

(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2015-506369

(P2015-506369A)

(43) 公表日 平成27年3月2日 (2015. 3. 2)

(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 N	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	4 J 0 0 2
C 0 8 L 89/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
C 0 8 K 5/17 (2006.01)	C 0 8 L 89/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-553812 (P2014-553812)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月30日 (2013. 1. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年9月19日 (2014. 9. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2013/050211
 (87) 国際公開番号 W02013/114112
 (87) 国際公開日 平成25年8月8日 (2013. 8. 8)
 (31) 優先権主張番号 61/592, 323
 (32) 優先日 平成24年1月30日 (2012. 1. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510288895
 アレコー リミテッド
 イギリス国 ケンブリッジ シービー4
 Oエフイー ケンブリッジ サイエンス
 パーク 2
 (74) 代理人 100095832
 弁理士 細田 芳徳
 (72) 発明者 ケーシー, ガイ
 イギリス国 ケンブリッジシャー シービー
 ー4 Oエフイー ケンブリッジ, ケンブ
 リッジ サイエンス パーク 2, アレコ
 ー リミテッド

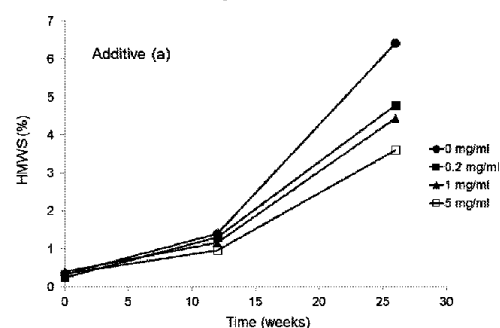
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定化された水性抗体組成物

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも約 10 mg / mL の濃度の抗体タンパク質と、エチレンイミンのオリゴマー（該オリゴマーにおけるエチレンイミンの繰り返し単位の数 (n) は n = 2 ~ 12 の範囲である）とを含有する水性組成物を提供する。

Figure 1A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも約10mg/mLの濃度の抗体タンパク質及びエチレンジアミンのオリゴマーを含有する水溶液であって、オリゴマーにおけるエチレンジアミンの繰り返し単位の数(n)が2～12の範囲である、水溶液。

【請求項 2】

エチレンジアミンのオリゴマーを水溶液に添加する工程を含む、水溶液における抗体タンパク質の凝集速度を低下させる方法であって、抗体タンパク質の濃度が少なくとも約10mg/mLであり、オリゴマーにおけるエチレンジアミンの繰り返し単位の数(n)がn=2～12の範囲である、方法。

10

【請求項 3】

n=3～11である、請求項 1 に記載の水溶液又は請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

n=6～8である請求項 3 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 5】

n=2～6、例えば3～5である請求項 4 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 6】

エチレンジアミンのオリゴマーが、ポリエチレングリコール(例えばPEG及びmPEG)、ポリプロピレングリコール(PPG)及びポリ-アミノ酸からなる群より選択される一以上のポリマーで誘導体化される、請求項 1～5のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

20

【請求項 7】

エチレンジアミンのオリゴマーが一以上のコポリマーで誘導体化される、水溶液又は方法であって、該コポリマーが、ポリエチレングリコール(例えばPEG及びmPEG)、ポリプロピレングリコール(PPG)及びポリ-アミノ酸からなる群より選択されるポリマー(及びそれらの関連するモノマー)からなる、請求項 1～6のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 8】

エチレンジアミンのオリゴマーが一以上のPEG又はmPEGで誘導体化される、請求項 1～5のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 9】

エチレンジアミンのオリゴマーが任意の架橋基を介して誘導体化され、該架橋基がカルボニル、アミド、カルバメート、尿素及びアルキレンからなる群より選択される、請求項 6～8のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

30

【請求項 10】

エチレンジアミンのオリゴマーが、ジエチレントリアミン、トリエチレントトラミン、テトラエチレンペンタミン及びペンタエチレンヘキサミンからなる群より選択される、請求項 1 に記載の水溶液又は請求項 2 に記載の方法。

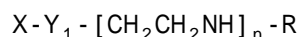
【請求項 11】

エチレンジアミンのオリゴマーが、 $-C_1-C_6$ アルキル、 $-(C_2-C_6$ アルキル) $-OH$ 及び $-(C_1-C_6$ アルキル) $-O-(C_2-C_6$ アルキル)からなる群より選択される不活性キャッピング基(inert capping group)でキャップされる、請求項 1～10のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

40

【請求項 12】

エチレンジアミンのオリゴマーが、式III:



式III

(式中、n=2～12; Xはポリエチレングリコール(例えばPEG-O-及びmPEG-O-)、ポリプロピレングリコール(PPG-O-)及びポリ-アミノ酸からなる群より選択される; Y_1 は任意に $-(C_0-C_6$ アルキル) $-C(O)-NH-$ 、 $-(C_2-C_6$ アルキル) $-OC(O)-NH-$ 、 $-(C_2-C_6$ アルキル) $-NHC(O)NH-$ 及び $-(CH_2)_mK-$ からなる群より選択され、ここで、m=3～10であり、KはO又はNHを表す; 並びにRはHであるか又は $-C_1-C_6$ アルキル、 $-(C_2-C_6$ アルキル) $-OH$ 及び $-(C_2-C_6$ アルキル) $-O-(C_1-C_6$ アルキル)からなる群より選択される不活性キャッピング基である)

50

である、請求項 1 又は 2 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 1 3】

ポリ-アミノ酸が、ポリグリシン、ポリアラニン、ポリバリン、ポリロイシン、ポリイソロイシン及びポリフェニルアラニンからなる群より選択される、請求項 1 ~ 7 又は 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 1 4】

$n=2 \sim 12$ 、XはPEG-O-又はmPEG-O-である； Y_1 は非存在である、及びRは-H又は-CH₂CH₂OHである、請求項 1 2 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 1 5】

$n=2 \sim 12$ ；XはmPEG-O-である；Yは存在し、かつ-(C₀-C₆)アルキル-C(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-OC(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-NHC(O)NH-及び-(CH₂)_mK-からなる群より選択され、ここで、 $m=3 \sim 10$ であり、KはO又はNHを表す；並びにRは-Hである、請求項 1 5 に記載の水溶液又は方法。

10

【請求項 1 6】

$n=4 \sim 8$ ；XはmPEG-O-である；Yは-(C₀-C₆)アルキル-C(O)-NH-である、及びRは-Hである、請求項 1 5 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 1 7】

KがNHである、請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 1 8】

エチレンジミンのオリゴマーの塩基性窒素中心(basic nitrogen centre)の少なくとも95%がプロトン化される、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

20

【請求項 1 9】

エチレンジミンのオリゴマーが約0.2mg/mL ~ 約5mg/mLの濃度で存在する、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 2 0】

抗体タンパク質が治療剤である、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 2 1】

抗体タンパク質が、抗体、抗体フラグメント、活性部分と複合体化した抗体、一以上の抗体フラグメントを含む融合タンパク質、又は上述のいずれかの誘導体である、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

30

【請求項 2 2】

抗体タンパク質がモノクローナル抗体である、請求項 2 1 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 2 3】

モノクローナル抗体が、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 2 2 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 2 4】

モノクローナル抗体がトラスツズマブ又はリツキシマブである、請求項 2 2 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 2 5】

モノクローナル抗体がインフリキシマブである、請求項 2 2 に記載の水溶液又は方法。

40

【請求項 2 6】

抗体タンパク質が、一以上の免疫グロブリンFcフラグメントに融合した活性タンパク質ドメインを含む融合タンパク質である、請求項 2 1 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 2 7】

抗体タンパク質がエタネルセプト、アバタセプト又はベラタセプトである、請求項 2 6 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 2 8】

誘導体が、一以上の抗体又は抗体フラグメントと、化学的に不活性なポリマーとを含む複合体化した誘導体である、請求項 2 1 に記載の水溶液又は方法。

50

【請求項 29】

複合体化した誘導体がセルトリズマブペゴールである、請求項 28 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 30】

抗体タンパク質の濃度が約25mg/mL～約300mg/mLである、請求項 1～29 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 31】

抗体タンパク質の濃度が50mg/mLよりも高い、請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 32】

エチレンイミンのオリゴマーに対する抗体タンパク質の重量比(wt/wt)が約50～約100である、請求項 1～31 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 33】

エチレンイミンのオリゴマーに対する抗体タンパク質の重量比(wt/wt)が約100～約200である、請求項 32 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 34】

請求項 1～33 のいずれか 1 項に記載の水溶液を被験体に投与する工程を含む、抗体タンパク質の投与を必要とする被験体に抗体タンパク質を投与する方法。

【請求項 35】

溶液が、皮下注射若しくは筋肉注射によって、又は静脈注射若しくは輸液によって投与される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

投与される溶液の全体積が約2mL以下である、請求項 34 又は 35 に記載の方法。

【請求項 37】

抗体タンパク質のpIが溶液のpHよりも高い、請求項 1～36 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 38】

抗体溶液のpIが溶液のpHよりも少なくとも0.5単位高い、請求項 37 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 39】

抗体タンパク質のpIが少なくとも7である、請求項 1～38 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 40】

抗体タンパク質のpIが7～10の範囲である、請求項 39 に記載の水溶液又は方法。

【請求項 41】

水溶液が等張である、請求項 1～40 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 42】

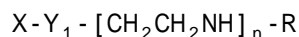
水溶液が、非荷電性張度調節剤(uncharged tonicity modifier)を含有する、請求項 1～41 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 43】

水溶液が荷電性張度調節剤(charged tonicity modifier)を含有する、請求項 1～41 のいずれか 1 項に記載の水溶液又は方法。

【請求項 44】

式V:



式V

(式中、n=2～6; Xはポリエチレングリコール(例えば、PEG-O-及びmPEG-O-)、ポリプロピレングリコール(PPG-O-)、及びポリ-アミノ酸からなる群より選択される; Y₁は-(C₂-C₆)アルキル-C(O)-NH-及び(CH₂)_mKからなる群より選択され、ここでm=3～10でありKはNHを表す; 並びにRはH又は-C₁-C₆アルキル、-(C₂-C₆アルキル)-OH及び-(C₂-C₆アルキル)-O-(C₁-

10

20

30

40

50

C₆アルキルからなる群より選択される不活性キャッピング基である)の化合物。

【請求項 4 5】

nが3~5である、請求項 4 4 に記載の化合物。

【請求項 4 6】

Xは500Da~5000DaのMWを有し、かつポリエチレングリコール(例えばPEG-O-及びmPEG-O-)又はポリプロピレングリコール(PPG-O-)である、請求項 4 4 又は 4 5 に記載の化合物。

【請求項 4 7】

Y₁が-(C₂-C₆)アルキル-C(O)-NH-である、請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

10

【請求項 4 8】

Y₁が(CH₂)_mKである；m=3又は4及びKはNHを表す、請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 4 9】

RがHである請求項 4 4 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 5 0】

Rが-(C₂-C₄アルキル)-OHである請求項 4 4 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 5 1】

mPEG 吉草酸アミドペンタエチレンヘキサミン、mPEG 吉草酸アミドテトラエチレンペンタミン、mPEG 吉草酸アミドトリエチレンテトラミン、mPEG プロピルトリエチレンテトラミンエタノール及びmPEG プロピルペンタエチレンヘキサミンエタノールから選択される請求項 4 4 に記載の化合物。

20

【請求項 5 2】

エチレンイミンのオリゴマーが請求項 4 4 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の化合物である、請求項 1 に記載の水溶液。

【請求項 5 3】

請求項 1 ~ 3 3、3 7 ~ 4 3 又は 5 2 のいずれか 1 項に記載の水溶液を含有する、パッケージ化された医薬組成物を必要とする被験体への投与に適した、パッケージ化された医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の背景

様々な化学的プロセス、例えば酸化、脱アミノ化及びアスパラギン酸塩の異性化は、治療用タンパク質、例えば抗体の重大な品質特性に影響を及ぼすことがあるが、タンパク質の凝集は、おそらくはタンパク質の安定性に影響を与える最も一般的なプロセスである。典型的には凝集は悪化し、高濃度、例えば10mg/ml以上で水溶液中に製剤化されたタンパク質の重要な分解経路である。貯蔵の間、凝集によって、製剤中に許容できない程度の高レベル高分子量種(HMWS)が生じ得るか、又はより大きな不溶性凝集体(粒子状物質)の形成が生じ得る。このような汚染した製剤は米国食品医薬品局及び他の医薬の規制当局によって定められた仕様の範囲には入らないだろう。

40

【0 0 0 2】

タンパク質組成物の種々のパラメータを最適化することによって、タンパク質の凝集をある程度コントロールすることができる。例えば、凝集速度をコントロールする方法は、pHの最適化、金属イオンのキレート剤の添加、又は界面活性剤の添加を含み得る。

【0 0 0 3】

その組成物のイオン強度も、水性タンパク質組成物における凝集速度に影響を与え得る。それゆえに、治療用タンパク質についての従来の製剤開発は、典型的には非荷電性化学種、例えば糖類、又は荷電性化学種、例えば無機塩若しくは有機塩から選択し得る張度調節剤(tonicity modifier)のスクリーニングを含む。より低いイオン強度の組成物におい

50

て凝集速度がより遅い場合、非荷電性張度調節剤(uncharged tonicity modifier)が一般的に好ましく、それに対してより高いイオン強度の組成物において凝集速度がより遅い場合、荷電性張度調節剤(charged tonicity modifier)が好ましい。通常、治療用途のための水性タンパク質組成物中で使用される荷電性張度調節剤は塩化ナトリウムを含む。典型的な非荷電性張度調節剤としては、ショ糖、トレハロース、グリセロール及びマンニトールが挙げられる。

【0004】

タンパク質の凝集は、多数の異なるメカニズムを伴った極めて複雑なプロセスである。しかしながら、二種類の主要な非共有性の相互作用：(1)タンパク質分子の非極性部分間の疎水性相互作用、及び(2)タンパク質分子の荷電領域間の電荷-電荷相互作用がタンパク質を凝集させるものと考えられている。より低いイオン強度の組成物よりも、より高いイオン強度の組成物における凝集速度がより遅いケースにおいては、凝集の主な原因はタンパク質分子間の電荷-電荷相互作用によるものであると考えられている。

10

【0005】

しかしながら、タンパク質の凝集を制御し得る溶液及び組成物が治療用途に有用な場合、該溶液及び組成物は、好ましい毒性プロファイルを発揮することも決定的に重要である。従って、タンパク質の凝集速度を低下させるために使用され得る任意の添加剤は、それら自体が好ましい毒性プロファイルを有しているはずである。

【0006】

このように、好ましい毒性プロファイルを有し、それゆえに治療用途に適した、安定で高濃度のタンパク質溶液、特に高濃度の抗体溶液を調製するための改善された方法についてのニーズがある。

20

【0007】

US 2007/0036866 (Kissel et al.)には、PEI残基及びPEG残基を含有するカチオン性ブロックポリマーが記載されている。

【発明の概要】

【0008】

発明の概要

本発明は抗体タンパク質の凝集、とりわけ高濃度の抗体タンパク質の凝集という課題に取り組む。本発明はさらに、好ましい毒性プロファイルを発揮し、治療用途に適する濃縮された抗体溶液を提供するという課題に取り組む。本発明の応用によって、好ましい毒性プロファイルを発揮し、それゆえに治療への応用において有用となり得る組成物が提供されるのと同時に、水性抗体タンパク質組成物における凝集速度を顕著に低下させることが期待される。本発明はさらに、好ましい毒性プロファイルを発揮する抗体タンパク質の治療上有用な組成物を提供すると同時に、抗体タンパク質の自己会合及び水性組成物における抗体タンパク質の自己会合、とりわけ高濃度の抗体タンパク質の自己会合という課題に取り組む。

30

【0009】

一つの態様において、本発明は少なくとも約10mg/mLの濃度の抗体タンパク質及びエチレンジアミンのオリゴマーを含有する水溶液に関するものであり、ここで、該オリゴマーにおけるエチレンジアミンの繰り返し単位の数(n)は2~12の範囲内である。

40

【0010】

一つの態様において、本発明は少なくとも約10mg/mLの濃度の水溶液における抗体タンパク質の凝集速度を低減する方法を提供する。本方法は、n=2~12であるエチレンジアミンのオリゴマーを溶液に添加する工程を含む。

【0011】

一つの態様において、本発明は少なくとも約10mg/mLの抗体濃度の水性抗体タンパク質溶液の、貯蔵中の粘度の上昇速度を低減する方法を提供し得る。本方法は、n=2~12のエチレンジアミンのオリゴマーを溶液に添加する工程を含む。

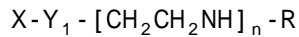
【0012】

50

一つの態様において、本発明は、貯蔵中の低分子量種の形成によって検出される場合に、少なくとも約10mg/mLの濃度の水溶液中での抗体タンパク質の望ましくない断片化の速度を低減する方法を提供し得る。とりわけ、かかる望ましくない断片化は、一以上の抗体フラグメントを含む融合タンパク質で生じ得る。本方法は、 $n=2\sim 12$ であるエチレンイミンのオリゴマーを溶液に添加する工程を含む。

【0013】

本明細書で開示される特定のエチレンイミンのオリゴマーは新規であり、それゆえに、本発明の一つの局面として特許請求される。従って、本発明は、本発明の溶液、組成物及び方法において有用であり、以下により詳細に記載される式(V)：



式V

の化合物も提供する。

【0014】

本明細書に記載される態様の溶液及び組成物は、好ましい毒性プロファイルを実証することが期待され、そしてそれゆえに、治療用途に適している。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A】図1Aは、PEG化エチレンイミンのオリゴマー及び非-PEG化エチレンイミンのオリゴマー及び5k mPEGの、40 のリツキシマブの製剤の凝集速度に対する効果を示す。

