

(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2014-514275

(P2014-514275A)

(43) 公表日 平成26年6月19日(2014.6.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 195 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-557933 (P2013-557933)	(71) 出願人	500039463
(86) (22) 出願日	平成24年3月9日 (2012.3.9)		ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバ ーシテイ・オブ・テキサス・システム
(85) 翻訳文提出日	平成25年11月8日 (2013.11.8)		アメリカ合衆国、テキサス・78701、 オースティン、ウエスト・セブンス・スト リート・201
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/028640	(74) 代理人	230104019
(87) 国際公開番号	W02012/122544		弁護士 大野 聖二
(87) 国際公開日	平成24年9月13日 (2012.9.13)	(74) 代理人	230111590
(31) 優先権主張番号	61/451, 571		弁護士 金本 恵子
(32) 優先日	平成23年3月10日 (2011.3.10)	(74) 代理人	100105991
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田中 玲子
(31) 優先権主張番号	61/587, 648	(74) 代理人	100119183
(32) 優先日	平成24年1月17日 (2012.1.17)		弁理士 松任谷 優子
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 タンパク質ナノ粒子分散系

(57) 【要約】

本明細書においては、とりわけ、高密度のタンパク質ナノクラスターを含むタンパク質分散系、及び、その作製方法が提供される。希釈すると、該クラスターは、可逆的に解離して、生物活性の高い本来のタンパク質分子となり得る。該ナノクラスター分散系の粘性は、小体積の皮下注射を可能にするだけ十分に低いと考えられる。

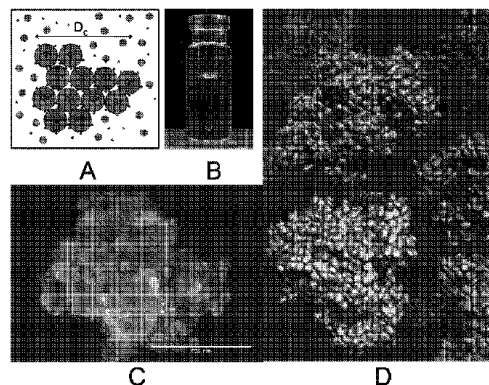


FIG. 36

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系であって、前記分散系が複数のナノクラスターを含み、前記複数のナノクラスターのそれぞれが複数のタンパク質を含み、前記複数のタンパク質のそれぞれがアミノ酸配列同一性を共有する、分散系。

【請求項 2】

前記複数のナノクラスターのそれぞれの平均直径が約 20 から約 1,000 ナノメートルの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 3】

前記平均直径が水力学的直径の平均値である、請求項 2 に記載の分散系。

10

【請求項 4】

前記平均直径が、前記複数のナノクラスターの最長寸法の平均値である、請求項 2 に記載の分散系。

【請求項 5】

前記複数のナノクラスター中の前記複数のタンパク質の 5%未満が不可逆的に凝集している、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 6】

前記複数のナノクラスター中の前記複数のタンパク質の 2%未満が不可逆的に凝集している、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 7】

前記複数のナノクラスター中の前記複数のタンパク質の 1%未満が不可逆的に凝集している、請求項 1 に記載の分散系。

20

【請求項 8】

粘度が約 1 センチポアズから約 1,000 センチポアズの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 9】

粘度が約 1 センチポアズから約 500 センチポアズの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 10】

粘度が約 1 センチポアズから約 250 センチポアズの間である、請求項 1 に記載の分散系。

30

【請求項 11】

粘度が約 1 センチポアズから約 100 センチポアズの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 12】

粘度が約 1 センチポアズから約 90 センチポアズの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 13】

粘度が約 1 センチポアズから約 80 センチポアズの間である、請求項 1 に記載の分散系。

40

【請求項 14】

粘度が約 1 センチポアズから約 70 センチポアズの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 15】

粘度が約 1 センチポアズから約 60 センチポアズの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 16】

粘度が約 1 センチポアズから約 50 センチポアズの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 17】

50

粘度が約 1 センチポアズから約 40 センチポアズの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 18】

粘度が約 50 センチポアズであり、せん断速度が約 1000 秒^{-1} である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 19】

粘度が約 25 センチポアズから約 75 センチポアズの間であり、せん断速度が約 1000 秒^{-1} である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 20】

粘度が約 10 センチポアズから約 90 センチポアズの間であり、せん断速度が約 1000 秒^{-1} である、請求項 1 に記載の分散系。 10

【請求項 21】

粘度が約 50 センチポアズであり、せん断速度が約 1000 秒^{-1} から約 50000 秒^{-1} の間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 22】

粘度が約 25 センチポアズから 75 センチポアズの間であり、せん断速度が約 100 秒^{-1} から約 50000 秒^{-1} の間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 23】

