

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-507202

(P2018-507202A)

(43) 公表日 平成30年3月15日 (2018.3.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U 4 C 0 7 6
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	4 C 0 8 5
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 O 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-542055 (P2017-542055)
 (86) (22) 出願日 平成28年2月12日 (2016.2.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年9月22日 (2017.9.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/053068
 (87) 国際公開番号 W02016/128564
 (87) 国際公開日 平成28年8月18日 (2016.8.18)
 (31) 優先権主張番号 15305218.8
 (32) 優先日 平成27年2月13日 (2015.2.13)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 504456798
 サノファイ
 フランス国、エフ - 7 5 0 0 8 ・ パリ、リ
 ュ・ラ・ボエティ・5 4
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 ティル・ブセマー
 ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフル
 ト・パテント・デパートメント・サノフィ
 - アベンティス・ドイチュラント・ゲー・
 エム・ペー・ハー、

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体のための安定的な液体製剤

(57) 【要約】

本発明は、モノクローナル抗体、例えば I g G 抗体のための安定的な医薬組成物に関する。本発明は、さらに、本発明の医薬組成物を使用する医薬および治療に関する。さらに本発明は、本発明の医薬組成物の少なくとも 1 つを含むキットおよび抗体の凝集を低減させるための方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 抗体、
- b) 酢酸塩およびヒスチジンからなる群から選択される少なくとも 1 つの緩衝剤、
- c) グリシン、アスパラギンおよびグルタミンからなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸、ならびに / またはトレハロースおよびマンニトールからなる群から選択される少なくとも 1 つの賦形剤、ならびに
- d) 表面活性剤

を含む医薬組成物であって、該組成物の pH は 5 . 0 ~ 6 . 5 である、前記医薬組成物。

【請求項 2】

10

抗体が I g G 抗体である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

5 ~ 1 5 m M の少なくとも 1 つの緩衝剤を含む、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

少なくとも 1 つの緩衝剤が酢酸塩である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

少なくとも 1 つの緩衝剤がヒスチジンである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

20

1 ~ 7 0 m g / m l の少なくとも 1 つの賦形剤を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの賦形剤がマンニトールである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

7 m g / m l 未満の塩化ナトリウムを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

30

表面活性剤がポリソルベートである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

0 . 0 0 1 % w / v ~ 0 . 1 5 % w / v の表面活性剤を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

1 m g / m l ~ 3 0 m g / m l の少なくとも 1 つのアミノ酸を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

少なくとも 1 つのアミノ酸がグリシンである、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

40

- a) 4 0 ~ 5 0 m g / m l の抗体、ならびに
- b) 5 ~ 1 5 m M の酢酸緩衝液またはヒスチジン緩衝液、ならびに
- c) 2 0 m g / m l のマンニトールおよび / または 1 5 m g / m l のグリシン、ならびに
- d) 0 . 1 % w / v のポリソルベート 8 0 または 0 . 0 1 % w / v のポリソルベート 2 0

を含み、pH が 5 . 0 ~ 6 . 5 である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

- a) 5 0 m g / m l の抗体、ならびに
- b) 5 ~ 1 5 m M の酢酸緩衝液またはヒスチジン緩衝液、ならびに

50

c) 20 mg / ml のマンニトールおよび / または 15 mg / ml のグリシン、ならびに

d) 0.1 % w / v のポリソルベート 80 または 0.01 % w / v のポリソルベート 20

を含み、pH が 5.0 ~ 6.5 である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 15】

a) 50 mg / ml の抗体、ならびに

b) 10 mM の酢酸緩衝液、ならびに

c) 20 mg / ml のマンニトールおよび 15 mg / ml のグリシン、ならびに

d) 0.1 % w / v のポリソルベート 80

10

を含み、pH が 5.5 である、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 16】

a) 50 mg / ml の抗体、ならびに

b) 1.17 mg / ml の酢酸ナトリウム三水合物および 0.08 mg / ml の酢酸、ならびに

c) 20 mg / ml のマンニトールおよび 15 mg / ml のグリシン、ならびに

d) 0.1 % w / v のポリソルベート 80

を含み、pH が 5.5 である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液包内または髄腔内投与のための、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 18】

参照組成物と比較して、

(a) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって測定したときの、約 55 で 1 週間貯蔵した後の低下した凝集体量、

(b) SEC で測定したときの、約 55 で 1 週間貯蔵した後のより多い単量体量、

(c) SEC で測定したときの、約 55 で 1 週間貯蔵した後のより少ない断片からなる群から選択される少なくとも 1 つの特色を有する、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 19】

30

(a) 組成物が、55 で 1 週間の熱ストレスに対して安定的であること、

(b) 組成物が、55 で 3 時間の攪拌の機械的ストレスに対して安定的であること、および / または

(c) 組成物が、凍結融解に起因するストレスに対して安定的であり、凍結融解が、-80 で 24 時間の組成物の凍結、それに続く室温で 90 分間の融解を指し、サイクルが 5 反復繰り返され、5 サイクル目では、温度は -80 で 72 時間維持されることからなる群から選択される少なくとも 1 つの特色を有する、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 20】

安定的が、以下の特徴：

40

i) 組成物が、SEC で測定した場合に、すべてのピークの総面積に対して、90 % を超える単量体含有量 % を有すること、

ii) 組成物が、SEC で測定した場合に、すべてのピークの総面積に対して、3 % 未満の凝集体含有量 % を有すること、および / または

iii) 組成物が、SEC で測定した場合に、すべてのピークの総面積に対して、3 % 未満の断片含有量 % を有すること

の少なくとも 1 つを指す、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

(a) 光遮断 / 光遮蔽 (LO) によって測定したときの、約 40 で 1 ~ 6 か月貯蔵した後の低下した凝集体量、および

50

(b) 動的光散乱法(DLS)によって測定したときの、約40で3か月間貯蔵した後のより多い単量体量からなる群から選択される少なくとも1つの特色を有する、請求項1~17のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項22】

40で1~6か月の熱ストレスに安定である、請求項1~17のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項23】

安定的が、以下の特徴：

i) 組成物が、DLSによって測定された体積によって分析した場合に、90%を超える単量体含有量を有すること、

ii) 組成物が、DLSによって測定された強度によって分析した場合に、90%を超える単量体含有量を有すること、

iii) 組成物が、LOによって測定した場合に、 $>10\mu\text{m}$ を6000粒子未満、 $>25\mu\text{m}$ を600粒子未満および $>1\mu\text{m}$ を10000粒子未満有することの少なくとも1つを指す、請求項22に記載の組成物。

【請求項24】

抗体が配列番号1によって表されるアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号2によって表されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、請求項1~23のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項25】

抗体がアダリムマブである、請求項1~23のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項26】

医薬としての、請求項1~25のいずれか1項に記載の医薬組成物の使用。

【請求項27】

医薬として使用するための、請求項1~25のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項28】

治療有効量の、請求項1~25のいずれか1項によって定義された医薬組成物を、それらを必要とする対象に投与することを含む、疾患または障害を治療または予防する方法。

【請求項29】

請求項1~25のいずれか1項によって定義された医薬組成物を含有する少なくとも1つの容器およびインジェクション装置を含む、キット。

【請求項30】

請求項1~25のいずれか1項によって定義された組成物を使用する、治療用モノクローナル抗体の凝集および/または断片化を低減させる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、モノクローナル抗体、例えばIgG抗体のための安定的な医薬組成物に関する。本発明は、さらに、本発明の医薬組成物を使用する医薬および治療に関する。さらに本発明は、本発明の医薬組成物の少なくとも1つを含むキットおよび抗体の凝集を低減させるための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体の不安定性は、抗体薬物の商業的開発に対する大きな障害である。例えば、これまでのある種の液状抗体製造物は貯蔵寿命が短く、抗体は、貯蔵の間に、化学的および物理的不安定性によって生物活性を失う可能性がある。化学的不安定性は脱アミド、ラセミ化、加水分解、酸化、ベータ脱離またはジスルフィド交換に起因する可能性があり、物理的不安定性は抗体の変性、凝集、沈殿または吸着に起因する可能性がある。これらの中で、凝集、脱アミドおよび酸化は、抗体分解の最も一般的な原因であることが知られている(

10

20

30

40

50

非特許文献 1)。したがって、目的の抗原に結合する抗体の安定的な組成物が必要であり、そのような安定的な組成物は、例えば、安定性の増大、低レベルから検出不可能なレベルの凝集および低レベルから検出不可能なレベルの抗体断片化/分解を示す。さらに、前記安定的な組成物の物理的安定性および化学的安定性の向上のために、これらは、さらに、長期貯蔵中でも抗体の生物活性の喪失がほとんどないか全くない。

【0003】

特許文献 1 に記載されているように、アダリムマブと呼ばれるヒト抗 TNF アルファモノクローナル抗体 D 2 E 7 が、例えば、リウマチ性関節炎およびクローン病を治療するため開発された。アダリムマブは、Humira (登録商標) という名称の市販製剤で、Abbvie によって売られている Ig G 1 クラスのモノクローナル抗体である。現在この抗体は、尋常性乾癬、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、リウマチ性関節炎、多関節型若年性特発性関節炎の治療で一般に使用されている。

10

【0004】

Humira (登録商標) という市販製剤は、特許文献 2 および非特許文献 2 に記載されている。これは、抗 TNF アルファ抗体、マンニトール、クエン酸一水和物、クエン酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム二水和物、塩化ナトリウム、ポリソルベート 80 および水酸化ナトリウムを含む。

【0005】

本発明者らは、Humira (登録商標) という市販製剤は機械的ストレスに対する安定性が限られていることを発見した。

20

【0006】

本発明者らは、アダリムマブのバイオシミラーを含む新規の組成物を開発し、本発明の組成物が、機械的ストレスおよび熱ストレスに対する抗 TNF アルファ抗体の安定性を向上させることを示した。

【0007】

酢酸またはヒスチジン緩衝液、グリシンおよび/またはマンニトールならびに表面活性剤、例えばポリソルベートを含む本発明の組成物が最抗体の凝集体および粒子の形成を最小限にすることが、さらに示された。本発明の組成物は、例えば 55 で 1 週間組成物を貯蔵した場合に、例えば、市販製剤 (特許文献 2 に記載されているような Humira (登録商標) 製剤) と比べて、より高含量の単量体抗体、より少ない凝集体および断片を示す (実施例セクションの表 15 および 23 を参照されたい)。

30

【0008】

特に、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析は、55 で 1 週間たった後に、試験した組成物は全ピーク面積の 95 % を超える抗体単量体含量を有するが、Humira (登録商標) 製剤の抗体単量体含量は全ピーク面積の 89 % しかないことを示した。

【0009】

本発明者らは、少なくとも 1 つの酢酸またはヒスチジン緩衝液、グリシンおよび/またはマンニトールならびに表面活性剤、例えばポリソルベートを含む組成物が、40 で 3 か月たった後でさえも、全ピーク面積の 90 % を超える単量体量を有し、それにより試験条件下で安定的であることを長期研究でさらに示した。さらに本発明者らは、本発明の組成物が、200 rpm で 3 時間のような機械的ストレスにさらした後に、まだ全ピーク面積の 99 % より多くに相当する単量体量を有し、それにより試験条件下で安定的であることを安定性研究で示した。

40

【0010】

さらに、該組成物は、試験条件下で凍結融解に起因するストレスに耐性であり、したがって、5 サイクル目の後においてでさえも、単量体の量がまだ全ピーク面積の 99 % より多く、それにより試験条件下で安定的である。

【0011】

別の例では、本発明の組成物は、例えば粒子形成に関して、より高い機械的安定性を示し、例えば、実施例 6 の表 24 に示すように、市販製剤 (特許文献 2 に記載されているよ

50

うな Humira (登録商標) 製剤) と比べて、より少ない量の、肉眼では見えない粒径の小さな凝集体が観察される ($> 1 \mu\text{m}$ であるが $< 10 \mu\text{m}$)。実施例でさらに示すように、その効果は、特に、緩衝液 (酢酸またはヒスチジン)、pH 範囲、マンニトールまたはグリシンの添加およびポリソルベートのような界面活性剤の添加の選択と関係している。本発明者らは、さらに、アスパラギンおよびグルタミンがグリシンで達成される安定化効果に匹敵する安定化効果を有することを示した。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】国際特許出願第 WO 1997 29131 号

10

【特許文献2】国際特許出願第 WO 2004 / 016286 号

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Clellandら、1993、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10 (4) : 307 ~ 377

【非特許文献2】EMA に許可された販売承認の添付書類 I

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

20

したがって、本発明は、抗体、酢酸もしくはヒスチジン緩衝液、グリシン、アスパラギンおよびグルタミンからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸、例えばグリシンおよびアスパラギンならびに / またはトレハロースおよびマンニトールからなる群から選択される少なくとも1つの賦形剤ならびに表面活性剤、例えばポリソルベートなどを含む、IgG 抗体のような抗体、例えば抗 hTNF アルファ抗体に適した医薬組成物を定義する。

【課題を解決するための手段】

【0015】

したがって、本発明は、

30

a) 抗体、

b) 酢酸塩およびヒスチジンからなる群から選択される少なくとも1つの緩衝剤、

c) グリシン、アスパラギンおよびグルタミンからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸 (例えばグリシンおよびアスパラギン) ならびに / またはトレハロースおよびマンニトールからなる群から選択される少なくとも1つの賦形剤、ならびに

d) 表面活性剤

を含む医薬組成物であって、組成物の pH は 5.0 ~ 6.5 である、医薬組成物に関する。

【0016】

一実施形態では、少なくとも1つの賦形剤はマンニトールである。

【0017】

40

さらなる実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸はグリシンである。

【0018】

抗体は治療用抗体である。一実施形態では、治療用抗体は IgG 抗体である。さらなる実施形態では、IgG 抗体は抗 hTNF アルファ抗体である。

【0019】

本発明は、酢酸またはヒスチジン緩衝液、グリシンおよび / またはマンニトールならびに表面活性剤、例えばポリソルベートを含む、5.0 ~ 6.5 の pH 値を有する医薬組成物が抗体の安定性を向上させるという驚くべき発見に基づく。さらに本発明者らは、塩化ナトリウムの添加は抗 hTNF 抗体の安定性を支持しないことを示した。塩化ナトリウムの添加は、抗体の変性温度 (T_M) に負の効果さえ及ぼす。

50

【0020】

したがって、一実施形態では、本発明の組成物は、10 mg/ml未満の塩化ナトリウム、例えば7 mg/ml未満の塩化ナトリウムを含む。一実施形態では、組成物は、2 mg/ml以下の塩化ナトリウムを含む。別の実施形態では、組成物は塩化ナトリウムを含まない。

【0021】

一実施形態では、表面活性剤はポリソルベート、例えばポリソルベート80または20である。組成物は、0.01% w/v ~ 1% w/vの表面活性剤（組成物の全体積に対する重量）を含むことができる。

【0022】

本発明の組成物は、例えば0.01% w/vのポリソルベート20を含むことができる。別の例では、組成物は、0.1% w/vのポリソルベート80を含むことができる。

10

【0023】

一実施形態では、組成物は、1 ~ 100 mM、例えば5 ~ 50 mM、5 ~ 20 mM、例えば5 ~ 15 mM、例えば10 mMの少なくとも1つの緩衝剤を含むことができる。

【0024】

本発明の組成物は、30 ~ 70 mg/ml、例えば50 mg/mlの抗体を含むことができる。

【0025】

本発明の組成物は、1 ~ 30 mg/mlの少なくとも1つのアミノ酸を含むことができる。

20

【0026】

一実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸はグリシンである。組成物は、5 ~ 30 mg/mlのグリシン、例えば15 mg/mlのグリシンを含むことができる。

【0027】

別の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸はアスパラギンである。組成物は、1 ~ 10 mg/mlのアスパラギン、例えば2 mg/mlのアスパラギンを含むことができる。

【0028】

一実施形態では、少なくとも1つの賦形剤はトレハロースである。組成物は、1 ~ 70 mg/mlのトレハロース、例えば50 mg/mlのトレハロースを含むことができる。

30

【0029】

別の実施形態では、少なくとも1つの賦形剤はマンニトールである。組成物は、1 ~ 60 mg/mlのマンニトール、例えば20 mg/mlのマンニトールを含むことができる。

【0030】

一実施形態では、本発明は、

- a) 40 ~ 50 mg/mlの抗体、
 - b) 5 ~ 15 mMの酢酸緩衝液またはヒスチジン緩衝液、
 - c) 15 ~ 25 mg/mlのマンニトールおよび/または10 ~ 20 mg/mlのグリシン、ならびに
 - d) 0.08 ~ 0.12% w/vのポリソルベート80または0.008 ~ 0.012% w/vのポリソルベート20
- を含む医薬組成物であって、該組成物のpHは5.0 ~ 6.5である、医薬組成物に関する。

40

【0031】

さらなる実施形態では、本発明は、

- a) 50 mg/mlの抗体、
- b) 5 ~ 15 mMの酢酸緩衝液またはヒスチジン緩衝液、
- c) 15 ~ 25 mg/mlのマンニトールおよび/または10 ~ 20 mg/mlのグリシン