【図1B】図1Bは、PEG化エチレンイミンのオリゴマー及び非-PEG化エチレンイミンのオリゴマー及び5k mPEGの、40 のリツキシマブの製剤の凝集速度に対する効果を示す。

【図1C】図1Cは、PEG化エチレンイミンのオリゴマー及び非-PEG化エチレンイミンのオリゴマー及び5k mPEGの、40 のリツキシマブの製剤の凝集速度に対する効果を示す。

【図1D】図1Dは、PEG化エチレンイミンのオリゴマー及び非-PEG化エチレンイミンのオリゴマー及び5k mPEGの、40 のリツキシマブの製剤の凝集速度に対する効果を示す。

【図1E】図1Eは、PEG化エチレンイミンのオリゴマー及び非-PEG化エチレンイミンのオリゴマー及び5k mPEGの、40 のリツキシマブの製剤の凝集速度に対する効果を示す。

【図1F】図1Fは、PEG化エチレンイミンのオリゴマー及び非-PEG化エチレンイミンのオリゴマー及び5k mPEGの、40 のリツキシマブの製剤の凝集速度に対する効果を示す。

【図2】図2は、PEIのサイズのHEK 293及びVero細胞への細胞毒性に対する効果を示す。

【図3】図3は、エチレンイミンのオリゴマーのサイズのVero細胞の阻害に対する効果を示す。各点近傍の数値は、テストされたオリゴマー又はポリマーの分子量(Da)を示す。

【図4】図4は、エチレンイミンのオリゴマーのサイズのMDCK細胞の阻害に対する効果を示す。各点近傍の数値は、テストされたオリゴマーの分子量(Da)を示す。

【図5】図5は、ペンタエチレンヘキサミン及び2K mPEG吉草酸アミドペンタエチレンヘキサミン(化合物(1))のVero細胞の阻害に対する効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

本発明は、 $n=2\sim 12$ であるエチレンイミンのオリゴマーが好ましい毒性プロファイルを発揮することが期待されるのと同時に、それが高濃度の水性抗体溶液(即ち少なくとも約10mg/mLの濃度)を安定化させるという発見に関する。特に、本発明のエチレンイミンのオリゴマーは、より大きいホモログ(例えば600Daを超える分子量のポリエチレンイミン)よりもさらに好ましい毒性プロファイルを発揮することが期待される。

【0017】

この期待される好ましい毒性プロファイルのために、本発明は、治療用途の抗体タンパク質の水性組成物に特に適用できる。

【0018】

高濃度の抗体タンパク質の水性製剤を安定化させるための現在の方法と比べると、特に凝集及び可逆的自己会合の速度を低減させることに関して、本発明はいくつかの利点を提

10

20

30

40

50

供する。例えば、試験的な製剤化の計画の際により少ない試行錯誤が要求される製剤開発のためのより合理的なアプローチが、本発明によって可能となるはずである。次いで、このことによって、貯蔵安定性及び低容量の皮下注射のための適合性という重要な性能要件を満足させるような最適化された製剤へのルートを、加速させることができ、より低コストとすることができる。

【0019】

既知の方法と比較すると、本発明により示される安定性の利益及び期待される好ましい毒性プロファイルによって、治療上重要な抗体タンパク質のより高濃度の水性製剤の使用が可能となるはずである。

【0020】

本明細書で用いられているような、用語「抗体タンパク質」とは、抗体、抗体フラグメント、活性部分と複合体化した抗体、一以上の抗体フラグメントを含む融合タンパク質、例えば免疫グロブリンFcドメイン、又は上述のいずれかの誘導体のことを言う。誘導体の例としては、複合体化した誘導体、例えば抗体又は別の部分と複合体化した抗体フラグメントが挙げられる。このような部分としては、化学的に不活性なポリマー、例えばPEGが挙げられる。好ましい抗体としては、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体、好ましくはモノクローナル抗体が挙げられる。モノクローナル抗体は、例えば哺乳類又は鳥類の抗体、キメラ抗体、例えばヒト/マウスのキメラ又はヒト/霊長類のキメラ、ヒト化抗体又は完全なヒト抗体であり得る。適切な抗体としては、免疫グロブリン、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄等のIgG、IgM、IgA₁又はIgA₂等のIgA、IgD、IgE又はIgYが挙げられる。適切な抗体としては、一本鎖抗体も挙げられる。さらには、Fc、Fab、Fab₂、ScFvのフラグメント等の抗体フラグメントも挙げられる。さらには、ナノボディ等の単一ドメイン抗体も包含される。

【0021】

抗体タンパク質としては治療用抗体タンパク質が好ましい。このような抗体タンパク質は、望ましい治療活性又は予防活性を有し、かつ疾患又は医学的障害の治療、阻害又は予防に適用される。

【0022】

用語「PEI」とは、ポリエチレンジアミン、随意に誘導体化されていてもよい多数の繰り返し基(repeating group)を含むエチレンジアミンのポリマーのことを言う。

【0023】

用語「OEI」とは、随意に誘導体化されていてもよい2~12の繰り返し単位を含むエチレンジアミンのオリゴマーのことを言う。

【0024】

本明細書で用いられているような、用語「水溶液」とは、水の溶液のことを言い、好ましくは、蒸留水、脱イオン水、注射用水、注射用滅菌水、又は注射用静菌水の溶液である。本発明の水溶液には、溶解された抗体タンパク質、エチレンジアミンのオリゴマー、及び随意に一以上の添加剤及び/又は賦形剤が含まれる。水溶液には、一以上の成分、例えば添加剤又は賦形剤も含有され得、これらは部分的に溶解されるか又は溶解されない。このような一つ又は複数の成分が存在することで、多相の組成物、例えば懸濁液又はエマルションが生じる。好ましくは、本発明の水溶液は、目視又は光散乱によって決定される場合に均質の溶液である。

【0025】

オリゴマーにおけるエチレンジアミンの繰り返し単位の数(n)が2~12の範囲内であるエチレンジアミンのオリゴマーは、典型的には、式-(CH₂CH₂NH)_n-の部分又はその分岐誘導体から本質的に構成されるか又はこれを含むものであり得、ここで、nは2~12の範囲内である。直鎖エチレンジアミンのオリゴマーは第二級アミノ基のみを含み(オリゴマーの末端の官能基性は考慮しない)、これに対してポリエチレンの分岐オリゴマーは第一級、第二級及び第三級アミノ基を含んでもよい。本発明において、直鎖及び分岐のエチレンジアミンのオリゴマーの混合物を含有する水溶液も企図される。適切には、本発明のエチレンジアミンの

オリゴマーは直鎖である。

【0026】

例えば、 $n=2$ 、 $n=3$ 、 $n=4$ 、 $n=5$ 、 $n=6$ 、 $n=7$ 、 $n=8$ 、 $n=9$ 、 $n=10$ 、 $n=11$ 、又は $n=12$ である。一つの態様において、 $n=3\sim 12$ 、 $4\sim 12$ 、 $5\sim 12$ 又は $6\sim 12$ である。さらなる態様において、 $n=2\sim 11$ 、 $2\sim 10$ 、 $2\sim 9$ 、 $2\sim 8$ 、 $2\sim 7$ 、 $2\sim 6$ 、又は $2\sim 5$ 、例えば $3\sim 5$ である。さらなる態様において、 $n=3\sim 9$ 、 $4\sim 8$ 又は $5\sim 7$ である。よりさらなる態様において、 $n=2\sim 11$ 、 $3\sim 11$ 、 $4\sim 10$ 、 $5\sim 9$ 、又は $6\sim 8$ である。よりさらなる態様において、 $n=4\sim 7$ 、 $4\sim 6$ 又は $4\sim 5$ である。 $n=2\sim 12$ であるエチレンジミンのオリゴマーは、誘導体化されていてもよく、されていなくてもよい。一つの態様において、エチレンジミンのオリゴマーは誘導体化されておらず、ジエチレントリアミン、トリエチレントトラミン、テトラエチレンペンタミン及びペンタエチレンヘキサミンからなる群より選択されるものが適切である。誘導体化されていないエチレンジミンのオリゴマーは、対応する誘導体化オリゴマーと比べてコストがより低く、かつ入手がより容易である。

10

【0027】

用語「エチレンジミンのオリゴマー」は、例えば不活性なポリマー又はキャッピング基によってオリゴマーの一以上の末端が誘導体化された(例えば化学修飾された)誘導体を包含する。

【0028】

本明細書で用いられているような、「 C_1 - C_6 アルキル」は、 $1\sim 6$ の炭素原子を含む直線又は分岐の脂肪族炭素鎖と定義され、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、イソブチル、 t -ブチル、ペンチル、イソペンチル、及びヘキシル、並びに対応するアルキレンラジカル、例えばメチレン、エチレン等である。

20

【0029】

エチレンジミンのオリゴマーも、化学的に不活性なポリマーで誘導体化されていてもよい。本明細書で用いられているような、用語「ポリマー」には、別途規定されていない限り、コポリマーも含まれる。化学的に不活性なポリマーは、例えば水への溶解性を高めたり、安定性を向上させたり、又は毒性を軽減することによって、エチレンジミンのオリゴマーそのものに生理化学的利点を付与し得る。代替的に又は追加的に、化学的に不活性なポリマーは、例えば抗体タンパク質の凝集の低減におけるエチレンジミンのオリゴマーの効果を上昇させることによって、水溶液中の抗体タンパク質に生理化学的利点を付与し得る。一つの態様において、エチレンジミンのオリゴマーは、ポリエチレングリコール(PEG及びmPEG(mPEGとはメトキシでキャップされたポリエチレングリコールポリマーである))、ポリプロピレングリコール(PPG)、及びポリ-アミノ酸からなる群より選択される一以上のポリマーで誘導体化される。さらなる態様において、エチレンジミンのオリゴマーはコポリマーで誘導体化され、ここで該コポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG及びmPEG)、ポリプロピレングリコール(PPG)、及びポリ-アミノ酸からなる群より選択されるポリマー(及び/又はそれらの関連するモノマー)からなる。適切なポリ-アミノ酸としては、非荷電の又は側鎖を持たないものが挙げられ、ポリグリシン、ポリアラニン、ポリバリン、ポリロイシン、ポリイソロイシン及びポリフェニルアラニンが挙げられる。適切には、エチレンジミンのオリゴマーは、一以上のポリエチレングリコール(PEG)基で誘導体化される。

30

40

【0030】

エチレンジミンのオリゴマーが、化学的に不活性なポリマーで誘導体化される場合、典型的には、該ポリマーの分子量は、約500～約10000Da、例えば約1000～約5000Daの範囲内である。

【0031】

ポリマーのポリエチレングリコール(例えばPEG及びmPEG)、ポリプロピレングリコール(PPG)は、公式的には(formulaically)PEG-O-、mPEG-O-及びPPG-O-(及び同様にそのコポリマー)として、即ち、PEG、mPEG、PPG又は誘導体として機能するときは-O-で終了するコポリマー分子として定義される。例えば、代表的な式PEG-O- $(CH_2CH_2NH)_4H$ 又はPEG-O-OEIに

50

において、-O-の部分はエチレンイミンのオリゴマーよりもむしろPEG分子と結合する。この背景に対して、本明細書で用いられているような、「PEG」及び「PEG-O-」は、後者の場合においてのみ、構造的に均等なものとみなされるべきであり、PEGの末端基は明確に規定されてきた。同様の場合、本明細書においてポリ-アミノ酸は、公式的にはそれが結合するオリゴマー上の基の官能基性に依存してアミノ末端又はカルボキシ末端を包含すると規定される。例えば、代表的な式[ポリ-アミノ酸]-NH-(CH₂CH₂NH)₄Hにおいて、-NH-の部分はポリ-アミノ酸に結合する。あるいは、代表的な式H₂N-(CH₂CH₂NH)₄-C(O)-[ポリ-アミノ酸]において、-C(O)-の部分はポリ-アミノ酸に結合する。

【0032】

存在する場合、化学的に不活性なポリマーの末端はキャップされ得る。即ち、そのポリマーの末端は、特定のポリマーに通常関連するものとは異なる官能基性を伴う。例えば、一つの態様において、化学的に不活性なポリマーはポリエチレングリコールであり、メトキシ基で末端がキャップされ、即ちMeOCH₂CH₂-PEG-O-である。すでに述べたように、メトキシでキャップされたポリエチレングリコールポリマーは、「mPEG」で表示され得る。好ましい態様において、エチレンイミンのオリゴマーは一以上のPEG又はmPEG基で誘導体化される。PEG又はmPEGサブユニットは最適なサイズが選択され得る。一つの態様において、PEG又はmPEGは約500Da～約10000Da、例えば約1000Da、2000Da又は5000Daである。多分散性が小さいPEG及びmPEGサブユニットが望ましい。好ましくは、多分散性は1.2未満であり、より好ましくは1.1未満である。

【0033】

任意の架橋基、即ちエチレンイミンのオリゴマーと誘導化基(derivatising group)(例えば、キャッピング基若しくはキャリア基(carrier group)又は化学的に不活性なポリマー)との間に位置する基を介して、エチレンイミンのオリゴマーを誘導体化できる。この任意の架橋基は、好ましくは低い反応性を有し、かつ本発明の組成物中の水溶液中での加水分解に安定である。例えば、適切な架橋基としては、カルボニル、アミド、カルバメート及び尿素が挙げられる。随意に、アルキレン基(例えばC₂-C₁₀アルキレン又はC₃-C₁₀アルキレン)が当該架橋基と誘導化基との間に位置し得る。好ましい架橋基は、アルキレン基に随意に結合するアミドである。代替的な態様において、架橋基は単にC₃-C₁₀アルキレン基からなり、C₃-C₆アルキレンが適切であり、C₃又はC₄のアルキレンがより適切であり、これはエチレンイミンのオリゴマーの一つの末端のNHに直接結合する。

【0034】

エチレンイミンのオリゴマーは上記のように誘導体化され得、ここにおいてオリゴマーの一以上の末端が誘導体化される。あるいは、エチレンイミンのオリゴマーの一以上の末端が誘導体化され得、オリゴマーの一以上の代替的な末端が-H又は不活性キャッピング基でキャップされ得る。

【0035】

適切な不活性キャッピング基としては、-C₁-C₆アルキル、-(C₂-C₆アルキル)-OH及び-(C₂-C₆アルキル)-O-(C₁-C₆アルキル)が挙げられる。好ましいキャッピング基はCH₂CH₂OHである。

【0036】

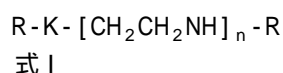
あるいは、エチレンイミンのオリゴマーは誘導体化されないものもあり得るが、上記のように、オリゴマーの一以上の末端が-H又は不活性キャッピング基でキャップされていてもよい。

【0037】

上記のような任意のエチレンイミンのオリゴマーは直鎖又は分岐であり得る。

【0038】

一つの態様において、式Iのエチレンイミンのオリゴマーは：



で示され、式中、KはO又はNHを表し、n=2～12、及びそれぞれのRは独立して、H又は-C₁-C

10

20

30

40

50

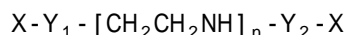
₆アルキル、-(C₂-C₆アルキル)-OH及び-(C₂-C₆アルキル)-O-(C₁-C₆アルキル)からなる群より選択される不活性キャッピング基である。

【0039】

一つの態様において、KはNHを表す。

【0040】

一つの態様において、式IIのエチレンイミンのオリゴマーは：



式II

で示され、式中、n=2~12、それぞれのXは独立してポリエチレングリコール(例えばPEG-O-及びmPEG-O-)、ポリプロピレングリコール(PPG-O-)及びポリ-アミノ酸からなる群より選択される；Y₁は任意であって、-(C₀-C₆)アルキル-C(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-OC(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-NHC(O)NH-及び-(CH₂)_mK-からなる群より選択され、ここで、m=3~10及びKはO又はNHを表す；Y₂は-C(O)-(C₀-C₆)アルキル-、-C(O)O(C₂-C₆)アルキル-、C(O)-NH-(C₂-C₆)アルキル-及び-(CH₂)_mからなる群より選択され、ここで、m=2~10。

10

【0041】

一つの態様において、任意のY₁は、-(C₀-C₆)アルキル-C(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-OC(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-NHC(O)NH-及び-(CH₂)_mK-からなる群より選択され、ここで、m=3~10及びKはNHを示す。

【0042】

一つの態様において、任意のY₁は、-(C₂-C₆)アルキル-C(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-OC(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-NHC(O)NH及び(CH₂)_mKからなる群より選択され、ここで、m=3~10及びKはO又はNHを示す。

20

【0043】

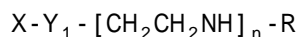
一つの態様において、任意のY₁は、-(C₂-C₆)アルキル-C(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-OC(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-NHC(O)NH及び(CH₂)_mKからなる群より選択され、ここで、m=3~10及びKはNHを示す。

【0044】

一つの態様において、Y₂は、-C(O)-(C₂-C₆)アルキル-、-C(O)O(C₂-C₆)アルキル-、-C(O)-NH-(C₂-C₆)アルキル-及び-(CH₂)_mからなる群より選択され、ここで、m=2~10。

【0045】

代替的態様において、式IIIのエチレンイミンのオリゴマーは：



式III

で示され、式中、n=2~12；Xはポリエチレングリコール(例えばPEG-O-及びmPEG-O-)、ポリプロピレングリコール(PPG-O-)、及びポリ-アミノ酸からなる群より選択される；Y₁は任意であって、-(C₀-C₆)アルキル-C(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-OC(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-NHC(O)NH-及び(CH₂)_mKからなる群より選択され、ここで、m=3~10及びKはO又はNHを表す；並びにRはHか又は-C₁-C₆アルキル、-(C₂-C₆アルキル)-OH及び-(C₂-C₆アルキル)-O-(C₁-C₆アルキル)からなる群より選択される不活性キャッピング基である。

