/mL <sup>1</sup> )	-
DoE2 - 2	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物 (106mg/mL <sup>1</sup> )	-
DoE2 - 3	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	マンニトール(51mg/mL <sup>1</sup> )	Tween 20 (0.5mg/mL)
DoE2 - 4	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物 (106mg/mL <sup>1</sup> )	Tween 20 (0.5mg/mL)
DoE2 - 5	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	マンニトール(51mg/mL <sup>1</sup> )	ポロキサマー188 (0.5mg/mL)
DoE2 - 6	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物 (106mg/mL <sup>1</sup> )	ポロキサマー188 (0.5mg/mL)
DoE1 - 8	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	マンニトール(51mg/mL <sup>1</sup> )	Tween 20 (0.5mg/mL)
参照	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	マンニトール(51mg/mL)/L-メチオニン(0.21mg/mL)	Tween 20 (0.5mg/mL)

## 【0114】

DoE2試験は、D - マンニトール対トレハロース二水和物の効果、およびpH 5.2、20mg/mLの増加したタンパク質濃度の酢酸ナトリウム緩衝液における界面活性剤(Tween 20もしくはポロキサマー188、または界面活性剤なし)の影響を比較的に評価するために実施した。2つのpH 5.5の参照試料がデザインに含まれる: L - メチオニンを有する「参照」、およびL - メチオニンを有さない参照製剤、DoE1 - 8に相当。

## 【0115】

## 3.1 製造

あらかじめ製剤化した原薬(DS)(10mM酢酸ナトリウムpH 5.5中27.1mg/mLアベルマブ)を使用した。次いで、必要な賦形剤をDS材料に添加した。

DS溶液への成分の添加の順番は、以下の通りであった:

D - マンニトールまたはトレハロース二水和物を添加し、完全に溶解するまで攪拌し、ポロキサマー188またはポリソルベート20(20mg/mL保存溶液)を添加し、完全に溶解するまで攪拌し、L - メチオニンを添加し完全に溶解するまで攪拌し(参照のためのみ)、完全に溶解するまで攪拌し、pHを調べて水酸化ナトリウムまたは希釈した酢酸によって目標に調整した。

溶液は、表7に列挙したDP組成物を得るために適当な緩衝液によって目標に重量調整した。

DP溶液をDIN6Rバイアル中に充填した(8mL)

## 【0116】

## 3.2 熱ストレス

## 3.2.1 タンパク質含量

40 で4週間(表7)および25で8週間(表8)にわたり、タンパク質含量(OD、Lambda35、Perkin Elmer)の変化は観察されなかった。

【0117】

【表8】

表7: DoE2 製剤の OD によるタンパク質含量(mg/mL)(40°Cでの熱ストレス)

#	ID	タンパク質濃度(mg/mL)	緩衝液	賦形剤(280 mM)	界面活性剤	時間0	2週間(40°C)	4週間(40°C)
1	DoE2-1	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	なし	22.3	20.0	20.9
2	DoE2-2	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物	なし	22.0	20.6	21.6
3	DoE2-3	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	21.9	20.5	21.6
4	DoE2-4	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物	Tween 20 (0.5mg/mL)	22.1	20.5	22.3
5	DoE2-5	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	21.7	20.7	22.8
6	DoE2-6	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	22.7	21.3	22.5
7	DoE1-8	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	21.5	20.5	23.5
8	参照	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール + L-メチオニン	Tween 20 (0.5mg/mL)	21.5	20.4	23.3

10

20

【0118】

【表9】

表8: DoE2 製剤の OD によるタンパク質含量(mg/mL)(25°Cでの熱ストレス)

30

#	ID	タンパク質濃度(mg/mL)	緩衝液	賦形剤(280 mM)	界面活性剤	時間0	8週間(25°C)
1	DoE2-1	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	なし	22.3	20.6
2	DoE2-2	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物	なし	22.0	21.0
3	DoE2-3	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	21.9	21.3
4	DoE2-4	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物	Tween 20 (0.5mg/mL)	22.1	21.5
5	DoE2-5	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	21.7	20.5
6	DoE2-6	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	22.7	21.0
7	DoE1-8	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	21.5	21.1
8	参照	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール + L-メチオニン	Tween 20 (0.5mg/mL)	21.5	21.2

40

【0119】

### 3.2.2 総凝集

40 および25 での安定性に関して S E - H P L C によって測定した総凝集をそれぞれ図6 および図7 に示す。凝集の少ない、顕著ではない変化のみが観察された。

【0120】

50

### 3.2.3 バイオアナライザーによる断片化

断片は 40 で 1 カ月にわたり、および 25 で 2 カ月後に評価した。適当な結果を、それぞれ図 8 および図 9 に示す。

40 では、1 カ月後に 7 % より多くの量の断片を示す製剤 DoE2-1 は別として、他の製剤は、製剤 DoE2-4、DoE2-5、および DoE2-6 (40 で 1 カ月後、断片 4.0 ~ 4.5 %) の性能よりわずかに良い同様の性質 (1 カ月後、断片 4 ~ 6 %) を持つことが観察された。

25 では、同様の断片化の割合は 2 カ月後に見出された (4.6 ~ 6.1 %)

#### 【0121】

##### 3.2.4 アイソフォームプロファイル

DoE2 製剤において、iCE280 (Fast IEF Analyzer, Convergent Bioscience) によるアイソフォームプロファイルを、時間 0 および 40 での保管の 4 週間後に測定した。40 での保管時、典型的には酸性クラスターの増加が測定されるが、塩基性アイソフォームにおいて同時に減少が観察される。

アイソフォームプロファイルは、40 で 1 カ月にわたり (表 9)、および 25 で 8 週間後 (表 10) に評価された。

相当する変化が、両ストレス条件で全ての試料において観察された。

#### 【0122】

#### 【表 10】

表 9: 40°C で 4 週間後の DoE2 製剤の iCE280 の結果

	時間 0			40°C で 4 週間		
	酸性形態 (%)	主要ピーク (%)	塩基性形態 (%)	酸性形態 (%)	主要ピーク (%)	塩基性形態 (%)
DoE2-1	32.3	36.0	31.7	40.3	31.9	27.8
DoE2-2	32.0	37.7	30.4	38.0	33.6	28.5
DoE2-3	32.2	36.7	31.1	39.9	32.7	27.5
DoE2-4	32.7	36.7	30.6	39.7	33.0	27.3
DoE2-5	32.5	37.4	30.2	38.1	33.4	28.5
DoE2-6	32.4	37.0	30.7	38.3	33.7	28.0
DoE1-8	33.2	36.9	30.0	38.8	33.5	27.7
参照	32.2	36.2	31.7	37.7	33.4	28.9

#### 【0123】

##### 3.2.6 濁度

40 で 1 カ月後 (表 8)、および 25 で 2 カ月後 (表 9) に変化は観察されなかつた。

#### 【0124】

10

20

30

40

## 【表 1 1】

表 10: 40°Cで 1 カ月後の DoE2 製剤の濁度

#	ID	タンパク質濃度 (mg/mL)	緩衝液	賦形剤 (280 mM)	界面活性剤	時間 0	2 週間 (40°C)	4 週間 (40°C)
1	DoE2 - 1	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	なし	2	2	2
2	DoE2 - 2	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	なし	2	2	2
3	DoE2 - 3	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	2	2	2
4	DoE2 - 4	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Tween 20 (0.5mg/mL)	2	2	2
5	DoE2 - 5	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	2	2	2
6	DoE2 - 6	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	2	2	2
7	DoE1 - 8	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	2	2	2
8	参照	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール + L-メチオニン	Tween 20 (0.5mg/mL)	3	3	2

## 【0 1 2 5】

## 【表 1 2】

表 11: 25°Cで 2 カ月後の DoE2 製剤の濁度

#	ID	タンパク質濃度 (mg/mL)	緩衝液	賦形剤 (280 mM)	界面活性剤	時間 0	8 週間 (25°C)
1	DoE2 - 1	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	なし	2	2
2	DoE2 - 2	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	なし	2	2
3	DoE2 - 3	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	2	2
4	DoE2 - 4	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Tween 20 (0.5mg/mL)	2	2
5	DoE2 - 5	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	2	2
6	DoE2 - 6	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	2	2
7	DoE1 - 8	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	2	3
8	参照	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール + L-メチオニン	Tween 20 (0.5mg/mL)	3	3

## 【0 1 2 6】

40で1ヶ月後(表12)、および25で2ヶ月後(表13)に変化は観察されなかつた。

【0127】

【表13】

表12: 40°Cで1ヶ月後のDoE2製剤のpH

#	ID	タンパク質濃度 (mg/mL)	緩衝液	賦形剤 (280 mM)	界面活性剤	時間 0	2週間 (40°C)	4週間 (40°C)
1	DoE2-1	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	なし	5.2	5.2	5.2
2	DoE2-2	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物	なし	5.2	5.2	5.2
3	DoE2-3	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	5.2	5.2	5.2
4	DoE2-4	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物	Tween 20 (0.5mg/mL)	5.2	5.2	5.2
5	DoE2-5	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	5.2	5.2	5.2
6	DoE2-6	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	5.2	5.2	5.2
7	DoE1-8	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	5.5	5.5	5.5
8	参照	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール+L-メチオニン	Tween 20 (0.5mg/mL)	5.5	5.5	5.5

10

20

【0128】

【表14】

表13: 25°Cで2ヶ月後のDoE2製剤のpH

#	ID	タンパク質濃度 (mg/mL)	緩衝液	賦形剤 (280 mM)	界面活性剤	時間 0	8週間 (25°C)
1	DoE2-1	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	なし	5.2	5.2
2	DoE2-2	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物	なし	5.2	5.2
3	DoE2-3	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	5.2	5.3
4	DoE2-4	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物	Tween 20 (0.5mg/mL)	5.2	5.2
5	DoE2-5	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	5.2	5.2
6	DoE2-6	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース二水和物	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	5.2	5.2
7	DoE1-8	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	5.5	5.5
8	参照	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール+L-メチオニン	Tween 20 (0.5mg/mL)	5.5	5.6

30

40

【0129】

3.2.8 円偏光二色性

DoE2製剤のCDスペクトル(J-810 Spectropolarimeter、Jasco)を時間0、40で4週間後、および25で8週間後に近UV範囲付近で回収した。全ての製剤中のタンパク質は、通常40で4週間後、および25で8週間後にその三次構造を維持する。