50

ン、ならびに

d) 0.08 ~ 0.12 % w / v のポリソルベート 80 または 0.008 ~ 0.012 % w / v のポリソルベート 20

を含む医薬組成物であって、該組成物の pH は 5.0 ~ 6.5 である、医薬組成物に関する。

【0032】

一実施形態では、本発明は、

a) 40 ~ 50 mg / ml の抗体、

b) 5 ~ 15 mM の酢酸緩衝液またはヒスチジン緩衝液、

c) 20 mg / ml のマンニトールおよび / または 15 mg / ml のグリシン、ならびに

d) 0.1 % w / v のポリソルベート 80 または 0.01 % w / v のポリソルベート 20
を含む医薬組成物であって、該組成物の pH は 5.0 ~ 6.5 である、医薬組成物に関する。

【0033】

特定の実施形態では、本発明は、

a) 50 mg / ml の抗体、ならびに

b) 5 ~ 15 mM の酢酸緩衝液またはヒスチジン緩衝液、ならびに

c) 20 mg / ml のマンニトールおよび / または 15 mg / ml のグリシン、ならびに

d) 0.1 % w / v のポリソルベート 80 または 0.01 % w / v のポリソルベート 20
を含む医薬組成物であって、該組成物の pH は 5.0 ~ 6.5 である、医薬組成物に関する。

【0034】

本発明者らは、Humira (登録商標) という市販製剤中に存在する同じ抗 TNF アルファ抗体よりも安定性が向上した抗 TNF アルファ抗体の医薬組成物を開発した。したがって、一実施形態では、医薬組成物は、同じ抗 TNF アルファ抗体の参照組成物と比べて安定性が向上した抗 TNF アルファ抗体を提供する。

【0035】

安定性の向上は、例えば、機械的ストレス、熱ストレスおよび / または凍結融解ストレスでもよいストレスにさらされたときの物理的および / または化学的安定性の増大を指す。したがって、新しく開発した本発明の医薬組成物は、ストレス条件、特に、熱ストレスおよび / または機械的ストレスに参照組成物よりもよく耐えることができる。

【発明を実施するための形態】

【0036】

抗体

「抗体」は、2つの重鎖がジスルフィド結合によって互いに連結し、各重鎖がジスルフィド結合によって軽鎖に連結している、天然の抗体でもよいし従来の抗体でもよい。2タイプの軽鎖、すなわちラムダ (λ) およびカッパ (κ) が存在する。抗体分子の機能活性を決定する5つの主な重鎖クラス (またはアイソタイプ) : IgM、IgD、IgG、IgA および IgE が存在する。各鎖は、異なる配列ドメインを含む。軽鎖は、2つのドメインまたは領域、すなわち可変ドメイン (VL) および定常ドメイン (CL) を含む。重鎖は、4つのドメイン、すなわち可変ドメイン (VH) および3つの定常ドメイン (まとめてCHと称される、CH1、CH2 および CH3) を含む。軽 (VL) および重 (VH) 鎖の両方の可変領域は、抗原に対する結合の認識および特異性を決定する。サブクラスのIgM、IgD、IgG、IgA および IgE は、重鎖の定常領域中にアミノ酸配列の違いがある。所与の1クラス内のすべての免疫グロブリンは、非常に類似した重鎖定常領域を有する。軽 (CL) および重 (CH) 鎖の定常領域ドメインは、重要な生物学的特性、例えば、抗体の鎖結合、分泌、経胎盤性移動、補体結合およびFc受容体 (FcR) への結合を与える。Fv断片は免疫グロブリンのFab断片のN末端部分であり、1つの軽鎖および1つの重鎖の可変性部分からなる。抗体の特異性は、抗体結合部位と抗原決定基の間の構造的相補性にある。抗体結合部位は、超可変領域または相補性決定領域 (CDR

）に主に由来する残基で構成されている。たまた、非超可変領域またはフレームワーク領域（FR）に由来する残基が、全体的なドメイン構造、したがって結合部位に影響する。

【0037】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、従来の抗体およびその断片ならびに単ドメイン抗体およびその断片、例えば単ドメイン抗体の可変重鎖、ならびにキメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体または多重特異性抗体を意味する。

【0038】

本発明者らは、本発明の医薬組成物が、機械的ストレスおよび/または熱ストレスのようなストレス条件下で抗hTNFアルファ抗体を安定化することを示した。例で使用する抗hTNFアルファ抗体はIgG抗体である。したがって、一実施形態では、治療用抗体はモノクローナル抗体、例えばIgG抗体である。

10

【0039】

用語「IgG抗体」は、中でも、様々なIgGサブクラス（例えば；IgG1、2、3および4）を包含する。重鎖の定常領域のアミノ酸配列の小さな違いに基づいて、IgG抗体をサブクラスに分けることができる。IgG抗体は、4つのペプチド鎖からなる約150kDaの分子である。これは、約50kDaの同一クラスの2つのガンマ重鎖および約25kDaの同一の2つの軽鎖を含むので、四量体の四次構造である。2つの重鎖は互いにおよび1つの軽鎖にそれぞれジスルフィド結合によって連結している。生じた四量体は、2つの同一の半分を有しこれらは、フォークまたはY様形状を一緒に形成する。フォークの各末端は、同一の抗原結合部位を含む。

20

【0040】

「相補性決定領域」または「CDR」は、ネイティブな免疫グロブリン結合部位の天然Fv領域の結合親和性および特異性を一緒に規定するアミノ酸配列を指す。免疫グロブリンの軽鎖および重鎖は、それぞれCDR1-L、CDR2-L、CDR3-LおよびCDR1-H、CDR2-H、CDR3-Hと呼ばれる3つのCDRをそれぞれ有する。したがって、従来の抗体抗原結合部位は、重鎖および軽鎖のV領域のそれぞれからのCDRセットを含む、6つのCDRを含む。

【0041】

「フレームワーク領域」（FR）は、CDRの間に挿入されたアミノ酸配列、すなわち、単一種における様々な免疫グロブリンの間で比較的保存された免疫グロブリンの軽鎖および重鎖可変領域部分を指す。免疫グロブリンの軽鎖および重鎖は、それぞれFR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-LおよびFR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-Hと呼ばれる4つのFRをそれぞれ有する。

30

【0042】

一実施形態では、本発明における抗体は治療用抗体である。

【0043】

本明細書で使用する場合、用語「治療用抗体」または「治療的抗体」または「治療的使用のための抗体」は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体およびマウス抗体を含む。これらは、ヒト、哺乳動物、脊椎動物または脊索動物から単離されたネイティブ抗体および変異誘発または遺伝子操作された抗体をさらに含む。

40

【0044】

一実施形態では、抗体は、ヒトTNFアルファ（hTNFアルファ）に結合する抗体を指す。本発明における抗体は、さらに、hTNFアルファに結合するが、hTNFベータ（リンホトキシン）には結合しないこと、およびヒトTNFアルファに加えて他の霊長類TNFアルファおよび非霊長類のTNFアルファに結合する能力を有することを特徴とする。

【0045】

本明細書で使用する場合、用語「ヒトTNFアルファ」（hTNFアルファまたは単にhTNFと本明細書で略される）は、17kDの分泌型および26kDの膜結合型として存在するヒトサイトカインを指すことが意図され、その生物学的に活性な型は非共有結合

50

している 17 kD 分子の三量体からなる。hTNF アルファの構造は、例えば、Pennica, D. ら、1984 (Nature 312: 724 ~ 729)、Davis, J. M. ら 1987 (Biochemistry 26: 1322 ~ 1326) および Jones, E. Y. ら、1989 (Nature 338: 225 ~ 228) にさらに記載されている。TNF アルファの少なくとも 1 つのエピトープの単なる結合が、受容体結合反応を阻害し、それにより、以下で言及される障害を治療するためのメカニズムを開始する。一実施形態では、抗体は有害な hTNF アルファ活性を阻害または中和する。

【0046】

一実施形態では、本発明の枠内で使用される抗体は、D2E7 もしくはアダリムマブ (Abbvie) と称される抗 TNF アルファ抗体または表面再構成技術を介して得られるその誘導体でもよい。上述の抗体のタンパク質配列は公的に入手可能であり、例えば、特許文献 2 (アダリムマブ / D2E7) または WO 97 / 29131 (D2E7) に参照される。

10

【0047】

さらなる実施形態では、上記で概要を述べた医薬組成物は標的の CXCR5、LAMP1 または VLA-2 に結合する治療用抗体を含む。

【0048】

本明細書で使用する場合、用語「CXCR5」は非無差別受容体を指す。CXCL13 は CXCR5 のリガンドであり、間質細胞、例えば濾胞樹状細胞で、およびリンパ組織で構成的に発現している。さらに、活性化 T 細胞は CXCR5 の発現を誘導またはアップレギュレートする。CXCR5 がリウマチ性関節炎の病因に関連する成熟 B 細胞で選択的に発現しているので、この受容体の遮断は、罹患者の関節炎誘発性応答をモジュレートする。

20

【0049】

特定の実施形態では、本発明の枠内で使用される抗体は抗 CXCR5 抗体、例えば、WO 2009 / 032661 に開示されている抗 CXCR5 抗体または表面再構成技術を介して得られるその誘導体でもよい。そのような抗体のタンパク質配列は公的に入手可能であり、例えば、WO 2009 / 032661 に参照される。

【0050】

本明細書で使用する場合、用語「表面再構成技術」は、非ヒト起源の表面に露出していない残基は保持されるが、表面残基はヒト残基に変えられる、ヒト化技術を指す。表面再構成技術は、分子モデリング、統計解析および変異誘発の組み合わせを使用して、標的宿主の既知の抗体の表面と似ているが、十分な抗原結合親和性および抗体の特異性を維持するように抗体可変領域の非 CDR 表面を変える。標的宿主がヒトである場合、したがって、表面再構成技術は、ヒトへ導入するための異種抗体、例えばマウス抗体の免疫原性を低減させる。抗体の表面再構成のための戦略および方法、ならびに様々な宿主内で抗体の免疫原性を低減させる他の方法が、米国特許第 5,639,641 号に開示されている。手短に言えば、好ましい方法では、(1) 抗体の重鎖および軽鎖可変領域のプールの位置アライメントを作成して、一連の重鎖および軽鎖可変領域フレームワークの表面露出位置を得る(ここで、すべての可変領域に対するアライメントの位置は少なくとも約 98% 同一である); (2) げっ歯類抗体(またはその断片)について、重鎖および軽鎖可変領域フレームワークの一連の表面露出アミノ酸残基を定める; (3) げっ歯類の一連の表面露出アミノ酸残基に最も密に同一である一連の重鎖および軽鎖可変領域フレームワークの表面露出アミノ酸残基を同定する; (4) げっ歯類抗体の相補性決定領域の任意の残基の任意の原子の 5 以内にあるアミノ酸残基を除いて、工程(2)で定められた重鎖および軽鎖可変領域フレームワークの一連の表面露出アミノ酸残基を工程(3)で同定した重鎖および軽鎖可変領域フレームワークの一連の表面露出アミノ酸残基で置換する; ならびに(5)結合特異性を有するヒト化げっ歯類抗体を生成する。したがって一実施形態では、「表面再構成された」抗体をヒト化抗体と呼ぶこともでき、逆もまた同じである。

30

40

【0051】

50

一実施形態では、本発明の枠内で使用される抗体は、D 2 E 7 もしくはアダリムマブ (A b b v i e) またはそれらのバイオシミラーと同じ重鎖および軽鎖配列を含む抗 T F N アルファ抗体である。

【 0 0 5 2 】

さらなる実施形態では、本発明の枠内で使用される抗体はアダリムマブのバイオシミラーであるか、またはアダリムマブと互換的である。

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用する場合、(承認された参照製品 / 生物学的薬物、例えば、タンパク質治療剤、抗体などの)「バイオシミラー」は、(a) 臨床的に不活性な成分の軽微な違いにもかかわらずバイオ製品が参照製品に非常に類似していることを示す分析的研究; および / または (b) 動物研究 (毒性評価を含める); および / または (c) 参照製品が認可され使用が意図される、およびバイオ製品について許認可が求められる 1 つまたはそれ以上の適切な使用条件において、安全性、純度および効力を示すのに十分である臨床研究 (免疫原性および薬物動態または薬力学の評価を含める) に由来するデータに基づいて、参照製品と類似しているバイオ製品を指す。一実施形態では、バイオシミラーのバイオ製品および参照製品は、提案された表示において指示、推奨または提唱される使用条件について同じ作用メカニズムを利用するが、これは、作用メカニズムが参照製品について知られている程度までである。一実施形態では、バイオ製品について提案された表示において指示、推奨または提唱される使用条件は、参照製品について以前に承認されている。一実施形態では、バイオ製品の投与経路、剤形および / または強度は、参照製品のものと同じである。一実施形態では、バイオ製品が製造、処理、包装、または保管される施設は、バイオ製品が安全で、純粋で、効力があり続けることを保証するように考案された基準を満たす。参照製品は、米国、ヨーロッパまたは日本の少なくとも 1 つが承認していてもよい。

【 0 0 5 4 】

一実施形態では、本発明における抗体の重鎖はアダリムマブの重鎖 C D R (C D R 1 - H、C D R 2 - H、C D R 3 - H) を含み、軽鎖はアダリムマブの軽鎖 C D R (C D R 1 - L、C D R 2 - L および C D R 3 - L) を含む。

【 0 0 5 5 】

さらなる実施形態では、本発明における抗体の重鎖は、配列番号 1 によって表されるアミノ酸配列中に存在する重鎖 C D R (C D R 1 - H、C D R 2 - H、C D R 3 - H) を含み、軽鎖は、配列番号 2 によって表されるアミノ酸配列中に存在する軽鎖 C D R (C D R 1 - L、C D R 2 - L および C D R 3 - L) を含む。

【 0 0 5 6 】

さらなる実施形態では、本発明における抗体の重鎖は、配列番号 1 によって表されるアミノ酸配列中に存在する重鎖可変ドメインを含み、軽鎖は、配列番号 2 によって表されるアミノ酸配列中に存在する軽鎖可変ドメインを含む。

【 0 0 5 7 】

さらなる実施形態では、本発明における抗体は、配列番号 1 によって表されるアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 2 によって表されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む。

【 0 0 5 8 】

免疫グロブリンの軽鎖または重鎖に関する C D R / F R の定義は、K a b a t の定義 (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>) または I M G T の定義 (L e f r a n c e Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1): 55 ~ 77; www.imgt.org) に基づいて与えることができる。両方の定義は当業者に既知であり、したがって、当業者は、これらの定義に基づいて、所与の軽鎖および重鎖のアミノ酸配列の C D R および F R を定義することができる。上述の抗体の上述のタンパク質配列は公的に入手可能であり、例えば、特許文献 2 (アダリムマブ / D 2 E 7) または W O 9 7 / 2 9 1 3 1 (D 2 E 7) に参照される。

【 0 0 5 9 】

本明細書に開示する配列に対して少なくとも 8 5 %、より詳細には、少なくとも 9 0 %

10

20

30

40

50

、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %または 1 0 0 %同一の配列を含む抗体が、本発明にさらに含まれる。

【 0 0 6 0 】

「参照配列に少なくとも 8 5 %同一の」配列は、その全長について、参照配列の全長と 8 5 %またはそれ以上、例えば 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %または 9 9 %の配列同一性を有する配列である。

【 0 0 6 1 】

「配列同一性」のパーセンテージは、比較ウィンドウに関して最適に整列させた 2 つの配列を比較することによって決定することができ、2 つの配列の最適なアライメントのために、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の一部は、（付加または欠失を含まない）参照配列と比べて、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含むことができる。パーセンテージは、両方の配列に同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が存在する位置の数を決定して、一致した位置の数を得、一致した位置の数を比較ウィンドウ中の位置の総数で割り、その結果に 1 0 0 を掛けて、配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。比較のための最適な配列アライメントは、例えば N e e d l e m a n および W u n s c h J . M o l . B i o l . 4 8 : 4 4 3 (1 9 7 0) のアルゴリズムを使用して、グローバルペアワイズアライメントによって行われる。例えば、B L O S U M 6 2 行列および以下のパラメーター、ギャップ開始 = 1 0、ギャップ伸長 = 0 . 5 を用いるプログラム N e e d l e を使用して、配列同一性のパーセンテージを容易に決定することができる。

10

20

【 0 0 6 2 】

具体的な実施形態では、本発明による使用のための抗体はネイキッド抗体であり、すなわち、これは、抗体 - 薬物共役物を形成するために、いかなる薬物にも連結していない。

【 0 0 6 3 】

医薬組成物

本明細書で使用する場合、用語「医薬組成物」は、活性成分の生物活性を確実に有効にすることができるような形態であり、且つ組成物が投与されるであろう対象に対して有意に毒性を持つ付加的な成分を含まない、液体製造物を指す。そのような組成物は無菌である。「医薬的に許容可能な」賦形剤（ビヒクル、添加物）は、対象への投与に適したものである。

30

【 0 0 6 4 】

「医薬製剤」または「製剤」は、活性薬物を化学物質と組み合わせて最終的な医薬品を生成するプロセスを指すが、そのプロセスの生成物も指し、したがって、最終的な製剤は、カプセル剤、丸剤、錠剤、乳剤または組成物のような医薬品を指す。したがって、一実施形態では、医薬製剤は医薬組成物である。