30

【0046】

一つの態様において、Y₁は任意であり、-(C₀-C₆)アルキル-C(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-OC(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-NHC(O)NH-及び(CH₂)_mKからなる群より選択され、ここで、m=3~10及びKはNHを表す。

40

【0047】

一つの態様において、任意のY₁は、-(C₂-C₆)アルキル-C(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-OC(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-NHC(O)NH及び(CH₂)_mKからなる群より選択され、ここで、m=3~10及びKはO又はNHを表す。

【0048】

一つの態様において、任意のY₁は、-(C₂-C₆)アルキル-C(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-OC(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-NHC(O)NH及び(CH₂)_mKからなる群より選択され、ここで、m=3

50

~10及びKはNHを示す。

【0049】

式(III)の一つの態様において、 $n=2\sim 12$;XはPEG-O-又はmPEG-O-であり、 Y_1 は非存在であり、及びRは-H又は-CH₂CH₂OHである。さらなる態様において、 $n=2\sim 12$;XはmPEG-O-である; Y_1 は非存在であり、及びRは-Hである。さらなる態様において、 $n=2\sim 12$;XはmPEG-O-である; Y_1 はなく、及びRは-CH₂CH₂OHである。さらなる態様において、 $n=2\sim 8$;XはmPEG-O-である; Y_1 は非存在であり、及びRは-CH₂CH₂OHである。さらなる態様において、 $n=2$;XはmPEG-O-である; Y_1 は非存在であり、及びRは-CH₂CH₂OHである。さらなる態様において、 $n=5$;XはmPEG-O-である; Y_1 は非存在であり、及びRは-CH₂CH₂OHである。さらなる態様において、 $n=8$;XはmPEG-O-である; Y_1 は非存在であり、及びRは-CH₂CH₂OHである。

10

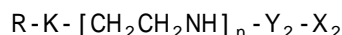
【0050】

式(III)の一つの態様において、 $n=2\sim 12$;XはmPEG-O-である、 Y_1 は存在し、-(C₀-C₆)アルキル-C(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-OC(O)-NH-、-(C₂-C₆)アルキル-NHC(O)NH-及び-(CH₂)_mK-からなる群より選択され、ここで、 $m=3\sim 10$ 及びKはO又はNHを表す;及びRは-H又はCH₂CH₂OHである。さらなる態様において、 $n=4\sim 8$;XはmPEG-O-である; Y_1 は-(C₀-C₆)アルキル-C(O)-NH-であり、Rは-Hである。さらなる態様において、 $n=5$;XはmPEG-O-である; Y_1 は-(C₂)アルキル-C(O)-NH-であり、Rは-Hである。さらなる態様において、 $n=5$;XはmPEG-O-である; Y_1 は-(C₄)アルキル-C(O)-NH-であり、Rは-Hである。

【0051】

代替的な態様において、式IVのエチレンイミンのオリゴマーは:

20



式IV

で示され、式中、 $n=2\sim 12$ 、KはO又はNHを表す; X_2 は、ポリエチレングリコール(例えばPEG-O-及びmPEG-O-)、ポリプロピレングリコール(PPG-O-)及びポリ-アミノ酸からなる群より選択される; Y_2 は、-C(O)-(C₀-C₆)アルキル-、-C(O)O(C₂-C₆)アルキル-、-C(O)-NH-(C₂-C₆)アルキル-及び-(CH₂)_m-からなる群より選択され、ここで、 $m=2\sim 10$;並びにRは-Hか、又は-C₁-C₆アルキル、-(C₂-C₆アルキル)-OH及び-(C₂-C₆アルキル)-O-(C₁-C₆アルキル)からなる群より選択される不活性キャッピング基である。

【0052】

式IVの一つの態様において、 $n=2$;KはOを表し、 X_2 はmPEG-O-である; Y_2 は-C(O)-(C₂)アルキル-である;並びにRは-Hである。同様に、式IVの別の態様において、 $n=2$;KはOを表す; X_2 はmPEG-O-である; Y_2 は-(CH₂)₃-である;及びRは-Hである。一つの態様において、 Y_2 は、-C(O)-(C₂-C₆)アルキル-、-C(O)O(C₂-C₆)アルキル-、-C(O)-NH-(C₂-C₆)アルキル-及び-(CH₂)_m-からなる群より選択され、ここで、 $m=2\sim 10$ 。

30

【0053】

それらの誘導体を含むエチレンイミンのオリゴマーを、従来のプロセスによって、例えば次の工程を含む工程によって調製することができる:

(i)エチレンイミンの重合あるいは2-メチル-2-オキサゾリン又は2-エチル-2-オキサゾリンの重合と、それに続くアルカリ加水分解による脱アシル化。例えば、本方法はmPEGにより誘導体化されたエチレンイミンのオリゴマーの調製に適しており、ここで、mPEG誘導体のmPEG-X(式中、XはNH₂、OH、O-メシル又はO-トシルである)を重合のための開始反応物として使用する。このような手法は、KisselらによるUS20070036866A1及びアキヤマらによるMacromolecules, 2000, 33, 5841-5845により記載されたものに基づき得る。

40

【0054】

(ii)担体ポリマーの活性化カルボキシル誘導体との反応による、プレ形成されたエチレンイミンのオリゴマーのアシル化。例えば、mPEGに基づく担体ポリマーの場合、適切な活性化カルボキシル誘導体はmPEG-スクシンイミジルプロパン酸及びmPEG-スクシンイミジル吉草酸であり、それによってアルキル-アミド架橋基が組み込まれる。このような手法は、WagnerらによるUS20040248842A1及びSchluepによるUS20050031579A1により記載されたものに基づき得る。

50

【 0 0 5 5 】

(iii) プレ形成された(pre-formed)エチレンイミンのオリゴマーの、担体ポリマーのイソシアネート誘導体との反応。これによってアルキル-尿素架橋基が組み込まれる。例えば、mPEGに基づく担体ポリマーの場合、mPEG-アルコール及びヘキサメチレンジイソシアネートから適切なイソシアネート誘導体が調製される。このような手法は、PetersenらによるMacromolecules 2002, 35, 6867-6874に記載されたものに基づき得る。

【 0 0 5 6 】

(iv) プレ形成されたエチレンイミンのオリゴマー及び担体ポリマーのアルデヒド誘導体とを使用する還元的アミノ化。これにより $(CH_2)_m$ 架橋基が組み込まれる。例えば、mPEGに基づく担体ポリマーの場合、適切なアルデヒド誘導体はmPEGプロピオンアルデヒド及びmPEGブチルアルデヒドである。対応するアルデヒド水和物も使用され得る。このような手法は、タンパク質のN-末端PEG化において利用された方法、例えばKintzlerによるUS5824784及びBentley及びHarrisによるUS5990237に記載されたような方法に基づき得る。例示的な条件は実施例のセクションに記載されている。

【 0 0 5 7 】

遊離塩基の形又は塩の形で、エチレンイミンのオリゴマーを本発明の水溶液又は組成物に添加し得る。好ましくは、水溶液又は組成物のpHは、エチレンイミンのオリゴマーの塩基性基の少なくとも一部が溶液中でプロトン化されるほどに十分に小さい。典型的には、本発明に係る水溶液又は組成物のpHは4~8、例えば5.0~7.5又は5.5~7.0の範囲内である。好ましくは、本発明に係る水溶液又は組成物のpHは、5.5~6.0、6.0~6.5又は6.5~7.0の範囲内であってもよい。

【 0 0 5 8 】

エチレンイミンのオリゴマーを、適切な酸、例えば薬学的に許容し得る酸の塩として水溶液又は組成物に添加することもできる。適切な酸としては、塩酸、臭化水素酸、クエン酸、乳酸、酒石酸、リン酸、メタンスルホン酸、酢酸、ギ酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、コハク酸、マロン酸、硫酸、L-グルタミン酸、酒石酸、L-アスパラギン酸、ピルビン酸、粘液酸、安息香酸、グルクロン酸(glucuronic acid)、シュウ酸、及びアスコルビン酸が挙げられる。一つの態様において、酸は二以上の酸性基を含むポリ酸である。式I、II、III及びIVのポリエチレングリコールの誘導体化オリゴマーはプロトン化されていない窒素中心で描かれているが、これらの式のオリゴマー(式中、一部又は本当に全ての塩基性窒素中心はプロトン化されている)も本発明の範囲内に含まれているとみなされることを意図することに注意すべきである。塩基性窒素中心の一部又は全てがプロトン化されている誘導されないエチレンイミンのオリゴマーを企図する全ての態様も、本発明の範囲内に含まれるとみなされる。

【 0 0 5 9 】

一つの態様において、エチレンイミンのオリゴマーの50~100%の塩基性窒素中心がプロトン化される。さらなる態様において、エチレンイミンのオリゴマーの80~100%の塩基性窒素中心がプロトン化される。好ましくは、エチレンイミンのオリゴマーの少なくとも95%の塩基性窒素中心がプロトン化される。理論に縛られることを望むわけではないが、エチレンイミンのオリゴマーの少なくとも95%の塩基性窒素中心がプロトン化される場合、抗体タンパク質表面上の高い電荷密度が覆われ、それによって抗体タンパク質の凝集が阻害されると予想される。特に、理論に縛られることを望むわけではないが、抗体タンパク質表面における負の電荷を帯びたパッチがエチレンイミンのオリゴマーで覆われ、それによって電荷主導の抗体タンパク質の凝集が阻害されると予想される。

【 0 0 6 0 】

一つの態様において、抗体タンパク質を含む水溶液のpHはそのタンパク質の等電点(pI)よりも下である。一つの態様において、抗体タンパク質のpIは、溶液のpHよりも高く、適切には少なくとも0.5単位高く、より適切には0.5~5単位高く、さらにより適切には1~3単位高い。一つの態様において、抗体タンパク質のpIは、少なくとも7、例えば7~10又は7.5~9の範囲内である。

10

20

30

40

50

【0061】

一つの態様において、抗体タンパク質を含む水溶液は等張である。一つの態様において、抗体タンパク質を含む水溶液は高張である。一つの態様において、抗体タンパク質を含む水溶液は低張である。

【0062】

エチレンジミンのオリゴマーは所望の安定性を提供するのに十分な濃度で組成物中に存在する。一つの態様において、エチレンジミンのオリゴマーの濃度は約0.01～約10mg/mL、例えば約0.01～約0.1mg/mL、約0.1～約0.25mg/mL、約0.25～約1mg/mL、約1～約2mg/mL、約2～約5mg/mL又は約5～約10mg/mLである。一つの態様において、エチレンジミンのオリゴマーの濃度は約0.2mg/mL～約2mg/mLである。本明細書で用いられているような、本発明の組成物におけるエチレンジミンのオリゴマーの質量は遊離の塩の均等物のことを言い、即ち、存在する場合は対アニオンを含まない。

【0063】

特定の態様において、エチレンジミンのオリゴマーに対する抗体タンパク質の比率(wt/wt)は、少なくとも10、例えば少なくとも20である。特定の態様において、エチレンジミンのオリゴマーに対するタンパク質の重量比は、約20～約300、好ましくは約50～約200である。特定の態様において、エチレンジミンのオリゴマーに対するタンパク質の重量比は、約100である。特定の態様において、エチレンジミンのオリゴマーに対するタンパク質の重量比は、300より高い、例えば500まで、800まで、又は1000までであり得る。これらの重量比は、あらゆる誘導化基(例えばPEG基)を除いたエチレンジミンのオリゴマー成分それ自体の重量のことを言う。一つの態様において、オリゴマーに対する抗体タンパク質の比率(wt/wt)は約100～約200である。

【0064】

本発明の溶液は好ましくは緩衝剤を含有する。典型的には、緩衝剤はタンパク質を所望の濃度に溶解させることを可能とし得るpHを提供するように選択される。好ましくは、pHは、エチレンジミンのオリゴマーにおける少なくとも一部の塩基性基がプロトン化される程度に十分に低い。緩衝剤は、タンパク質の安定性を向上させるためにも選択され得る。

【0065】

本発明者らは、実施例7及び8に記載されるように、エチレンジミンのオリゴマー及びポリマーのサイズの細胞毒性に対する効果を研究してきた。その結果を図2、3及び4に図示する。そしてこの結果は、ポリエチレンジミンのサイズが小さくなるのに従って、その細胞毒性効果も小さくなることを明確に実証している。細胞毒性が減少することは、約50,000Daの量(weight)のポリエチレンジミンが約800Daに低下することについて実証されている(実施例7を参照すること)。細胞毒性が低下するこの傾向は、エチレンジミンのオリゴマー(オリゴマー中のエチレンジミンの繰り返し単位の数(n)は2～12の範囲内である(即ち800Da未満の量))は細胞毒性をさらに低下させたことを示唆することが合理的に推定され得る。実際のところ、細胞毒性の低下は約100Daにまで小さくしてさらに実証される(実施例8を参照すること)。理論に縛られることを望むわけではないが、本発明者らは、エチレンジミンのオリゴマー(オリゴマー中のエチレンジミンの繰り返し単位の数(n)は2～12の範囲内である)は高い電荷密度を有する抗体タンパク質表面の領域を覆うのに十分なサイズであり、それによって濃縮された溶液における抗体タンパク質の凝集という課題が解決されると考えている。特に、理論に縛られることを望むわけではないが、エチレンジミンのオリゴマー(n=2～12である)は高い陰性の電荷密度を有する抗体タンパク質のパッチを覆うのに十分なサイズであり、それによって濃縮された溶液における電荷主導の抗体タンパク質の凝集という課題が解決されることが企図される。さらに、発明者らの研究の結果(図2、3及び4を参照すること)、そして繰り返し、あらゆる理論に縛られることを望むわけではないが、本発明者らは、エチレンジミンのオリゴマー(オリゴマーにおけるエチレンジミンの繰り返し単位の数(n)は2～12の範囲である)も細胞膜の崩壊に関連するあらゆる毒性効果の発揮を避けるのに十分に小さなサイズであると考えている。従って、このようなオリゴマーは、好ましい毒性プロファイルを発揮すると同時に、濃縮された抗

体タンパク質溶液における凝集を軽減し得る。従って、かかるオリゴマーは治療用途に特に有用である。

【0066】

実施例1~6に記載されているように、本明細書で規定されるエチレンジイミンのオリゴマーが組成物、例えば水性抗体タンパク質溶液において、該エチレンジイミンのオリゴマーを含まないがその他は類似又は同一である組成物と比較して、同一の条件及び同一の時間の長さの下での貯蔵後に、抗体タンパク質の凝集速度を顕著に低下させ得ることが見いだされた。

【0067】

一つの態様において、抗体タンパク質の濃縮された水溶液中にエチレンジイミンのオリゴマー（オリゴマーにおけるエチレンジイミンの繰り返し単位の数(n)は2~12の範囲である）が存在することで、高分子量タンパク質種の増加が（全タンパク質の重量で）、40 で一か月の貯蔵後に5%以下、適切には3%以下、より適切には2%以下に制限される。一つの態様において、抗体タンパク質の濃縮された水溶液中に、エチレンジイミンのオリゴマー（オリゴマーにおけるエチレンジイミンの繰り返し単位の数(n)は2~12の範囲である）が存在することで、高分子量タンパク質種の増加が（全タンパク質の重量で）、2~8 で最大二年間貯蔵後に5%以下、適切には3%以下、より適切には2%以下に制限される。高分子量種の定量は組成物中の全タンパク質の重量パーセントとしてである。

10

【0068】

一つの態様において、抗体タンパク質の濃縮された水溶液中のエチレンジイミンのオリゴマー（オリゴマーにおけるエチレンジイミンの繰り返し単位の数(n)は2~12の範囲である）の存在は、エチレンジイミンのオリゴマーを欠くが他の点は同一である組成物と比べて、高分子量タンパク質種の増加を、同じ条件と時間の長さの下での貯蔵後に少なくとも10%まで、好ましくは少なくとも25%まで、より好ましくは少なくとも50%まで制限する。

20

【0069】

一つの態様において、抗体タンパク質の濃縮された水溶液におけるエチレンジイミンのオリゴマー（ここでオリゴマーにおけるエチレンジイミンの繰り返し単位の数(n)は2~12の範囲）の存在によって、目に見える凝集体が無いタンパク質の水性組成物が維持され、一方、同じ条件及び同じ時間の長さの貯蔵の後、エチレンジイミンのオリゴマーを欠くがその他は同一である組成物では、目に見える凝集体の形成が観察される。濁度又は他のタイプの光散乱測定によって、目に見える凝集体の定量を実施することができる。

30

【0070】

特定の態様において、抗体は活性分子、例えば毒素、又は放射性金属イオン、例えば⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹³¹I又は⁹⁰Yに結合し得るキレート剤と融合するか又は複合体化する。そのような態様において、典型的には、抗体は標的化剤、例えば活性分子を特定の細胞表面タンパク質を提示する細胞に向かわせることとして機能する。