【0130】

50

## 3.2.9 サブビジブル粒子

DoE2 製剤のサブビジブル粒子を、2~8°Cでの保管の8週間後に測定した。結果は表14に示す。値は、ヨーロッパ薬局方限度内に見出された(100mLより少ない名目量を容器に供給した溶液)。

【0131】

【表15】

表14: 2~8°Cで8週間後のDoE2 製剤のサブビジブル粒子

#	ID	タンパク質濃度 (mg/mL)	緩衝液	賦形剤 (280 mM)	界面活性剤	サブビジブル粒子 > 10μm (容器あたり)	サブビジブル粒子 > 25μm (容器あたり)
1	DoE2-1	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	なし	754	33
2	DoE2-2	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	なし	716	14
3	DoE2-3	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	597	24
4	DoE2-4	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Tween 20 (0.5mg/mL)	1839	100
5	DoE2-5	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	431	38
6	DoE2-6	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	521	28
7	DoE1-8	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	915	14
8	参照	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール+ L-メチオニン	Tween 20 (0.5mg/mL)	1873	52

【0132】

## 3.3 機械的ストレス

## 3.3.1 バイオアナライザーによる断片化

300 rpmで24時間後、断片のわずかな変化(表15)が試験した特定の組成物に特定の関係なく全ての試料(5.0~6.5%まで)において観察された。

【0133】

10

20

30

## 【表 1 6】

表 15: 24 時間振盪(300rpm、室温)後の DoE2 製剤のバイオアナライザによる断片(%)

#	ID	タンパク質濃度 (mg/mL)	緩衝液	賦形剤 (280 mM)	界面活性剤	時間 0	24 H 300 RPM
1	DoE2 - 1	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	なし	4.9	5.5
2	DoE2 - 2	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	なし	4.6	5.0
3	DoE2 - 3	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	4.7	5.7
4	DoE2 - 4	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Tween 20 (0.5mg/mL)	4.6	6.5
5	DoE2 - 5	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	5.1	6.2
6	DoE2 - 6	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	5.2	5.3
7	DoE1 - 8	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	3.5	5.4
8	参照	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール + L-メチオニン	Tween 20 (0.5mg/mL)	3.4	5.4

## 【0 1 3 4】

## 3 . 3 . 2 凝集

機械的振盪後、変化が観察されなかった(表 1 6)。

## 【0 1 3 5】

## 【表 1 7】

表 16: 24 時間振盪(300rpm、室温)後の DoE2 製剤の SE-HPLC による凝集(%)

#	ID	タンパク質濃度 (mg/mL)	緩衝液	賦形剤 (280 mM)	界面活性剤	時間 0	24 H 300 RPM
1	DoE2 - 1	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	なし	1.5	1.5
2	DoE2 - 2	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	なし	1.5	1.5
3	DoE2 - 3	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	1.6	1.5
4	DoE2 - 4	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Tween 20 (0.5mg/mL)	1.6	1.5
5	DoE2 - 5	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	D-マンニトール	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	1.6	1.5
6	DoE2 - 6	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	1.6	1.6
7	DoE1 - 8	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	1.6	1.6
8	参照	20	10 mM 酢酸塩 pH 5.5	D-マンニトール + L-メチオニン	Tween 20 (0.5mg/mL)	1.6	1.6

## 【0 1 3 6】

## 3 . 3 . 3 pH

機械的振盪後、変化が観察されなかった(表 1 7)。

## 【0 1 3 7】

10

20

30

40

## 【表 1 8】

表 17: 24 時間振盪(300rpm、室温)後の DoE2 製剤の pH

#	ID	タンパク質濃度 (mg/mL)	緩衝液	賦形剤 (280 mM)	界面活性剤	時間 0	24 H 300 RPM
1	DoE2 - 1	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.2	D-マンニトール	なし	5.2	5.2
2	DoE2 - 2	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	なし	5.2	5.2
3	DoE2 - 3	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.2	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	5.2	5.2
4	DoE2 - 4	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Tween 20 (0.5mg/mL)	5.2	5.2
5	DoE2 - 5	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.2	D-マンニトール	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	5.2	5.2
6	DoE2 - 6	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	5.2	5.2
7	DoE1 - 8	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.5	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	5.5	5.5
8	参照	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.5	D-マンニトール+ L-メチオニン	Tween 20 (0.5mg/mL)	5.5	5.5

## 【0 1 3 8】

## 3 . 4 濁度

機械的振盪後、変化が観察されなかった(表 1 8)。

10

## 【0 1 3 9】

## 【表 1 9】

表 18: 24 時間振盪(300rpm、室温)後の DoE2 製剤の濁度(NTU)

#	ID	タンパク質濃度 (mg/mL)	緩衝液	賦形剤 (280 mM)	界面活性剤	時間 0	24h 300 rpm
1	DoE2 - 1	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.2	D-マンニトール	なし	2	2
2	DoE2 - 2	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	なし	2	2
3	DoE2 - 3	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.2	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	2	2
4	DoE2 - 4	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Tween 20 (0.5mg/mL)	2	2
5	DoE2 - 5	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.2	D-マンニトール	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	2	2
6	DoE2 - 6	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.2	トレハロース 二水和物	Lutrol F-68 (0.5mg/mL)	2	2
7	DoE1 - 8	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.5	D-マンニトール	Tween 20 (0.5mg/mL)	2	2
8	参照	20	10 mM 酢酸 塩 pH 5.5	D-マンニトール+ L-メチオニン	Tween 20 (0.5mg/mL)	3	2

30

40

## 【0 1 4 0】

## 3 . 5 D o E 2 : 結果

これらの結果は、pH 5 . 2 (DoE1 から推定) が断片化に影響せず、したがって安定な製剤での使用に好適であることを実証する。タンパク質の安定性を保つために最適な pH は 5 . 0 ~ 5 . 5 の範囲内であることが実証された(DoE1)。対照的に、pH 値 5 . 6 ~ 5 . 7 はより高い断片化をもたらし得た。

マンニトールおよびトレハロース二水和物は同様の性質をもたらした。

Tween 20 を上回るポロキサマー 188 の優位性は見出されなかった。

50

これらの結果は、D o E 2 製剤中のより高いタンパク質濃度 ( 2 0 m g / m L ) が、観察されないまたは予測される安定性事象を実現可能であることも実証する。

【 0 1 4 1 】

D o E 2 : 製剤 3 ( 最も好ましい、および 2 0 m g / m L でさらなる使用のために最終的に選択される製剤 ) を、異なる条件での安定時間にわたり 2 つの製剤間の異なる性質が存在するかどうか評価するため、時間 0 、 4 0 で 4 週間後および 2 5 で 8 週間後に参考製剤とアイソフォームプロファイルに関して比較した。結果を表 1 9 に示す。

【 0 1 4 2 】

【表 2 0 】

表 19: 時間 0 、 4 週間 (40°C) および 8 週間 (25°C) 後の DoE2 製剤 3 および参考製剤の iCE280 によるアイソフォームプロファイル

ID#	緩衝液	pH	賦形剤	界面活性剤	クラス	時間 0	4 週間 (40°C)	8 週間 (25°C)
DoE2 - 3	10 mM 酢酸塩	5.2 0	D- マンニトール	Tween 20 (0.5mg/ mL)	1	1.6	3.1	2.9
					2	4.5	5.3	7.1
					3	9.9	10.8	9.1
					4	16.2	20.7	18.0
					5	36.7	32.7	34.9
					6	22.2	19.7	20.3
					7	8.9	7.8	7.7
参考	10 mM 酢酸塩	5.5 0	マンニトール + L- メチオニン	Tween 20 (0.5mg/ mL)	1	1.8	2.3	3.4
					2	4.3	5.0	8.1
					3	9.8	10.6	10.0
					4	16.3	19.8	16.9
					5	36.2	33.4	34.7
					6	22.6	21.1	19.6
					7	9.1	7.8	7.4

【 0 1 4 3 】

2 5 でのさらなる時点 ( 8 週間 ) も、参考製剤に関して減少した pH に由来する主な事象を強調しなかった。

【 実施例 4 】

【 0 1 4 4 】

抗酸化剤 ( L - メチオニン ) の効果

国際公開第 2 0 1 3 0 7 9 1 7 4 号パンフレットに開示の製剤においてメチオニンが使用されたように、本アベルマブ製剤開発は、抗酸化剤としてこの化合物の影響を明らかにすることも目的とした。

【 0 1 4 5 】

1 0 m g / m L の試料 ( D o E 1 セットから ) を 2 0 0  $\mu$  L の 6 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> によって 2 倍に希釈し、約 5 m g / m L の最終タンパク質濃度および 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> を得て、次いで 5 で 3 時間インキュベートした。インキュベートの終わりに、試料を Amicon U 1 t r a ( Millipore ) 4 m L 1 0 k D a を使用して超遠心分離によって水に対して洗浄した ( 各ステップ、 1 m L を 4 回洗浄 ) 。 Amicon 処置後の最終タンパク質濃度は約 1 0 m g / m L であった。

【 0 1 4 6 】

D o E 1 : 製剤 8 は、 L - メチオニンの存在を除いて D o E 2 の参考製剤と同一である : 2 つの製剤の H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> による強制的な酸化 ( 2 ~ 8 で 3 時間 ) 、ならびに続く i C E 2 8 0 ( 酸化は通常、電気泳動図におけるより酸性種の増加をもたらす ) およびバイオアナライザによる試験は、抗酸化剤の存在により 2 つの製剤にいずれかの違いが生じるか

10

20

30

40

50

どうか測定することを目的とした。結果を表20および21に示す。

【0147】

【表21】

表20: 強制酸化処置後の DoE1 製剤 8 および参考製剤の iCE280 によるアイソフォームプロファイル。上の表:2~8°Cで保管した試料。下の表:40°Cで4週間+2~8°Cで6週間保管した試料。