【 0 0 6 5 】

一実施形態では、本発明の医薬組成物は安定的である。

【 0 0 6 6 】

「安定性」は、化学的安定性および物理的安定性を指し、当技術分野で説明され、例えば P e p t i d e a n d P r o t e i n D r u g D e l i v e r y、2 4 7 ~ 3 0 1、V i n c e n t L e e 編、M a r c e l D e k k e r , I n c .、N e w Y o r k、N . Y .、P u b s . (1 9 9 1) および J o n e s , A . A d v . D r u g D e l i v e r y R e v . 1 0 : 2 9 ~ 9 0 (1 9 9 3) で概説されている様々な分析法を使用して、定性的および/または定量的に評価することができる。これらの方法は、（例えば、サイズ排除クロマトグラフィーを使用する、混濁度を測定することによる、および/または目視検査による）凝集体形成の評価；陽イオン交換クロマトグラフィーまたはキャピラリーゾーン電気泳動を使用して電荷の不均一性を評価することによるもの；アミノ末端またはカルボキシ末端の配列解析；質量分析；還元抗体とインタクト抗体を比較するための S D S - P A G E 分析；ペプチドマップ（例えばトリプシン性または L Y S - C ）分析；抗体の生物活性または抗原結合機能を評価すること；などを含む。不安定性は

40

50

、以下のいずれか１つまたはそれ以上を伴い得る：凝集、脱アミド（例えば、A s n 脱アミド）、酸化（例えば、M e t 酸化）、異性化（例えば、A s p 異性化）、クリッピング／加水分解／断片化（例えば、ヒンジ領域の断片化）、スクシンイミド形成、不對システイン、N 末端伸長、C 末端プロセシング、グリコシル化の変化など。本明細書における「脱アミドされた」モノクローナル抗体は、その１つまたはそれ以上のアスパラギン残基が、翻訳後修飾によって、例えばアスパラギン酸またはイソアスパラギン酸に修飾されたものである。安定性を測定するために、本発明の組成物の試料を安定性研究で試験することができ、この場合、選択された期間にわたってストレス条件に試料をさらし、続いて、適切な分析法を使用して、化学的および物理的安定性を定量的および定性的に分析する。

【 0 0 6 7 】

したがって、安定性は、選択された温度で選択された期間にわたって、例えば、- 8 0 、 - 2 0 、 5 、 2 5 および 5 5 で 1 か月間まで試料を貯蔵することによって、および定性的および定量的分析のために、例えば S E C 、 W C X 、光遮断、混濁度および D L S を使用することによって、測定することができる。

【 0 0 6 8 】

上記によれば、「安定的な組成物」は、抗体が物理的に安定かつ化学的に安定であり、および／または貯蔵の際にその生物活性を保持するものである。

【 0 0 6 9 】

「化学的安定性」は、化学的に変化した形態の抗体を検出および定量することによって評価することができる。化学的変化としては、サイズの変化（例えば、クリッピング）を挙げることができ、これは、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、S D S - P A G E 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（M A L D I / T O F M S ）を使用して評価することができる。他のタイプの化学的変化としては、電荷の変化（例えば、脱アミドの結果として生じる）が挙げられ、これは、例えば、イオン交換クロマトグラフィーによって評価することができる。本発明においては、化学的安定性は、例えば、弱陽イオン交換クロマトグラフィー（W C X ）によって測定され、2 ～ 3 % の変化を有意と考えることができる。

【 0 0 7 0 】

「物理的安定性」は、本発明において、凝集、沈殿および／または変性の兆候がない抗体を実質的に指す。物理的安定性にアクセスする方法は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー（S E C ）、動的光散乱（D L S ）、光遮蔽（L O ）および色および透明性である。サイズ排除クロマトグラフィー（S E C ）については、含有量の 1 % の違いを、使用するカラム、操作圧力、緩衝液の速度に応じて、試験条件下で、本発明において有意差があると考えることができる。

【 0 0 7 1 】

医薬組成物中の抗体がその意図された目的について生物学的に活性である場合、抗体は医薬組成物中で「その生物活性を保持する」。例えば、（例えば、抗原結合アッセイで決定した際に）医薬組成物中の抗体の生物活性が、医薬組成物が製造されたときに示された生物活性の約 3 0 % 、約 2 0 % または約 1 0 % 以内（アッセイの誤差内）である場合、生物活性は保持される。当業者に既知であるように、適切な医薬的活性組成物にとって最も重要であることは、溶液中で製剤化される単量体抗体の量である。凝集体はいくつかのおよび重度の副作用の発生に關与する可能性があるため、単量体の含有量は、薬物、すなわち抗体またはその抗体断片の実際の医薬的に活性な量を示す。

【 0 0 7 2 】

本発明における用語「ストレス」または「ストレス条件」は、機械的ストレス、熱ストレスまたは凍結融解に起因するストレスを指す。機械的ストレス、熱ストレスまたは凍結融解に起因するストレスをシミュレートするための方法および条件は多様であり、当業者に既知である。機械的ストレスは、例えば、2 0 0 r p m で 2 ～ 3 時間の攪拌でもよい。熱ストレスは、例えば、ある時間にわたる低下したまたは増大した温度での貯蔵を指し、一例を挙げれば、- 8 0 、 - 2 0 、 5 、 2 5 および 4 0 で試料を貯蔵すること

10

20

30

40

50

ができ、例えば、 -80 、 -20 および 40 がストレス条件を指す。 -80 で 24 時間の凍結および室温で 90 分間の融解のいくつかのサイクルに試料をさらすことによって、試料を凍結融解由来のストレスにさらすことができ、サイクルは 5 回繰り返され、5 サイクル目は、例えば、 -80 で 72 時間、より長く維持される。

【0073】

一実施形態では、組成物は機械的ストレスに対して安定性が増大している。したがって、例えば Variomag Multipoint HP を使用して、例えばバイアル中で試料を攪拌することによって、例えば 200 rpm で少なくとも 2 時間または 3 時間、組成物にストレスを与えることができる。

【0074】

一実施形態では、組成物は熱安定性が増大している。したがって、 40 、 50 または 55 で少なくとも 1 週間または 1 か月間まで、組成物にストレスを与えることができる。 40 で 3 か月間または 6 か月間まで、組成物にさらにストレスを与えることができる。

【0075】

さらなる実施形態では、組成物は凍結融解に起因するストレスに対して安定性が増大している。したがって、組成物を -80 で 24 時間で凍結し、続いて室温で 90 分間融解することができ、サイクルは、例えば 5 回繰り返される。5 サイクル目は、例えば -80 で 72 時間維持することができる。

【0076】

「低下した」、「より高い」、「より少ない」、「より小さい」、「増大した」、「より低い」または「より少ない」などのような用語は、同様に、2 つの状況間の量的な差を示し、2 つの状況間の少なくとも統計的に有意な差を指す。

【0077】

一実施形態では、組成物は 55 で 1 週間安定である。

【0078】

さらなる実施形態では、組成物は 40 で 1 か月、3 か月または 6 か月間安定である。

【0079】

さらなる実施形態では、組成物は 200 rpm で 3 時間攪拌した後で安定である。

【0080】

追加的な実施形態では、組成物は凍結融解後に安定であり、凍結融解は、 -80 で 24 時間の組成物の凍結、それに続く室温で 90 分間の融解を指し、サイクルは 5 反復繰り返され、5 サイクル目では、温度は -80 で 72 時間維持される。

【0081】

同じ実施形態では、安定的は、SEC で測定した場合に、すべてのピークの総面積に対して、90 % を超える、91 % を超える、92 % を超える、93 % を超える、94 % を超える、95 % を超える、96 % を超える、97 % を超えるまたは 98 % を超える単量体 % を有する組成物を指す。

【0082】

あるいは、安定的は、DLS で測定したときの体積でおよび / または強度で分析した場合に、90 % を超える、91 % を超える、92 % を超える、93 % を超える、94 % を超える、95 % を超える、96 % を超える、97 % を超える、98 % を超えるまたは 99 % を超える単量体 % 含有量を有する組成物を指すことができる。

【0083】

一実施形態では、本発明の組成物は安定性が向上している。

【0084】

さらなる実施形態では、本発明の組成物はストレスに対して安定性が向上しており、ストレスは機械的ストレス、熱ストレスまたは凍結融解に起因するストレスから選択される。

【0085】

本発明における「安定性の向上」および／または「安定性の増大」は、上記のように定性的および／または定量的に評価され、同じ抗体の参照組成物の物理的および／または化学的安定性と比べて増大している、物理的および／または化学的安定性を指す。

【0086】

ある種の実施形態では、参照組成物は、アダリムマブ、塩化ナトリウム、一塩基性リン酸ナトリウム二水和物、二塩基性リン酸ナトリウム二水和物、クエン酸ナトリウム、クエン酸一水和物、マンニトール、ポリソルベート80および注射用水を含む、特許文献2の市販のアダリムマブ製剤である。

【0087】

上記に従って、一実施形態では、本発明の医薬組成物は、参照組成物と比較して、

- (a) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって測定したときの、約55 で1週間貯蔵した後の低下した凝集体量、
- (b) SECで測定したときの、約55 で1週間貯蔵した後のより多い単量体量、
- (c) SECで測定したときの、約55 で1週間貯蔵した後のより少ない断片からなる群から選択される少なくとも1つの特色を有する。

【0088】

さらに、上記に従って、一実施形態では、本発明の医薬組成物は、

- (a) 組成物が、55 で1週間の熱ストレスに対して安定的であること、
 - (b) 組成物が、55 で3時間の攪拌の機械的ストレスに対して安定的であること、および／または
 - (c) 組成物が、凍結融解に起因するストレスに対して安定的であり、凍結融解は、-80 で24時間の組成物の凍結、それに続く室温で90分間の融解を指し、サイクルは5反復繰り返され、5サイクル目では、温度は-80 で72時間維持されること
- からなる群から選択される少なくとも1つの特色を有し、ここで安定性は、以下の特徴：
- i) 組成物が、SECで測定した場合に、すべてのピークの総面積に対して、90%を超える、91%を超える、92%を超える、93%を超える、94%を超える、95%を超える、96%を超える、97%を超えるまたは98%を超える単量体含有量%を有すること、
 - ii) 組成物が、SECで測定した場合に、すべてのピークの総面積に対して、3%未満、2%未満、1.5%未満、1.4%未満、1.3%未満、1.2%未満、1.1%未満、1.0%未満の凝集体含有量%を有すること、および／または
 - iii) 組成物が、SECで測定した場合に、すべてのピークの総面積に対して、3%未満、2%未満、1.5%未満、1.4%未満、1.3%未満、1.2%未満、1.1%未満、1.0%未満の断片含有量%を有すること
- の少なくとも1つを指す。

【0089】

さらに、上記に従って、一実施形態では、本発明の医薬組成物は、参照組成物と比較して、

- (a) 動的光散乱法 (DLS) によって測定したときの、約40 で3か月間貯蔵した後のより多い単量体量、および
 - (b) 光遮断 / 光遮蔽 (LO) によって測定したときの、40 で1～6か月間貯蔵した後の肉眼では見えない粒子の低下した量
- からなる群から選択される少なくとも1つの特色を有する。

【0090】

さらに、上記に従って、一実施形態では、本発明の医薬組成物は、40 で1～6か月、特に、1か月、3か月または6か月の熱ストレスに対して安定的であり、安定的は以下の特徴の少なくとも1つを指す。

- i) 組成物が、DLSによって測定された体積によって分析した場合に、90%を超える、91%を超える、92%を超える、93%を超える、94%を超える、95%を超える

、 96%を超える、97%を超える、98%を超えるまたは99%を超える単量体含有量%を有すること、

i i) 組成物が、DLSによって測定された強度によって分析した場合に、90%を超える、91%を超える、92%を超える、93%を超える、94%を超える、95%を超える、96%を超える、97%を超える、98%を超えるまたは99%を超える単量体含有量%を有すること、

i i i) 組成物が、LOによって測定した場合に、 $> 10 \mu\text{m}$ を6000粒子未満、 $> 25 \mu\text{m}$ を600粒子未満および $> 1 \mu\text{m}$ を10000粒子未満有すること。

【0091】

本発明者らは、塩化ナトリウムの添加は抗hTNF抗体の安定性を支持しないことを示した。さらに、塩化ナトリウムの添加は抗体の変性温度(T_M)に負の効果を及ぼす。

【0092】

したがって、一実施形態では、組成物は、7mg/ml未満の塩化ナトリウム、6mg/ml未満、5mg/ml未満、2mg/ml未満の塩化ナトリウムを含み、例えば塩化ナトリウムを含まない。

【0093】

組成物が塩化ナトリウムを含まない場合は、組成物は塩素酸ナトリウムを本質的に含まない。

【0094】

本明細書で使用する場合、用語「本質的に」は、塩素酸ナトリウム分子が積極的に加えられない、すなわち、加えられることが意図されない組成物を示す。微量の塩素酸ナトリウムは、5mg/ml未満、3mg/ml未満、2mg/ml未満、1mg/ml未満、例えば0.5mg/ml未満、より好ましくは0.05mg/ml未満の濃度で存在し得る。

【0095】

一実施形態では、組成物の抗体は治療有効量で含まれる。

【0096】

本発明における薬理学的意味では、抗体の「治療有効量」または「有効量」は、抗体が有効な治療に関して、障害の予防または治療において有効な量を指す。したがって、組成物は、1~150mg/mlの抗体、1~140mg/ml、10~130mg/ml、15~110mg/ml、20~100mg/ml、25~90mg/ml、30~80mg/ml、30~70mg/ml、40~70mg/ml、40~60mg/mlの抗体、例えば、45~55mg/ml、例えば、45、56、47、48、49、50、51、52、53、54、55mg/mlの抗体を含むことができる。上で列挙した濃度の中間の範囲も本発明の一部であることが意図される。例えば、上で列挙した値のいずれかの組み合わせを上限および/または下限として使用する値の範囲が含まれることが意図される。

【0097】

本明細書で使用する場合、「緩衝液」は、その酸-塩基共役成分の作用によってpHの変化に抵抗する緩衝溶液を指す。本明細書において「pH」は、25の組成物の酸性度または塩基度を指す。組成物のpHを測定する標準的な方法は、当業者に既知である。一例を挙げれば、pHは、一般的には25でpHメーターを使用して測定される。一般的には、pHの測定は、機器をキャリブレーションすること、十分に混合した試料へ電極を設置すること、次いで、pHメーターから直接的にpHを読み取ることからなる。本発明者らは、スクリーニング研究において、高い緩衝液濃度ほど、組成物に含まれる抗体のアンフォールディング温度が低いことを示した。

【0098】

したがって、組成物は、1~100mMの少なくとも1つの緩衝剤、1~50mMの少なくとも1つの緩衝剤、1~30mMの少なくとも1つの緩衝剤、1~15mMの少なくとも1つの緩衝剤、例えば、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11

10

20

30

40

50

m M、12 m M、13 m M、14 m M、15 m Mのような5～15 m Mの少なくとも1つの緩衝剤を含む。一実施形態では、組成物は、10 m Mの少なくとも1つの緩衝剤を含む。

【0099】

本発明者らは、他の緩衝系と比べて、酢酸塩およびヒスチジン緩衝液が抗hTFN抗体の安定性を強く向上させることを示した。抗CXCR5抗体が40で6か月間まで酢酸緩衝液中で安定的であることをさらに示した。

【0100】

したがって、本発明における少なくとも1つの緩衝剤は酢酸塩またはヒスチジンである。

10

【0101】

一実施形態では、少なくとも1つの緩衝剤は、2つ、3つまたはそれ以上の緩衝剤でもよい。したがって、一実施形態では、少なくとも1つの緩衝剤は2つの緩衝剤である。一例を挙げれば、2つの緩衝剤は酢酸塩およびヒスチジンでもよく、得られた緩衝液は酢酸-ヒスチジン緩衝液またはヒスチジン-酢酸緩衝液である。

【0102】

一実施形態では、少なくとも1つの緩衝液は酢酸緩衝液であり、同じ実施形態では、組成物のpHは5～6.5、例えば5.0～6.0、例えば5.2～5.8、例えば5.4～5.6、例えば5.4、5.5、5.6である。

【0103】

当業者に既知であるように、酢酸緩衝液は、塩基としての酢酸塩、例えば酢酸ナトリウムと酸としての酢酸の混合物からなる。特定の濃度とpHの酢酸緩衝液を調製するために、当業者は、酢酸と混合しなければならない、例えば酢酸ナトリウムまたは酢酸ナトリウム三水和物の量を計算する必要がある。例えば10 m Mの酢酸緩衝液(pH 5.5) 1 mlについては、酢酸ナトリウム三水和物1.17 mgを酢酸0.08 mgと混合し、酢酸は通常pH調整のために使用される。したがって、特定の実施形態では、組成物は、1.17 mg/mlの酢酸ナトリウム三水和物および0.08 mg/mlの酢酸を含むことができ、その結果、組成物は、10 m Mの酢酸緩衝液を含み、pH 5.5のものである。

20

【0104】

一実施形態では、少なくとも1つの緩衝液はヒスチジン緩衝液であり、同じ実施形態では、組成物のpHは5～6.5、例えば5.5～6.5、例えば5.7～6.3、例えば5.9～6.1、例えば5.9、6.0、6.1である。

30

【0105】

ヒスチジン(pK 5.97)は、皮下、筋肉内および腹膜の注射にとって好ましい緩衝液である。

【0106】

本発明者らは、さらに、様々な賦形剤、例えば、糖およびポリオールの安定化効果を試験した。驚いたことに、μDSC実験において、トレハロースおよびマンニトールが最も高いT_m温度を示すことを発見した。