【0071】

本明細書で記載されるように製剤化され得る具体的な抗体としては、特に限定されないが、インフリキシマブ(キメラ抗体、抗TNF)、アダリムマブ(ヒト抗体、抗TNF)、バシリキシマブ(キメラ抗体、抗IL-2)、アブシキシマブ(キメラ抗体、抗GpIIb/IIIa)、ダクリズマブ(ヒト化抗体、抗IL-2)、ゲムツズマブ(ヒト化抗体、抗CD33)、アレムツズマブ(ヒト化抗体、抗CD52)、エドレコロマブ(マウスIg2a、抗EpCAM)、リツキシマブ(キメラ抗体、抗CD20)、パリビズマブ(ヒト化抗体、抗呼吸器合胞体ウイルス)、トラスツズマブ(ヒト化抗体、抗HER2/neu(erbB2)レセプター)、ベバシズマブ(ヒト化抗体、抗VEGF)、セツキシマブ(キメラ抗体、抗EGFR)、エクリズマブ(ヒト化抗体、抗補体系タンパク質C5)、エファリズマブ(ヒト化抗体、抗CD11a)、イブリツモマブ(マウス抗体、抗CD20)、ムロモナブ-C D3(マウス抗体、抗T細胞CD3レセプター)、ナタリズマブ(ヒト化抗体、抗4インテグリン)、ニモツズマブ(ヒト化IgG1、抗EGFレセプター)、オマリズマブ(ヒト化抗体、抗IgE)、パニツムマブ(ヒト抗体、抗EGFR)、ラニビズマブ(ヒト化抗体、抗VEGF)、1-131トシツモマブ(ヒト化抗体、抗CD20)、オフアツムマブ(ヒト抗体、抗CD-20)、セルトリズマブ(ヒト

40

50

化抗体、抗TNF- α ）、ゴリムマブ(ヒト抗体、抗TNF α)及びデノスマブ(ヒト抗体、抗RANKリガンド)が挙げられる。好ましい抗体としては、トラスツズマブ及びリツキシマブが挙げられる。さらなる対象の抗体はインフリキシマブである。

【0072】

本明細書で記載されるように製剤化され得るその他のキメラ抗体としては、バビツキシマブ(抗ホスファチジルセリン)、ブレンツキシマブ(抗CD30)、シルツキシマブ(抗IL-6)、クレノリキシマブ(抗CD4)、ガリキシマブ(抗CD80)、ゴミリキシマブ(抗CD23)、ケリキシマブ(抗CD4)、ルミリキシマブ(抗CD23)、プリリキシマブ(抗CD4)、テネリキシマブ(抗CD40)、パパリキシマブ(抗VAPB)、エクロメキシマブ(抗GD3)、及びバギバキシマブ(抗ブドウ球菌リポタイコ酸)が挙げられる。

10

【0073】

本明細書で記載されるように製剤化され得るその他のヒト化抗体としては、エブラツズマブ(抗CD22)、アフツズマブ(抗CD20)、ビバツズマブメルタンシン(抗CD44)、カンツズマブメルタンシン(抗ムチン)、シタツズマブボガトックス(bogatox)(抗TACSTD1)、ダセツズマブ(抗CD40)、エロツズマブ(抗CD319)、エタラシズマブ(抗 $\alpha_v\beta_3$ -インテグリン)、ファルレツズマブ(抗FR α)、イノツズマブオソガマイシン(抗CD22)、ラベツズマブ(抗がん胎児性抗原)、リンツズマブ(抗CD33)、ミラツズマブ(抗CD74)、ニモツズマブ(抗EGFR)、オボルツズマブモナトックス(monatox)(抗EpCAM)、ペルツズマブ(抗HER2)、シブロツズマブ(抗FAP)、タカツズマブテトラキセタン(tetraxetan)(抗アルファ-フェトタンパク質)、チガツズマブ(抗TRAIL-2)、ツコツズマブセルモリューキン(celmoleukin)(抗EpCAM)、ベルツズマブ(抗CD20)、アセリズマブ(抗CD62L)、アボリズマブ(抗HLA-DRB)、ベンラリズマブ(抗CD125)、セデリズマブ(抗CD4)、エブラツズマブ(抗CD22)、エルリズマブ(抗CD18)、フォントリズマブ(抗インターフェロン- γ)、メボリズマブ(抗IL5)、オクレリズマブ(抗CD20)、パスコリズマブ(抗IL4)、ペクセリズマブ(抗補体成分5)、PRO-140(抗CCR5)、レスリズマブ(抗IL5)、ロンタリズマブ(抗インターフェロン- γ)、ロベリズマブ(抗CD11、CD18)、シブリズマブ(抗CD2)、タリズマブ(抗IgE)、テブリズマブ(抗CD3)、トシリズマブ(抗IL6R)、ベドリズマブ(抗 $\alpha_4\beta_7$ -インテグリン)、ビシリズマブ(抗CD3)、イバリズマブ(抗CD4)、テフィバズマブ(抗クランピング因子A)、タドキズマブ(抗 $\alpha_{11b}\beta_3$ -インテグリン)、パピネウズマブ(抗アミロイド- β)、ソラネズマブ(抗アミロイド- β)、タネズマブ(抗NGF)、ウロトクサズマブ(抗大腸菌シガ様毒素II Bサブユニット)、フェルビズマブ(抗呼吸器合胞体ウイルス)、モタビズマブ(抗呼吸器合胞体ウイルス糖タンパク質F)及びレブリキズマブ(抗IL13)が挙げられる。

20

30

【0074】

本明細書で記載されるように製剤化され得るさらなるヒト抗体としては、アトロリムマブ(抗Rh因子)、フレソリムマブ(抗TGF β -1、-2、及び-3)、レルデリムマブ(抗TGF β -2)、メテリムマブ(抗TGFP-1)、モロリムマブ(抗Rh因子)、イピリムマブ(抗CTLA-4)、トレメリムマブ(抗CTLA-4)、ベルチリムマブ(抗CCL11)、ザノリムマブ(抗CD4)、ベリアキヌマブ(抗IL12、-23)、カナキヌマブ(抗IL1 α)、ウステキヌマブ(抗IL12、-23)、アダカツムマブ(抗EpCAM)、ベリムマブ(抗B細胞活性化因子)、シクツムマブ(抗IGF-1レセプター)、コナツムマブ(抗TRAIL-R2)、フィギツムマブ(抗IGF-1レセプター)、イラツムマブ(抗CD30)、レクサツムマブ(抗TRAIL-R2)、ルサツムマブ(抗CD40)、マバツムマブ(抗TRAIL-R4)、ネシツムマブ(抗EGFR)、オララツムマブ(抗PDGF-R)、プリツムマブ(抗ビメンチン)、ロバツムマブ(抗IGF-1レセプター)、ボツムマブ(抗腫瘍抗原CTAA16.88)、ザルツムマブ(抗EGFR)、スタムルマブ(抗ミオスタチン)、エフヌグマブ(抗真菌HSP90)、エクソビビルマブ(抗B型肝炎表面抗原)、フォラビルマブ(抗狂犬病糖タンパク質)、リビビルマブ(抗B型肝炎表面抗原)、ラフィビルマブ(抗狂犬病糖タンパク質)、レガビルマブ(抗サイトメガロウイルス糖タンパク質B)、セビルマブ(抗サイトメガロウイルス)、ツビルマブ(抗B型肝炎ウイルス)、パノバクマブ(抗緑膿菌血清型IAT5 011)、ラキバクマブ(抗炭疽菌毒素)、ラムシルマブ(抗VEGF-R2)、及びガンテネルマブ(抗アミロイド- β)が挙げられる。

40

【0075】

50

免疫グロブリン分子のフラグメントを含む融合タンパク質も、本発明によって製剤化され得る。適切な融合タンパク質としては、一つ以上の免疫グロブリンフラグメント、例えばFcドメインに融合した活性タンパク質ドメインを含むタンパク質が挙げられる。かかる融合タンパク質には、可溶性レセプター又はレセプター細胞外リガンド結合ドメイン等の活性タンパク質ドメインを含むモノマー単位を有する二量体タンパク質が挙げられ、これは免疫グロブリンFcドメインと融合する。二つのFcドメインはジスルフィド結合を介して会合し得、二量体タンパク質を形成する。かかる融合タンパク質としては、エタネルセプト、アパタセプト及びベラタセプトが挙げられる。

【0076】

抗体(又は一以上の抗体フラグメント)及び化学的に不活性なポリマー、例えばPEGを含む複合体化した誘導体も、本発明によって製剤化し得る。かかる誘導体としてはセルトリズマブベゴールが挙げられる。

【0077】

抗体タンパク質は天然源から単離することができ、又は組換えタンパク質であり得る。

【0078】

特定の態様において、抗体タンパク質は実質的に純粋であり、即ち、この組成物は単一のタンパク質を含み、かつ実質的な量の任意の付加的なタンパク質を含まない。好ましい態様において、タンパク質は、組成物中の全タンパク質含量の少なくとも99%、好ましくは少なくとも99.5%、より好ましくは少なくとも約99.9%を含む。好ましい態様において、タンパク質は医薬組成物として使用するために十分に純粋である。

【0079】

水溶液における抗体タンパク質の濃度は少なくとも約10mg/mL、好ましくは約25mg/mL～約400mg/mLの範囲である。特定の態様において、濃度は少なくとも約25mg/mLである。特定の態様において、タンパク質の濃度は、少なくとも約30mg/mL、40mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mL又は100mg/mLである。より好ましくは、タンパク質の濃度は50mg/mLよりも高く、例えば少なくとも約80mg/mLである。この濃度は最大で約400mg/mLで有り得、例えば最大で約350mg/mL、300mg/mL、250mg/mL、200mg/mL又は175mg/mLであり得る。前述の下限値の一つ及び前述の上限値の一つによって制限されているあらゆる濃度範囲が、本明細書において企図される。

【0080】

本明細書で用いられているような、用語「薬学的に許容される」とは、使用目的及びヒト又は動物、例えば哺乳類の体への投与形態に適した医薬組成物の成分であって、過度の悪い結果、例えば毒性、刺激及びアレルギー反応を伴わず、そして妥当なリスク/便益比を伴うもののことを言う。

【0081】

適切には、組成物のpHを安定化させるために、本発明の組成物は緩衝剤を含み、これはタンパク質の安定性も高めるために選択することができる。一つの態様において、緩衝剤は、組成物のpHに近いpKaを持つものから選択され、組成物のpHが4.5～5.5の範囲である場合、例えば、酢酸塩は適した緩衝剤として採用される。組成物のpHが5.6～6.5の範囲である場合、ヒスチジンは適した緩衝剤として採用される。あるいは、別の態様において、WO2008/084237に開示されたように、本発明の組成物はさらに安定化される。ここでは、タンパク質及び一以上の添加剤を含む組成物が記載され、この系は実質的に従来の緩衝剤、即ち、組成物の意図される貯蔵温度の範囲において、組成物のpHの1単位以内のpKaを有する化合物を含まないことに特徴がある。この態様において、組成物のpHは、その組成物がpHに関して測定可能な最大の安定性を有する値に設定され、一つ以上の添加剤(取って代わった緩衝剤)は、タンパク質とプロトンを交換し得、組成物の意図される貯蔵温度の範囲における組成物のpHよりも、少なくとも1単位多い又は少ないpKa値を有する。タンパク質を適切なpHに維持することによって、測定可能な安定性が最大となる値又はその近傍において、従来の緩衝剤が無い場合であっても、タンパク質の貯蔵安定性は実質的に向上し得る。特定の態様において、水性組成物の意図される貯蔵温度の範囲で、水性組成物の

pHの1～5pH単位、好ましくは1～3pH単位、より好ましくは1.5～2.5pH単位のpKaを有する添加剤を使用することによって、おそらくは実質的に一般的な貯蔵安定性はさらに向上させることができる。

【0082】

本発明の溶液は、一以上の従来の賦形剤、例えば無機塩、好ましくはナトリウム、カリウム、カルシウム又はアンモニウムと、塩化物、硫酸塩、炭酸塩、亜硫酸塩、硝酸塩、乳酸塩、コハク酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩又は乳酸塩との組み合わせである塩；アミノ酸、好ましくはヒスチジン、グリシン、アルギニン又はメチオニン(例えば酸化防止剤として)；糖又は糖アルコール、好ましくはトレハロース、ショ糖、マンニトール、ラフィノース、ソルビトール、ラクチトール(lactitol)、グリセロール又は1,2-プロパンジオール；界面活性剤、好ましくはポリソルベート20、ポリソルベート60、ポリソルベート80、ポロキザマー(poloxamer)188又はポロキザマー407；微量金属のキレート剤、好ましくはETDA；保存料、好ましくはフェノール、m-クレゾール、ベンジルアルコール、プロピルパラベン、塩化ベンザルコニウム又は塩化ベンゼトニウムをさらに含有し得る。マグネシウムと、塩化物、硫酸塩、炭酸塩、亜硫酸塩、硝酸塩、乳酸塩、コハク酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩又は乳酸塩との組み合わせである無機塩も、適切な賦形剤である。

10

【0083】

本発明の溶液は、随意に張度調節剤を含んでもよい。適切な張度調節剤は、本発明の背景において上記にリストアップされ、荷電性又は非荷電性の化学種であり得る。典型的な非荷電性張度調節剤としては、糖類、例えばショ糖、トレハロース、グリセロール及びマンニトールが挙げられる。典型的な荷電性張度調節剤としては、荷電性化学種、例えばアルギニン又は塩化ナトリウムが挙げられる。

20

【0084】

一つの態様において、抗体タンパク質の水溶液の張度は、荷電性種、例えば無機塩又は有機塩を用いることで調整される。一つの態様において、抗体タンパク質水溶液の張度は、非荷電性種、例えば糖又は糖アルコールを用いることで調整される。

【0085】

本発明の水性組成物は広範囲のモル浸透圧濃度をカバーしており、低張、等張及び高張の組成物が含まれる。好ましくは、本発明の溶液は実質的に等張である。好ましい溶液は、約200～約500mOsm/Lの範囲のモル浸透圧濃度を有する。好ましくは、モル浸透圧濃度は約250～約350mOsm/Lの範囲である。より好ましくは、モル浸透圧濃度は約300mOsm/Lである。一つの態様において、溶液は筋肉注射又は皮下注射によって被験体に投与されることを目的とし、溶液のモル浸透圧濃度は、注射時の痛みを最小化するために選択される。

30

【0086】

本明細書で用いられているような、用語「高分子量種」とは、見かけの分子量が親の活性タンパク質の少なくとも約二倍の分子量を有するタンパク質の実体(content)の任意の成分を意味する。即ち、高分子量種は親タンパク質の多重凝集体である。多重凝集体は、大幅にコンフォメーションが変化した親タンパク質分子を含み得、又は多重凝集体は、ネイティブ又はネイティブに近いコンフォメーションを持つ親タンパク質単位の集合体であり得る。高分子量種の決定は、本技術分野において公知の方法を用いて行うことが可能であり、サイズ排除クロマトグラフィー、電気泳動、分析的超遠心/沈降速度、光散乱、動的散乱、静的散乱及びフィールドフローフラクシオネーションが挙げられる。

40

【0087】

40 で少なくとも一、二又は三か月間の貯蔵の後の本発明の組成物が、(全タンパク質重量の)5%以下の高分子量種を含むことが好ましい。一つの態様において、40 で少なくとも一、二又は三か月間の貯蔵の後の高分子量種の量は(全タンパク質重量の)5%以下まで増加し、好ましくは3%以下である。高分子量種の定量は、組成物における全タンパク質の重量パーセントとして示される。

【0088】

好ましい態様において、本発明の組成物は、同一の条件と期間の貯蔵後のエチレンイミ

50

ンのオリゴマーを欠くがその他は同一である組成物と比べて、貯蔵の間の高分子量種の増加が少なくとも10%低く、好ましくは少なくとも25%低くより好ましくは少なくとも50%低いことを示すはずである。

【0089】

一つの態様において、本発明の組成物は、治療用抗体タンパク質の投与を必要とする被験体に治療用抗体タンパク質を投与することに適した医薬組成物である。このような組成物は、治療用タンパク質の被験体への投与方法に使用され得る。

【0090】

別の態様において、本発明は、治療用抗体タンパク質をそれを必要とする被験体に投与する方法を提供する。本方法は、少なくとも約10mg/mLの濃度の抗体タンパク質と、エチレンイミンのオリゴマーを含む水溶液を投与する工程であって、オリゴマーにおけるエチレンイミンの繰り返し単位の数(n)が2~12の範囲である工程を含む。好ましくは、組成物は静脈注射、皮下注射又は筋肉注射によって投与される。より好ましくは、組成物は皮下注射によって投与される。

【0091】

好ましい態様において、タンパク質の濃度は、それぞれの投与の全体積が約2mLを超えない程度に十分に高いものである。好ましくは、それぞれの投与の全体積は約1.5mL又は約1.0mLを超えない。一つの態様において、それぞれの投与の溶液の体積は約0.5~約2mLであり、好ましくは約0.5~約1.5mLである。

【0092】

別の態様において、本発明は、パッケージ化された医薬組成物を必要とする被験体への投与に適したパッケージ化された医薬組成物を提供する。医薬組成物は、少なくとも約10mg/mLの濃度の治療用抗体タンパク質及びエチレンイミンのオリゴマーを含む水溶液を含有し、ここでオリゴマーにおけるエチレンイミンの繰り返し単位の数(n)の範囲は2~12である。

【0093】

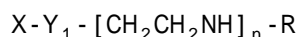
好ましくは、溶液の体積は約2mL以下である。一つの態様において、溶液の体積は、シリンジを介して摂取される溶液の制限を収容するために、十分に過剰である約0.5~約2mLの投与体積を提供する。一つの態様において、過剰量は投与体積の約10%~約20%である。医薬組成物は、好ましくは、溶液を除去するための針の導入に適したバイアルでパッケージ化されたものである。一つの態様において、医薬組成物はゴムのストッパーが付いたガラス製のバイアルにパッケージ化されたものである。パッケージ化された医薬組成物は、キットとして提供可能であり、さらには使用説明書を含み、随意に、筋肉内投与又は皮下投与に適したシリンジを含み得る。あるいは、パッケージ化された医薬組成物は、筋肉内投与又は皮下投与に適する予め充填された使い捨てのシリンジの形態で提供され得る。予め充填された自動注入装置も、筋肉内投与又は皮下投与に適するだろう。