ID#	緩衝液	pH	抗 PD-L1 (mg/mL)	賦形剤	界面活性剤	クラスター	3%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> により酸化した(2~8°Cで10週間保管後)
DoE1 - 8	10 mM 酢酸塩	5.50	10	マンニトール(280 mM)	Tween 20 (0.5mg/mL)	1	2.2
						2	4.5
						3	9.8
						4	23.2
						5	39.0
						6	16.6
						7	4.8
参照	10 mM 酢酸塩	5.50	10	マンニトール(280 mM) + L-メチオニン(1.4 mM)	Tween 20 (0.5mg/mL)	1	2.2
						2	4.5
						3	10.1
						4	23.7
						5	37.9
						6	16.8
						7	4.8

ID#	緩衝液	pH	抗 PD-L1 (mg/mL)	賦形剤	界面活性剤	クラスター	3%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> により酸化した(40°Cで4週間+2~8°Cで6週間保管後)
DoE1 - 8	10 mM 酢酸塩	5.50	10	マンニトール(280 mM)	Tween 20 (0.5mg/mL)	1	2.5
						2	5.9
						3	11.4
						4	27.2
						5	34.5
						6	14.6
						7	4.0
参照	10 mM 酢酸塩	5.50	10	マンニトール(280 mM) + L-メチオニン(1.4 mM)	Tween 20 (0.5mg/mL)	1	2.7
						2	5.9
						3	11.1
						4	26.7
						5	35.8
						6	14.4
						7	3.4

【0148】

相当する酸性クラスターの存在量を2つの製剤に関して観察した(メチオニンありまたはなし)。

【0149】

バイオアナライザにより、断片もこれらの試料に関して試験した(表21):相当するレベルの断片化が2つの製剤に関して観察された(メチオニンありまたはなし)。

【0150】

10

20

30

40

## 【表 2 2】

表 21: 強制酸化処置後の DoE1 製剤 8 および参照製剤のバイオアナライザーによる断片。

上の表:2~8°Cで保管した試料。

下の表:40°Cで 4 週間+2~8°Cで 6 週間保管した試料。

ID#	緩衝液	pH	抗 PD-L1 (mg/mL)	賦形剤	界面活性剤	3%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> により酸化した(2~8°Cで 10 週間保管後)
DoE1 - 8	10 mM 酢酸塩	5.50	10	マンニトール(280 mM)	Tween 20 (0.5mg/mL)	2.4
参照	10 mM 酢酸塩	5.50	10	マンニトール(280 mM) + L-メチオニン(1.4 mM)	Tween 20 (0.5mg/mL)	2.5

ID#	緩衝液	pH	抗 PD-L1 (mg/mL)	賦形剤	界面活性剤	3%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> により酸化した(40°Cで 4 週間+2~8°Cで 6 週間保管後)
DoE1 - 8	10 mM 酢酸塩	5.50	10	マンニトール(280 mM)	Tween 20 (0.5mg/mL)	2.5
参照	10 mM 酢酸塩	5.50	10	マンニトール(280 mM) + L-メチオニン(1.4 mM)	Tween 20 (0.5mg/mL)	3.0

## 【0 1 5 1】

これらの結果は、抗酸化剤がアベルマブの安定化に必要ではなく、したがって製剤から除かれ得ることを示す。

## 【実施例 5】

## 【0 1 5 2】

## 長期安定性試験

## 5.1 製剤組成および濃度

表 2 2 に列挙したアベルマブ製剤 1、2、3、4、および 5 を製造し、長期安定性試験に使用した。製造工程は、調合に続いてバイアルへの最終充填前に 0.22 μm 膜 (PES および PVDF フィルターを試験した) を通す滅菌二重濾過ステップを含んだ。実施例 2 および 3 に記載のように参照に相当する製剤 5 は DoE1 および DoE2 試験にも使用した。

## 【0 1 5 3】

10

20

30

## 【表 2 3】

表 22: DP 組成物

成分	DP 組成物				
	製剤 1 (DP 01- 190214)	製剤 2 (DP 02- 190214)	製剤 3 (DP 03- 180214)	製剤 4 (DP 04- 180214)	参照 (DP 05- 190214)
アベルマブ	20mg/mL	20mg/mL	10mg/mL	10mg/mL	10mg/mL
酢酸ナトリウム 緩衝液	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
マンニトール	51mg/mL	0mg/mL	51mg/mL	0mg/mL	51mg/mL
トレハロース二水和物	0mg/mL	106mg/mL	0mg/mL	106mg/mL	0mg/mL
ポリソルベート 20	0.5mg/mL	0.5mg/mL	0.5mg/mL	0.5mg/mL	0.5mg/mL
L-メチオニン	0	0	0	0	1.4 mM
水酸化ナトリウムまたは 塩酸	pH5.2±0.1 に適量	pH5.2±0.1 に適量	pH5.2±0.1 に適量	pH5.2±0.1 に適量	pH5.5±0.1 に 適量
充填容積(1型ガラスバイ アル中)	10 mL	10 mL	20 mL	20 mL	8 mL

## 【0 1 5 4】

製造時(時間 0)、オスモル濃度を測定し、期待値(範囲: 320 ~ 350 mOsm / kg)に一致していることを見出した。

## 【0 1 5 5】

## 5.2 安定性試験計画および期間

製剤の安定性に関して、試験スケジュール、保管条件、および適用される試験を表 2 3 に要約する。各時点に関して、表は試験される保管条件を示す。

試料の保管は、立位のバイアルで行った。試験は 40 で 1 カ月、促進条件(25)で 6 カ月、長期条件(2 ~ 8)で 12 カ月にわたり実施した。

## 【0 1 5 6】

10

20

30

## 【表 2 4】

表 23: 安定計画

試験	T=0	0.5 M (2 wk)	1 M (4 wk)	2 M (8 wk)	3 M (13 wk)	6 M (26 wk)	9M (39 wk)	12 M (52 wk)
色	X	40°C 40°C	25°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C
濁度	X	40°C 40°C	25°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C
pH	X	40°C 40°C	25°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C
A280-A320 含量	X	40°C 40°C	25°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C
SE-HPLC	X	40°C 40°C	25°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C
SDS-page red	X	40°C 40°C	25°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C
SDS-page non-red	X	40°C 40°C	25°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C
iCE-280	X	40°C 40°C	25°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C
オスモル濃度	X	40°C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
サブビジブル粒子	X	40°C 40°C	25°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C
効力	X	40°C 40°C	25°C 25°C	N/A	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C

## 【0157】

データは、40（1ヶ月まで）、25（6ヶ月まで）、および2~8（12ヶ月まで）で回収した。

## 【0158】

5.3.2~8 での安定性

5.3.1 目視検査による呈色の程度

安定性に関して変化は観察されなかった。全ての溶液は、最も透明な標準液(<Y7)よりも透明なままである。値は規定内である。

## 【0159】

5.3.2 比濁計による白濁の程度

全ての溶液は、透明な溶液の範囲(1~3NTU)に含まれる濁度を示す。値は規定内である。

## 【0160】

5.3.3 pH

安定性に関して、変化は観察されなかった。全ての溶液は目標に一致したpH値を示す(製剤1から4は5.2±0.1、参照DPは5.5±0.1)。値は規定内である。

## 【0161】

10

20

30

40

50

## 5.3.4 O D によるタンパク質含量

製剤 1 および 2 の濃度（目標濃度 = 20 mg / mL）は、試験中 18.7 ~ 19.8 mg / mL の範囲内（目標に対して ± 10 % 限度内）であり、経時的に著しい変化がないことが見出された。

製剤 3 および 4、ならびに参照 D P の濃度（目標濃度 = 10 mg / mL）は、試験中 9.3 ~ 10.2 mg / mL の範囲内であることが見出され、著しい変化が見出されなかつた。

したがって、タンパク質含量は、2 ~ 8 での安定性が 12 カ月にわたり変わらないままである（値は規定内である）。

## 【0162】

## 5.3.5 S E - H P L C によるダイマーおよび H M W

時間 0 に関して 2 ~ 8 で 12 カ月にわたり凝集の変化は見られなかつた。値は規定内である。

## 【0163】

## 5.3.6 S D S - P A G E N - R e d による断片（L M W）

図 11 に示すように、試料は、11.9 ~ 16.2 % の範囲の S D S - P A G E N - R E D による L M W の時間 0 値を示し、続いて次の時点（8 週間）で +5 ~ 7 % 増加、および安定性試験の残りの間、6 カ月まで小さな変化を示した。

## 【0164】

## 5.3.7 サブビジブル粒子

容器当たりのサブビジブル粒子に関して、数値は 100 mL より少ない規準含量の注入または注射用溶液のために米国、欧州、および日本薬局方によって設定された限度未満であった（10 μm 以上である容器あたり 6000 および 25 μm 以上である容器あたり 600）。2 つの粒子サイズ範囲に関する適当な棒グラフをサブビジブル粒子 10 μm およびサブビジブル粒子 25 μm についてそれぞれ図 12 および図 13 に示す。

保管時のサブビジブル粒子の変化は強調されなかつた。

## 【0165】

## 5.3.8 生物活性

生物活性値は、典型的には安定性試験のうちに試験した全ての時点で 89 ~ 110 % の範囲であった。保管時に低下は観察されなかつた。

## 【0166】

## 5.3.9 アイソフォームパターン

i C E 280 実験からの結果を図 14（酸性クラスター、ピーク 1 - 2 - 3 - 4 の合計）、図 15（主要ピーク）、および図 16（塩基性クラスター、ピーク 6 - 7 の合計）に報告する。アイソフォームプロファイルは、12 カ月の安定性期間を通して保持される。冷蔵条件では、抗体のアイソフォームへの pH の影響は観察されない。

## 【0167】

## 5.3.10 2 ~ 8 での安定性の結果

試験した 5 つの製剤の物理化学的特性は、2 ~ 8 での 12 カ月の安定性に関して著しい変化を受けないことが見出された。このことは特にアイソフォームパターンに関して、製剤 1 から 4 においてメチオニンが存在しないため驚きである。

## 【0168】

## 5.4.25 での安定性

## 5.4.1 目視検査による呈色の程度

安定性に関して変化は観察されなかつた。全ての溶液は、最も透明な標準液 (< Y 7 ) よりも透明なままである。値は規定内である。

## 【0169】

## 5.4.2 比濁計による白濁の程度

全ての溶液は、1 ~ 3 N T U の間（透明な溶液の範囲）に含まれる濁度を示す。値は規定内である。

10

20

30

40

50

## 【0170】

## 5.4.3 pH

安定性に関して変化は観察されなかった。全ての溶液は目標に一致したpH値を示す(製剤1-2-3-4は $5.2 \pm 0.1$ 、参照DPは $5.5 \pm 0.1$ )。値は規定内である。