【0107】

したがって、一実施形態では、本発明の組成物は、トレハロースおよびマンニトールからなる群から選択される少なくとも1つの賦形剤、例えばマンニトールを含む。

40

【0108】

本発明の一実施形態では、組成物は、1～70 mg/mlの賦形剤、例えば1～60 mg/mlの賦形剤、10～50 mg/mlの少なくとも1つの賦形剤を含む。

【0109】

トレハロースは、2つのアルファ-グルコースユニット間のアルファ、アルファ-1,1-グルコシド結合によって形成されるアルファ結合した二糖(アルファ-D-グルコピラノシル-(1→1)-アルファ-D-グルコピラノシド)である、非還元糖である。一実施形態では、組成物は、1～70 mg/mlのトレハロース、例えば10～70 mg/ml

50

ml のトレハロース、例えば 20 ~ 70 mg / ml のトレハロース、例えば 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65 および 70 mg / ml のトレハロース、例えば 50 mg / ml のトレハロースを含む。

【0110】

一実施形態では、組成物は、1 ~ 60 mg / ml のマンニトール、1 ~ 50 mg / ml、例えば 1 ~ 40 mg / ml、例えば 7.5 ~ 40 mg / ml のマンニトール、例えば 7.5 ~ 30 mg / ml のマンニトール、例えば 15 ~ 25 mg / ml のマンニトール、例えば 7.5、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30 mg / ml、例えば 12 mg / ml または 20 mg / ml を含むことができる。一実施形態では、少なくとも 1 つの賦形剤は、2 つ 3 つまたはそれ以上の賦形剤でもよい。したがって、一実施形態では、少なくとも 1 つの賦形剤はマンニトールおよびトレハロースである。

10

【0111】

本発明者らはアミノ酸の安定化効果をさらに試験し、グリシン、L - アスパラギンおよびグルタミンが、 μ D S C 実験において、最も高い抗体変性温度を示した。

【0112】

本明細書で使用する場合、用語「アミノ酸」は、カルボキシル基に対して α 位に位置するアミノ部分を有する、医薬的に許容可能な有機分子を示す。アミノ酸の例としては、以下が挙げられる：アルギニン、グリシン、オルニチン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、イソロイシン、ロイシン、アラニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリンおよびプロリン。用いられるアミノ酸は場合により L 型である。

20

【0113】

一実施形態では、組成物は、1 ~ 50 mg / ml、1 ~ 40 mg / ml、例えば 1 ~ 30 mg / ml の少なくとも 1 つのアミノ酸を含む。

【0114】

一実施形態では、少なくとも 1 つのアミノ酸はグリシンである。組成物は、5 ~ 30 mg / ml のグリシン、例えば 10 ~ 20 mg / ml のグリシン、例えば 12 ~ 16 mg / ml のグリシン、例えば 12、13、14、15、16、例えば 15 mg / ml を含むことができる。

【0115】

さらなる実施形態では、少なくとも 1 つのアミノ酸はアスパラギンでもよい。組成物は、1 ~ 20 mg / ml のアスパラギン、例えば 1 ~ 10 mg / ml のアスパラギン、例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、例えば 2 mg / ml を含むことができる。

30

【0116】

用語「表面活性剤」および「界面活性剤」は、本明細書で互換的に使用することができる。例示的界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート 20、80 など）またはポロキサマー（例えば、ポロキサマー 188）が挙げられる。加えられる界面活性剤の量は、製剤化された抗体の凝集を低減させる、および / または組成物中の粒子形成を最小限にする、および / または吸着を低減させるようなものである。

40

【0117】

一実施形態では、表面活性剤はポリソルベートである。ポリソルベートは、脂肪酸でエステル化された P E G 化ソルビタン（ソルビトール誘導体）に由来する乳化剤である。このクラスの薬剤には、中でも、ポリソルベート 20、21、40、60、61、65、80、81、85 および 120 が含まれる。

【0118】

さらなる一実施形態では、組成物は、表面活性剤ポリソルベート 20（一般的な商業ブランド名としては、A l k e s t T W 20 および T w e e n 20 が挙げられる）ならびに / またはポリソルベート 80（一般的な商業ブランド名としては、A l k e s t T W

50

80、Canarcel、Poegasorb80、Tween80が挙げられる)。組成物は、0.001%w/v~1%w/vの表面活性剤、例えば0.001%w/v~0.15%w/vの表面活性剤、例えば0.01%w/v~0.15%w/vの表面活性剤を含むことができる。

【0119】

一実施形態では、組成物は、0.001%w/v~0.15%w/vのポリソルベート80、例えば0.01%w/v~0.15%w/v、例えば0.05%w/v~0.15%w/v、例えば0.08%w/v~0.12%w/v、例えば0.08、0.085、0.09、0.095、0.1、0.115、0.12%w/vのポリソルベート80を含む。本発明の組成物は、例えば約0.1%w/vのポリソルベート80を含む。

10

【0120】

別の実施形態では、組成物は、0.001%w/v~0.15%w/vのポリソルベート20、例えば0.005%w/v~0.1%w/v、例えば0.008%w/v~0.05%w/v、例えば0.008%w/v~0.015%w/v、例えば0.008%w/v~0.012%w/v、例えば0.008、0.009、0.01、0.011、0.012、0.013、0.014、0.015%w/vを含む。本発明の組成物は、例えば0.01%w/vのポリソルベート20を含む。

【0121】

一例によれば、本発明の組成物は、50mg/mlの抗体、pH5.5の10mM酢酸緩衝液、20mg/mlのマニトール、15mg/mlのグリシンおよび0.1%w/vのポリソルベート80(PS80)を含む。より詳細には、一例によれば、本発明の組成物は、50mg/mlの抗体、1.17mg/mlの酢酸ナトリウム三水合物、0.08mg/mlの酢酸、20mg/mlのマニトール、15mg/mlのグリシンおよび0.1%w/vのPS80を含み、組成物のpHは5.5である。

20

【0122】

別の例によれば、本発明の組成物は、50mg/mlの抗体、pH5.5の10mM酢酸緩衝液、20mg/mlのマニトール、15mg/mlのグリシンおよび0.01%w/vのポリソルベート20(PS20)を含む。より詳細には、別の例によれば、本発明の組成物は、50mg/mlの抗体、1.17mg/mlの酢酸ナトリウム三水合物、0.08mg/mlの酢酸、20mg/mlのマニトール、15mg/mlのグリシンおよび0.01%w/vのPS20を含み、組成物のpHは5.5である。

30

【0123】

さらなる例によれば、本発明の組成物は、41mg/mlの抗体、pH5.5の10mM酢酸緩衝液、20mg/mlのマニトール、15mg/mlのグリシンおよび0.1%w/vのPS80を含む。

【0124】

さらなる例によれば、本発明の組成物は、50mg/mlの抗体、pH5.5の10mM酢酸緩衝液、20mg/mlのマニトール、15mg/mlのグリシン、0.1%w/vのPS80および2mg/mlのNaClを含む。

【0125】

さらなる例によれば、本発明の組成物は、50mg/mlの抗体、pH5.5の10mM酢酸緩衝液、15mg/mlのグリシンおよび0.01%w/vのPS20を含む。

40

【0126】

さらなる例によれば、本発明の組成物は、50mg/mlの抗体、pH5.5の10mM酢酸緩衝液、12mg/mlのマニトール、0.1%w/vのPS80および6.165mg/mlのNaClを含む。

【0127】

さらなる例によれば、本発明の組成物は、50mg/mlの抗体、pH6.0の7.45mMヒスチジン緩衝液、12mg/mlのマニトール、0.1%w/vのPS80および6.165mg/mlのNaClを含む。

50

【0128】

一実施形態では、1つまたはそれ以上の他の医薬的に許容可能な担体、賦形剤または安定剤、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版、Osol, A. 編(1980)に記載されているものを、それらが組成物の所望の特徴に著しく悪影響を及ぼさないという条件で、組成物に含めることができる。許容される担体、賦形剤または安定剤は、用いられる投与量および濃度で受容者に無毒であり、さらなる緩衝剤；共溶媒；アスコルビン酸およびメチオニンを含めた抗酸化剤；EDTAのようなキレート剤；金属錯体（例えば、亜鉛-タンパク質錯体）；ポリエステルのような生分解性ポリマー；ならびに/またはナトリウムのような塩形成対イオンを含む。

10

【0129】

治療を受ける特定の適応症に必要である場合、本発明の組成物を1つまたはそれ以上の他の治療剤、好ましくは、組成物の抗体に悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものと組み合わせることもできる。そのような治療剤は、所期の目的に有効な量で組み合わせ中に適切に存在する。

【0130】

医薬組成物を使用する医薬および治療

一実施形態では、本発明は、治療有効量の本発明の医薬組成物をそれらを必要とする対象に投与することを含む、疾患または障害を治療または予防する方法を提供する。

【0131】

本発明は、医薬として使用するための本発明の医薬組成物にも関する。本発明は、さらに、対象において疾患または障害を治療するための医薬を製造するための本発明の医薬組成物の使用に関する。一実施形態では、本発明は、対象において疾患または障害を治療するための本発明の医薬組成物の使用に関する。

20

【0132】

用語「対象」または「個体」は互換的に使用され、例えば、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物でもよい。例えば、対象は、コウモリ；フェレット；ウサギ；ネコ科の動物（ネコ）；イヌ科の動物（イヌ）；霊長類（サル）、ウマ科の動物（ウマ）；男性、女性および子供を含めたヒトである。一実施形態では、「対象」はヒトを指す。

【0133】

本発明において、用語「治療すること」または「治療」は、治療的使用（すなわち、所与の疾患を有する対象に対する）を指し、そのような障害または状態の1つまたはそれ以上の症状の進行を逆行させる、軽減する、阻害することを意味する。したがって、治療は、疾患の完全な治癒につながる治療だけでなく、疾患の進行を遅くするおよび/または対象の生存を延ばす治療も指す。

30

【0134】

「予防すること」は、予防的使用（すなわち、所与の疾患を発症することがあり得る対象に対する）を意味する。

【0135】

「疾患」または「障害」は、抗体による治療から恩恵を受けるとされる任意の状態である。これらは、問題になっている障害に対象を罹りやすくする病的状態を含めて、慢性および急性の障害または疾患を含む。

40

【0136】

用語「治療を必要としている」は、障害を既に有する対象および障害が予防されるべき対象を指す。

【0137】

一実施形態では、障害は、TNFアルファ活性が有害である障害を指す。

【0138】

本明細書で使用する場合、用語「TNFアルファ活性が有害である障害」は、障害に罹患している対象におけるTNFアルファの存在が、障害の病態生理に関与するか、障害の

50

悪化の一因となる因子であるかのいずれかであることが示されているか、こうした疑いがある、疾患および障害を含む。したがって、TNFアルファ活性が有害である障害は、TNFアルファ活性の阻害が障害の症状および/または進行を軽減することが期待される障害である。そのような障害は、例えば、障害に罹患している対象の生体液のTNFアルファ濃度の増大（例えば、対象の血清、血漿、滑液などにおけるTNFアルファ濃度の増大）によって証明することができ、この濃度は、例えば、上記の抗TNFアルファ抗体を使用して検出することができる。TNFアルファ活性が有害である障害に関する多数の例が存在する。TNFアルファ活性が有害である障害の例は、参照によって本明細書に組み入れる米国出願第60/397275号に記載されている。TNFアルファ活性が有害である例は、それぞれ参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第6,015,557号、第6,177,077号、第6,379,666号、第6,419,934号、第6,419,944号、第6,423,321号および第6,428,787；米国特許出願第US2001/0016195号、第US2001/0004456号および第US2001/026801号；WO00/50079およびWO01/49321にも記載されている。

10

【0139】

一実施形態では、疾患または障害は、尋常性乾癬、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、リウマチ性関節炎、多関節型若年性特発性関節炎である。

【0140】

別の実施形態では、障害は、非定型のまたは異常なCXCR5バイオロジーおよび機能に関連する障害を指す。

20

【0141】

本明細書で使用する場合、用語「非定型のまたは異常なCXCR5バイオロジーおよび機能に関連する障害」は、CXCL13または他のCXCR5リガンドの過剰発現またはレベルの増大、B細胞レベルの増大、B細胞活性レベルの増大、CXCR5レベルの増大またはCXCR5の不適切な代謝および活性を特徴とするまたはこれらに起因する障害を指す。そのような障害としては、自己免疫障害、例えば、狼瘡、シェーグレン症候群、重症筋無力症および多発性硬化症；大腸炎、リウマチ性関節炎または乾癬性関節炎が挙げられる。

【0142】

「有効量」は、所望の治療的または予防的な結果を達成するのに必要な投与量および期間での有効な量を指す。

30

【0143】

本発明の医薬組成物の「治療有効量」は、個体の病態、年齢、性別および体重ならびに本発明における抗体が所望の治療結果を引き出す能力のような要因に従って変動し得る。治療有効量は、抗体の任意の有毒なまたは有害な作用を治療的有益作用が上回る量を包含する。治療有効量は、利益、例えば臨床的有用性を与えるのに十分である量も包含する。

【0144】

当分野で通常の技術を有する医師または獣医師は、必要とされる有効量の本発明の医薬組成物を容易に決定し、処方することができる。例えば、医師または獣医師は、所望の治療効果を達成するために、必要とされるより低いレベルで本発明の組成物の用量を開始することができ、所望の効果が得られるまで次第に投与量を増大させる。

40

【0145】

成人では、組成物の用量は、例えば、2週ごとに与えられる40mgでもよい。例えばクローン病および例えば乾癬を有する成人については、初期（導入）用量は80mgでもよく、その後、例えば1週後に、例えば2週ごとに40mgが続く。潰瘍性大腸炎については、例えば最初の2用量が、通常、例えば2週間離して与えられる160mgおよび80mgであり、その後、例えば2週ごとに40mgが続く。

【0146】

一実施形態では、有効量の医薬組成物は、TNFアルファ活性を阻害するのに、例えば

50

、有害なTNFアルファ活性に付随する状況の様々な形態的および身体的症状を予防するのに必要または十分な量である。

【0147】

医薬組成物は、例えばボラスとしての、またはある期間にわたる持続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液包内または髄腔内投与によるもの、例えば筋肉内投与または皮下投与によるものなどの既知の方法に従って対象に投与される。

【0148】

一実施形態では、投与は皮下投与である。したがって、本発明の一実施形態では、前記医薬組成物は皮下投与に適している。薬物の皮下投与または注射では、薬物は、皮下組織（皮膚と総称される真皮および表皮の真下にある皮膚層）にボラスを送達する。皮下注射は、感染の危険性の低減および投与の容易さにより、それぞれの訓練を受けていることを条件に医学的に非熟練者が実施することができるので、インスリンのような医薬品の投与において非常に有効であり、十分に確立されている。したがって、皮下投与は外来投与、例えば医学的に非熟練者が薬物投与を担当する、社会基盤が貧弱な地域における投与、または自宅での使用に適する。

10

【0149】

皮下投与は、例えば、自己免疫疾患（例えば、リウマチ性関節炎もしくは強直性脊椎炎）のような多くの慢性疾患または標的療法が原因で慢性もしくはほぼ慢性になる多くの癌タイプの場合と同様に、反復治療を必要とする治療レジメンで重要である。

20

【0150】

しかし、上述の理由のために、皮下投与に適している医薬組成物には、一般の人々によって最適以下の貯蔵条件にさらされる危険性がより高い（例えば、冷蔵連鎖が中断されるか、組成物が光または突然の温度変化にさらされる）ことに留意されたい。さらに、1回の注射で投与される体積がかなり制限される（0.1～2.0 mLまで）ので、皮下投与組成物は比較的高濃度の治療剤を必要とする。さらに、注射中の針の痛みを低減させるために針を細くする必要があり、これは、注射溶液の低い粘性を要求する。最後に、皮下注射は、針を抜いた後でさえも、注射部位に痛みをもたらし得る。これは、おそらく、タンパク質溶液の成分、例えば、緩衝分子の種類およびモル浸透圧濃度の影響を受け、それぞれの療法についての対象の服薬遵守に著しい影響を及ぼし得る。したがって、安定性が向上し、対象の服薬遵守が向上した本発明による組成物は、皮下投与に適する。

30

【0151】

疾患の予防または治療については、抗体の適切な投与量は、上記で定義された治療される疾患のタイプ、疾患の重症度および経過、予防目的または治療目的のためにモノクローナル抗体が投与されるかどうか、以前の療法、対象の病歴およびモノクローナル抗体に対する応答、ならびに主治医の自由裁量に依存する。抗体は、1回でまたは一連の治療にわたって、適切に対象に投与される。例えば、1つまたはそれ以上の別々の投与によろうと、持続注入によろうと、疾患のタイプおよび重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $50\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1\sim 20\text{mg}/\text{kg}$ ）の抗体が対象への投与に対する初期候補投与量である。抗体の投与量は、通常、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ である。

40

【0152】

別の治療剤が投与される場合は、別の治療剤は、通常、既知の投与量で投与され、したがって、または場合により、薬物の組み合わせ作用または治療剤の投与に起因し得る負の副作用が原因で低下される。そのような治療剤の調製および投薬スケジュールは、製造者の説明書に従って、または熟練の医師によって経験的に決定されたように使用することができる。