【0094】

本明細書で用いられているような、エチレンイミンのオリゴマーのパーセンテージとは、エチレンイミンのオリゴマーの遊離塩基に基づく重量である(即ち、あらゆる対イオンの重量は除かれる)。

【0095】

別の側面において、本発明は式Vの化合物は：



式V

で示され、式中、n=2~6;Xはポリエチレングリコール(例えばPEG-O-及びmPEG-O-)、ポリプロピレングリコール(PPG-O-)、及びポリ-アミノ酸からなる群より選択される;Y₁は-(C₂-C₆)アルキル-C(O)-NH-及び(CH₂)_mKからなる群より選択され、ここで、m=3~10でありKはNHを示す;並びにRはHか、又は-C₁-C₆アルキル、-(C₂-C₆アルキル)-OH及び-(C₂-C₆アルキル)-O-(C₁-C₆アルキル)からなる群より選択される不活性キャッピング基である。

【0096】

式(V)の一つの態様において、 n は3～5である。

【0097】

式(V)の一つの態様において、 X は500Da～5000DaのMWを有し、ポリエチレングリコール(例えばPEG-O-及びmPEG-O-)又はポリプロピレングリコール(PPG-O-)であり、 X は約2000Da又は約5000DaのMWを有し、mPEG-Oが適している。

【0098】

式(V)の一つの態様において、 Y_1 は $-(C_2-C_6)$ アルキル-C(O)-NH-であり、 $-(C_2-C_4)$ アルキル-C(O)-NH-が適している。

【0099】

式(V)の一つの態様において、 Y_1 は $(CH_2)_m$ であり、 $m=3\sim 10$ 、例えば $m=3$ 又は4、及び K はN 10
Hを表す。

【0100】

式(V)の一つの態様において、 R はHである。(V)の一つの態様において、 R は $-(C_2-C_4)$ アルキル)-OHである。

【0101】

式(V)の一つの態様において、 $n=2\sim 6$ 、 X は500Da～5000DaのMWを有し、ポリエチレングリコール(例えばPEG-O-及びmPEG-O-)又はポリプロピレングリコール(PPG-O-)である； Y_1 は、 $-(C_2-C_6)$ アルキル-C(O)-NH-及び $(CH_2)_m$ からなる群より選択され、ここで、 $m=3\sim 10$ であり、 K はNHを表す；並びに R はHか、又は $-C_1-C_6$ アルキル、 $-(C_2-C_6)$ アルキル)-OH及び $-(C_2-C_6)$ アルキル)-O- (C_1-C_6) アルキル)からなる群より選択される不活性キャッピング基である。 20

【0102】

式(V)の一つの態様において、 $n=2\sim 6$ 、 X はポリエチレングリコール(例えばPEG-O-及び/又はmPEG-O-)である； Y_1 は $-(C_2-C_6)$ アルキル-C(O)-NH-及び $(CH_2)_m$ からなる群より選択され、ここで、 $m=3\sim 4$ であり K はNHを表す；並びに R はHか、又は $-C_1-C_6$ アルキル、 $-(C_2-C_6)$ アルキル)-OH及び $-(C_2-C_6)$ アルキル)-O- (C_1-C_6) アルキル)からなる群より選択される不活性キャッピング基である。

【0103】

式(V)の一つの態様において、 $n=2\sim 6$ 、 X はmPEG-O-である； Y_1 は $-(C_2-C_6)$ アルキル-C(O)-NH-及び $(CH_2)_m$ からなる群より選択され、ここで、 $m=3\sim 4$ であり K はNHを表す；並びに R はH又は $-(C_2-C_6)$ アルキル)-OHである。 30

【0104】

式(V)の一つの態様において、 $n=2\sim 6$ 、 X はポリエチレングリコール(例えばPEG-O-及びmPEG-O-)である； Y_1 は $-(C_2-C_6)$ アルキル-C(O)-NH-及び $(CH_2)_m$ からなる群より選択され、ここで、 $m=3\sim 4$ であり K はNHを表す；並びに R はH又は $-(C_2-C_6)$ アルキル)-OHである；ここで、 Y_1 が $(CH_2)_mK$ の場合、 R は $-(C_2-C_6)$ アルキル)-OHである。

【0105】

式(V)の典型的な化合物としては、mPEG吉草酸アミドペンタエチレンヘキサミン(例えばその中のmPEGが2K mPEGであるもの)、mPEG吉草酸アミドテトラエチレンペンタミン(例えばその中のmPEGが2K mPEGであるもの)、mPEG吉草酸アミドトリエチレンテトラミン(例えばその中のmPEGが2K mPEGであるもの)、mPEGプロピルトリエチレンテトラミンエタノール(例えばその中のmPEGが2K又は5K mPEGであるもの)及びmPEGプロピルペンタエチレンヘキサミンエタノール(例えばその中のmPEGが2K又は5K mPEGであるもの)が挙げられる。 40

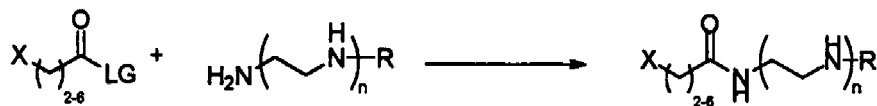
【0106】

式(V)の化合物は、当業者にとって公知の方法と一緒に、実施例に記載された方法及びそれに類似する方法を使用して調製され得る。

【0107】

例えば、 Y_1 が $-(C_2-C_6)$ アルキル-C(O)-NH-である式(V)の化合物は次のようにして調製され得る。ここで、LGは脱離基、例えばO-スクシンイミドを表す(例えば化合物(I)の合成を参照すること)。

【化 1】



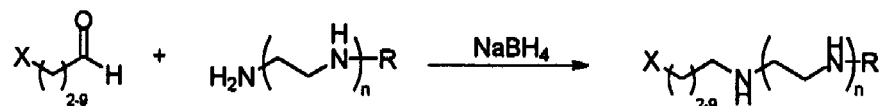
スキーム 1

【 0 1 0 8 】

Y_1 が $(CH_2)_mK$ であり K が NH である式 (V) の化合物は、還元的アミノ化を経て次のように調製され得る。

10

【化 2】



スキーム 2

【 0 1 0 9 】

20

スキーム 1 及び 2 において、ポリエチレングリコール-含有化合物と反応する前に、エチレンイミンのオリゴマーは予め R を伴う官能基を有している。官能基を持たないエチレンイミンのオリゴマー ($R=H$) とポリエチレングリコール-含有化合物との反応も同様に可能性があり、次いで、それに続く反応によってキャッピング基 R が次のように付加する。ここで、 LG は適切な脱離基、例えば O -スクシンイミド、 Cl 、 Br 又は I である。

【化 3】



スキーム 3

30

【 0 1 1 0 】

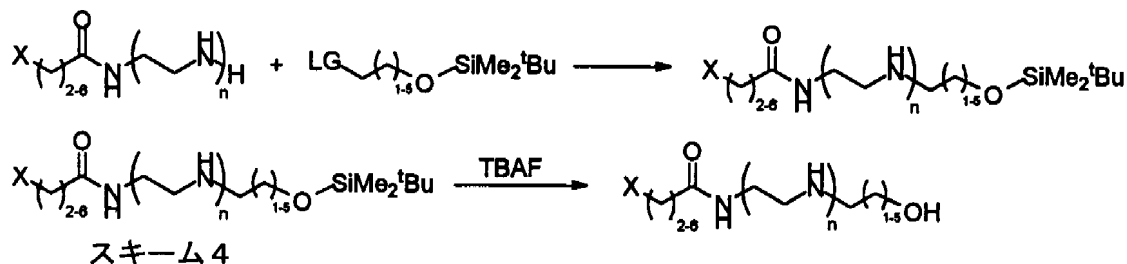
スキーム 3 はスキーム 1 の代替案であるが、キャッピング基 R が一度付加するとエチレンイミンのオリゴマー及びポリエチレングリコール-含有基 X がカップリングするという、この反対の工程の順序付けは、スキーム 2 に同様に適用される。

【 0 1 1 1 】

R が $-(C_2-C_6 \text{ アルキル})-OH$ である場合、カップリングの前に R のヒドロキシル基を保護するかについての追加工程が要求され得る。例えば、 R 基が $-SiMe_2^tBu$ 基 ($tert$ ブチルジメチルシリル) で保護されている場合、一旦エチレンイミンのオリゴマーにカップリングすると、次のような外部の脱保護工程において $-SiMe_2^tBu$ 基が取り除かれるはずである。

40

【化 4】



10

【 0 1 1 2 】

ケイ素保護基、例えばtertブチルジメチルシリルの除去に適した試薬としては、フッ素化試薬、例えばテトラブチルアンモニウムフルオリド(TBAF)が挙げられる(例えば化合物(2)の合成における工程3を参照すること)。

【 0 1 1 3 】

上記の式(V)の化合物は、本発明の溶液、組成物及び方法において有用である。

【 0 1 1 4 】

本発明のさらなる側面には次のものが含まれる：

A． 次のものを含む水溶液：

(a) 少なくとも約10mg/mL、25mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、80 mg/mL、90mg/mL又は100mg/mLの濃度の抗体タンパク質、又は約25mg/mL～約400mg/mLの範囲(例えば、約350mg/mL以下、300mg/mL以下、250mg/mL以下、200mg/mL以下又は175mg/mL以下)の抗体タンパク質；及び

20

(a) 本明細書に記載されるような式I、式II、式III、式IV、又は式Vのエチレンジアミンのオリゴマー、ここで、オリゴマーにおけるエチレンジアミンの繰り返し単位の数(n)は2～12の範囲(又は式Vの定義に従う範囲)であり、エチレンジアミンの濃度が約0.01～約10mg/mL(例えば、約0.01～約0.1mg/mL、約0.1～約0.25mg/mL、約0.25～約1mg/mL、約1～約2mg/mL、約2～約5mg/mL、又は約5～約10mg/mL)である；及び

水溶液のpHが4～8の範囲(例えば5.0～7.5又は5.5～7.0)であり、そして溶液が約200～約500mOsm/Lの範囲のモル浸透圧濃度を有する。

30

【 0 1 1 5 】

B． 側面Aの水溶液、ここで溶液は、タンパク質を所望の濃度に溶解させるのに十分なpHと、エチレンジアミンのオリゴマーにおける塩基性基の一部をプロトン化させるのに十分に低いpHを与える緩衝剤を含有する。

【 0 1 1 6 】

C． 側面A又はBの水溶液、ここで、エチレンジアミンのオリゴマーは、随意に末端がキャップされていてもよい化学的に不活性なポリマーで誘導体化される。

【 0 1 1 7 】

D． 側面A、B又はCの水溶液、ここで、抗体タンパク質の濃度は、それぞれの投与の全体積が約2mLを超えないように十分に高い。

40

【 0 1 1 8 】

E． 側面A、B、C又はDの水溶液、ここで、水溶液は一以上の従来の賦形剤をさらに含有する。

【実施例】

【 0 1 1 9 】

材料

エチレンジアミン(Mw 60Da)、ジエチレントリアミン(Mw 103Da)、トリエチレンテトラミン(Mw 146Da)、テトラエチレンペンタミン(Mw 189Da)、ペンタエチレンヘキサミン(Mw 232Da)及びPEI800(ポリエチレンジアミン、分岐エチレンジアミン、LSによる平均Mw約800、GPCによる平均Mn約600)はSigma-Aldrich社から入手した。5K mPEGアルコール(Mw 5000Da)

50

はDr Reddy's CPSから入手した。2K mPEGスクシンイミジル吉草酸はLayson Bio社から入手した。5K mPEGプロピオンアルデヒドはDr Reddy's CPSから入手した。

【 0 1 2 0 】

略号

CPE 細胞変性効果

DMEM ダルベッコ最小必須培地

FBS ウシ胎児血清

HEK ヒト胎児由来腎臓

MDCK メイディン・ダービー・イヌ腎臓上皮

MTBE メチルtert-ブチルエーテル

10

mPEG メトキシでキャップされたポリエチレングリコールポリマー

PEG ポリエチレングリコール

PEI ポリエチレンイミン

PPG ポリプロピレングリコール

THF テトラヒドロフラン

【 0 1 2 1 】

選択されたエチレンイミンのオリゴマー誘導体の合成

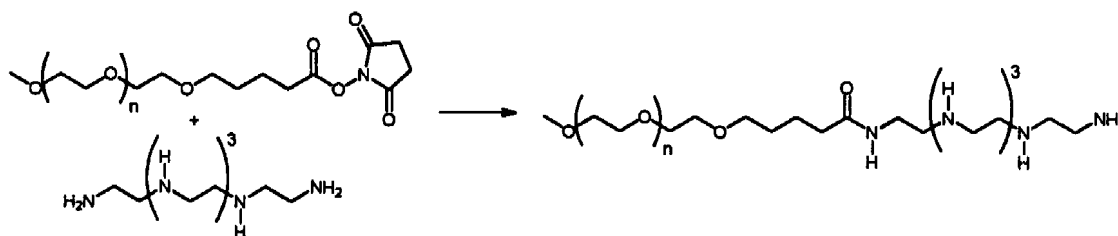
次の誘導体化されたエチレンイミンのオリゴマーを合成した：

【 0 1 2 2 】

化合物 (1) mPEG-O(CH₂)₄CONH-(CH₂CH₂NH)₅H(=2K mPEG吉草酸アミドペンタエチレンヘキサミン)(Mw約2331)

20

【 化 5 】



30

2K mPEGスクシンイミジル吉草酸(1.5g、0.75mmol)をアセトニトリル(45ml)に溶解させた。ペンタエチレンヘキサミン(0.26g、1.12mmol)もアセトニトリル(5ml)に溶解させ、溶解させたmPEG試薬に数分間かけて滴下した。次いで、反応混合物を室温で一晩攪拌し、その後、不透明の懸濁液を得た。反応混合物をセライトでろ過した後、メチルtert-ブチルエーテル(MTBE)(300ml)の添加によってmPEG成分がアセトニトリルから沈殿した。紙でろ過する前に、氷水浴の容器で懸濁液を冷却し、追加のメチルtert-ブチルエーテル(50ml)で洗浄した。湿った生成物を室温、減圧下で数時間かけて乾燥させ、白色固体物として表題のオリゴマーを得た(1.24g;83%)。

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz); 3.41-3.84 (m, PEG及びm, OCH₂CH₂CH₂CH₂CONH)、3.38 (s, OCH₃)、2.37-3.36 (m, 種々のCH₂)、2.21 (m, CH₂CONH)、1.56-1.72(m, OCH₂CH₂CH₂CH₂CONH)

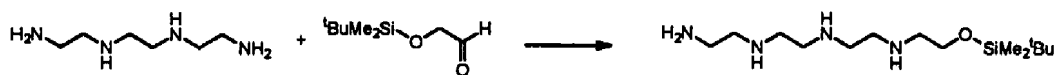
40

【 0 1 2 3 】

化合物 (2) mPEG-O(CH₂)₃-(NHCH₂CH₂)₃NHCH₂CH₂OH(=5K mPEGプロピルトリエチレンテトラミンエタノール)(Mw約5247)

工程1: モノ - 保護ジアミン

【化 6】



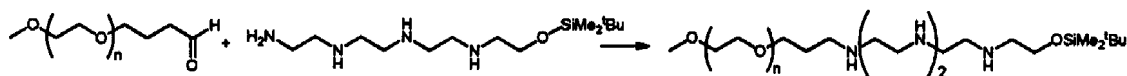
トリエチレンテトラミン(1.15g、7.9mmol)及び(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)アセトアルデヒド(0.7g、3.9mmol、0.5当量)をメタノール(50ml)中でひとまとめにして、室温で1時間撹拌した。この時間が経過後、水素化ホウ素ナトリウム(89mg、2.4mmol、0.3当量)を添加し、わずかな発泡が生じた。反応混合物を15分間撹拌し、次いで減圧下でメタノール溶媒を除去した。得られた不透明の液体をジクロロメタン(50ml)に溶解し、水(10ml)及び塩水(10ml)で洗浄した。生じた層は不透明であったが、すぐに分離した。ジクロロメタン層を分取し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、この乾燥剤を取り除き、減圧下で溶媒を除去した。これによって、不透明の液体としてモノ-保護されたジアミン1.0g(ジアミンから42%)を得た。

10

【0124】

工程2: 5K mPEG-プロピオンアルデヒドとの反応

【化 7】



20

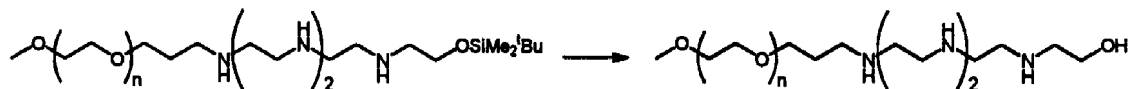
5K mPEGプロピオンアルデヒド(5.0g、1mmol)及び工程1のモノ-保護されたジアミン(1.5g、5mmol、5当量)をメタノール(60ml)に溶解させ、室温で1時間撹拌した。水素化ホウ素ナトリウム(0.11g、3mmol、3当量)を反応混合物に添加し、15分間撹拌した。次いで、減圧下でメタノール溶媒を除去して、湿った白色固形物を得た。これをジクロロメタン(30ml)に溶解させ、生成物をMTBE(300ml)で結晶化させて、白色固形物としてのシリル保護化生成物5.3g(100%)を得た。