## 【0171】

## 5.4.4 ODによるタンパク質含量

製剤1および2の濃度(目標濃度=20mg/mL)は、試験中18.5~20.0mg/mLの範囲内(目標に対して $\pm 10\%$ 限度内)であり、経時的に著しい変化がないことが見出された。

製剤3および4、ならびに参照DPの濃度(目標濃度=10mg/mL)は、試験中9.5~10.0mg/mLの範囲内であることが見出され、著しい変化は見出されなかった。

したがって、タンパク質含量は、25での6ヶ月の安定性に関して変わらないままである。値は規定内である。

## 【0172】

## 5.4.5 SE-HPLCによるダイマーおよびHMW

時間0に関して25で6ヶ月にわたり凝集の変化は見られなかった。試験を通して、規定限度(5%以下)より少ない凝集が見出された。

## 【0173】

## 5.4.6 SDS-PAGE N-Redによる断片(LMW)

試料は、11.9~16.2%の範囲のSDS-PAGE N-REDによるLMWの時間0値を示し、続いて次の時点(4週間)で段階的増加、続いて安定性試験の残りの間、6ヶ月まで小さな変化を示した(図17)。

## 【0174】

## 5.4.7 サブビジブル粒子

容器当たりのサブビジブル粒子に関して、数値は100mLより少ない規準含量の注入または注射用溶液のために米国、欧州、および日本薬局方によって設定された限度未満であった(10 $\mu\text{m}$ 以上である容器あたり6000および25 $\mu\text{m}$ 以上である容器あたり600)。適当な棒グラフを図18および図19に示す。

25でのサブビジブル粒子の安定性の変化は強調されなかった。

## 【0175】

## 5.4.8 生物活性

生物活性値は、典型的には安定性試験のうちに試験した全ての時点(90~110%)の範囲であった。25での安定時に低下は観察されなかった。

## 【0176】

## 5.4.9 アイソフォームパターン

iCE280実験からの結果を図20(酸性クラスター、ピーク1-2-3-4の合計)、図21(主要ピーク)、および図22(塩基性クラスター、ピーク6-7の合計)に報告する。

酸性クラスターは25での保管時に増加する傾向がある。全ての試料は、25で6ヶ月後、約+10%の酸性クラスターの増加を示し、同時に主要ピーク(6ヶ月後、-5%)および塩基性クラスター(6ヶ月後、-5%)の減少を示した。

## 【0177】

## 5.4.10 25での安定性の結果

25で6ヶ月の安定性に関して、試験した5つの製剤は、時間0に対するタンパク質含量、外観、透明度、pH、凝集、サブビジブル粒子、および生物活性に関して変化を示さなかった。

25で6ヶ月後、SDS-PAGE N-REDにより、断片は+5パーセントポイント増加することが見出されたが、バイオアナライザによって統計的に有意な変化は強

10

20

30

40

50

調されなかった。

i C E 2 8 0 によるアイソフォームプロファイルにおける類似の性質：全ての製剤の酸性クラスターは、6カ月試験に関して + 10 % 増加し、同時に主要ピークおよび塩基性クラスターが減少する傾向がある。

【0178】

5.5.4.0 での安定性

5.5.1 目視検査による呈色の程度

安定性に関して変化は観察されなかった。全ての溶液は、最も透明な標準液 (< Y 7 ) よりも透明なままである。

【0179】

10

5.5.2 比濁計による白濁の程度

安定性に関して変化は観察されなかった。全ての溶液は、2 N T U ( 透明な溶液の範囲 ) からなる濁度を示す。値は規定内である。

【0180】

5.5.3 pH

安定性に関して変化は観察されなかった。全ての溶液は目標に一致した pH 値を示す ( 製剤 1 - 2 - 3 - 4 は  $5.2 \pm 0.1$  、参照 D P は  $5.5 \pm 0.1$  ) 。値は規定内である。

【0181】

20

5.5.4 O D によるタンパク質含量

製剤 1 および 2 の濃度 ( 目標濃度 = 20 m g / m L ) は、試験中 18.0 ~ 19.0 m g / m L の範囲内 ( 目標に対して  $\pm 10\%$  限度内 ) であり、経時的なタンパク質の減少に向かう傾向はないことが見出された。

製剤 3 および 4 、ならびに参照 D P の濃度 ( 目標濃度 = 10 m g / m L ) は、試験中 9.5 ~ 10.0 m g / m L の範囲内であり、経時的なタンパク質の減少に向かう傾向はないことが見出された。値は規定内である。

結論として、熱ストレスは、試験した条件でのタンパク質含量に有害ではない ( 40 で 1 カ月まで ) 。

【0182】

30

5.5.5 S E - H P L C によるダイマーおよび H M W

1 カ月後、凝集の主な変化は強調されなかった。1 カ月後、全ての値は 1 % 総凝集未満であった ( 規定限度より低く、5 % 以下である ) 。

【0183】

5.5.6 S D S - P A G E N - R e d 、バイオアナライザーによる断片 ( L M W )

S D S - P A G E N - R E D 法の変動性を考慮すると ( 例えば、D P 0 1 - 1 9 0 2 1 4 および D P 0 2 - 1 9 0 2 1 4 では、時間 0 値はそれぞれ 11.9 および 14.5 が測定された ) 、40 での試験中主な変化は生じなかったと結論付けられる ( 図 2 3 ) 。

【0184】

5.5.7 サブビジブル粒子

40

容器当たりのサブビジブル粒子に関して、数値は 100 m L より少ない規準含量の注入または注射用溶液のために米国、欧州、および日本薬局方によって設定された限度未満であった ( 10  $\mu$  m 以上である容器あたり 6000 および 25  $\mu$  m 以上である容器あたり 600 ) 。適当な棒グラフを図 2 4 および図 2 5 に示す。

熱ストレス時のサブビジブル粒子の変化は強調されなかった。

【0185】

5.5.8 生物活性

生物活性値は、典型的には安定性試験のうちに試験した全ての時点で 99 ~ 120 % の範囲であった。試料の熱ストレス時に低下は観察されなかった。

【0186】

50

## 5.5.9 アイソフォームパターン

i C E 2 8 0 実験からの結果を図 2 6 (酸性クラスター、ピーク 1 - 2 - 3 - 4 の合計)、図 2 7 (主要ピーク)、および図 2 8 (塩基性クラスター、ピーク 6 - 7 の合計)に報告する。

酸性クラスターは 4 0 での保管時に増加する傾向がある。

## 【0187】

主要ピークの変化により (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden)、1 0 m g / m L の新しい製剤のわずかに良い安定性および残りの組成物の同一の性質を確認した。

## 【0188】

塩基性クラスター測定によって得られた結果により上記の結果を確認した。

2 週間まで、5 つの組成物において同様の性質が観察された。より高い安定時間において、2 0 m g / m L のアベルマブ D P と 1 0 m g / m L のアベルマブ D P の間においてわずかな差が生じる (1 0 m g / m L の製剤においてわずかに良い耐性)。

## 【0189】

## 5.5.10 4 0 での安定性の結果

4 0 (1 カ月)において、試験した5 つの製剤は、時間 0 に対するタンパク質含量、外観、透明度、p H、凝集、サブビジブル粒子、および生物活性に関して変化を示さなかった。

1 0 m g / m L の D P 製剤と 2 0 m g / m L の D P 製剤の間のわずかな違いは、i C E 2 8 0 によって強調された (酸性クラスターは、保管時にいくらかの増加を受ける傾向があり、1 0 m g / m L の D P 製剤よりも 2 0 m g / m L の D P 製剤においてわずかに明らかである)。

## 【0190】

## 5.6 結論

## 5.6.1 2 ~ 8 での安定性 (12 カ月)

全ての製剤が安定であることが見出された: 時間 0 に対する外観、濁度 (比濁計による)、サブビジブル粒子、p H、タンパク質含量 (OD による)、凝集 (S E - H P L C による)、断片 (S D S - P A G E N - R E D およびバイオアナライザーによる)、アイソフォームプロファイル (i C E 2 8 0 による)、および生物活性 (バイオアッセイによる) に関して著しい変化は観察されなかった。

## 5.6.2 2 5 での安定性 (6 カ月)

時間 0 に対するタンパク質含量、外観、透明度、p H、凝集、サブビジブル粒子、および生物活性に関して変化は見られなかった。

断片は、2 5 で 6 カ月後の S D S - P A G E N - R E D により + 5 % の増加が見出されたが、バイオアナライザー (断片化の発生の結論にロバスト性を追加する追加のツールとして使用した方法) により統計的に有意な変化は強調されなかった。

同様の性質が i C E 2 8 0 によるアイソフォームプロファイルにおいて観察された: 全ての製剤の酸性クラスターは、6 カ月試験に関して + 1 0 % 増加し、同時に主要ピークおよび塩基性クラスターが減少する傾向がある。

## 【0191】

## 5.6.3 4 0 での安定性 (1 カ月)

時間 0 に対するタンパク質含量、外観、透明度、p H、凝集、サブビジブル粒子、および生物活性に関して変化は見られなかった。

1 0 m g / m L の D P 製剤と 2 0 m g / m L の D P 製剤の間のわずかな違いは i C E 2 8 0 によって強調された (酸性クラスターは、保管時にいくらかの増加を受ける傾向があり、1 0 m g / m L の D P 製剤よりも 2 0 m g / m L の D P 製剤においてわずかにより明らかである)。

## 【0192】

## 5.7 2 4 カ月にわたる安定性

10

20

30

40

50

## 5.7.1 DP 組成物の製造

以下の DP 組成物を製造し、それらの安定性を 24 カ月の期間にわたって試験した。

## 【0193】

## 【表 25】

表 24: DP 組成物

成分	DP 組成物	
	DP 01-160414	DP 02-160414
アベルマブ	20mg/mL	20mg/mL
氷酢酸(100%)	0.60mg/mL *	0.60mg/mL *
マンニトール	51mg/mL	51mg/mL
ポリソルベート 20	0.5mg/mL	0.5mg/mL
水酸化ナトリウム	0.30mg/mL **	0.30mg/mL **
充填容積	10 mL	30 mL
濃度	200 mg/バイアル	600 mg/バイアル