【0153】

製造品

本明細書において、本発明は本発明の医薬組成物を含む装置にも関する。そのような装置は、0.1 mL～2 mLの間（単回使用）または0.5～1.5 mLの間の液量を保持

50

することができる。一実施形態では、液量は約 0.8 または約 1.0 ml である。

【0154】

一実施形態では、装置は皮下送達用である。皮下送達については、注射器（例えば、予め充填された注射器）；自動インジェクター；インジェクション装置（例えば、INJECT-EASE（商標）および GENJECT（商標）装置）；インジェクターペン（例えば、GENPEN（商標））；または懸濁組成物の皮下投与に適した他の装置を介して組成物を投与することができる。一実施形態では、本明細書の装置は予め充填された注射器である。

【0155】

関連した態様では、本発明は、本発明の医薬組成物を容器に充填することを含む、製造品の製造方法を提供する。

10

【0156】

製造品の容器の実施形態は、以下のものを含む：注射器（例えば、予め充填された注射器）、自動インジェクター、ボトル、バイアル（例えば、二重チャンバーバイアル）および試験管など。容器は懸濁組成物を保持し、容器上のラベルまたは容器に付随するラベルは、使用のための指示を示すことができる。製造品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、注射器、および先のセクションで述べた使用のための説明を含む添付文書を含めた、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含むことができる。

【0157】

キット

20

本発明の別の態様によれば、キットが提供され；前記キットは、少なくとも 1 つの上記の医薬組成物を含む少なくとも 1 つの容器およびインジェクション装置を含む。一実施形態では、キットまたはインジェクション装置は、筋肉内投与または皮下投与、例えば皮下投与に適している。一実施形態では、キットは、組成物の投与、例えば皮下投与に関する説明書をさらに含む。

【0158】

本発明のさらに別の実施形態によれば、医薬組成物を含む装置の使用または本発明によるキットの使用が提供される。さらなる実施形態では、本発明は、上記の少なくとも 1 つの疾患の治療のための、本発明の医薬組成物を含む装置の使用または本発明におけるキットの使用に関する。

30

【0159】

凝集を低減させる方法

上記を鑑みれば、本発明は、本発明による組成物を使用することによって抗体の凝集および/または断片化を低減させる方法にも関する。本発明による組成物中に凝集しやすいまたは安定性が低い治療的に活性な抗体を製剤化することによって、参照組成物と比較して、凝集量が低減され、抗体が安定化することを当業者なら理解するであろう。

【0160】

したがって、一態様では、本発明は、組成物中に抗体を製剤化することを含む、抗体の凝集を低減させる方法であって：

40

- b) 酢酸塩またはヒスチジンからなる群から選択される少なくとも 1 つの緩衝剤、
 - c) グリシン、アスパラギンおよびグルタミンからなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸、例えばグリシンおよびアスパラギン、ならびに/またはトレハロースおよびマンニトールからなる群から選択される少なくとも 1 つの賦形剤、ならびに
 - d) 表面活性剤
- を含む方法に関する（pH は 5.0 ~ 6.5 である）。

【0161】

さらなる態様では、本発明は、本発明の組成物中に抗体を製剤化することを含む、抗体を安定化する方法に関する。

【0162】

「凝集しやすい」抗体は、特に凍結、攪拌の際のおよび/または 40 もしくは 55

50

のような上昇温度における他の抗体分子との凝集体であることが分かった。凝集しやすい抗体は、例えば、SECで測定したときに、約55 で1週間貯蔵した後に94%未満、93%未満、92%未満、90%未満の単量体を有する抗体であり得る。凝集しやすい抗体は、例えば、DLSで測定したときに、約40 で3か月貯蔵した後に94%未満、93%未満、92%未満、90%未満の単量体を有する抗体であり得る。

【0163】

「断片化しやすい」抗体は、例えばそのヒンジ領域で、2つまたはそれ以上の断片に切断されることが分かっている抗体である。

【0164】

「凝集または断片化を低減させる」は、Humira（登録商標）という市販製剤のような参照組成物中に製剤化される抗体と比べて、凝集もしくは断片化を防止する、または凝集もしくは断片化の量を低下させることが意図される。

10

【0165】

上記実施形態のいかなる組み合わせも、本発明の一部を構成する。

【0166】

本出願を通して、用語「含む」は、すべての具体的に言及された特色および随意のさらなる特定されない特色を包含すると解釈すべきである。本明細書で使用する場合、用語「含む」の使用は、具体的に言及された特色以外の特色が存在しない（すなわち、「からなる」）実施形態も開示する。さらに、不定冠詞「1つ(a)」または「1つ(an)」は、複数を排除しない。互いに異なる従属請求項にある種の基準が記載されるという単なる

20

【0167】

次に、以下の実施例を参照して本発明をより詳細に説明する。本明細書で引用されるすべての文献および特許文献を、参照によって本明細書に組み入れる。前述の説明で本発明を例示し、詳細に説明してきたが、例は、例示的または代表的であり、制限的でないと考えべきである。

【0168】

配列の簡単な説明

配列番号1は、抗TNFアルファ抗体の重鎖配列を示す。

配列番号2は、抗TNFアルファ抗体の軽鎖配列を示す。

30

【実施例】

【0169】

1. 方法

1.1 試料調製

抗TNFアルファ抗体を使用して、様々な緩衝液を最初にスクリーニングした。これは、viva spin(15R; 膜: 30,000 MWCO HY)を使用して、表1に列挙される緩衝液に対して抗TNFアルファ抗体を透析することによって行った。対照用に、市販のアダリムマブ抗体についても緩衝液スクリーニングを行った。

【0170】

【表 1】

表 1:抗 TNF アルファ抗体のフェーズ III 組成物開発研究中にスクリーニングした緩衝液および pH 値

緩衝液	pH 値
Tris クエン酸	5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0
Tris	7.0
リン酸	6.5, 7.0
ヒスチジン	5.5, 6.0, 6.5
クエン酸	5.0, 5.5, 6.0
酢酸	5.0, 5.5
コハク酸	5.0, 5.5, 6.0
リン酸-クエン酸	5.2, 5.5, 6.0

10

20

【0171】

2.1.6に記載されている賦形剤スクリーニングについては、ショ糖、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、グリセリン、L-アルギニンHCl、L-グリシン、L-アスパラギン-水和物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、塩化ナトリウム、ポリソルベート20（PS20）およびポリソルベート80（PS80）のような賦形剤を、抗TNFアルファ抗体に粉末状（例えば、マンニトールおよび塩化ナトリウム）で加えるか、液体形態（例えば、原液のTween80）で加えた。Sartopore-2膜を使用して、すべての試料、溶液および緩衝液を濾過滅菌（0.22μm）した。試料を滅菌したボトルまたはバイアル中に濾過し、これを、クリーンベンチ内部で無菌状態で閉めて、微生物汚染を防止した。

30

【0172】

1.2 分析方法

ストレス研究に進む前に予備選択を行うために、示差走査マイクロカロリーメトリー（μDSC）をほとんどのスクリーニング研究（緩衝液スクリーニング、イオン強度、賦形剤スクリーニング）で使用した。次いで、ストレス研究（セクション1.3でさらに記載される）に進んだ組成物を、例えばサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、弱陽イオン交換クロマトグラフィー（WCX）、光遮断および/もしくは動的光散乱法（DLS）または以下に記載されるさらなる分析方法のような分析方法を使用して分析した。

40

【0173】

1.2.1 示差走査マイクロカロリーメトリー（μDSC）

ストレス研究に進む前に予備選択を行うために、示差走査マイクロカロリーメトリー（μDSC）をすべてのスクリーニング研究で使用した。GE HealthCareのVP CAPI L L A R Y μDSCを使用して、すべての測定を行った。基本的に、90/時間の加熱速度を使用して、各試料を30~100に加熱した。最も有望な組成物を選択するために、主にアンフォールディング温度（T_m）をパラメーターとして使用した。特に、Fc1ドメインのT_mがサーモグラムの最初のアンフォールディング事象であったことから、Fc1ドメインのT_mをランキング用のパラメーターとして使用した。

【0174】

1.2.2 サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）

50

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を使用して、単量体の相対量ならびに高分子量変異体 (HMW) および低分子量変異体 (LMW) を測定した。サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、抗体のサイズ、可溶性凝集体 (HMW) および抗体断片 (LMW) によるタンパク質分離を行った。凝集体はインタクトな抗体より前に溶出し、断片は後に溶出する。すべてのピークのパーセンテージでの総面積に対するメインピークの面積パーセンテージを使用して評価した。

【0175】

1.2.3 弱陽イオン交換クロマトグラフィー (WCX)

弱陽イオン交換クロマトグラフィーを使用して荷電アイソフォームのレベルを測定した。UV 検出に連結した弱陽イオン交換カラムでクロマトグラフィー分離を行った。弱陽イオン交換クロマトグラフィー (WCX) は、電荷の不均一性に基づいて抗体の異なるアイソフォームを分離する。より酸性のアイソフォームほど、イオン性相互作用を示さないもので、WCX クロマトグラムにおいて、塩基性アイソフォームよりも早く溶出する。この方法の目的は、荷電アイソフォームの相対量を決定することである。酸性、中性および塩基性のアイソフォームの合計を 100% に設定し、メインピークの面積、酸性アイソフォームの面積および塩基性アイソフォームの面積を相対的に計算した。

10

【0176】

1.2.4 動的光散乱法 (DLS) :

Malvern の Zetasizer Nano-ZS を使用して、ナノメートルサイズ範囲の凝集体および粒子の存在を測定した。強度によっておよび体積によって、粒径分布を測定した。さらに、流体力学的直径および多分散指数を測定した。この測定のために、250 ~ 300 μ l が必要であった。

20

【0177】

1.2.5 光遮断 / 光遮蔽 (LO)

光遮蔽測定を行って、抗 TNF アルファ抗体を含む組成物中の肉眼では見えない粒子のサイズおよび濃度を評価した。測定は、HIA C (登録商標) 粒子カウンター (HACH LANGE、Dusseldorf、Germany) を使用して行った。この測定のために、800 ~ 1000 μ l が必要であった。

【0178】

1.2.6 マイクロ流イメージング

ある場合には、この方法を使用して、形成された粒子の形態をより深く調べた。他の場合では、この方法は、光遮断の代替方法として使用した。

30

【0179】

1.2.7 示差走査蛍光定量法 (DSF)

測定は、CFX96 BioRad を使用して行った。温度走査は、加熱速度 1 / 分 および SyproOrange 蛍光レポーター色素: Invitrogen、水に希釈、5 $\times$ 最終濃度を使用して、20 ~ 90 の範囲に及んだ。21 種の様々な組成物を 5 mg / ml の濃度のプラセボに対して試験した。試料 9 μ l を SyproOrange 蛍光色素 1 μ l に加え、これによって、4.5 mg / ml の最終的な抗 TNF アルファ抗体濃度になった。各組成物を 2 回測定した。

40

【0180】

1.8 第 2 ビリアル浸透係数 (B_{22})

浸透第 2 ビリアル係数、 A_2 または B_{22} は、タンパク質 - タンパク質相互作用およびタンパク質 - 溶媒相互作用の尺度である。ビリアル係数は分子間の全体的な引力または斥力を示し、溶媒によって媒介される分子間ポテンシャルの一般的な尺度を提供する。バイオテクノロジー用途では、ビリアル係数は、緩衝液中の様々な賦形剤の pH、イオン強度および濃度の変化を評価することによって組成物の安定性、精製および結晶化に対する最適な条件を決定するのに役立つ。 B_{22} 値は、静的光散乱法を使用して各組成物の濃度の範囲から作成されるデバイプロット ($K_c / R\theta$ 対 c) の傾きから計算し、mol / mL g^{-2} で報告する。 B_{22} の陽性値はより大きな斥力、したがってより少ない凝集

50

体形成を示し、陰性の B_{22} 値はより大きな引力、したがってより大きな凝集傾向を示す。したがって、より高い陽性の B_{22} が好ましい。

【0181】

1.3 ストレス研究

1.3.1 加速安定性研究

異なる加速安定性研究を、様々な種類のストレスに組成物をさらす本研究で適用した。

【0182】

機械的ストレス：本研究による機械的ストレスは、例えば 200 rpm で最大 6 時間の攪拌であった。この条件は、各実験において適宜調整した。本研究では、バイアル中で攪拌することによって試料にストレスを与え、ここでは、Variomag Multipoint HP 攪拌機を使用した。

10

【0183】

短期等温性ストレス：短期等温性安定性研究では、適用した試験に従って、40 で 7 ~ 14 日間試料を貯蔵した。

【0184】

長期等温性ストレス：長期等温性安定性研究では、適用した試験に従って、40 で 1 か月、3 か月または 6 か月間試料を貯蔵した。

【0185】

加速熱ストレス：加速安定性研究では、50 および 55 で 1 か月まで試料を貯蔵した。これらの条件は、例えば、様々な組成物の最終的な選択に適用した。

20

【0186】

凍結融解：本研究では、試料を -80 で 24 時間凍結し、室温で 90 分間融解した。これを 5 サイクル繰り返した。5 サイクル目は、-80 で 72 時間維持した。

【0187】

1.3.2 探索的安定性研究

最終的な組成物の最終的な選択のために、本発明の組成物を用いて、より長い等温性安定性研究を行った。したがって、抗 TNF アルファ抗体を含む組成物を様々な温度 (-80、-20、5、25 および 40) で 6 か月まで貯蔵した。次いで、安定性について試料を調べた。

【0188】

30

1.4 組成物の選択方法 / ランキング

セクション 1.2 の下で上述した異なる分析方法の誤った解釈を避けるために、各方法の有意性に基づいてランキング方法を確立した。第 1 のランキングは、各安定性研究の各分析方法から得られた結果に従った一群の組成物内で行った。次いで、すべての分析方法から得られた様々なランキングの平均を計算することによって最終的なランキングを得た。加えたストレスに従って、各分析方法の重要性を評価し、ランキング手順で考慮した。

【0189】

1.4.1 物理的安定性ランキング

全体的な物理的安定性ランキングを、下記のすべての方法に由来する平均ランキングに基づいて計算した。方法の重要性は、加えたストレスによって変化した。例えば貯蔵ストレスについては、SEC ランキングを粒子分析よりも重要であると考え、機械的ストレスおよび凍結融解に由来するストレスについては、粒子分析を SEC よりも重要であると考えた。

40

【0190】

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)：様々な組成物はすべて安定化効果を有するので、単量体含有量のわずかな 0.5 % の差をこのランキング内で有意差があると考えた。

【0191】

動的光散乱法 (DLS)：4 つのランキングパラメーターを使用した：第 1 のランキングパラメーターは体積で分析した単量体含有量 (第 1) であり、第 2 のランキングパラメーターは強度で分析した単量体含有量 (第 2) であり、Z 平均は第 3 のランキングパラメ

50

ーターであり、第4のランキングパラメーターは多分散指数(PDI)であった。組成物が第1で落とされた場合、その組成物を残りの部分でさらに考慮しないという方法で、上述の順序でランク付けを行い、第2、第3、第4のランキングパラメーターについても同様であった。

【0192】

光遮蔽(LO)：組成物内で観察されたサイズ分布に従って組成物をランク付けした。
>10 μ mを6000粒子未満、>25 μ mを600粒子未満および>1 μ mを10000粒子未満有する組成物を1にランク付けした。>10 μ mを6000粒子未満、>25 μ mを600粒子未満および>1 μ mを100000粒子未満有するすべての組成物を2にランク付けした。>10 μ mを6000粒子未満、>25 μ mを600粒子未満および>1 μ mを100000粒子より多く有するすべての組成物を3にランク付けした。>10 μ mおよび>25 μ mの粒子に対する制限を破るすべての組成物は、>1 μ mの粒子数に関係なく4にランク付けした。

10

【0193】

色および透明性：ランキングはホルマジン比濁分析単位(FNU)の単位に単に基づき、有意な変化は、標準的な数の変化(例えば、<Iから<II)をもたらすFNUの変化を指す。

【0194】

1.4.2 化学的安定性ランキング

弱陽イオン交換クロマトグラフィー(WCX)：酸性、中性および塩基性のアイソフォームのパーセンテージの変化をランキングパラメーターとした。2~3%の変化を有意と考えた。

20

【0195】

1.4.3 全体的安定性ランキング

全体的安定性ランキングは物理的安定性ランキングと化学的安定性ランキングの両方の平均から生じ、物理的安定性および化学的安定性の両方を等しく重要であると考えた。

【0196】

2 結果および考察

2.1 緩衝液スクリーニング(実施例1)

2.1.1 初期緩衝液スクリーニング

30

アダリムマブおよびそのバイオシミラー(本明細書で抗TNFアルファ抗体BSと呼ばれる)の安定性を、様々な緩衝液(10mM)およびpH値において試験した。分析については、セクション1.2.1において上述したように、示差走査マイクロカロリーメトリー(μ DSC)を分析方法として使用した。抗TNFアルファ抗体BSのアンフォールディング曲線は、独立にアンフォールドする4つのドメイン(Fab、Fc1、Fc2、Fc3)の存在を示し、最大のエンタルピーを有するピークはFab断片であり、他の3つはFc断片であった(データ非表示)。Fc1断片のピークが最初の生じたアンフォールディング事象であるので、ランキング目的のために、Fc1断片のピークを使用した。抗TNFアルファ抗体BSおよびアダリムマブは、同様の結果(同様の T_M 値)を示した。ほとんどの緩衝液において、両方の分子について最適なpH範囲をpH5.5~6.5と決定した。表2は、抗TNFアルファ抗体BSについて得られたアンフォールディング温度を示す。