30

【0125】

工程3: mPEG プロピルトリエチレンテトラミンエタノールへの脱保護

【化 8】



40

温かい水浴内で穏やかに加熱(約40℃)することによって、工程2のシリル保護化前駆体(4.8g、0.96mmol)をテトラヒドロフラン(THF)(50ml)に溶解させた。次いで、テトラブチルアンモニウムフルオリド(1.5ml、THF中の1M溶液、1.5当量)を添加し、反応混合物を室温で一晩撹拌した。MTBE(125ml)を反応混合物に添加し、ろ過によって沈殿を集めた。ろ別された湿ったケーキをジクロロメタン(10ml)に溶解し、プロパン-2-オール(250ml)の添加によって沈殿させた。次いで、ジクロロメタン及びプロパン-2-オールからの沈殿を繰り返し、白色の固形物を単離し、30℃で3時間かけて乾燥させて、高密度の白色固形物としての表題の生成物2.2g(45%)を得た。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz); 3.43-3.84 (m, PEG, CH₂OH及びPEGCH₂), 3.38 (s, OCH₃), 2.45-2.85 (m, 多重CH₂N), 1.72-1.82 (2H, m, PEGCH₂CH₂NH)。

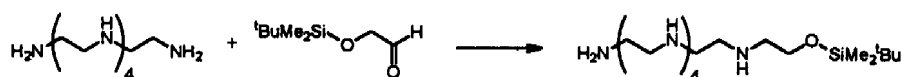
【0126】

化合物 (3) mPEG-O(CH₂)₃-(NHCH₂CH₂)₅NHCH₂CH₂OH(=5K mPEGプロピルペンタエチレンヘキサミンエタノール)(Mw約5333Da)

50

工程1：モノ-保護化ジアミン

【化9】

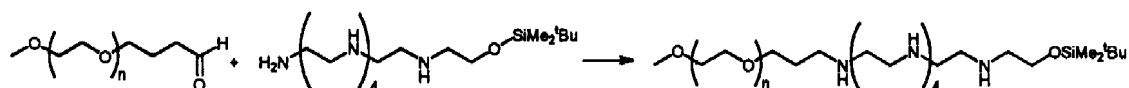


ペンタエチレンヘキサミン(5.3g、23.0mmol)及び(*tert*-ブチルジメチルシリルオキシ)アセトアルデヒド(2.0g、11.5mmol、0.5当量)をメタノール(100ml)中でひとまとめにし、室温で1時間撹拌した。その後、水素化ホウ素ナトリウム(260mg、6.9mmol、0.3当量)を添加し、わずかな発泡が生じた。反応混合物を15分間撹拌し、次いで減圧下でメタノール溶媒を除去した。得られた不透明の液体をジクロロメタン(75ml)に溶解し、水(10ml)及び塩水(10ml)で二回洗浄した。生じた層は不透明であったがすぐに分離した。一旦ジクロロメタン層を分離して硫酸ナトリウムで乾燥させ、この乾燥材を取り除き、減圧下で溶媒を除去した。これによって、不透明の淡い黄色の液体としてモノ-保護されたジアミン3.0g(ジアミンから33%)が得られた。

【0127】

工程2：5K mPEG-プロピオンアルデヒドとの反応

【化10】



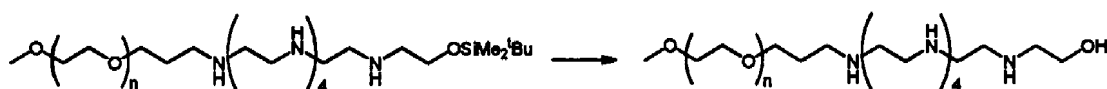
【0128】

5K mPEGプロピオンアルデヒド(5.0g、1mmol)及び工程1のモノ-保護されたジアミン(1.9g、5mmol、5当量)をメタノール(60ml)に溶解させ、室温で1時間撹拌した。水素化ホウ素ナトリウム(0.13g、3mmol、3当量)を添加し、反応混合物を15分間撹拌した。次いで、減圧下でメタノール溶媒を除去して、湿った白色固形物を得た。これをジクロロメタン(30ml)に溶解させ、生成物をMTBE(300ml)で結晶化させて、白色固形物としてのシリル保護された生成物5.2g(100%)を得た。

【0129】

工程3：mPEG プロピルペンタエチレンヘキサミンエタノールへの脱保護

【化11】



温かい水浴内で穏やかに加熱(約40℃)することによって、工程2のシリル保護前駆体(4.8g、0.96mmol)をTHF(50ml)に溶解させた。次いで、テトラブチルアンモニウムフルオリド(1.5ml、THF中の1M溶液、1.5当量)を添加し、反応混合物を室温で一晩撹拌した。MTBE(125ml)を反応混合物に添加し、ろ過によって沈殿を集めた。湿ったフィルター上のケーキをジクロロメタン(10ml)に溶解させ、プロパン-2-オール(250ml)の添加によって沈殿させた。次いで、ジクロロメタン及びプロパン-2-オールからの沈殿を繰り返し、白色固形物を単離し、30℃で3時間かけて乾燥させて、高密度の白色固形物としての表題の生成物3.1g(65%)を得た。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz); 3.44-3.85 (m, PEG, CH₂OH及びPEGCH₂), 3.38 (s, OCH₃), 2.45-2.83 (m, 多重CH₂N), 1.73-1.82 (2H, m, PEGCH₂CH₂CH₂NH)。

【0130】

参照物質として以下の化合物を合成した：

10

20

30

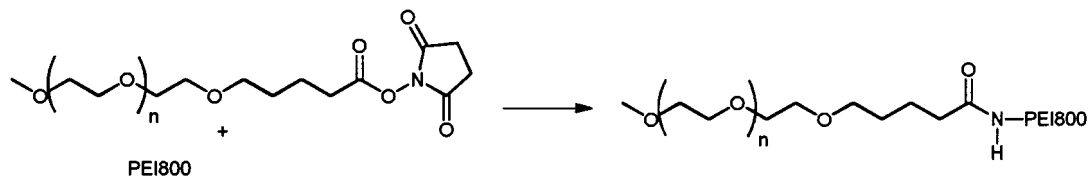
40

50

【 0 1 3 1 】

化合物(4) mPEG-O(CH₂)₄CONH-(PEI800) (=2K mPEG吉草酸PEI800) (Mw約2900Da)

【 化 1 2 】



【 0 1 3 2 】

PEI800(0.48g、0.6mmol)をジクロロメタン(90ml)に溶解して、不透明な溶液を形成した。次いで、少量の2K mPEGスクシンイミジル吉草酸(1.5g、0.75mmol)を固形物として数分間かけて添加して、透明な溶液を作製した。次いで、反応混合物を、周囲温度で一晩攪拌し、その後、不透明な懸濁物が得られた。セライトに通したる過により、外来の固形物を除去し、その後、減圧下で約2/3のジクロロメタンを除去した。次いで、得られた濃縮物を、メチルtert-ブチルエーテルMTBE(300ml)と混合し、氷/水浴中で冷やし、生成物の沈澱を得た。紙に通したる過によりこれを回収して、MTBE(50ml)で洗浄し、減圧下、周囲温度で数時間乾燥させた。表題の生成物を、白色固体(1.50g、89%)として得た。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz); 3.41-3.84 (m, PEGおよびm, OCH₂CH₂CH₂CH₂CONH), 3.38 (s, OCH₃), 2.43-3.36 (m, 種々のCH₂), 2.21 (m, CH₂CONH), 1.53-1.74 (m, OCH₂CH₂CH₂CH₂CONH)。

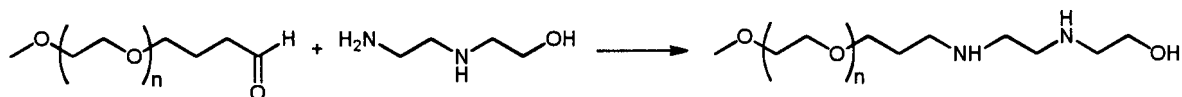
10

20

【 0 1 3 3 】

化合物(5) mPEG-O-(CH₂)₃-NHCH₂CH₂NHCH₂CH₂OH (=5K mPEGプロピル-N-(ヒドロキシエチル)エチレンジアミン) (Mw約5161Da)

【 化 1 3 】



【 0 1 3 4 】

水浴中、約40℃まで温めて、5K mPEGプロピオンアルデヒド(2g、0.4mmol)をメタノール(20ml)に溶解した。溶解時に、mPEG溶液を周囲温度に戻して、N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン(0.125g、1.2mmol、3等量)を添加した。アミド、アルデヒド混合物を15分間攪拌して、その後臭化水素ナトリウム(45mg、1.2mmol、3等量)を添加して、わずかな発泡が得られた。反応混合物を周囲温度で1時間攪拌し、次いで、MTBE(150ml)によりPEG成分が沈殿し、ろ過により回収した。湿ったろ過ケーキ(filter cake)をMTBE(50ml)で洗浄し、次いで、減圧下で乾燥させて、白色固体の表題の化合物(1.86g、93%)を得た。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz); 3.43-3.84 (m, PEG, CH₂OHおよびPEGCH₂), 3.38 (s, OCH₃), 2.52-2.80 (m, 多数のCH₂N), 1.72-1.82 (m, PEGCH₂CH₂CH₂NH)。

30

【 0 1 3 5 】

製剤化調製物および安定性試験

40

タンパク質治療薬、リツキシマブおよびセルトリズマブペゴールの製剤を、エチレンジアミンの種々のオリゴマーの非存在下または存在下のいずれかで調製した。以下の生成物：MabThera(登録商標)(リツキシマブ)およびCimzia(登録商標)(セルトリズマブペゴール)を開始物質として使用した。2つの生成物の組成は以下の通りである：

【 0 1 3 6 】

MabThera(登録商標)：

リツキシマブ(10mg/ml)

クエン酸ナトリウム二水和物(7.35mg/ml)

ポリソルベート80(0.7mg/ml)

塩化ナトリウム(9.0mg/ml)

50

pHは約6.5

供給源：EMA Scientific discussion on MabThera(登録商標)

(http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000165/WC500025817.pdf)

【0137】

Cimzia(登録商標)：

セルトリズマブペゴール(200mg/ml)

酢酸ナトリウム(1.36mg/ml)

塩化ナトリウム(7.31mg/ml)

pHは約4.7

供給源：RxList(<http://www.rxlist.com/script/main/hp.asp>)

【0138】

試験のための製剤を調製するために、元の賦形剤を除去し、それらを選択された賦形剤で置き換えることが必要であった。試験のための製剤を調製するために以下の手順を使用した：製造容器から元の組成物を除去し、3.5kDaカットオフ透析カセット(Thermo Pierce)中2～8 で、3回交換して、それぞれにおいて最低4時間透析し、一晚インキュベートした。次いで、タンパク質を、Amicon遠心分離濃縮器を使用して、MWCO 50kDa(リツキシマブ)または30kDa(セルトリズマブペゴール)で、133.3mg/ml(リツキシマブ、実施例1～4)、187mg/ml(リツキシマブ、実施例5)または150mg/ml(セルトリズマブペゴール、実施例6)に濃縮した。

【0139】

新しい賦形剤を含み、必要なpHに調整されたバックグラウンド溶液を、透析したタンパク質に添加して、最終組成物中、賦形剤およびタンパク質の要求される濃度を達成した。製剤化した試料を40 または5 で貯蔵庫に入れ、一定期間後に安定性を試験した。エチレンイミンのオリゴマーを含む組成物中でタンパク質の安定性を試験して、オリゴマーの非存在下で同じバックグラウンドを有する「対照製剤」と比較した。さらなる比較のために、元の生成物(すなわち、リツキシマブの場合MabThera(登録商標)、およびセルトリズマブペゴールの場合Cimzia(登録商標))と同じ賦形剤の組成を有するが、それぞれの実施例で特定されるような特定の濃度のタンパク質を有する「元の製剤」を調製した(例えば、実施例1において、元の製剤は100mg/mlのリツキシマブを有する)。

【0140】

凝集の評価方法

水性タンパク質組成物中の凝集は、以下の手法により評価し得る：

(a)視覚評価

バイアルを、適切に選択された対照化バックグラウンドを有する適切な位置、任意の潜在力または検出された視覚的偏りを強調する十分かつ適切な照明下に置く。対照(または新たに調製した物質)を、直接比較のために並べて置く。溶液は、視覚的な欠陥がない場合は、透明である、物質の不透明性がわずかに変化する場合に濁っている、および不溶性の画分がある場合またはバイアルの底に粒子が見られる場合は、沈殿が形成されていると分類する。

【0141】

(b)サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)

高分子量種の量を、ガードカラムを有する300x7.8mm S3000(または同等)サイズ排除カラムを使用して測定する。移動相はリン酸カリウムpH6.5であり、流速0.4ml/分、注入体積1μlであり、210および280nmで検出する。結果は、%高分子量種(HMWS)、すなわちクロマトグラム上の全てのタンパク質関連ピークの合計に対する凝集したタンパク質に対応するピーク面積の合計で表す。例えば繰り返しのサイズ排除カラムの使用のために、%HMWSの絶対値に関して、小さな時点～時点の変動性が観察され得る。しかしながら、所定の時点中で、同じ条件のカラムを使用して試料を試験するので、該時点中に得られる値は、試験した組成物中におけるタンパク質の相対的な安定性の非常に良好な徴候を表す。

【 0 1 4 2 】

実施例1：リツキシマブ-テトラエチレンペンタミンおよびペンタエチレンヘキサミンの存在下での凝集調節の表示

リツキシマブは、以下のバックグラウンド溶液：EDTA(0.2mM)、メチオニン(1mM)、ヒスチジン(10mM)中に100mg/mlで調製した。pHを6.5に調整した。エチレンジイミン(i)テトラエチレンペンタミン五塩酸塩(n=4)および(ii)ペンタエチレンヘキサミン(n=5)のオリゴマーの、40 および5 でのトレハロースの存在下での凝集の増加に対する効果を表1および表2にそれぞれ示す。全てのバックグラウンド溶液において、エチレンジイミン(i)および(ii)のオリゴマーの存在は、HMWSの形成速度をかなり低減することが見出された。また、40 で、エチレンジイミンのオリゴマーを含まない対照製剤において、8週間後に沈殿が観察された。

【 0 1 4 3 】

【表 1 - 1】

表1. 40℃でのリツキシマブの製剤中の凝集速度

トレハロース* (mM)	テトラエチレン ペンタミン** (mg/ml)	ペンタエチレン ヘキサミン (mg/ml)	pH	% HMWS T ₀	% HMWS 8週間	視覚 (8週間)
200			6.5	1.49	2.82	透明
200	0.1		6.5	1.40	1.79	透明
200	0.5		6.5	1.44	1.85	透明
200	2.5		6.5	1.40	1.45	透明
200		0.2	6.5	1.42	1.89	透明
200		1.0	6.5	1.40	1.24	透明

【表 1 - 2】

200		5.0	6.5	1.41	1.29	透明
元の製剤, 154mM NaCl, 25mM クエン酸, 700 mg/l Tween 80			6.5	1.55	3.22	透明, 底部で 沈殿

* および EDTA (0.2 mM), メチオニン (1 mM) およびヒスチジン (10 mM)

** 五塩酸塩として(塩基の重量に基づいたカラムにおける濃度)

【 0 1 4 4 】

【表 2】

表2. 5℃でのリツキシマブの製剤の凝集速度

トレハロース* (mM*)	テトラエチレン ペンタミン** (mg/ml)	ペンタエチレン ヘキサミン (mg/ml)	pH	% HMWS T ₀	% HMWS 8週間	視覚 (8週間)
200			6.5	1.49	1.25	透明
200	0.1		6.5	1.40	1.23	透明
200	0.5		6.5	1.44	1.22	透明
200	2.5		6.5	1.40	1.21	透明
200		0.2	6.5	1.42	1.22	透明
200		1.0	6.5	1.40	1.24	透明
200		5.0	6.5	1.41	1.07	透明
元の製剤, 154mM NaCl, 25mM クエン酸, 700 mg/l Tween 80			6.5	1.55	1.28	透明

* および EDTA (0.2 mM), メチオニン (1 mM) およびヒスチジン (10 mM)

** 五塩酸塩として(塩基の重量に基づいたカラムにおける濃度)

【 0 1 4 5 】

実施例2：リツキシマブ-種々のオリゴマー添加物およびポリマー添加物の存在下での凝集

調節のさらなる調査

リツキシマブは、以下のバックグラウンド溶液:EDTA(0.2mM)、メチオニン(1mM)、ヒスチジン(10mM)中に100mg/mlで調製する。pHを6.5に調整する。以下のモノマー、オリゴマーおよびポリマーの添加物を試験し得る：

- (a) 2K mPEG吉草酸アミドペンタエチレンヘキサミン[化合物(1)]
- (b) 2K mPEG吉草酸塩PEI800[化合物(4)]；対照
- (c) エチレンジアミン；対照
- (d) ジエチレントリアミン
- (e) トリエチレンテトラミン
- (f) テトラエチレンペンタミン
- (g) ペンタエチレンヘキサミン

【 0 1 4 6 】

【 表 3 】

表3

アルギニン (mM)	トレハロース (mM)	(a) (mg/ ml)	(b) (mg/ ml)	(c) (mg/ ml)	(d) (mg/ ml)	(e) (mg/ ml)	(f) (mg/ ml)	(g) (mg/ ml)	pH
80									6.5
	200								6.5
	200	0.2							6.5
	200	1							6.5
	200	5							6.5
	200		0.2						6.5
	200		1						6.5
	200		5						6.5
	200			0.2					6.5
	200			1					6.5
	200			5					6.5
	200				0.2				6.5
	200				1				6.5
	200				5				6.5
	200					0.2			6.5
	200					1			6.5
	200					5			6.5
	200						0.2		6.5
	200						1		6.5
	200						5		6.5
	200							0.2	6.5
	200							1	6.5
	200							5	6.5
	200								0.15
	200								1.5
	200								8
	200								16
元の製剤, 154mM NaCl, 25mM クエン酸, 700 mg/l Tween 80									6.5