10

20

\* 10mM 酢酸ナトリウムに相当

\*\* 最終 pH: 5.2

## 【0194】

表 22 に示したように、両製剤は製剤 DP 01-190214 に相当する。違いは、固定量 0.3 mg / mL (7.5 mM) の水酸化ナトリウムが使用され、0.6 mg / mL の氷酢酸と組み合わせた場合に pH 5.2 を生じたことのみである。製剤 DP 01-160414 と DP 02-160414 の間の唯一の違いは、後者の製剤がバイアルあたり 30 mL の容積であるのに対し前者はバイアルあたり 10 mL であることである。

30

## 【0195】

両製剤は、0.22 μm PVDF 膜を通して二重濾過し、続いてバイアルに手動で充填した。濾過の前後にタンパク質含量を試験し、関連する結果は、二重無菌濾過時にタンパク質の喪失が生じないことを示す。

## 【0196】

24 カ月まで (+5 ± 3) 、および +25 ± 2 (RH 60% ± 5%) で 6 カ月までの安定性データをそれぞれの最終濃度 (バイアル) の 2 つの製剤において回収した。

## 【0197】

## 5.7.2 24 カ月までの安定性 (+5 ± 3)

40

+5 ± 3 で、24 カ月まで、タンパク質含量 (OD による) 、H MW (S E - H P L C による) 、濁度 (比濁計による) 、粒子形成 (光オプスキュレーションによる) 、呈色の程度 (目視検査による) 、および生物作用能において変化が観察されなかった。酸性アソシフォームにおいてわずかな増加 (2 年後、全ての組成物に関して +5 % が観察された)。SDS-PAGE N-RED、バイオアナライザー、および C E - SDS N-RED による断片化に関して、統計的に有意な変化は観察されなかった。

## 【0198】

## 5.7.3 +25 ± 2 (RH 60% ± 5%) での 6 カ月までの安定性

+25 ± 2 (RH 60% ± 5%) で、6 カ月まで、タンパク質含量 (OD による) 、H MW (S E - H P L C による) 、濁度 (比濁計による) 、粒子形成 (光オプスキュレ

50

ーションによる)、アイソフォームプロファイル(ICE280による)、呈色の程度(目視検査による)、電気泳動の純度(SDS/-PAGE REDによる)、および生物作用能において変化は観察されなかった。5での安定性と同様に、断片化の統計的に有意な増加は $+25 \pm 2$ (RH 60%  $\pm 5\%$ )で観察されなかった(結果はバイオアナライザーによって確認した)。

【0199】

5.7.4 保留時間

濾過前の保留時間(バッグ内、室温で24時間まで)、濾過後の保留時間(バッグ内、室温で72時間まで)、および振盪(室温、200 rpmで24時間まで)は、タンパク質含量、粒子形成、凝集、および濁度において著しい変化を示さず、したがって、典型的には製造工程中と考えられる標準的な操作時間中に生じ得る主要な事象はないことを示した。

【0200】

5.7.5 凍結/融解試験

凍結/融解試験は、試験した製剤が-80で安全に凍結され、次いでタンパク質に主な変化を生じずに、 $+5 \pm 3$ 、または $+25$ まで加温することができる事を証明した。

また、本発明は以下を提供する。

[1]

(i) 抗体として1 mg / mLから30 mg / mLの濃度のアベルマブ；  
 (ii) 緩衝剤として5 mMから15 mMの濃度の酢酸塩またはヒスチジン；  
 (iii) 安定剤として240 mMから320 mMの濃度のD-マンニトールもしくはトレハロース、または50から150 mMの濃度のアルギニンHC1と25 mMから75 mMの濃度のグルタミン酸の組合せ；  
 (iv) 界面活性剤として0.25 mg / mLから0.75 mg / mLの濃度のポロキサマー188もしくはポリソルベート20、または界面活性剤なし；  
 を含み、メチオニンを含まず、さらにpHが5.0から6.0である、水性医薬抗体製剤。

[2]

前記pHが5.0から5.6である、[1]に記載の製剤。

[3]

アベルマブの濃度が約10 mg / mLから約20 mg / mLである、[1]または[2]に記載の製剤。

[4]

前記酢酸塩またはヒスチジンの濃度が約10 mMである、[1]～[3]に記載の製剤。

[5]

前記D-マンニトールもしくはトレハロースの濃度が約280 mMである、またはアルギニンHC1とグルタミン酸の前記組合せの場合、アルギニンHC1の濃度が約150 mMでありグルタミン酸の濃度が約50 mMである、[1]～[3]に記載の製剤。

[6]

前記ポロキサマー188またはポリソルベート20の濃度が約0.5 mg / mLである、[1]～[3]に記載の製剤。

[7]

前記pHが5.2( $\pm 0.1$ )から5.5( $\pm 0.1$ )である、[1]～[3]に記載の製剤。

[8]

約10 mMの濃度の酢酸塩を含み、他の緩衝剤を含まない、[1]～[7]のいずれか一項に記載の製剤。

[9]

10

20

30

40

50

約 280 mM の濃度の D - マンニトールまたはトレハロースを含み、他の安定剤を含まない、[1] ~ [8] のいずれか一項に記載の製剤。

[10]

約 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 またはポロキサマー 188 を含み、他の界面活性剤を含まない、[1] ~ [9] のいずれか一項に記載の製剤。

[11]

(i) 抗体として約 10 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 (ii) 緩衝剤として約 10 mM の濃度の酢酸塩；  
 (iii) 安定剤として約 280 mM の濃度の D - マンニトールまたはトレハロース；  
 (iv) 界面活性剤として約 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 またはポロキサマー 188；  
 を含み、メチオニンを含まず、さらに pH が 5.5 (± 0.1) である、水性医薬抗体製剤。

[12]

(i) 10 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 (ii) 10 mM の濃度の酢酸塩；  
 (iii) 280 mM の濃度の D - マンニトールまたはトレハロース；  
 (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 またはポロキサマー 188；  
 を含み、pH が 5.5 (± 0.1) である、[9] に記載の製剤。

[13]

(i) 10 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 (ii) 10 mM の濃度の酢酸ナトリウム三水和物；  
 (iii) 280 mM の濃度の D - マンニトールまたはトレハロース；  
 (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 またはポロキサマー 188；  
 (v) pH を調整するための HCl；  
 (vi) 溶媒としての水（注射用）；  
 からなり、pH が 5.5 (± 0.1) である、[10] に記載の製剤。

[14]

(i) 10 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 (ii) 10 mM の濃度の酢酸ナトリウム三水和物；  
 (iii) 280 mM の濃度のトレハロース二水和物；  
 (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20；  
 (v) pH を調整するための HCl；  
 (vi) 希釀剤としての水（注射用）；  
 からなり、pH が 5.5 (± 0.1) である、[13] に記載の製剤。

[15]

(i) 10 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 (ii) 10 mM の濃度の酢酸ナトリウム三水和物；  
 (iii) 280 mM の濃度の D - マンニトール；  
 (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20；  
 (v) pH を調整するための HCl；  
 (vi) 希釀剤としての水（注射用）；  
 からなり、pH が 5.5 (± 0.1) である、[11] に記載の製剤。

[16]

(i) 抗体として約 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 (ii) 緩衝剤として約 10 mM の濃度の酢酸塩；  
 (iii) 安定剤として約 280 mM の濃度の D - マンニトールまたはトレハロース；  
 (iv) 界面活性剤として約 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 またはポロキサマー 188；  
 を含み、pH が 5.2 (± 0.1) である、[1] に記載の製剤。

10

20

30

40

50

## [ 17 ]

( i ) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 ( i i ) 10 mM の濃度の酢酸塩；  
 ( i i i ) 280 mM の濃度の D - マンニトールまたはトレハロース；  
 ( i v ) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 またはポロキサマー 188；  
 を含み、pH が 5.5 ( ± 0.1 ) である、[ 16 ] に記載の製剤。

## [ 18 ]

抗酸化剤を含まない、[ 1 ] ~ [ 12 ]、[ 16 ]、または [ 17 ] のいずれか一項に記載の製剤。

## [ 19 ]

( i ) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 ( i i ) 10 mM の濃度の酢酸；  
 ( i i i ) 280 mM の濃度の D - マンニトールまたはトレハロース二水和物；  
 ( i v ) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 またはポロキサマー 188；  
 ( v ) pH を調整するための酢酸ナトリウム；  
 ( v i ) 希釀剤としての水(注射用)；  
 からなり、pH が 5.2 ( ± 0.1 ) である、[ 16 ] に記載の製剤。

## [ 20 ]

( i ) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 ( i i ) 10 mM の濃度の酢酸；  
 ( i i i ) 280 mM の濃度の D - マンニトール；  
 ( i v ) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 ；  
 ( v ) pH を調整するための酢酸ナトリウム；  
 ( v i ) 希釀剤としての水(注射用)；  
 からなり、pH が 5.2 ( ± 0.1 ) である、[ 19 ] に記載の製剤。

## [ 21 ]

( i ) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 ( i i ) 10 mM の濃度の酢酸；  
 ( i i i ) 280 mM の濃度のトレハロース二水和物；  
 ( i v ) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート 20 ；  
 ( v ) pH を調整するための酢酸ナトリウム；  
 ( v i ) 希釀剤としての水(注射用)；  
 からなり、pH が 5.2 ( ± 0.1 ) である、[ 19 ] に記載の製剤。

## [ 22 ]

( i ) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 ( i i ) 10 mM の濃度の酢酸；  
 ( i i i ) 280 mM の濃度の D - マンニトール；  
 ( i v ) 0.5 mg / mL の濃度のポロキサマー 188；  
 ( v ) pH を調整するための酢酸ナトリウム；  
 ( v i ) 希釀剤としての水(注射用)；

からなり、pH が 5.2 ( ± 0.1 ) である、[ 19 ] に記載の製剤。

## [ 23 ]

( i ) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 ( i i ) 10 mM の濃度の酢酸；  
 ( i i i ) 280 mM の濃度のトレハロース二水和物；  
 ( i v ) 0.5 mg / mL の濃度のポロキサマー 188；  
 ( v ) pH を調整するための酢酸ナトリウム；  
 ( v i ) 希釀剤としての水(注射用)；  
 からなり、pH が 5.2 ( ± 0.1 ) である、[ 19 ] に記載の製剤。