粘度が約 25 センチポアズから 75 センチポアズの間であり、せん断速度が約 1000 秒^{-1} から約 10000 秒^{-1} の間である、請求項 1 に記載の分散系。 20

【請求項 24】

前記粘度が、注射器装填法により測定される、請求項 8 から 23 のいずれか一項に記載の分散系。

【請求項 25】

前記分散系は注射可能であるが、同一濃度の前記複数のタンパク質の水溶液は注射可能ではない、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 26】

粘度が、同一濃度の前記複数のタンパク質の水溶液の粘度の約 2 分の 1 である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 27】

粘度が、同一の濃度の前記複数のタンパク質の水溶液の粘度の約 5 分の 1 である、請求項 1 に記載の分散系。 30

【請求項 28】

粘度が、同一の濃度の前記複数のタンパク質の水溶液の粘度の約 10 分の 1 である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 29】

約 200 mg/mL から約 600 mg/mL の間の前記タンパク質を含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 30】

約 200 mg/mL から約 400 mg/mL の間の前記タンパク質を含む、請求項 1 に記載の分散系。 40

【請求項 31】

約 200 mg/mL から約 300 mg/mL の間の前記タンパク質を含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 32】

約 200 mg/mL から約 250 mg/mL の間の前記タンパク質を含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 33】

約 200 mg/mL 超の前記タンパク質を含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 34】

約 300 mg / mL 超の前記タンパク質を含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 35】

約 400 mg / mL 超の前記タンパク質を含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 36】

約 500 mg / mL 超の前記タンパク質を含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 37】

約 600 mg / mL 超の前記タンパク質を含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 38】

光減衰量測定値が約 0.05 cm^{-1} 未満、 0.1 cm^{-1} 未満、 0.25 cm^{-1} 未満、又は 0.5 cm^{-1} 未満であり、前記光減衰量測定値が、波長 400 nm から 700 nm の間での平均の光減衰量を含む、請求項 1 に記載の分散系。 10

【請求項 39】

光減衰量測定値が約 0.05 cm^{-1} 未満、 0.1 cm^{-1} 未満、 0.25 cm^{-1} 未満、又は 0.5 cm^{-1} 未満であり、前記光減衰量測定値が、波長 600 nm で得られるものである、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 40】

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 ナノメートルから約 800 ナノメートルの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 41】

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 ナノメートルから約 600 ナノメートルの間である、請求項 1 に記載の分散系。 20

【請求項 42】

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 ナノメートルから約 400 ナノメートルの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 43】

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 ナノメートルから約 200 ナノメートルの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 44】

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 ナノメートルから約 100 ナノメートルの間である、請求項 1 に記載の分散系。 30

【請求項 45】

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 ナノメートルから約 75 ナノメートルの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 46】

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 ナノメートルから約 50 ナノメートルの間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 47】

前記複数のナノクラスターの充填率の平均値が、約 30 % から約 80 % の間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 48】

前記複数のナノクラスターの充填率の平均値が、約 30 % から約 70 % の間である、請求項 1 に記載の分散系。 40

【請求項 49】

前記複数のナノクラスターの充填率の平均値が、約 30 % から約 60 % の間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 50】

前記複数のナノクラスターの充填率の平均値が、約 30 % から約 50 % の間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 51】

前記複数のナノクラスターの充填率の平均値が、約 50 % から約 60 % の間である、請 50

求項 1 に記載の分散系。

【請求項 5 2】

前記複数のナノクラスターの充填率の平均値が、約 60 % から約 74 % の間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 5 3】

クラウドを含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 5 4】

クラウドを含み、前記クラウドが単糖である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 5 5】

クラウドを含み、前記クラウドが、グルコース、マンノース、フルクトース、アラビノース、キシロース、リボース、及びガラクトースから選択される単糖である、請求項 1 に記載の分散系。

10

【請求項 5 6】

クラウドを含み、前記クラウドが二糖である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 5 7】

クラウドを含み、前記クラウドが、トレハロース、ラクツロース、ラクトース、セロビオース、マルトース、又はスクロースから選択される二糖である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 5 8】

クラウドを含み、前記クラウドが多糖である、請求項 1 に記載の分散系。

20

【請求項 5 9】

クラウドを含み、前記クラウドが多価電解質である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 6 0】

クラウドを含み、前記クラウドがポリ酸である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 6 1】

クラウドを含み、前記クラウドがポリ（エチレングリコール）である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 6 2】

クラウドを含み、前記クラウドが、PEG 200 から PEG 5000 の間の分子量を有するポリ（エチレングリコール）である、請求項 1 に記載の分散系。

30

【請求項 6 3】

クラウドを含み、前記クラウドが塩である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 6 4】

クラウドを含み、前記クラウドがデキストランである、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 6 5】

クラウドを含み、前記クラウドがボラキサマーである、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 6 6】