【 0 1 4 7 】

実施例3：リツキシマブ-アルギニンを含む代替的なバックグラウンド溶液中のテトラエチレンペンタミンおよびペンタエチレンヘキサミンの存在下の凝集調節の表示。

リツキシマブは、以下のバックグラウンド溶液:EDTA(0.2mM)、メチオニン(1mM)、ヒスチジン(10mM)中、張性変更剤としてアルギニン(80mM)の存在下で、100 mg/mlで調製した

。全ての製剤のpHを6.5に調整した。比較のために、市販の液体リツキシマブ製品の製剤(「元の製剤」もリツキシマブを100mg/mlで有する)も含めた。エチレンジアミン(i)テトラエチレンペンタミン五塩酸塩(n=4)および(ii)ペンタエチレンヘキサミン(n=5)のオリゴマーの、40℃での凝集の増加に対する効果を表4に示す。全てのバックグラウンド溶液において、エチレンジアミン(i)および(ii)のオリゴマーの存在は、エチレンジアミンのオリゴマーを含まないバックグラウンド溶液と比較して、HMWSの形成速度をかなり低減することが見出された。また、エチレンジアミンのオリゴマーの存在下、40℃でのHMWSの形成速度は、元の製剤中よりも低いことが見出され、これは、8週間後に沈澱の徴候も示した。

【0148】

【表4】

表4. 40℃でのリツキシマブの製剤中の凝集速度

アルギニン (mM)	テトラエチレン ペンタミン (mg/ml)	ペンタエチレン ヘキサミン (mg/ml)	% HMWS 0 週間	% HMWS 12 週間
80			1.47	2.57
80	0.1		1.58	2.08
80	0.5		1.53	1.89
80	2.5		1.47	0.85
80		0.2	1.42	1.92
80		1.0	1.57	1.62
80		5.0	1.36	0.83
元の製剤:リツキシマブ(100 mg/ml), クエン酸ナトリウム二水和物 (7.35 mg/ml), ポリソルベート80(0.7 mg/ml), 塩化ナトリウム(9.0 mg/ml), pH 6.5			1.55	3.22

10

20

【0149】

実施例4：リツキシマブ-エチレンジアミンの種々のオリゴマーによる凝集調節の表示

リツキシマブは、以下のバックグラウンド溶液:EDTA(0.2mM)、メチオニン(1mM)、ヒスチジン(10mM)およびトレハロース(200mM)中に100mg/mlで調製した。pHを6.5に調整した。40℃での存在下の凝集の増加に対する以下の添加剤の効果を表5に示す。

- (a) 2K mPEG吉草酸アミドペンタエチレンヘキサミン[化合物(1)]
- (b) エチレンジアミン(参照)
- (c) ジエチレントリアミン
- (d) トリエチレントトラミン
- (e) ペンタエチレンヘキサミン
- (f) 2K mPEG吉草酸塩PEI800[化合物(4)]

30

【0150】

結果は、SECにより測定した%高分子種(HMWS)で表す。以下の観察を行った。全てのバックグラウンド溶液において、エチレンジアミンのオリゴマー(c)、(d)および(e)の存在は、エチレンジアミンのオリゴマーを含まないバックグラウンド製剤と比較して、用量依存的な様式で、HMWSの形成速度をかなり低減することが見出され、エチレンジアミンのペグ化オリゴマー(a)の使用によっても、安定化効果が達成され、および(c)、(d)および(e)と同様のモル基準の効果が現れ、エチレンジアミンのオリゴマー(a)、(c)、(d)および(e)の存在下の凝集速度は、市販の液体リツキシマブ製品の製剤(「元の製剤」)と比較した場合、全ての場合において低く、エチレンジアミン(b)を含む別の比較(comparator)製剤は、HMWSの形成の低減において効果が低く、2K mPEG吉草酸塩PEI800(f)を含む別の比較製剤は、用量依存的な様式でHMWSの形成速度を低減したが、添加剤(f)は、添加剤(a)、(c)、(d)および(e)に対して、都合の良い毒性プロファイルをほとんど持たないことが予測され得る。

40

【0151】

【表 5 - 1】

表5. 16週間後の40℃でのリツキシマブの製剤中の凝集速度

(a) (mg/ml)/ mM	(b) (mg/ml)/ mM	(c) (mg/ml)/ mM	(d) (mg/ml)/ mM	(e) (mg/ml)/ mM	(f) (mg/ml)/ mM	% HWMS 0 週間	% HMWS 16 週間
						0.69	3.21
0.2/0.086						0.73	2.47
1/0.43						0.73	1.18
5/2.1						0.70	0.88
	0.2/3.3					0.49	2.44
	1/17					0.72	2.27
	5/83					0.78	2.08
		0.2/1.9				0.81	0.94
		1/9.7				0.70	0.70
		5/49				0.79	0.67
			0.2/1.4			0.74	0.81
			1/6.8			0.84	0.56

10

【表 5 - 2】

			5/34			0.74	0.51
				0.15/0.65		0.59	1.28
				1.5/6.5		0.67	0.24
				8/34		0.52	0.17
				16/69		0.73	0.16
					0.2/0.069	0.69	2.57
					1/0.34	0.79	1.06
					5/1.7	0.69	0.93
元の製剤:リツキシマブ (100 mg/ml), クエン酸ナトリウム 二水和物 (7.35 mg/ml), ポリソルベート80 (0.7 mg/ml), 塩化ナトリウム (9.0 mg/ml), pH 6.5						0.75	3.40

20

【 0 1 5 2 】

実施例5：リツキシマブ-ペグ化および非ペグ化エチレンイミンオリゴマーの両方によるより高濃度での凝集調節の表示

リツキシマブは、以下のバックグラウンド溶液:EDTA(0.2mM)、メチオニン(1mM)、ヒスチジン(10mM)およびトレハロース(200mM)中に140mg/mlで調製した。pHを6.5に調整した。凝集速度に対する以下の添加剤の効果を調査した。

- (a) 5K mPEG プロピルトリエチレンテトラミンエタノール[化合物(2)]
- (b) 5K mPEG プロピルペンタエチレンヘキサミンエタノール[化合物(3)]
- (c) 5k mPEGアルコール
- (d) ジエチレントリアミン
- (e) トリエチレンテトラミン
- (f) ペンタエチレンヘキサミン

30

【 0 1 5 3 】

添加剤(c)は、選択されたエチレンイミンのオリゴマーのペグ化の効果をよりよく理解させるために追加した。

40

【 0 1 5 4 】

40 でのリツキシマブの凝集速度に対するエチレンイミンのオリゴマーの効果を表6に示す。結果は、SECにより測定された%高分子種(HMWS)で表す。図1A～1Fにも同じ結果を示す。5K mPEGプロピルトリエチレンテトラミンエタノール(a)および5K mPEGプロピルペンタエチレンヘキサミンエタノール(b)の存在下で凝集速度の低下が観察された(図1Aおよび1B)。効果は用量依存的であり、5k mPEGペンタエチレンヘキサミン(b)の場合において、効果は5mg/mlのみで観察された。対照的に、5k mPEGアルコール(c)単独では、凝集速度に対して下限に近い効果のみを有した(図1C)。エチレンイミンの非ペグ化オリゴマー(d)、(e)および(f)は、リツキシマブの凝集速度において、かなりの用量依存的な減少を示した(

50

図1D～1F)。

【 0 1 5 5 】

【 表 6 】

表6. 40℃でのリツキシマブの製剤における凝集速度に対するエチレンイミンのペグ化および非ペグ化オリゴマーならびに5k mPEGアルコールの効果

(a) (mg/ml)/ mM	(b) (mg/ml)/ mM	(c) (mg/ml)/ mM	(d) (mg/ml)/ mM	(e) (mg/ml)/ mM	(f) (mg/ml)/ mM	%HMWS 0 週間	%HMWS 12 週間	%HMWS 26 週間
						0.33	1.41	6.42
0.2/0.038						0.25	1.31	4.79
1/0.19						0.40	1.17	4.44
5/0.95						0.35	0.97	3.60
	0.2/0.038					0.35	1.51	5.55
	1/0.19					0.45	1.02	6.69
	5/0.94					0.32	1.16	3.47
		0.2/0.040				0.36	1.86	5.34
		1/0.20				0.40	1.53	5.84
		5/1.00				0.36	1.73	6.60
			0.02/0.19			0.37	0.91	4.09
			0.1/0.97			0.38	0.35	0.89
			1/9.7			0.38	0.24	1.51
			5/49			0.37	0.29	1.83
				0.03/0.21		0.36	0.29	4.18
				0.14/0.96		0.35	0.32	3.26
				1/6.8		0.36	0.27	0.45
				5/34		0.26	0.17	0.64
					0.04/0.17	0.33	0.96	4.66
					0.22/0.95	0.28	0.69	1.01
					1/4.3	0.36	0.26	0.54
					5/22	0.29	0.26	0.32
元の製剤:リツキシマブ(140 mg/ml),クエン酸ナトリウム二水和物(7.35 mg/ml),ポリソルベート80 (0.7 mg/ml),塩化ナトリウム(9.0 mg/ml), pH 6.5						0.31	1.23	3.34

10

20

30

【 0 1 5 6 】

実施例6：セルトリズマブペゴール-エチレンイミンのペグ化および非ペグ化オリゴマーの存在下での凝集調節の表示

セルトリズマブペゴールは、張性変更剤としてNaCl (150mM)または1,2-プロパンジオール (200mM) のいずれかの存在下で、ヒスチジンバッファ (10mM、pH6.0) 中、100mg/mlで調製した。エチレンイミンのオリゴマー (b) ~ (e) の40℃での凝集速度に対する効果を、表7 (150mM NaCl 張性変更剤) および表8 (200mM 1,2-プロパンジオール 張性変更剤) に示す。

以下の添加剤を試験した。

(a) 5k mPEGアルコール

(b) ペンタエチレンヘキサミン

(c) 2K mPEG吉草酸アミドペンタエチレンヘキサミン [化合物(1)]

(d) トリエチレントトラミン

(e) 5K mPEGプロピルトリエチレントトラミンエタノール [化合物(2)]

【 0 1 5 7 】

結果は、SECにより測定した%高分子種 (HMWS) で表す。ペグ化および非ペグ化の両方のエ

50

チレンイミンのオリゴマー(b)～(e)、特にオリゴマー(b)、(c)および(d)は、HMWSの形成速度を低減することが見出された。1,2-プロパンジオールを含む組成物中(e)以外では(表8)、この効果は用量に伴って増加した。セルトリズマブペゴールの市販の液体製品の製剤(「元の製剤」)と比較して、エチレンイミンのオリゴマーの存在下で、HMWSの形成速度がかなり低いことも示された。さらに、mPEGアルコール(a)を含む別の比較製剤は、HMWSの形成速度の低減において効果的でないことが示された。

【 0 1 5 8 】

【表 7】

表7. NaClを含む組成物における40℃でのセルトリズマブペゴールの製剤における凝集速度

NaCl (mM)	(a) (mg/ml)/mM	(b) (mg/ml)/ mM	(c) (mg/ml)/ mM	(d) (mg/ml)/ mM	(e) (mg/ml)/ mM	% HMWS 0 週間	% HMWS 8 週間
150	1/0.20					0.70	3.15
150		1/4.3				0.53	1.72
150		3/13				0.45	1.21
150			3/1.3			0.56	1.86
150			10.1/4.3			0.59	1.60
150				1/6.9		0.63	1.51
150				3/21		0.49	1.02
150					3/0.57	0.66	3.32
150					35.9/6.8	0.79	2.39
元の製剤:セルトリズマブペゴール(100 mg/ml), 酢酸ナトリウム (1.36 mg/ml), 塩化ナトリウム (7.31 mg/ml), pH 4.7						0.53	3.06

【 0 1 5 9 】

【表 8】

表8. 1,2-プロパンジオールを含む組成物における40℃でのセルトリズマブペゴールの製剤における凝集速度

1,2-プロパ ンジオール (mM)	(a) (mg/ml) /mM	(b) (mg/ml) /mM	(c) (mg/ml) / mM	(d) (mg/ml) /mM	(e) (mg/ml)/ mM	% HMWS 0 週間	% HMWS 8 週間
200	1/0.20					0.55	2.92
200		1/4.3				0.47	1.35
200		3/13				0.45	1.03
200			3/1.3			0.55	1.74
200			10.1/4.3			0.56	1.41
200				1/6.9		0.55	1.02
200				3/21		0.49	0.85
200					3/0.57	0.64	2.02
200					35.9/6.8	0.81	2.47
元の製剤:セルトリズマブペゴール(100 mg/ml), 酢酸ナトリウム(1.36 mg/ml), 塩化ナトリウム(7.31 mg/ml), pH 4.7						0.53	3.06

【 0 1 6 0 】

細胞傷害性を評価する方法

実施例7： HEK293およびVero細胞上の細胞傷害性効果に対するPEIのサイズの効果の決定

バーミンガム大学から得た細胞株ヒト胚性腎臓(HEK)293およびECACC(The European Collection of Cell Cultures)から得たVeroを継代培養して、ダルベッコ最小必須培地(Dulbecco's Minimum Essential Medium)(DMEM)+2%ウシ胎児血清(FBS)+4mM L-グルタミン中、 1×10^4 細胞/cm²の濃度の96ウェルプレートを作製するように使用した。細胞を37℃で24時間インキュベートして、コンフルエントにした。24時間後、約800Da～約50,000Daの間の分子量の種々のPEIを、5mg/mLのストック濃度に調製して、それらのpHを7に調整した(分子量600、1800、10,000および50～100,000)。次いで、ストックをDMEM+2%FBS+4mM L-グルタミンに希釈して、以下の濃度、2.5mg/mL、1.25mg/mL、600ug/mL、300ug/mL、150ug/mL、75ug/mL、25ug/mL、10ug/mLおよび5ug/mLにした。希釈工程後、ストック濃度を含む全ての濃度の100μLを8ウェル/プレートに添加し、8回の実験物(replicate)/濃度を得た。プレートを37℃で72時間インキュベートした後、図2に示されるように細胞病理学効果(CPE)についてスクリーニングした。上述のように、図2は、PEIの大きさが減少するにつれて、その細胞傷害性効果が生じることを明確に示す。

【0161】

本発明のエチレンジミンのオリゴマーの細胞傷害性効果は、実質的に同じ方法で試験し得る。

【0162】

実施例8：VeroおよびMDCK細胞を使用した、細胞傷害性効果に対するエチレンジミンオリゴマーのサイズの効果

Vero細胞およびMadin-Darbyイヌ腎臓上皮(Canine Kidney Epithelial)(MDCK)細胞はECACC(The European Collection of Cell Cultures, Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG)から得た。細胞を継代培養して、ダルベッコ最小必須培地(DMEM)+2%ウシ胎児血清(FBS)+4mM L-グルタミン中 1×10^4 細胞/cm²の濃度で96ウェルプレートを作製するように使用した。細胞を37℃で24時間インキュベートして、コンフルエントにした。24時間後、種々のエチレンジミンオリゴマーおよびポリマー(すなわちPEI)を5mg/mLのストック濃度に調製して、それらのpHを7に調整した。以下の分子量：102、145、188、231、800、1800、10,000および50～100,000Daのオリゴマーおよびポリマーを試験した。次いで、ストック溶液を、DMEM+2% FBS+4mM L-グルタミン中、以下の濃度：2.5mg/mL、1.25mg/mL、600μg/mL、300μg/mL、150μg/mL、75μg/mL、25μg/mL、10μg/mLおよび5μg/mLまで希釈した。希釈工程後、それぞれの濃度のそれぞれの試料の100μLをプレート上の8ウェルに添加して、1濃度当たり8回の実験物を得た。プレートを37℃で72時間インキュベートして、その後、細胞阻害および細胞病理学効果(CPE)についてスクリーニングした。図3は、エチレンジミンのオリゴマーまたはポリマーのサイズは、Vero細胞において細胞傷害性効果に直接関連し、細胞傷害性効果に必要なエチレンジミンのオリゴマーまたはポリマーの濃度で決定した場合、サイズが小さくなるほど細胞傷害性効果が小さくなることを示す。オリゴマーのいずれも、試験した最高濃度で細胞傷害性効果を示さなかった。試験した最少の3つのオリゴマーの間に違いは得られなかった。細胞傷害性効果に対するエチレンジミンのオリゴマーまたはポリマーのサイズの同様の効果は、MDCK細胞を使用して観察されたが(図4)、この場合の効果はゆるやかでなく、189Da未満のオリゴマーの細胞傷害性は急激な減少を有した。

【0163】

実施例9：Vero細胞を使用した細胞傷害性効果に対するペンタエチレンヘキサミンのペグ化の効果

Vero細胞を得て、実施例7と同様に培養した。細胞を37℃で24時間インキュベートして、コンフルエントにした。24時間後、ペンタエチレンヘキサミン(232Da)を5mg/mLのストック濃度に調製して、pHを7に調整した。次いで、ストックを、DMEM+2%FBS+4mM L-グルタミン中、以下の濃度：2.5mg/mL、1.25mg/mL、600μg/mL、300μg/mL、150μg/mL、75μg/mL、25μg/mL、10μg/mLおよび5μg/mLまで希釈した。同じバッファ条件およびpHを使用

して、100mg/mlのストックから2K mPEG吉草酸アミドペンタエチレンヘキサミン(化合物(1))を以下の濃度：50mg/ml、25mg/ml、12.5mg/ml、6mg/ml、3mg/ml、1.5mg/ml、750 µg/ml、250 µg/ml、125 µg/mlおよび60 µg/mlに調製した。希釈工程後、ストック濃度を含む全ての濃度の100 µLを8ウェル/プレートに添加して、8回の実験物/濃度を得た。プレートを37 °Cで72時間インキュベートした後、Vero細胞阻害についてスクリーニングした。ペンタエチレンヘキサミン(232Da)の細胞傷害性効果を、2K mPEG吉草酸アミドペンタエチレンヘキサミン(化合物(1))の効果と比較した。細胞傷害性効果を引き起こすために必要とされる2K mPEG吉草酸アミドペンタエチレンヘキサミン(化合物(1))の濃度は、非ペグ化ペンタエチレンヘキサミンの濃度よりも約10倍高いことが示された(図5)。この観察は、2K mPEG吉草酸アミドペンタエチレンヘキサミンのペンタエチレンヘキサミン部分が約10重量%であるという事実により可能な限り説明できた。