## [ 24 ]

10

20

30

40

50

(i) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 (ii) 10 mM の濃度の酢酸；  
 (iii) 280 mM の濃度のD-マンニトール；  
 (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート20；  
 (v) 7.5 mM の濃度の水酸化ナトリウム；  
 (vi) 希釀剤としての水（注射用）；

からなり、pHが5.2（±0.1）である、[16]に記載の製剤。

[25]

(i) 20 mg / mL のアベルマブ；  
 (ii) 0.6 mg / mL の氷酢酸；  
 (iii) 51 mg / mL のD-マンニトール；  
 (iv) 0.5 mg / mL のポリソルベート20；  
 (v) 0.3 mg / mL の水酸化ナトリウム；  
 (vi) 希釀剤としての水（注射用）；

を組み合わせることによって作製される、[24]に記載の製剤。

[26]

(i) 20 mg / mL の濃度のアベルマブ；  
 (ii) 0.6 mg / mL の濃度の酢酸；  
 (iii) 51 mg / mL の濃度のD-マンニトール；  
 (iv) 0.5 mg / mL の濃度のポリソルベート20；  
 (v) 0.3 mg / mL の濃度の水酸化ナトリウム；  
 (vi) 希釀剤としての水（注射用）；

からなり、pHが5.0から5.6である、[2]に記載の製剤。

[27]

有効成分として20 mg / mL の濃度のアベルマブ；ならびに賦形剤として氷酢酸、D-マンニトール、ポリソルベート20、水酸化ナトリウム、および注射用の水からなり、pHが5.0から5.6である、水性医薬抗体製剤。

[28]

pHが5.2（±0.1）である、[27]に記載の製剤。

[29]

前記アベルマブが、（配列番号1）または（配列番号2）のいずれかの重鎖配列、（配列番号3）の軽鎖配列を有し、Asn300にグリコシル化を有し、主なグリカン種としてFA2およびFA2G1を含み、合わせて全グリカン種の>70%を占める、[1]～[28]のいずれか一項に記載の製剤。

[30]

前記アベルマブのグリコシル化において、前記FA2が全グリカン種の44%～54%を占め、前記FA2G1が全グリカン種の25%～41%を占める、[29]に記載の製剤。

[31]

前記アベルマブのグリコシル化において、前記FA2が全グリカン種の47%～52%を占め、前記FA2G1が全グリカン種の29%～37%を占める、[30]に記載の製剤。

[32]

前記アベルマブのグリコシル化において、前記FA2が全グリカン種の約49%を占め、前記FA2G1が全グリカン種の約30%～約35%を占める、[29]に記載の製剤。

[33]

前記アベルマブのグリコシル化が、少ないグリカン種として全グリカン種の<5%を占めるA2、全グリカン種の<5%を占めるA2G1、全グリカン種の<5%を占めるA2G2、全グリカン種の<7%を占めるFA2G2をさらに含む、[29]～[32]のい

10

20

30

40

50

すれか一項に記載の製剤。

[ 3 4 ]

前記アベルマブのグリコシル化において、前記 A 2 が全グリカン種の 3 % ~ 5 % を占め、前記 A 2 G 1 が全グリカン種の < 4 % を占め、前記 A 2 G 2 が全グリカン種の < 3 % を占め、前記 F A 2 G 2 が全グリカン種の 5 % ~ 6 % を占める、[ 3 3 ] に記載の製剤。

[ 3 5 ]

前記アベルマブのグリコシル化において、前記 A 2 が全グリカン種の 約 3 . 5 % ~ 約 4 . 5 % を占め、前記 A 2 G 1 が全グリカン種の 約 0 . 5 % ~ 約 3 . 5 % を占め、前記 A 2 G 2 が全グリカン種の < 2 . 5 % を占め、前記 F A 2 G 2 が全グリカン種の 約 5 . 5 % を占める、[ 3 4 ] に記載の製剤。

10

[ 3 6 ]

前記アベルマブが（配列番号 2 ）の重鎖配列を有する、[ 2 9 ] ~ [ 3 5 ] のいずれか一項に記載の製剤。

[ 3 7 ]

静脈内（ I V ）投与用である、[ 1 ] ~ [ 3 6 ] のいずれか一項に記載の製剤。

[ 3 8 ]

[ 3 7 ] に記載の製剤を含有するバイアル。

[ 3 9 ]

2 0 m g / m L の濃度の溶液 1 0 m L 中にアベルマブ 2 0 0 m g を含有する、[ 3 8 ] に記載のバイアル。

20

[ 4 0 ]

ガラスバイアルである、[ 3 8 ] または [ 3 9 ] に記載のバイアル。

[ 4 1 ]

[ 1 ] ~ [ 3 7 ] のいずれか一項に記載の製剤を患者に投与するステップを含む、がんを処置する方法。

[ 4 2 ]

前記がんが、非小細胞性肺がん、尿路上皮癌、膀胱がん、中皮腫、メルケル細胞癌、胃もしくは胃食道接合部がん、卵巣がん、乳がん、胸腺腫、胃腺癌、副腎皮質癌、頭頸部扁平上皮癌、腎細胞癌、メラノーマ、および / または古典的ホジキンリンパ腫から選択される、[ 4 1 ] に記載の方法。

30

【図1】

図1a

アベルマップの重鎖配列-配列番号1

EVQLLESGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSG  
 GITFYADTVKGRFTISRDNNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARIKLGTFTVTVDYWG  
 QGTLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVSWNSGALT  
 SGVHTFPALVQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSC  
 DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
 WYWDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
 PIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
 ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL  
 LSPGK

図1b

C末端Kを欠損しているアベルマップの重鎖配列-配列番号2

EVQLLESGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSG  
 GITFYADTVKGRFTISRDNNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARIKLGTFTVTVDYWG  
 QGTLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVSWNSGALT  
 SGVHTFPALVQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSC  
 DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
 WYWDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
 PIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
 ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL  
 LSPG

【図2】

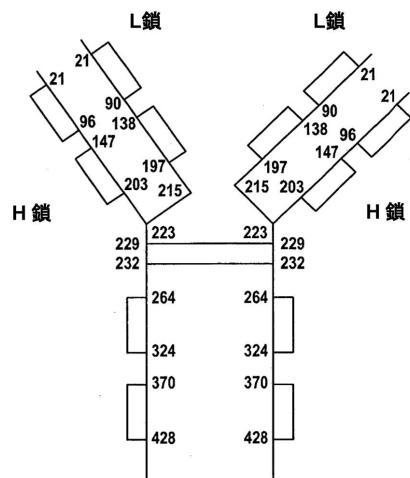
図2

アベルマップの軽鎖配列-配列番号3

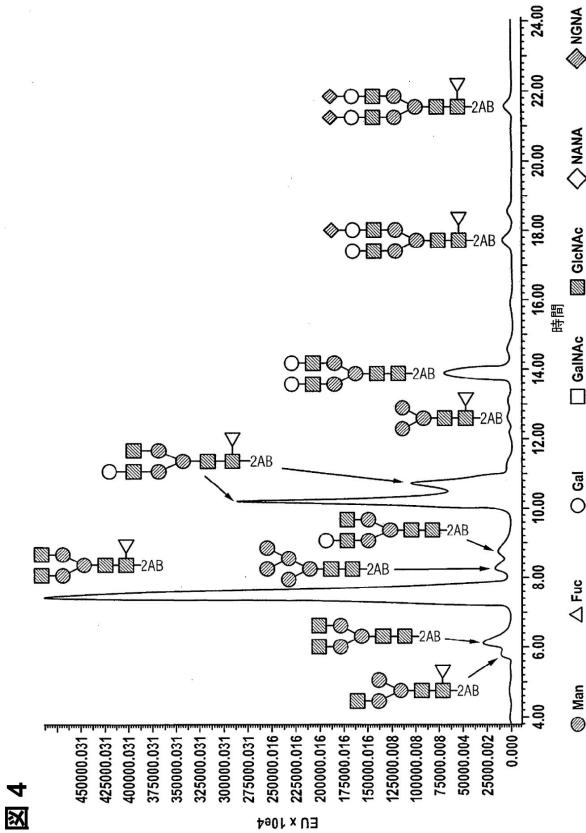
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSN  
 RPSGVSNRFGSKSGNTASLTLISGLQAEDEADYCYSSYTSSTRVFGTGTKVTVLG  
 QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKGVETTK  
 PSKQSNKYYASSYSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【図3】