40

【0197】

【表 2】

表 2:様々な緩衝系における抗 TNF アルファ抗体 BS に対する T_M 値

緩衝液 ¹	pH 値	様々なドメインのアンフォールディング温度(T _m)			
		Fab	Fc1	Fc2	Fc3
Tris クエン酸	5	71.18	64.88	73.13	81.87
Tris クエン酸	5.5	71.73	71.09	76.24	82.58
Tris クエン酸	6	71.91	70.25	74.08	83.34
Tris クエン酸	7	72	71.77	73.48	83.48
Tris	7.1	72.78	72.08	77.46	83.82
リン酸	6.5	72.76	72.68	76.82	83.59
リン酸	7	72.59	68.28	75.58	83.26
ヒスチジン	5.5	71.93			
ヒスチジン	6	73.03	71.28	76.28	83.3
ヒスチジン	6.5	73.36	71.57	74.08	83.93
クエン酸	5	70.7	65.55	74.55	81.53
クエン酸	5.5	71.3	70.06	75.83	83.12
酢酸	5	72.74	69.27	75.86	83.25
酢酸	5.5	72.99	72.4	79.72	84.08
コハク酸	5	71.94	67.38	74.98	82.72
コハク酸	5.5	72.3	71.1	76.48	83.25
コハク酸	6	72.68	71.41	73.59	83.47
クエン酸-リン酸	5.2	71.59	68.7	75.29	82.24
オリジナル	5.5	71.77	70.24	75.98	82.83
オリジナル	6	72.08	70.45	74.26	83.41
クエン酸-リン酸+Exc ²	5.2	71.52	68.8	75.12	82.15

¹10mM 緩衝液中、²Exc.=Humira(登録商標)製剤の賦形剤

【 0 1 9 8 】

8 つの最も良い緩衝系を選択し、機械的ストレス研究を行って、最も良い緩衝系を選択した。さらに、参照として、元来の緩衝液および元来の組成物（市販製剤）を試験した。機械的不安定性が前記抗体の主な弱点であると決定されたので、緩衝液および pH 値が抗 TNF アルファ抗体の機械的安定性を向上させることができるかどうかをモニターするた

10

20

30

40

50

めに、加速安定性研究として機械的安定性研究を選択した。機械的安定性をモニターするために、（セクション 1 . 2 に記載されているように）サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、光遮蔽（LO）および動的光散乱法（DLS）のような解析法を選択した。機械的ストレス研究の結果をセクション 1 . 3 に記載されているランキングシステムに基づいて評価し、表 3 に示す。

【 0 1 9 9 】

【表 3】

表 3:抗 TNF アルファ抗体 BS に対する様々な緩衝組成物の機械的安定性研究後の最終的なランキング

組成物 ¹	ランク SEC	ランク DLS	ランク HIAC	平均	ランク
リン酸 pH 6.5	6	9	2	5,666667	6
酢酸 pH 5.5	1	1	3	1,666667	1
ヒスチジン pH 6	4	2	3	3	2
Tris クエン酸 pH 5.5	7	4	6	5,666667	6
Tris クエン酸 pH 6	8	8	3	6,333333	8
Tris クエン酸 pH 6.5	9	7	6	7,333333	9
Tris クエン酸 pH 7	10	10	6	8,666667	10
コハク酸 pH 6	5	3	6	4,666667	4
クエン酸-リン酸 pH 5.2	2	6	6	4,666667	4
クエン酸-リン酸+Exc. ² pH 5.2	3	5	1	3	2

¹10mM 緩衝液中 ²Exc.=Humira(登録商標)製剤の賦形剤

【 0 2 0 0 】

このランキングによれば、pH 5 . 5 の酢酸緩衝液および pH 6 のヒスチジン緩衝液が試験した抗体について最も良い機械的安定性を示し、これらをさらなる安定性研究用に選択した。さらに、組合せ緩衝液を安定性研究に含めるために、pH 6 の Tris クエン酸緩衝液を選択した。

【 0 2 0 1 】

2 . 1 . 2 D S 安定性研究

選択した 3 つの緩衝液（pH 5 . 5 の酢酸緩衝液、pH 6 のヒスチジン緩衝液および pH 6 の Tris クエン酸緩衝液）を - 8 0、- 2 0、5、2 5 および 4 0 の短期探索的安定性研究（セクション 1 . 3 . 2 を参照されたい）でさらに試験した。最終的な緩衝液の予備選択を 1 か月後に行い（データ非表示）、3 か月後に確認した（データ非表示）。この研究を 6 か月後にさらに分析した。この研究については、分析のために、分析方法の SEC、WCX、DLS、UV、外観、LO、SDS - PAGE および ELISA を使用した。結果に基づいて、10 mM の酢酸緩衝液 pH 5 . 5 を、抗 TNF アルファ抗体 BS に対する最終的な緩衝組成物として選択した。予備として、pH 6 のヒスチジン緩衝液を第 2 の選択物として選択した。pH 6 の Tris クエン酸緩衝液は、選択した他の緩衝系よりも利点を示さず、したがって、表 3 に示す機械的安定性研究で観察された、抗 TNF

10

20

30

40

50

アルファ抗体 B S の低い機械的安定性の理由から、排除した。

【 0 2 0 2 】

2 . 1 . 4 表面活性剤スクリーニング (実施例 2)

P S 2 0 および P S 8 0 の両方を、酢酸緩衝液 p H 5 . 5 において、3 つの異なる濃度 (0 . 0 0 1 % w / v 、 0 . 0 1 % w / v および 0 . 1 % w / v) で最初に試験した。表面活性剤の主な期待される効果は、機械的ストレスから抗 T N F アルファ抗体 B S を保護することであるので、セクション B S 下で記載されるように、攪拌実験のみを行った。S E C 、 W C X 、光遮蔽および D L S によって、試料を分析した。表 4 に示す結果に基づくと、0 . 0 1 % w / v の P S 2 0 、 0 . 1 % w / v の P S 8 0 および 0 . 0 1 % w / v の P S 8 0 が最適な濃度であると結論付けることができる。

10

【 0 2 0 3 】

【 表 4 】

表 4: ポリソルベートの機械的安定性の最終的なランキング

組成物 ¹	ランク SEC	ランク DLS	ランク HIAC	平均	ランク
PS なし	1	1	7	3	6
PS 20 0.001%	1	1	6	2.67	4
PS 20 0.01%	1	1	1	1	1
PS 20 0.1%	1	7	1	3	7
PS 80 0.001%	1	1	5	2.33	5
PS 80 0.01%	1	1	1	1	1
PS 80 0.1%	1	1	1	1	1

20

¹ 酢酸緩衝液 pH5.5 中

【 0 2 0 4 】

しかし、より高濃度の 0 . 1 % の P S 8 0 で粒子がより少ない傾向があった。したがって、賦形剤のさらなる試験のために、0 . 0 1 % w / v (0 . 1 m g / m l) の P S 2 0 または 0 . 1 % w / v (1 m g / m l) の P S 8 0 の組み合わせを考慮した。

30

【 0 2 0 5 】

2 . 1 . 5 組成物のイオン強度 (実施例 3)

様々な緩衝液濃度および様々な N a C l 濃度に関して、組成物のイオン強度を試験した。1 0 および 1 0 0 m M 緩衝液濃度について、ならびに 2 および 2 0 m g / m l の N a C l 濃度について、μ D S C スクリーニングを行った。得られたアンフォールディング温度を表 5 に列挙する。

【 0 2 0 6 】

40

【表 5】

表 5:様々なイオン強度での抗 TNF アルファ抗体 BS のアンフォールディング温度

緩衝液(pH 値)	濃度 (mM)	NaCl (mg/mL)	様々なドメインのアンフォールディング 温度(Tm)			
			Fab	Fc1	Fc2	Fc3
酢酸(pH 5.5)	10	0	73.44	73.53	82.01	84.61
Tris クエン酸(pH 6)	10	0	71.9	69.47	74.28	83.34
ヒスチジン(pH 6)	10	0	73.78	71.67	82.91	85.11
酢酸(pH 5.5)	100	0	72.34	70.11	74.82	82.53
Tris クエン酸(pH 6)	100	0	72.44	71.02	72.25	82.75
ヒスチジン(pH 6)	100	0	72.34	68.84	74.87	82.65
酢酸(pH 5.5)	10	2	72.61	71.94	76.11	83.17
Tris クエン酸(pH 6)	10	2	72.15	71.42	76	83.34
ヒスチジン(pH 6)	10	2	72.51	70.35	74.90	82.76
酢酸(pH 5.5)	10	20	71.14	67.12	73.79	82.26
Tris クエン酸(pH 6)	10	20	71.54	68.29	74.53	82.48
ヒスチジン(pH 6)	10	20	71.46	68.28	74.2	82.13

10

20

【0207】

30

T_mスクリーニング研究は、trisクエン酸緩衝液の場合を除いて、より高い緩衝液濃度ほどアンフォールディング温度がより低いことを示す。さらに、得られたT_m値から結論付けたように、NaClの添加は抗TNFアルファ抗体BSの安定性を支持しない。さらに、NaCl濃度の増大は、T_mに対して強い負の効果を有する。上記のように、2.1.2に記載されているDS安定性研究の1か月のデータの後に、酢酸緩衝液を本発明による組成物に好ましい緩衝液として選択したので、酢酸緩衝液を使用して加速安定性研究を行った。次いで、短期等温性安定性研究(40℃で7日間)および機械的安定性研究(200rpmの撹拌を2時間)を行った。ストレスの前後に、以下の分析法:SEC、WCX、光遮断、およびDLSを使用して試料を分析した。

【0208】

40

加速安定性研究については、2mg/mLのNaClの存在および非存在下で、5mMのより低い緩衝液濃度を10mM緩衝液濃度と比較した。表6は、熱ストレスおよび機械的ストレス後の組成物の最終的なランキングを示す。表6に示す最終的なランキングは、10mMの緩衝液濃度についてより良い安定性を示し、0~2mg/mLのNaCl濃度について有意差がないことを示す。したがって、緩衝液濃度を10mMに固定し、NaCl(2mg/mL)の存在および非存在を、賦形剤の組み合わせ研究について後で考慮した。

【0209】

【表 6】

表 6:イオン強度安定性の総合ランキング(物理的および化学的)

組成物	条件		物理的	化学的	ランク	平均ラン キング
	時点	ストレス				
酢酸緩衝液 10mM	T0	/	1	1	1	1.22
	1 週	40°C	1	1	1	
	1 時間	200rpm	2.33	1	1.67	
酢酸緩衝液 10mM および 2mg/mL NaCl	T0	/	1.33	1	1.17	1.22
	1 週	40°C	2	1	1.5	
	1 時間	200rpm	1	1	1	
酢酸緩衝液 5mM	T0	/	3.33	1	2.17	1.89
	1 週	40°C	2.67	1	1.83	
	1 時間	200rpm	2.33	1	1.67	
酢酸緩衝液 5mM および 2mg/mL NaCl	T0	/	3	1	2	1.78
	1 週	40°C	3.67	1	2.33	
	1 時間	200rpm	1	1	1	

10

20

【0210】

2.1.6 賦形剤スクリーニング(実施例4):

糖およびポリオール:

μDSCを使用して、抗TNFアルファ抗体BSの安定性に対する効果について、異なる糖およびポリオールを酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)中で試験した。この研究の結果を表7に示す。トレハロースおよびマンニトールは、最も高いアンフォールディング温度を示した。ここでの(また、すべてのμDSCスクリーニング研究における)ランキングは、Fc1ドメインのT_mがサーモグラムの最初のアンフォールディング事象であったことから、Fc1ドメインのT_mに基づいた。ショ糖、ソルビトールおよびグリセリンは、最も低いT_m値を示した。

30

【0211】

【表 7】

表 7:異なる糖およびポリオールを含む組成物のアンフォールディング温度

組成物 ¹ (糖またはポリオール)	濃度 (mM)	濃度 (mg/mL)	様々なドメインのアンフォールディング 温度(Tm)			
			Fab	Fc1	Fc2	Fc3
ショ糖	146	50	73.65	72.36	74.85	83.95
トレハロース	146	55.24	73.76	73.77	79.52	84.2
マンニトール	146	26.6	73.52	73.4	79	83.94
ソルビトール	146	26.6	73.54	72.15	74.66	83.75
グリセリン	146	13.35	73.17	72.94	77.15	83.52

¹10mM 酢酸緩衝液 pH5.5 中

10

【0212】

20

したがって、加速安定性研究（短期等温性安定性研究（40℃で7日間）および機械的安定性研究（200rpmの撹拌を2時間）において、マンニトールおよびトレハロースを、2つの異なる濃度で酢酸緩衝液（10mM、pH5.5）中で試験した。さらに、T_m値に基づく選択を検証するために、陰性対照としてソルビトールを加速研究で試験した。ストレスの前後に、以下の分析法：SEC、WCX、光遮断、およびDLSを使用して、加速安定性研究に供した試料を分析した。得られた最終的なランキングは、表8に示すように、賦形剤としてのマンニトールについてより良い安定性を示した。したがって、さらなる研究のために様々な濃度のマンニトールを選択した。

【0213】

【表 8】

表 8:糖およびポリオールの安定性の総合ランキング(物理的および化学的)

組成物 ¹	条件		物理的	化学的	ランク	平均ランキング
	時点	ストレス				
マンニトール 10mg/ml	T0	/	1	1	1	1.375
	1 週	40℃	1.75	1	1.375	
	1 時間	200rpm	2.5	1	1.75	
マンニトール 40mg/ml	T0	/	2	1	1.5	1.708
	1 週	40℃	3.25	1	2.125	
	1 時間	200rpm	2	1	1.5	
ソルビトール 40mg/ml	T0	/	1.5	1	1.25	1.875
	1 週	40℃	3.25	2	2.625	
	1 時間	200rpm	2.5	1	1.75	
トレハロース 50mg/ml	T0	/	1	1	1	1.958
	1 週	40℃	1	3	2	
	1 時間	200rpm	1.75	4	2.875	
トレハロース 20mg/ml	T0	/	1.5	1	1.25	2.208
	1 週	40℃	1.75	3	2.375	
	1 時間	200rpm	2	4	3	

¹10mM 酢酸緩衝液 pH5.5 中

【 0 2 1 4 】

アミノ酸：

さらに、μDSCを使用して、様々なアミノ酸を10mMの酢酸緩衝液(pH5.5)中で試験した。得られたT_mを表9に列挙する。

【 0 2 1 5 】

【表 9】

表 9:賦形剤としての様々なアミノ酸に対する抗 TNF アルファ抗体 BS のアンフォールディング温度

組成物 ¹ (アミノ酸)	濃度 (mM)	濃度 (mg/mL)	様々なドメインのアンフォールディング温度 (T _m)			
			Fab	Fc1	Fc2	Fc3
アルギニン	200	42.13	70.48	68.09	74.35	81.89
グリシン	200	15	73.41	72.8	78.71	84.17
L-リジン HCl	200	36.53	71.14	69.46	75.27	82.76
L-アスパラギン	200	10	72.85	72.04	77.48	83.84
グルタミン	200	29.23	73.19	72.55	78.7	84.03
アルギニン/グルタミン酸	100/100	17.42 / 14.71	72.18	70.66	76.52	83.55

¹10mM 酢酸緩衝液 pH5.5 中

【0216】

T_m スクリーニング研究は、グリシン、L - アスパラギンおよびグルタミンが最も高い T_m を示すことを示した。一方で、アルギニン、L - リジンおよびアルギニン / グルタミン酸は最も低い T_m 値を示した。加速安定性研究については、グリシン、L - アスパラギンおよびグルタミンを 2 つの異なる濃度で試験した。表 10 に示す最終的なランキングは、グリシンおよびアスパラギンを使用した場合のより良い安定性を示す。

【0217】

10

20

【表 10】

表 10: アミノ酸安定性の総合ランキング(物理的および化学的)

組成物 ¹	条件		物理的	化学的	ランク	平均ランキング
	時点	ストレス				
グリシン 7.5mg/ml	T0	/	1.25	1	1.125	1.333
	1 週	40°C	1	2	1.5	
	1 時間	200rpm	1.75	1	1.375	
グリシン 30mg/ml	T0	/	2.75	1	1.875	2.25
	1 週	40°C	3.75	2	2.875	
	1 時間	200rpm	3	1	2	
アスパラギン 2mg/ml	T0	/	1	1	1	1.958
	1 週	40°C	1	3	2	
	1 時間	200rpm	1.75	4	2.875	
アスパラギン 5mg/ml	T0	/	2.25	1	1.625	2.375
	1 週	40°C	1	3	2	
	1 時間	200rpm	3	4	3.5	
グルタミン 15mg/ml	T0	/	3.75	1	2.375	2.958
	1 週	40°C	4	1	2.5	
	1 時間	200rpm	4	4	4	
グルタミン 29.23mg/ml	T0	/	3.75	1	2.375	2.75
	1 週	40°C	4.25	2	3.125	
	1 時間	200rpm	4.5	1	2.75	

¹10mM 酢酸緩衝液 pH5.5 中

【 0 2 1 8 】

2.2 プロトタイプ組成物の選択 (実施例 5) :