10

【0164】

文脈においてそうでないことが求められなければ、明細書および以下の特許請求の範囲を通じて、単語「含む(comprise)」、ならびに「含む(comprises)」および「含む(comprising)」などの変形は、述べられた整数、工程、整数の群または工程の群を包含することを意味するが、任意の他の整数、工程、整数の群または工程の群を排除することは意味しないことが理解されよう。

【0165】

本発明は、その好ましい態様に関して具体的に示され、記載されるが、添付の特許請求の範囲に包含される発明の範囲を逸脱することなく、形態および詳細における種々の変化が本発明中になされ得ることが当業者には理解されよう。本明細書に記載される態様は、相互に排他的ではないこと、および種々の態様からの特徴が、本発明に従って全体または一部において組み合され得ることも理解されるべきである。

20

【0166】

本発明の局面または態様が、マーカッシュ群または他の代替物の群で記載される場合、本発明は、全体として列挙される群全体だけでなく、個別に群のそれぞれの構成要素および主要な群の全ての可能な下位集団、ならびに群の構成要素の1つ以上を有さない主要な群も包含する。本発明はまた、特許請求される発明の群の構成要素のいずれかの1つ以上の明示的な排除をも予想するものである。

【0167】

本明細書において「Aおよび/またはB」などの句において使用される場合、用語「および/または」は、AおよびBの両方、AまたはB、A(単独)、ならびにB(単独)を含むことを意図する。同様に、「A、Bおよび/またはC」などの句において使用される場合、用語「および/または」は、以下の態様：A、BおよびC；A、BまたはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A(単独)；B(単独)；ならびにC(単独)のそれぞれを包含することを意図する。

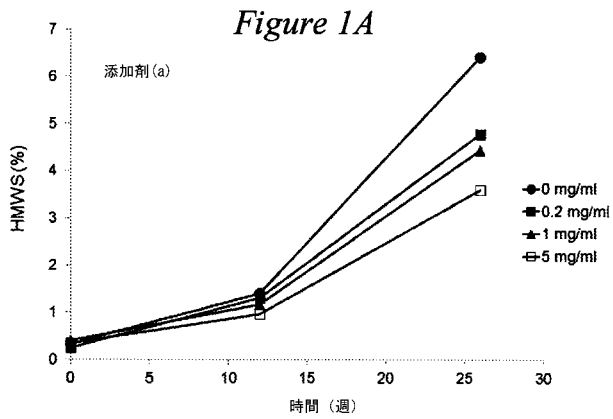
30

【0168】

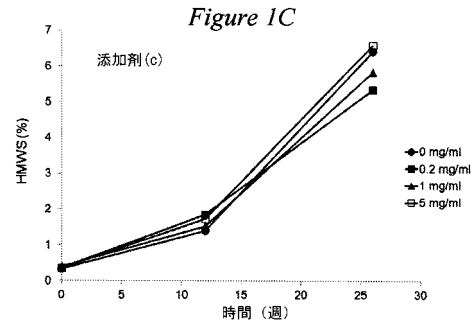
米国特許出願第61/592,323号の開示は、その全体において、参照により本明細書中に援用される。さらに、引用される全ての公報、特許、特許出願、インターネットサイトおよび受託番号/データベース配列(ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列を含む)は、それぞれ個々の公報、特許、特許出願、インターネットサイトまたは受託番号/データベース配列が、具体的にかつ個別に、参照により援用されるように示される場合と同程度までの全ての目的で、それらの全体において参照により本明細書中に援用される。

40

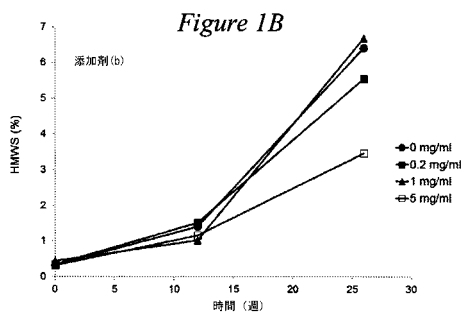
【図 1 A】



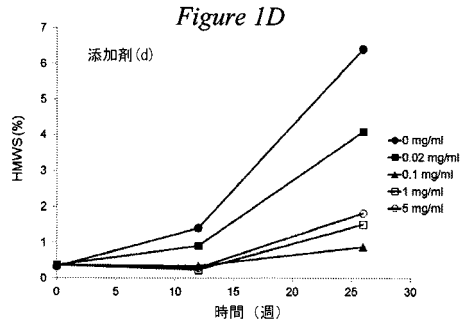
【図 1 C】



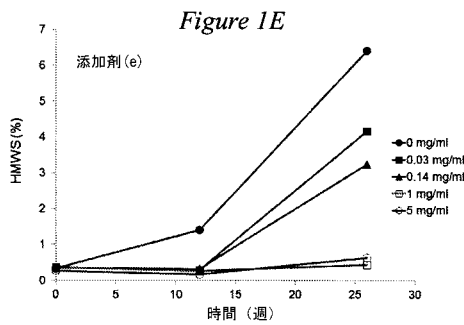
【図 1 B】



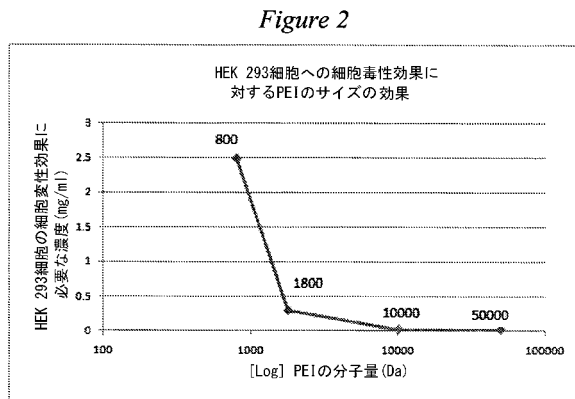
【図 1 D】



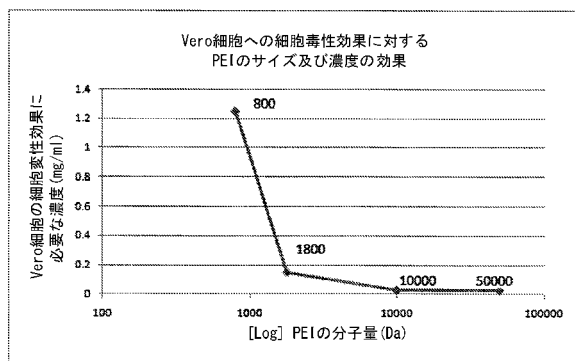
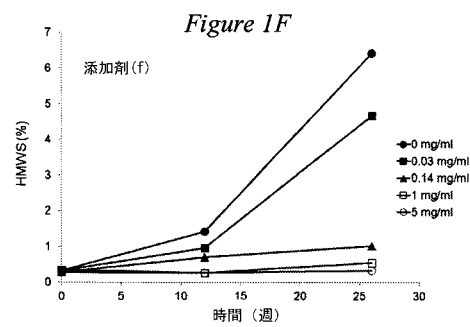
【図 1 E】



【図 2】

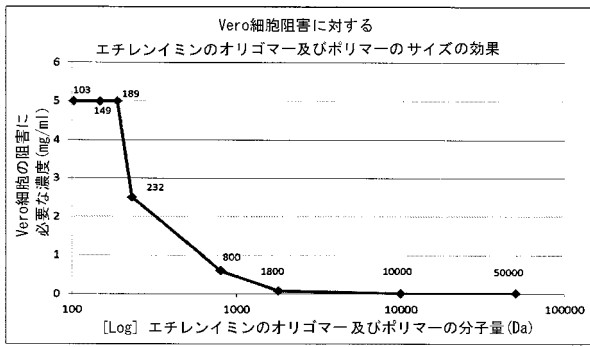


【図 1 F】



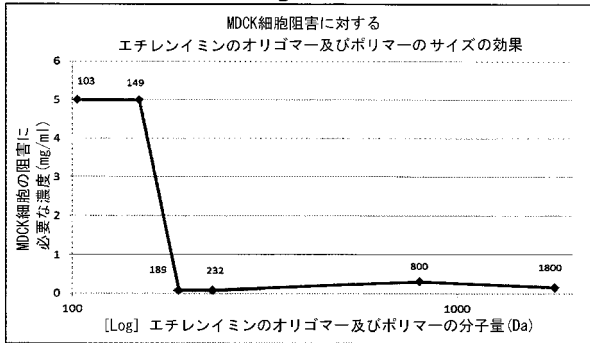
【図 3】

Figure 3



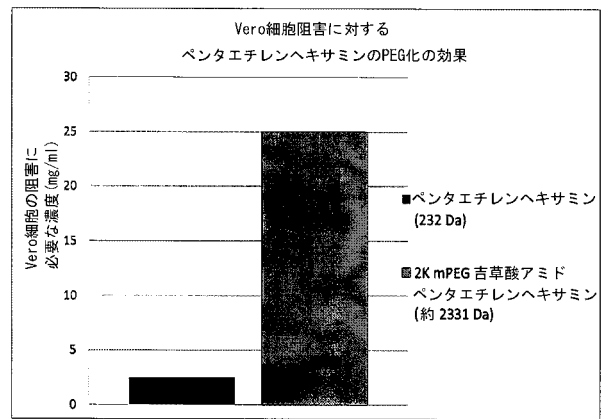
【図 4】

Figure 4



【図 5】

Figure 5



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2013/050211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/395 C07K16/28 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)

A61K C07K

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, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX, INSPEC, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2006/096461 A2 (PHARMACIA & UPJOHN CO LLC [US]; CARROLL JAMES ALAN [US]; DAS TAPAN KAN) 14 September 2006 (2006-09-14)</p> <p>paragraphs [0127] - [0135], [0141] - [0148], [0173], [0180], [0200] - [0202], [0218]</p> <p>----- -/--</p>	<p>1,2, 5-15, 17-43, 52,53</p>

☒ 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

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 July 2013

Date of mailing of the international search report

05/09/2013

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

Bayer, Annette

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2013/050211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2011/141926 A2 (INTAS BIOPHARMACEUTICALS LTD [IN]; TUNGA BINITA SHRIVASTAVA [IN]; SHAR) 17 November 2011 (2011-11-17)</p> <p>page 1, line 3 - line 5 page 1, line 16 - line 22 page 3, line 6 - page 4, line 7 page 6, line 17 - page 9, line 4 claims 1-11</p> <p>-----</p>	<p>1,2,5, 10,20, 21,26, 27,30, 31,34, 41-43</p>
A	<p>VERONIKA KNORR ET AL: "An Acid Sensitive Ketal-Based Polyethylene Glycol-Oligoethylenimine Copolymer Mediates Improved Transfection Efficiency at Reduced Toxicity", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NL, vol. 25, no. 12, 27 August 2008 (2008-08-27), pages 2937-2945, XP019647947, ISSN: 1573-904X, DOI: 10.1007/S11095-008-9700-6 the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1,2, 5-15, 17-43, 52,53</p>
A	<p>ALEXANDER PHILIPP ET AL: "Functional modification of amide-crosslinked oligoethylenimine for improved siRNA delivery", REACTIVE & FUNCTIONAL POLYMERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 71, no. 3, 3 October 2010 (2010-10-03), pages 288-293, XP028138580, ISSN: 1381-5148, DOI: 10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2010.10.003 [retrieved on 2010-10-08] the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1,2, 5-15, 17-43, 52,53</p>
A	<p>MAZZAFERRO L ET AL: "Polyethyleneimine-protein interactions and implications on protein stability", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, ELSEVIER BV, NL, vol. 47, no. 1, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 15-20, XP027054212, ISSN: 0141-8130 [retrieved on 2010-04-22] the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1,2, 5-15, 17-43, 52,53</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2013/050211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ARNIDA ET AL: "PEGylated gene nanocarriers based on block cationomers bearing ethylenediamine repeating units directed to remarkable enhancement of photochemical transfection", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 115, no. 2, 10 October 2006 (2006-10-10), pages 208-215, XP024957659, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2006.07.014 [retrieved on 2006-10-10] the whole documents, especially page 210, left-hand column, second full paragraph</p> <p>-----</p>	1,2, 5-15, 17-43, 52,53
A	<p>WO 2005/072121 A2 (BIO RAD LABORATORIES [US]; OLECH LEE [US]) 11 August 2005 (2005-08-11) paragraphs [0004] - [0006], [0009], [0014], [0015]; claims 1-19; figure 1; example 1</p> <p>-----</p>	1-43,52, 53
A	<p>XIAOFEI YUAN ET AL: "High PEGylation efficiency of pentaethylenehexamine-end poly(ethylene glycol) (mPEG-N6) for active-ester surface", COLLOIDS AND SURFACES. B, BIOINTERFACES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 92, 2 November 2011 (2011-11-02), pages 25-29, XP028448487, ISSN: 0927-7765, DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2011.11.013 [retrieved on 2011-11-11] the whole document</p> <p>-----</p>	1-43,52, 53
A	<p>YUAN XIAOFEI ET AL: "High-performance immunolatex possessing a mixed-PEG/antibody coimmobilized surface: highly sensitive ferritin immunodiagnosics.", ANALYTICAL CHEMISTRY 15 FEB 2009, vol. 81, no. 4, 15 February 2009 (2009-02-15), pages 1549-1556, XP002707724, ISSN: 1520-6882 the whole document, in particular page 1551, right-hand column, second and third paragraph</p> <p>-----</p>	1-43,52, 53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2013/050211**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-43, 52, 53(all partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ GB2013/ 050211

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2, 5-15, 17-43, 52, 53(all partially)

An aqueous solution comprising an antibody protein at a concentration of at least about 10 mg/ml and an oligomer of ethyleneimine, wherein the number of repeating units of ethyleneimine (n) in the oligomer is in the range of 2 and related subject-matter.

2-10. claims: 1-43, 52, 53(all partially)

An aqueous solution comprising an antibody protein at a concentration of at least about 10 mg/ml and an oligomer of ethyleneimine, wherein the number of repeating units of ethyleneimine (n) in the oligomer is in the range of 3-12 and related subject-matter, wherein each of the alternative ranges defines one independent invention.

11. claims: 44-51(completely); 52, 53(partially)

A compound of Formula V as recited in present claim 44 and related subject-matter.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2013/050211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006096461 A2	14-09-2006	AR 053026 A1	18-04-2007
		AR 053553 A1	09-05-2007
		AR 054233 A1	13-06-2007
		AR 062247 A1	29-10-2008
		AU 2006220828 A1	14-09-2006
		AU 2006220829 A1	14-09-2006
		BR P10608815 A2	26-01-2010
		BR P10608855 A2	02-02-2010
		CA 2600434 A1	14-09-2006
		CA 2600588 A1	14-09-2006
		CA 2600608 A1	14-09-2006
		CA 2600836 A1	14-09-2006
		EP 1858552 A2	28-11-2007
		EP 1865986 A2	19-12-2007
		EP 1868646 A2	26-12-2007
		EP 1871806 A2	02-01-2008
		EP 2311491 A1	20-04-2011
		EP 2620450 A2	31-07-2013
		IL 185483 A	30-04-2013
		JP 2006249081 A	21-09-2006
		JP 2006249083 A	21-09-2006
		JP 2006249084 A	21-09-2006
		JP 2006249085 A	21-09-2006
		JP 2012167120 A	06-09-2012
		JP 2013032387 A	14-02-2013
		KR 20070100848 A	11-10-2007
		KR 20070100922 A	12-10-2007
		NZ 560844 A	29-08-2008
		NZ 561137 A	30-09-2011
		US 2008248047 A1	09-10-2008
		US 2009110681 A1	30-04-2009
		US 2009130119 A1	21-05-2009
		US 2009238820 A1	24-09-2009
		US 2011027262 A1	03-02-2011
		WO 2006096461 A2	14-09-2006
		WO 2006096488 A2	14-09-2006
		WO 2006096490 A2	14-09-2006
		WO 2006096491 A2	14-09-2006
WO 2011141926 A2	17-11-2011	CN 102946858 A	27-02-2013
		EP 2568960 A2	20-03-2013
		WO 2011141926 A2	17-11-2011
WO 2005072121 A2	11-08-2005	AT 548347 T	15-03-2012
		DE 05705627 T1	03-05-2007
		EP 1718960 A2	08-11-2006
		US 2005155862 A1	21-07-2005
		WO 2005072121 A2	11-08-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 0 8 K 5/17

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 デラム, バリー キングストン

イギリス国 ケンブリッジシャー シービー4 0 エフイー ケンブリッジ, ケンブリッジ サイ
エンス パーク 2, アレコー リミテッド

(72)発明者 ジェゼック, ジャン

イギリス国 ケンブリッジシャー シービー4 0 エフイー ケンブリッジ, ケンブリッジ サイ
エンス パーク 2, アレコー リミテッド

(72)発明者 ロイル, ニッキ

イギリス国 ケンブリッジシャー シービー4 0 エフイー ケンブリッジ, ケンブリッジ サイ
エンス パーク 2, アレコー リミテッド

F ターム(参考) 4C076 AA12 BB13 BB15 BB16 BB17 CC26 EE17Q FF14 FF36 FF61

FF63

4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 CC21 CC23 GG02 GG03 GG04

4J002 AD031 EN046 GB04 HA04