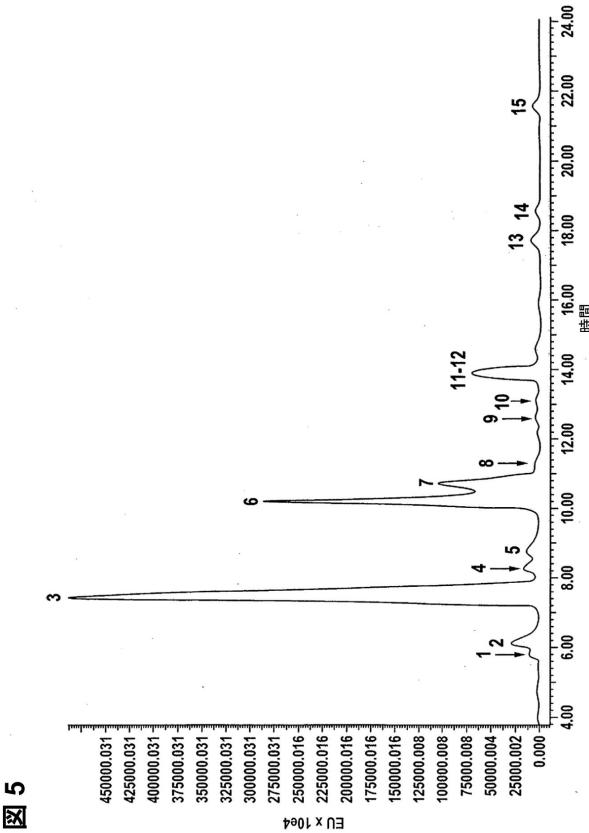
図3



【図4】

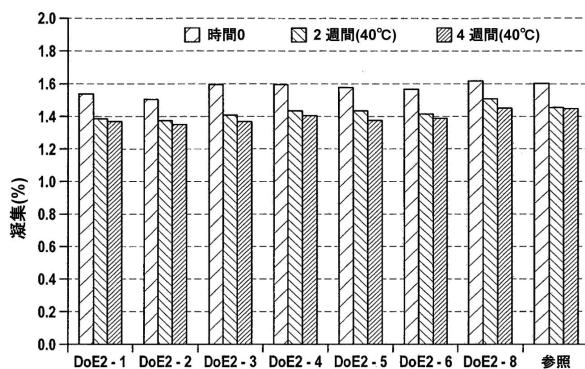


【図5】



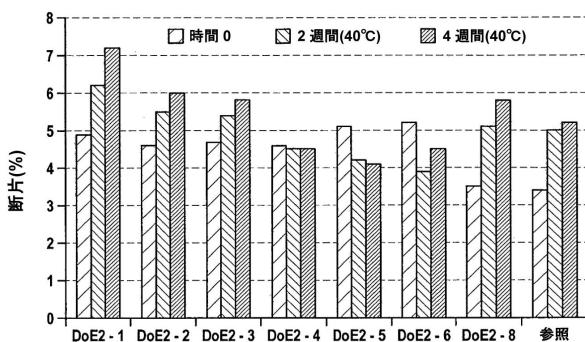
【図6】

図6



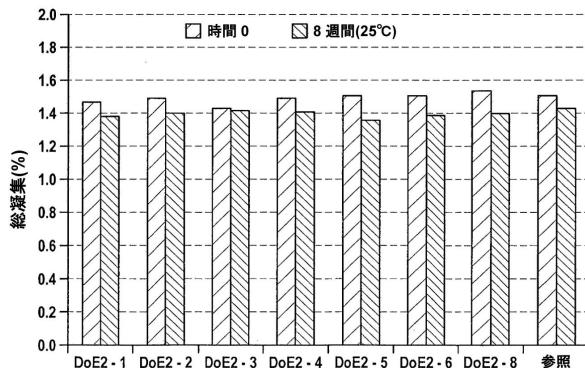
【図8】

図8



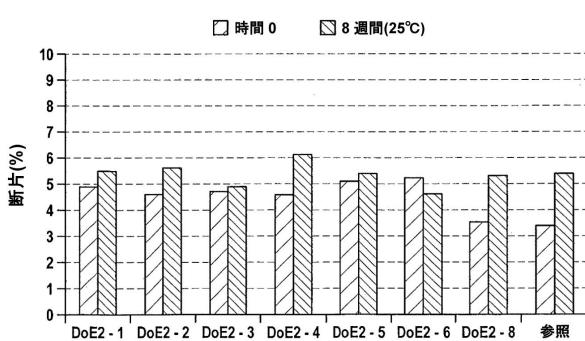
【図7】

図7



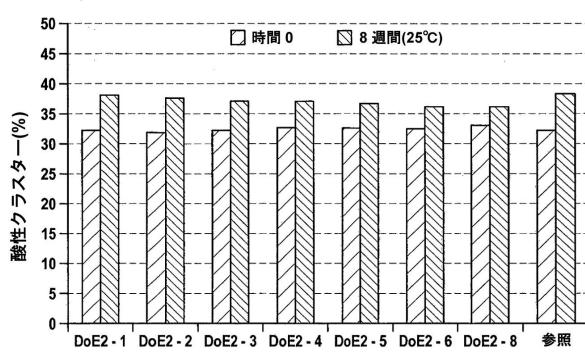
【図9】

図9



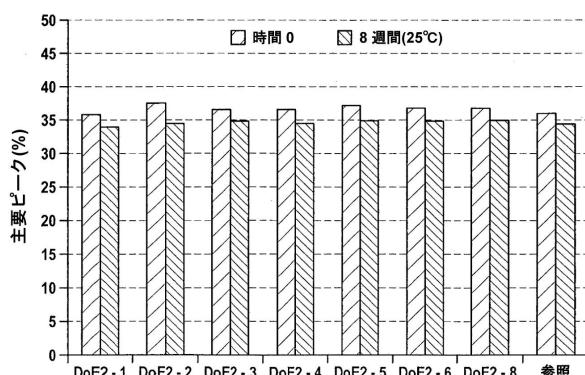
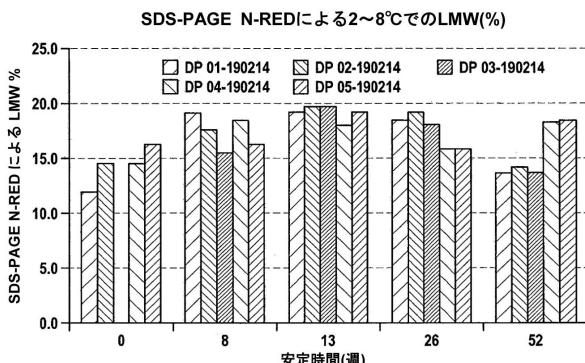
【図10】