2.2.1 実験計画法 (DOE)

最も良い条件 (緩衝液、pH 値およびイオン強度) ならびに最も良い安定剤を選択した後に、最終的な組成物を選択するために、実験計画 (DOE) アプローチを使用した。セクション 1.2 で上述した示差走査マイクロカロリーメトリー (μ DSC)、示差走査蛍光定量法 (DSF) および第 2 ビリアル浸透係数 (B_{22}) のようなハイスループット予想方法を使用した。DOE に含まれる組成物および各予想方法の結果を表 11 に示す。

【 0 2 1 9 】

【表 1 1】

表 11:DOE 組成物¹および 3 つの予測的ハイスループット法の結果

実施	NaCl (mg/mL)	マンニトール (mg/mL)	グリシン (mg/mL)	PS ²	μ DSC Fc1 T _m	DSF T _m	B ₂₂
1	2	10	7.5	80	71.115	69.8	
2	2	10	7.5	20	71.58	64.9	
3	0	20	7.5	20	72.615	67	
4	2	20	15	80	71.48	70.4	
5	0	10	15	80	73.515	71.7	
6	0	0	15	20	73.685	66.8	6.59
7	4	20	0	20	70.475	64	
8	4	0	15	80	70.58	70	
9	4	0	7.5	20	70.54	64.3	
10	2	10	7.5	80	70.875	69.8	3.1
11	2	10	7.5	20	71.14	64.8	
12	4	10	0	80	70.075	69	
13	4	20	15	20	71.17	64.8	2.79
14	0	20	0	80	71.945	70.7	5.83
15	0	0	0	20	71.59	66.2	
16	2	0	0	80	70.37	69.4	
17	0	0	7.5	80	72.705	71	
18	4	20	7.5	80	70.765	69.8	
19	2	10	7.5	80	71.05	69.9	
20	2	10	7.5	20	71.12	64.9	
21	4	0	0	80	70.015	68.8	2.88

10

20

30

¹すべての組成物は pH5.5 の 10mM 酢酸緩衝液中に存在する。²PS20 の濃度は 0.1mg/ml であり、PS80 は 1mg/ml である。

【0 2 2 0】

μ D S C による D O E から得られた結果は以下のことを示した： i) N a C l の有意な負の効果、 i i) グリシンの有意な正の効果、 i i i) マンニトールの正の効果、 i v) P S 2 0 と P S 8 0 に差がないこと。

【0 2 2 1】

D S F による D O E から得られた結果は、以下のことを示した： i) N a C l の有意な負の効果、 i i) マンニトールの有意な正の効果、 i i i) P S 8 0 の有意な正の効果および i v) P S 2 0 の有意な負の効果。

【0 2 2 2】

D O E による B₂₂ によって得られた結果は、N a C l の有意な負の効果を示した。

【0 2 2 3】

統計的 D O E に従って、 μ D S C の T_m および D S F の T_m に基づいて、表 1 2 に示すように、2 つの組成物を、さらなる 2 つの組成物 (1 つは N a C l を含み、もう 1 つはグリシンのみを含む) とともに探索的安定性研究用を選択した。

【0 2 2 4】

40

【表 1 2】

表 12:新しく開発した 4 つのプロトタイプ組成物の組成

緩衝液 (mM)	pH	マンニトール (mg/mL)	PS	グリシン (mg/mL)	NaCl (mg/mL)
酢酸(10mM)	5.5	20	80(1mg/ml)	15	0
酢酸(10mM)	5.5	20	20(0.1mg/ml)	15	0
酢酸(10mM)	5.5	20	80(1mg/ml)	15	2
酢酸(10mM)	5.5	0	80(1mg/ml)	15	0

10

【 0 2 2 5 】

探索的安定性研究は 2 4 か月まで計画し、セクション 1 . 4 に記載されているランキング方法を使用して、3 か月のデータに基づいて選択を行った。以下の分析法：S E C、W C X、光遮断、混濁度および D L S を使用して、様々な時点で試料を分析した。S E C の 3 か月のデータを表 1 3 に示す。3 か月のデータに基づいて最終的な組成物を決定した。

【 0 2 2 6 】

20

【表 1 3】

表 13:4 つの抗 TNF アルファ抗体 BS に対する探索的安定性による SEC の生データ

組成物 ¹	貯蔵温度	結果			ランキング	平均ランキング
		%HMW	%メインピーク	%LMW		
マンニトール 20mg/ml、グリシン 15mg/ml、PS80 0.1%w/v	-80°C	0.6	99.3	0.10	1	1.2
	-20°C	2.4	97.5	0.10	2	
	5°C	0.6	99.3	0.10	1	
	25°C	0.8	98.2	0.90	1	
	40°C	2.3	94.2	3.40	1	
マンニトール 20mg/ml、グリシン 15mg/ml、PS20 0.01%w/v	-80°C	0.6	99.3	0.10	1	1.2
	-20°C	2.5	97.4	0.10	2	
	5°C	0.6	99.3	0.10	1	
	25°C	0.9	98.2	0.90	1	
	40°C	2.5	94.2	3.40	1	
マンニトール 20mg/ml、グリシン 15mg/ml、PS80 0.1%w/v、NaCl 2mg/ml	-80°C	0.7	99.3	0.10	1	1
	-20°C	1.5	98.4	0.10	1	
	5°C	0.7	99.2	0.10	1	
	25°C	0.9	98.2	0.90	1	
	40°C	2.6	94.2	3.30	1	
グリシン 15mg/ml、 PS20 0.01%	-80°C	0.7	99.3	0.10	1	2.2
	-20°C	3.4	96.5	0.10	4	
	5°C	0.6	99.3	0.10	1	
	25°C	1	98.1	0.90	1	
	40°C	4.8	91.7	3.50	4	

¹すべての組成物は pH5.5 の 10mM 酢酸緩衝液中に存在する。

【0 2 2 7】

最終的な決定は、使用したすべての分析技術（SEC、WCX、光遮断、混濁度および DLS）によるランキングに基づく。3 か月後の最も良くランク付けされた 2 つの組成物を 2 つの有望な候補と定めた（表 1 4 を参照されたい）。

【0 2 2 8】

10

20

30

40

【表 1 4】

表 14-新しく開発した組成物に対する 3 か月の安定後の総合ランキング

組成物 ¹	貯蔵温度	物理的	化学的	ランキング	平均ランキング	
マンニトール 20mg/ml、グリシン 15mg/ml および PS80 0.01%w/v	-80°C	1.20	1	1.1	1.2	10
	-20°C	1.40	1	1.2		
	5°C	1.20	1	1.1		
	25°C	1.20	1	1.1		
	40°C	1.00	2	1.5		
マンニトール 20mg/ml、グリシン 15mg/ml および PS20 0.01%w/v	-80°C	1.20	1	1.1	1.2	
	-20°C	1.40	1	1.2		
	5°C	1.20	1	1.1		
	25°C	1.20	1	1.1		
	40°C	1.00	2	1.5		
マンニトール 20mg/ml、グリシン 15mg/ml、PS80 0.01%w/v および NaCl 2mg/mL	-80°C	1.60	1	1.3	1.26	20
	-20°C	1.80	1	1.4		
	5°C	1.60	1	1.3		
	25°C	1.60	1	1.3		
	40°C	1.00	1	1		
グリシン 15mg/ml および PS20 0.01%w/v	-80°C	1.20	1	1.1	1.65	30
	-20°C	3.40	1	2.2		
	5°C	1.00	1	1		
	25°C	2.40	1	1.7		
	40°C	2.50	2	2.25		

¹すべての組成物は pH5.5 の 10mM 酢酸緩衝液中に存在する。

【 0 2 2 9 】

2 . 2 . 2 等温性安定性研究：

3 か月のデータに基づいて選択した組成物（表 1 4）を裏付けるために、短期加速安定性研究を行った。ランキングに使用したパラメーターのうちの 1 つを例証するために、5 5 で 1 週間の等温性ストレスに組成物をさらした後に得た SEC の生データを表 1 5 に示す。表 1 6 に示す本研究の最終的なランキングは、4 つの組成物間の差をより明らかに示し；したがって、2 0 m g / m l のマンニトール、2 0 m g / m l、グリシン 1 5 m g / m l および 0 . 1 % w / v の P S 8 0 を有する組成物は、試験条件下で最も良い組成物のうちの 1 つである（表 1 6）。

【 0 2 3 0 】

【表 15】

表 15-等温性ストレス前後の4つのプロトタイプ組成物に対する SEC

組成物 ¹	貯蔵温度および 時間	結果			ランキング
		%HMW	%メインピーク	%LMW	
マンニトール 20mg/ml、 グリシン 15mg/ml、 PS80 0.1%w/v	T0	0.30	99.63	0.08	1
	55°C1 週間	1.01	96.00	0.80	1
マンニトール 20mg/ml、 グリシン 15mg/ml、 PS20 0.01%w/v	T0	0.29	99.60	0.11	1
	55°C1 週間	1.07	96.27	0.77	1
マンニトール 20mg/ml、 グリシン 15mg/ml、 PS80 0.1%w/v、 NaCl 2mg/ml	T0	0.34	99.58	0.08	1
	55°C1 週間	1.43	94.64	0.76	4
グリシン 15mg/ml、 PS20 0.01%w/v	T0	0.33	99.61	0.06	1
	55°C1 週間	1.27	95.20	0.75	3

¹すべての組成物は pH5.5 の 10mM 酢酸緩衝液中に存在する。

【0231】

10

20

30

【表 16】

表 16-等温性ストレス後の総合ランキング

組成物 ¹	温度/時間	物理的	化学的	平均	全体的ランキング
マンニトール 20mg/ml、 グリシン 15mg/ml、 PS80 0.1%w/v	50°C/1 か月 55°C/1 週間	1 1	1.33 1	1.165 1	1.0825
マンニトール 20mg/ml、 グリシン 15mg/ml、 PS20 0.01%w/v	50°C/1 か月 55°C/1 週間	2 2	1.33 1	1.665 1.5	1.5825
マンニトール 20mg/ml、 グリシン 15mg/ml、 PS80 0.1%w/v、 NaCl 2mg/ml	50°C/1 か月 55°C/1 週間	4 4	1 1	2.5 2.5	2.5
グリシン 15mg/ml、 PS20 0.01%w/v	50°C/1 か月 55°C/1 週間	3 3	1.33 1	2.165 2	2.0825

10

20

¹すべての組成物は pH5.5 の 10mM 酢酸緩衝液中に存在する。

【0232】

2.2.3 加速安定性研究

表 16 に示す 4 つの選択した組成物を、2 つの別の組成物（ヒスチジン緩衝液（7.45 mM、pH 6）、マンニトール 12、PS80 0.1%w/v、NaCl 6.165 mg/ml、および酢酸緩衝液（10 mM、pH 5.5）、マンニトール 12、PS80 0.1%w/v、NaCl 6.165 mg/ml）とともに、追加的な加速安定性研究にさらに供した。6 つの組成物を機械的安定性および凍結/融解安定性について試験し、以下の分析法：SEC、光遮断、および DLS を使用して、ストレスの前後に試料を

30

【0233】

【表 17】

表 17:機械的ストレス(200rpm、3 時間)前後の 6 つの組成物の SEC の生データ

組成物	ストレス条件: ストレスおよび 時間	結果			ランキング
		%LMW	%メイン ピーク	%HMW	
酢酸緩衝液(10mM、 pH5.5)、マンニトール 20mg/ml、グリシン 15mg/ml、PS80 0.1%w/v	T0 時点	0.08	99.63	0.30	1
	200rpm で 3 時間後	0.08	100.49	0.34	1
酢酸緩衝液(10mM、 pH5.5)、マンニトール 20mg/ml、グリシン 15mg/ml、PS20 0.01%w/v	T0 時点	0.11	99.60	0.29	1
	200rpm で 3 時間後	0.10	100.37	0.32	1
酢酸緩衝液(10mM、 pH5.5)、マンニトール 20mg/ml、グリシン 15mg/ml、PS80 0.1%w/v、 NaCl 2mg/ml	T0 時点	0.08	99.58	0.34	1
	200rpm で 3 時間後	0.08	100.13	0.35	1
酢酸緩衝液(10mM、 pH5.5)、グリシン 15mg/ml、PS20 0.01%w/v	T0 時点	0.06	99.61	0.33	1
	200rpm で 3 時間後	0.07	99.52	0.33	1
ヒスチジン緩衝液(7.45mM pH6)、マンニトール 12、 PS80 0.1%w/v、NaCl 6.165mg/ml	T0 時点	0.08	99.37	0.56	1
	200rpm で 3 時間後	0.13	99.40	0.57	1
酢酸緩衝液(10mM、 pH5.5)、マンニトール 12、 PS80 0.1%w/v、NaCl 6.165mg/ml	T0 時点	0.07	99.38	0.55	1
	200rpm で 3 時間後	0.08	99.06	0.53	1

10

20

30

【0234】

ランキングに使用したパラメーターのうちの 1 つを例証するために、凍結 / 融解ストレスの 5 サイクル目の後に得た SEC の生データを表 18 に示す。

【0235】

【表 18】

表 18:凍結/融解ストレス前後の 6 つの組成物の SEC の生データ

組成物	ストレス条件: ストレスおよび 時間	結果			ランキング
		%HMW	%メイン ピーク	%LMW	
酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、 マンニトール 20mg/ml、グリ シン 15mg/ml、PS80 0.1%w/v	T0 時点	0.30	99.63	0.08	1
	5 サイクル目	0.32	100.96	0.09	1
酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、 マンニトール 20mg/ml、グリ シン 15mg/ml、PS20 0.01%w/v	T0 時点	0.29	99.60	0.11	1
	5 サイクル目	0.35	101.68	0.10	1
酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、 マンニトール 20mg/ml、グリ シン 15mg/ml、PS80 0.1%w/v、NaCl 2mg/ml	T0 時点	0.34	99.58	0.08	1
	5 サイクル目	0.38	100.95	0.09	1
酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、 グリシン 15mg/ml、PS20 0.01%w/v	T0 時点	0.33	99.61	0.06	1
	5 サイクル目	0.43	100.16	0.08	1
ヒスチジン緩衝液(7.45mM pH6)、マンニトール 12、PS80 0.1%w/v、NaCl 6.165mg/ml	T0 時点	0.56	99.37	0.08	1
	5 サイクル目	0.60	100.03	0.09	1
酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、 マンニトール 12、PS80 0.1%w/v、NaCl 6.165mg/ml	T0 時点	0.55	99.38	0.07	1
	5 サイクル目	0.55	100.03	0.07	1

10

20

【0236】

30

機械的安定性および凍結 / 融解安定性研究によって得られた最終的なランキングを表 19 および 20 に示す。

【0237】

【表 19】

表 19:機械的ストレス後の総合ランキング

組成物	ストレス	方法			平均	ランク	全体的 ランキン グ
		ランク SEC	ランク DLS	ランク HIAC			
酢酸緩衝液(10mM、 pH5.5)、マンニトール 20mg/ml、グリシン 15mg/ml、PS80 0.1%w/v	100rpm	1.00	3	1	1.67	2	1.5
	200rpm	1.00	2.33333	1	1.44	1	
酢酸緩衝液(10mM、 pH5.5)、マンニトール 20mg/ml、グリシン 15mg/ml、PS20 0.01%w/v	100rpm	1.00	4.66667	1	2.222222	5	4.5
	200rpm	1.00	3.33333	1.5	1.944444	4	
酢酸緩衝液(10mM、 pH5.5)、マンニトール 20mg/ml、グリシン 15mg/ml、PS80 0.1%w/v、NaCl 2mg/ml	100rpm	1.00	3	1	1.666667	2	2.5
	200rpm	1.00	3	1.5	1.833333	3	
酢酸緩衝液(10mM、 pH5.5)、グリシン 15mg/ml、PS20 0.01%w/v	100rpm	1.00	3	1.5	1.833333	4	3
	200rpm	1.00	2.33333	1.5	1.611111	2	
ヒスチジン緩衝液 (7.45mM pH6)、マンニト ール 12、PS80 0.1%w/v NaCl 6.165mg/ml	100rpm	4.33	1.66667	2	2.666556	6	6
	200rpm	2.67	1.66667	2	2.111222	6	
酢酸緩衝液(10mM、 pH5.5)、マンニトール 12、PS80 0.1%w/v、NaCl 6.165mg/ml	100rpm	1.00	1.66667	1.5	1.388889	1	2.5
	200rpm	1.00	3.33333	1.5	1.944444	4	

10

20

30

【0238】

機械的安定性は、酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、マンニトール20mg/ml、グリシン15mg/ml、PS80 0.1%w/vを含む組成物について、すべての他の組成物よりも、有意なより良い安定性を示した。

【0239】

40

【表 2 0】

表 20-凍結/融解ストレス後の総合ランキング

組成物	ストレス	方法			平均	全体的ラン キング
		ランク SEC	ランク DLS	ランク HIAC		
酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、 マンニトール 20mg/ml、 グリシン 15mg/ml、 PS80 0.1%w/v	5 サイクル F/T	1.00	1.25	1	1.08	2
酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、 マンニトール 20mg/ml、 グリシン 15mg/ml、 PS20 0.01%w/v	5 サイクル F/T	1.00	1	1	1.00	1
酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、 マンニトール 20mg/ml、 グリシン 15mg/ml、 PS80 0.1%w/v、 NaCl 2mg/ml	5 サイクル F/T	1.00	4	1	2.00	4
酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、 グリシン 15mg/ml、 PS20 0.01%w/v	5 サイクル F/T	1.00	1.75	1	1.25	3
ヒスチジン緩衝液 (7.45mM pH6)、 マンニトール 12mg/ml、 PS80 0.1%w/v NaCl 6.165mg/ml	5 サイクル F/T	1.00	5	1.5	2.50	6
酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、 マンニトール 12mg/ml、 PS80 0.1%w/v、 NaCl 6.165mg/ml	5 サイクル F/T	1.00	5	1	2.33	5

10

20

30

【 0 2 4 0】

- 8 0 の凍結 / 融解研究は、酢酸緩衝液 (1 0 m M、p H 5 . 5)、マンニトール 2 0 m g / m l、グリシン 1 5 m g / m l、P S 2 0 0 . 0 1 % w / v の組成物についてより良い安定性を示し、次に、酢酸緩衝液 (1 0 m M、p H 5 . 5)、マンニトール 2 0 m g / m l、グリシン 1 5 m g / m l、P S 8 0 0 . 1 % w / v が続いた。しかし、得られた生データを考慮すると、凍結 / 融解安定性研究について得られた差は有意でない (非表示)。

40

【 0 2 4 1】

最終的な決定を下すために、6 つの組成物を 3 か月後にさらに比較した。次に、最終的な全体的安定性ランキングを表 2 1 に示す。

【 0 2 4 2】

【表 2 1】

表 21:様々な温度で 3 か月貯蔵した後の組成物の最終的なランキング

組成物	貯蔵温度	物理的	化学的	ランキング	平均ランキング
酢酸緩衝液(10mM pH5.5)、 マンニトール 20mg/ml、 グリシン 15mg/ml、 PS80 0.1%w/v	-80℃	1.75	1	1.375	1.67
	-20℃	2.75	1	1.875	
	5℃	1.75	1	1.375	
	25℃	1.75	1	1.375	
	40℃	1.67	3	2.3	
酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、 マンニトール 20mg/ml、 グリシン 15mg/ml、 PS20 0.01%w/v	-80℃	1.75	1	1.375	1.67
	-20℃	2.75	1	1.875	
	5℃	1.75	1	1.375	
	25℃	1.75	1	1.375	
	40℃	1.67	3	2.3	
酢酸緩衝液 (10mM、pH5.5)、 マンニトール 20mg/ml、 グリシン 15mg/ml、 PS80 0.1%w/v、 NaCl 2mg/ml	-80℃	1.75	1	1.375	1.67
	-20℃	2.75	1	1.875	
	5℃	1.75	1	1.375	
	25℃	1.75	1	1.375	
	40℃	1.67	3	2.3	
酢酸緩衝液(10mM.pH5.5)、 グリシン 15mg/ml、 PS20 0.01%w/v	-80℃	1.75	1	1.375	2.25
	-20℃	5.25	1	3.125	
	5℃	1.75	1	1.375	
	25℃	1.75	1	1.375	
	40℃	5	3	4	
酢酸緩衝液(10mM、pH5.5)、 マンニトール 12mg/ml、 PS80 0.1%w/v、 NaCl 6.165mg/ml	-80℃	2	1	1.5	1.825
	-20℃	2.25	1	1.625	
	5℃	2	1	1.5	
	25℃	4	1	2.5	
	40℃	3	1	2	
ヒスチジン緩衝液 (7.45mM pH6)、 マンニトール 12mg/ml、 PS80 0.1%w/v NaCl 6.165mg/ml	-80℃	2	1	1.5	1.8
	-20℃	2	1	1.5	
	5℃	2	1	1.5	
	25℃	4	1	2.5	
	40℃	3	1	2	

【 0 2 4 3 】

したがって、市販製剤とのさらなる比較研究用に、表 2 2 で定義された 1 つの最終的な組成物 (F C) を選択した。

【 0 2 4 4 】

【 表 2 2 】

表 22: フェーズ 3 についての抗 TNF アルファ抗体 BS 組成物の組成

成分	組成 mg/mL	機能	規格の参照	
抗 TNF アルファ抗体 BS	50.000	活性物質	社内	
酢酸ナトリウム三水和物	1.170	緩衝剤	USP	10
酢酸 ¹	0.080	緩衝剤	USP	
マンニトール	20.000	等張化剤		
グリシン	15.000	緩衝剤	USP	
ポリソルベート 80	1.000	表面活性剤、 タンパク質安定剤	NF	
注射用水 ²	1mL までの量	希釈剤	USP	20

¹すべての賦形剤を加えた後に(必要ならば)pH 調整のために酢酸を使用した。² Ph.Eur.に従って蒸留して製造した注射用水を USP に対して慣例的に試験する。

【 0 2 4 5 】

3 フェーズ I I I 用の抗 T N F アルファ抗体 B S 組成物と元来の組成物 (O C) の比較
(実施例 6)

3 . 1 等温性加速安定性研究

表 2 2 で定義された最終的な組成物 (F C) と元来の組成物 (O C) を 5 5 に 1 週間かけた。 1 . 3 に記載されている等温性加速安定性研究から得られた最終的な組成物のデータを、元来の組成で製造された元来の組成物について実施した同様の研究との比較に使用した。この場合、S E C および W C X のデータのみが比較に利用可能であった。この比較解析の結果を表 2 3 に示す。

【 0 2 4 6 】

【表 2 3】

表 23:1 週間 55℃における安定性に関する、選択した組成物と市販組成物の比較

組成物	時点	SEC		
		% LMW	%単量体	% HMW
FC	T0	0.08	99.63	0.30
	1 週	0.81	98.15	1.03
OC	T0	0.10	99.30	0.60
	1 週	4.40	88.30	7.40
WCX				
FC	T0	17	65	18
	1 週	48	34	17
OC	T0	16	63	21
	1 週	46	29	25

10

【0 2 4 7】

20

結果は、市販組成物（OC）と比べて、選択した最終的な組成物（FC）について有意なより良い安定性を示す。

【0 2 4 8】

さらに、表 2 3 および 1 5 に示すデータの比較は、表 1 に報告するようにアッセイした本発明の他の組成物も、市販製剤と比べて、抗体の抗 TNF アルファ抗体 BS に対して安定性を向上させたことを示す。したがって、6 つすべての組成物について活性単量体の量が全ピーク面積と比べて 9 4 % を超えるが、市販製剤は約 8 8 % の単量体量しか含まないので、6 つすべての組成物が市販製剤と比べて熱安定性を増大することができる。

【0 2 4 9】

3 . 2 機械的安定性

30

本研究では、抗 TNF アルファ抗体 BS を使用することによって、最終的な組成物（FC）の機械的安定性を市販組成物（OC）の機械的安定性と比較し、ここで、最終的な組成物を 2 0 0 r p m で撹拌し、2 0 0 r p m で 3 時間撹拌し、市販組成物は 2 時間撹拌した。評価について：SEC、DLS および光遮断（HIAC）を使用した（表 2 4）。

【0 2 5 0】

可溶性凝集体に関して差は見られなかった。主として、肉眼では見えない粒子の形成および光遮断と動的光散乱法（DLS）の両方で見られるようなより小さな凝集体に差があった。市販組成物（OC）よりも最終的な組成物（FC）にストレスをより多く与えたが（3 時間対 2 時間）、最終的な組成物は、特に粒子形成に関して、より高い機械的安定性を示した。

40

【0 2 5 1】

【表 2 4】

表 24:機械的安定性に関する、選択した組成物(FC)と市販組成物(OC)との比較

組成物	時点	光遮断(HIAC)			
		>1 μ m	>10 μ m	>25 μ m	
FC	T0	280	18	3	
	3 時間	5575	75	5	
OC	T0	1846	62	2	
	2 時間	54868	113	3	
DLS					
		体積基準の %単量体	強度基準の %単量体	Z 平均	PDI
FC	T0	100	100	1.72	0.07
	3 時間	100	36.5	8.74	0.89
OC	T0	100	100	13.28	0.06
	2 時間	98.7	48.1	51.80	0.54

10

20

【0 2 5 2】

4 . 結論

本発明者らは、抗体の安定性を向上させる組成物を開発するための1つの分子例として、抗TNFアルファ抗体BSを使用した。本発明者らは、様々なスクリーニング方法を使用することによって、ならびに様々な緩衝液、賦形剤、例えば、ポリオール、糖、アミノ酸、塩の存在および様々な界面活性剤を比較することによって機械的ストレスに対して抗体を安定化することを最初に望んだが、本発明者らは、抗体を機械的ストレスから保護するだけでなく、熱ストレスに対する安定性も増大させる組成物を開発することに成功した。

【0 2 5 3】

したがって、抗TNFアルファ抗体BSに基づいて、本発明者らは、参照市販製剤と比べて、抗体の機械的安定性および熱安定性向上させる組成物を開発することに成功した。様々な組成物が、多くの異なるストレス条件（例えば、高温および速度）で非常に良好な結果を示し、所望の貯蔵温度（2～8℃）に非常に適する。試験した抗体の抗TNFアルファ抗体BSはIgG抗体であり、それにより、他のIgG抗体のアミノ酸組成と高い類似性を有するので、開発した組成物は、同様に、他の抗体の安定性を向上させる可能性がある。

30

【0 2 5 4】

さらに、開発した組成物はすべて、市場に出ている組成物と比べて、抗TNFアルファ抗体BSの機械的安定性および熱安定性を向上させる。組成物は、55℃で1週間後に、94%を超える、機能的単量体形態の抗体を含み、最終的な選択組成物は、98.15%の機能的単量体を含むが、元来の組成物は、88.30%の機能的単量体しか含まない。機能的単量体を10%増加させることは、その製造に費用がかかる分子にとってかなりの利益である。

40

【0 2 5 5】

5 . 本発明の組成物の形態の抗CXCR5抗体の安定性研究（実施例7）

以下の表25で定義される抗CXCR5抗体を含む組成物を1～6か月間5℃または40℃に供した。

【0 2 5 6】

【表 2 5】

表 25:安定性試験で使した抗 CXCR5 抗体の組成

成分	組成 mg/mL	機能	規格の参照
抗 CXCR5 抗体 SAR113244	41.000	活性物質	社内
酢酸ナトリウム三水和物	1.170	緩衝剤	USP
酢酸 ¹	0.080	緩衝剤	USP
マンニトール	20.000	等張化剤	
グリシン	15.000	緩衝剤	USP
ポリソルベート 80	1.000	表面活性剤、 タンパク質安定剤	NF
注射用水 ²	1mL までの量	希釈剤	USP

¹すべての賦形剤を加えた後に(必要ならば)酢酸を pH 調整に使用した。

² Ph.Eur.に従って蒸留して製造した注射用水を USP に対して慣例的に試験する。

【0 2 5 7】

本研究では、組成物を 40 で 1 か月、3 か月および 6 か月貯蔵し、それを、5 で同じ期間貯蔵した同じ組成物と比較することによって、組成物の長期等温性安定性をアッセイした。評価については、DLS (表 2 6) および光遮断 (H I A C、表 2 7) を使用した。

【0 2 5 8】

結果は、本発明の製剤を用いると、加速条件下でさえも抗 C X C R 5 抗体が長時間にわたって安定的であることを明らかに示す。

【0 2 5 9】

【表 2 6】

表 26:DLS によって測定した、抗 CXCR5 抗体組成物のタンパク質凝集の測定値

時点	貯蔵温度	DLS			
		体積基準の 単量体%	強度基準の 単量体%	Z 平均	PDI
T0	-	100	100	5.03	0.076
3 か月	+5°C	100	100	4.978	0.053
3 か月	+40°C	100	100	6.41	0.113

【0 2 6 0】

【表 27】

表 27:光遮断によって測定した、抗 CXCR5 抗体組成物の肉眼では見えない粒子

時点	光遮断(HIAC)				
	T0	1 か月		6 か月	
温度	-	+5°C	+40°C	+5°C	+40°C
1.5 μ m	530	120	197	780	200
2.0 μ m	328	62	128	307	118
5.0 μ m	95	18	38	73	40
10.0 μ m	20	5	13	20	18
15.0 μ m	7	2	5	10	8
25.0 μ m	0	0	0	3	5

10

【0261】

したがって、これらの結果は、本発明の製剤がモノクローナル抗体の安定性を増大させることができることを確証するものである。

20

【配列表】

2018507202000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2016/053068
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).	
2.	☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	
3.	Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/053068

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 C07K16/24 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 2014/039903 A2 (COHERUS BIOSCIENCES INC [US]) 13 March 2014 (2014-03-13) page 17 - page 26	1-30
X	W0 2006/044908 A2 (GENENTECH INC [US]; ANDYA JAMES D [US]; GWEE SHIANG C [US]; LIU JUN [U] 27 April 2006 (2006-04-27) page 40 - page 42 ----- -/--	1-30
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 April 2016		02/05/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fellows, Edward

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/053068

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAMPATHKUMAR KRISHNAN ET AL: "Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals; Chapter 16: DEVELOPMENT OF FORMULATIONS FOR THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES AND Fc FUSION PROTEINS", 5 August 2010 (2010-08-05), FORMULATION AND PROCESS DEVELOPMENT STRATEGIES FOR MANUFACTURING BIOPHARMACEUTICALS, JOHN WILEY & SONS, INC, HOBOKEN, N.J, PAGE(S) 383 - 427, XP002712418, ISBN: 978-0-470-11812-2 table 16.1 -----	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/053068

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014039903 A2	13-03-2014	AU 2013312300 A1	16-04-2015
		CA 2884182 A1	13-03-2014
		CN 104768576 A	08-07-2015
		DO P2015000051 A	31-05-2015
		EP 2892550 A2	15-07-2015
		JP 2015527402 A	17-09-2015
		KR 20150047140 A	04-05-2015
		PE 09642015 A1	25-07-2015
		SG 112015017150 A	28-05-2015
		TW 201424749 A	01-07-2014
		US 2014186361 A1	03-07-2014
		US 2015182626 A1	02-07-2015
		US 2015190512 A1	09-07-2015
		US 2015190513 A1	09-07-2015
		US 2015191538 A1	09-07-2015
		US 2015191539 A1	09-07-2015
		US 2016031982 A1	04-02-2016
		US 2016039926 A1	11-02-2016
		WO 2014039903 A2	13-03-2014
WO 2006044908 A2	27-04-2006	AU 2005295394 A1	27-04-2006
		BR PI0516299 A	02-09-2008
		CA 2579861 A1	27-04-2006
		CN 101084015 A	05-12-2007
		CN 102319430 A	18-01-2012
		CR 9129 A	25-05-2009
		DK 1802344 T3	08-10-2012
		EC SP077308 A	26-04-2007
		EP 1802344 A2	04-07-2007
		EP 2371388 A2	05-10-2011
		ES 2389911 T3	02-11-2012
		GT 200500298 A	08-05-2006
		HK 1104483 A1	07-12-2012
		HK 1108391 A1	25-05-2012
		HR P20120893 T1	30-11-2012
		IL 181738 A	30-04-2015
		JP 5025482 B2	12-09-2012
		JP 2008520551 A	19-06-2008
		JP 2012176970 A	13-09-2012
		JP 2014159469 A	04-09-2014
		KR 20070068385 A	29-06-2007
		MA 29014 B1	01-11-2007
		MY 146100 A	29-06-2012
		NZ 553625 A	30-10-2009
		PA 8650001 A1	17-01-2007
		PE 10432006 A1	19-10-2006
		PE 13272009 A1	03-09-2009
		PT 1802344 E	15-11-2012
		RU 2007118648 A	27-11-2008
		RU 2011104955 A	20-08-2012
		SG 196859 A1	13-02-2014
		SI 1802344 T1	30-11-2012
		SV 2006002275 A	06-03-2006
		TW 1394582 B	01-05-2013
		UA 89798 C2	10-03-2010
		US 2006088523 A1	27-04-2006
		US 2010015157 A1	21-01-2010
		US 2013071384 A1	21-03-2013

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/053068

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2015196642 A1	16-07-2015
		WO 2006044908 A2	27-04-2006
		ZA 200702521 A	30-07-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 19/00 (2006.01)		A 6 1 P 19/00		
A 6 1 K 9/08 (2006.01)		A 6 1 K 9/08		
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		
A 6 1 K 47/26 (2006.01)		A 6 1 K 47/26		
A 6 1 K 47/04 (2006.01)		A 6 1 K 47/04		
A 6 1 K 47/10 (2006.01)		A 6 1 K 47/10		
C 0 7 K 16/24 (2006.01)		C 0 7 K 16/24	Z N A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00		A

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

(72)発明者 アネット・ピーパー
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト . パテント・デパートメント . サノフィ - アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー .

(72)発明者 ディヤーナ・ザーギ
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト . パテント・デパートメント . サノフィ - アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー .

(72)発明者 ニーナ・シュトレーベ
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト . パテント・デパートメント . サノフィ - アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー .

(72)発明者 アーメット・ヨーセフ
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト . パテント・デパートメント . サノフィ - アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー .

F ターム(参考) 4C076 AA12 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 CC03 CC09 CC16 CC18
DD09F DD23 DD38A DD41Z DD51Z DD67A EE23F FF63
4C085 AA14 BB36 EE05
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74 GA22