図10



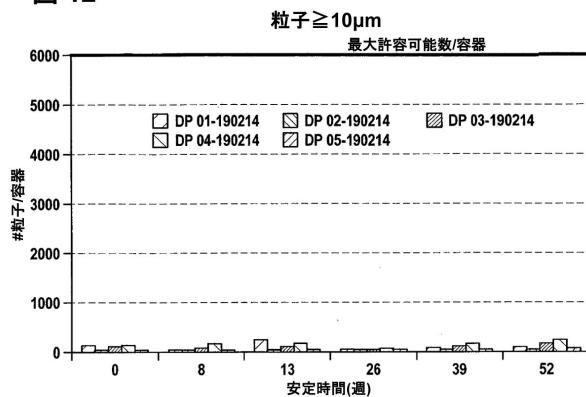
【図11】

図11



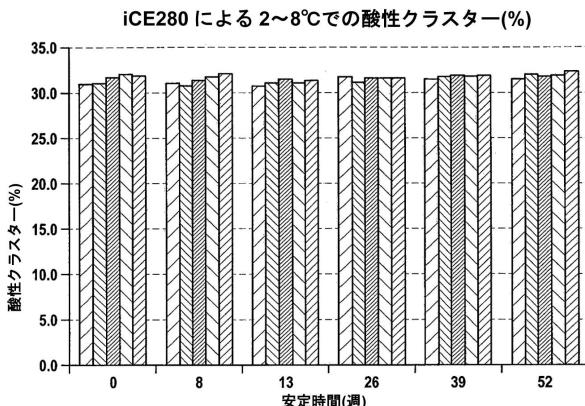
【図12】

図12



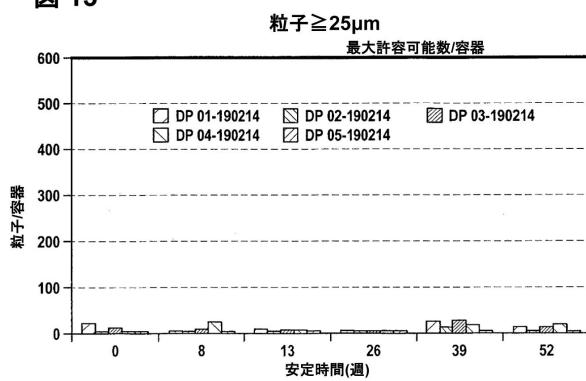
【図14】

図14



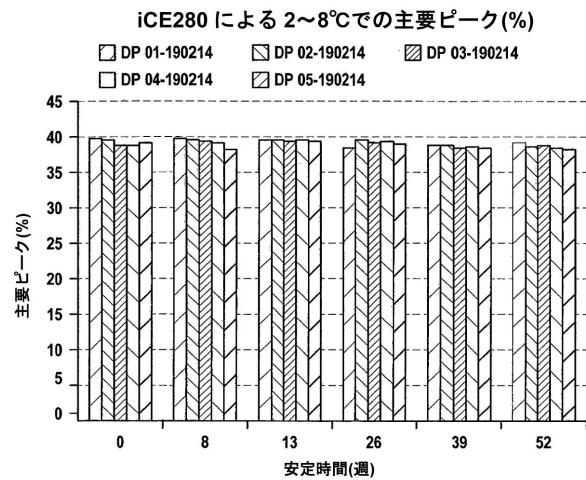
【図13】

図13



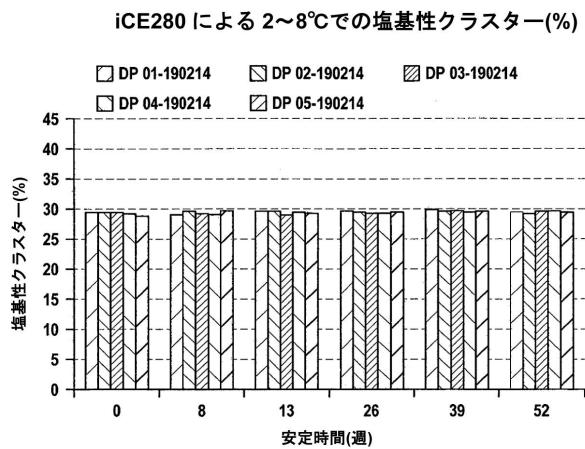
【図15】

図15



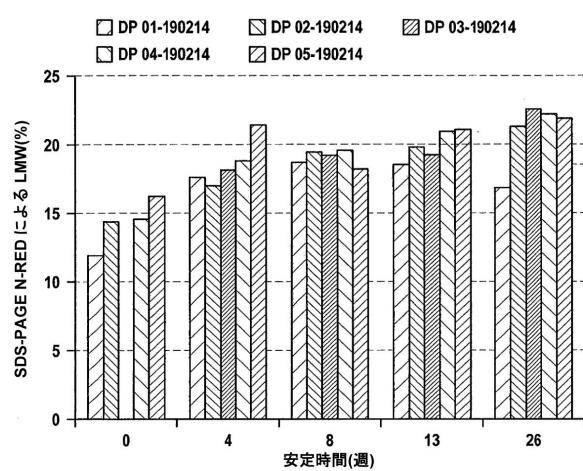
【図16】

図16



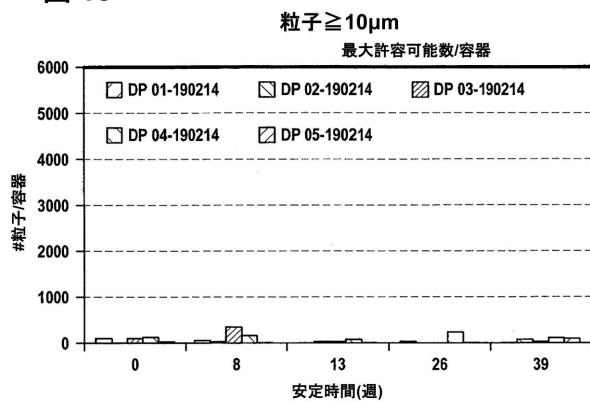
【図17】

図17



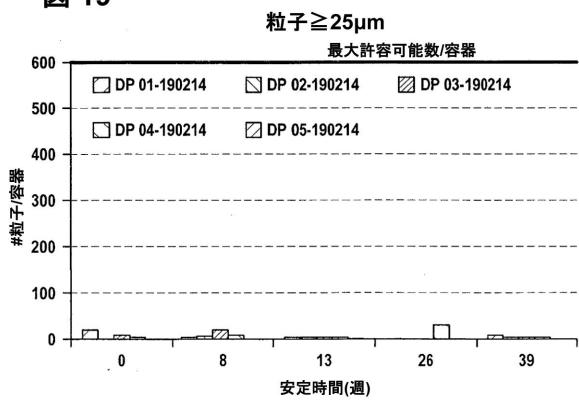
【図18】

図18



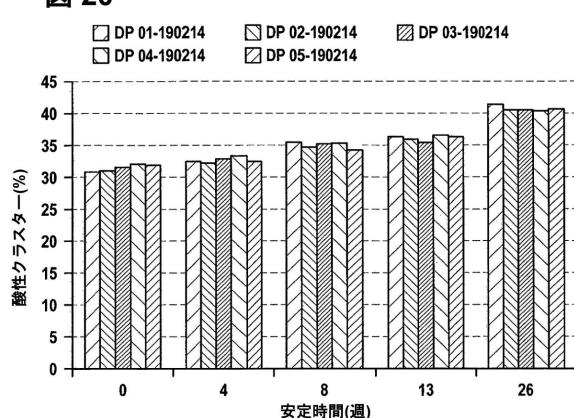
【図19】

図19



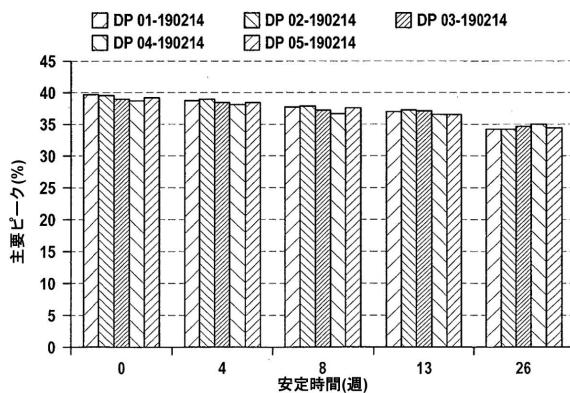
【図20】

図20



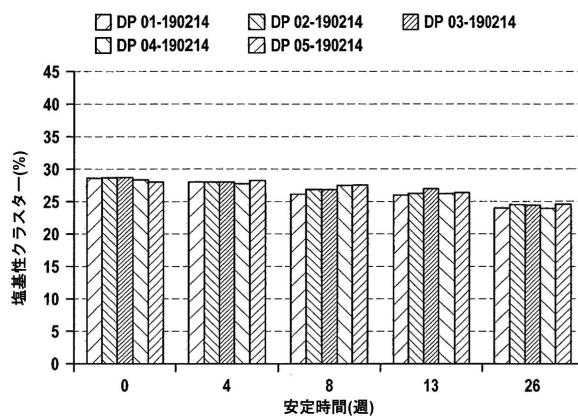
【図21】

図21



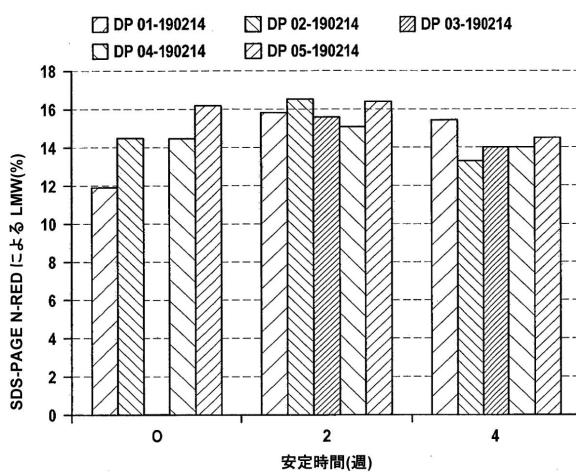
【図22】

図22



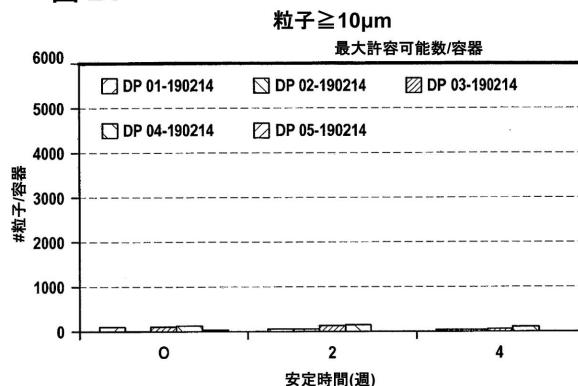
【図23】

図23



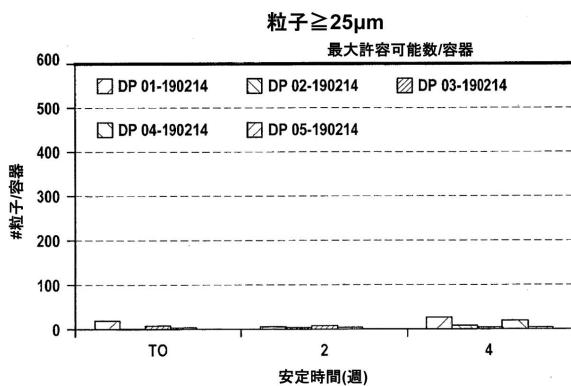
【図24】

図24



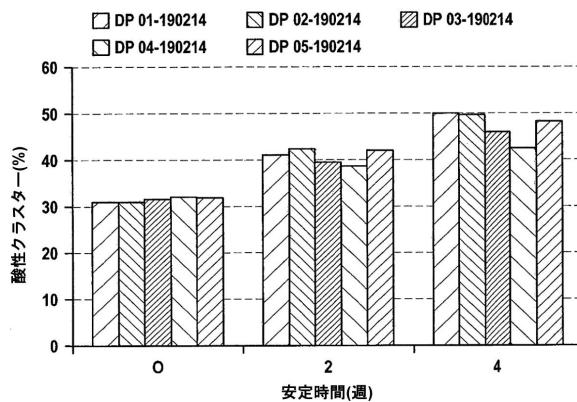
【図25】

図25



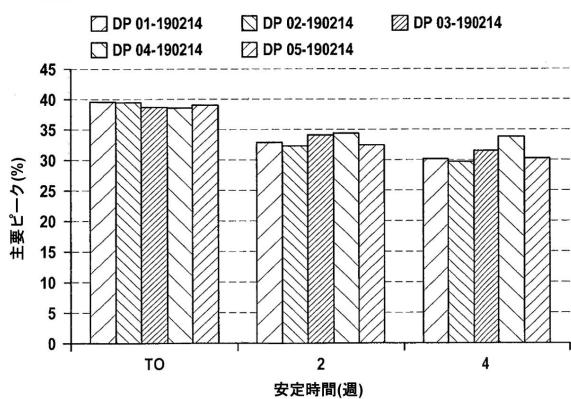
【図26】

図26



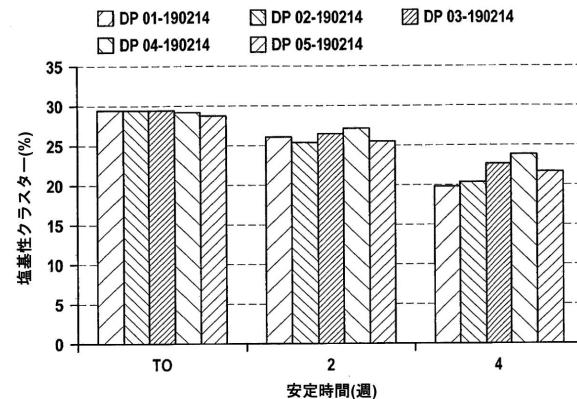
【図27】

図27



【図28】

図28



【配列表】

0006925337000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 K 47/12
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18

(73)特許権者 510069249

ファイザー・インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 1 0 0 1 7 ニューヨーク州ニューヨーク市イースト・フォーティセカンド・ストリ  
 ート 2 3 5

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100135943

弁理士 三橋 規樹

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 リナルディ, ギアンルカ

イタリア国 0 0 0 1 5 モンテロトンド, ヴィア ギノ シルヴェストリニ 9

(72)発明者 デル リオ, アレサンドラ

イタリア国 0 0 1 4 4 ローマ, ヴィア イルデブランド ヴィヴァンティ 1 0 8

(72)発明者 フラタールカンゲリ, シルヴィア

イタリア国 0 3 0 2 4 フロジノーネ チェプラーノ, シー. エスオーリソルジメント 3

(72)発明者 ヴォス, センタ

ドイツ国 5 5 1 2 2 マインツ, アン デル フィネンシドラン

(72)発明者 ヴェイガント, マルクス

ドイツ国 6 8 2 5 9 マンハイム, トルブルメンウェグ 2 2

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 特表2 0 1 5 - 5 0 0 2 0 7 (JP, A)

特表2 0 0 9 - 5 2 4 5 9 5 (JP, A)

特表2 0 1 2 - 5 1 1 5 4 0 (JP, A)

特表2 0 1 5 - 5 0 5 5 3 9 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

C A p l u s / W P I D S ( S T N )

M E D L I N E / B I O S I S / E M B A S E ( S T N )