クラウドを含み、前記クラウドがアルコールである、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 6 7】

クラウドを含み、前記クラウドがアミノ酸又はペプチド又はタンパク質である、請求項 1 に記載の分散系。

40

【請求項 6 8】

前記タンパク質のクラウドが、ジペプチド、トリペプチド、4 個のアミノ酸から成るペプチド、又は 5 個のアミノ酸から成るペプチドである、請求項 6 7 に記載の分散系。

【請求項 6 9】

クラウドを含み、前記クラウドが界面活性剤である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 7 0】

トレハロース、ポリ（エチレングリコール）、エタノール、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、バッファー、又はそれらの組合せから成る群から選択されるクラウドを含む、請求項 1 に記載の分散系。

50

【請求項 7 1】

タンパク質対クラウドを約 1 : 1 の重量比で含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 7 2】

タンパク質対クラウドを約 2 : 1 の重量比で含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 7 3】

タンパク質対クラウドを約 3 : 1 の重量比で含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 7 4】

タンパク質対クラウドを約 4 : 1 の重量比で含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 7 5】

タンパク質対クラウドを約 1 : 2 の重量比で含む、請求項 1 に記載の分散系。

10

【請求項 7 6】

タンパク質対クラウドを約 1 : 3、1 : 4、又は 1 : 10 の重量比で含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 7 7】

タンパク質対クラウドを約 10 : 1 の重量比で含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 7 8】

前記複数のナノクラスターが、多数の異なるタンパク質種を含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 7 9】

前記複数のナノクラスターが第 1 の複数のナノクラスターであり、前記複数のタンパク質が第 1 の複数のタンパク質であり、前記分散系が第 2 の複数のナノクラスターをさらに含み、前記第 2 の複数のナノクラスターのそれぞれが第 2 の複数のタンパク質を含み、前記第 2 の複数のタンパク質のそれぞれがアミノ酸配列同一性を共有し、前記第 2 の複数のタンパク質が前記第 1 の複数のタンパク質とは異なる、請求項 1 に記載の分散系。

20

【請求項 8 0】

前記複数のナノクラスターが、制御放出成分又は制御放出ポリマーをさらに含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 8 1】

前記複数のナノクラスターのそれぞれが低分子量化合物をさらに含み、前記低分子量化合物が、診断剤、医薬剤、造影剤、発蛍光団、放射性同位体、毒素、常磁性剤、金属、金属酸化物、又はアプタマーである、請求項 1 に記載の分散系。

30

【請求項 8 2】

複数のナノ粒子をさらに含む、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 8 3】

前記複数のナノ粒子が、Au、磁性剤、光学剤、診断剤、医薬剤、造影剤、発蛍光団、放射性同位体、毒素、常磁性剤、金属、金属酸化物、又はアプタマーから選択される複数の化合物を含む、請求項 8 2 に記載の分散系。

【請求項 8 4】

pH が、前記複数のタンパク質のほぼ等電点の値である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 8 5】

pH が、前記複数のタンパク質の等電点とは異なる、約 2.5 未満、約 2.0 未満、約 1.5 未満、約 1.0 未満、約 0.8 未満、約 0.75 未満、約 0.5 未満、約 0.3 未満、約 0.2 未満、約 0.1 未満、又は約 0.05 未満の pH 単位である、請求項 1 に記載の分散系。

40

【請求項 8 6】

pH が、約 4、約 4.5、約 5、約 5.5、約 6、約 6.5、約 7、約 7.5、約 8、約 8.5、約 9、又は約 9.5 である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 8 7】

ヒト血液に対して等張である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 8 8】

50

ヒト血液に対して低張である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 89】

容量オスモル濃度が約 300 mOsmol/L である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 90】

容量オスモル濃度が、約 250 mOsmol/L から 350 mOsmol/L の間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 91】

容量オスモル濃度が約 150 mOsmol/L から 450 mOsmol/L の間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 92】

容量オスモル濃度が約 150 mOsmol/L から 600 mOsmol/L の間である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 93】

前記複数のタンパク質のそれぞれが、抗体、抗体断片、ペグ化タンパク質、脂質付加タンパク質、成長因子若しくは成長因子拮抗薬、サイトカイン若しくはサイトカイン拮抗薬、受容体若しくは受容体拮抗薬、抗原、ワクチン、又は抗炎症剤である、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 94】

前記複数のタンパク質が複数のコンジュゲートであり、前記コンジュゲートのそれぞれが、低分子量化合物と結合しているタンパク質であり、前記低分子量化合物が、診断剤、医薬剤、造影剤、発蛍光団、放射性同位体、毒素、常磁性剤、又はアプタマーである、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 95】

前記複数のタンパク質が、自己群集している、請求項 1 に記載の分散系。

【請求項 96】

前記複数のタンパク質が複数のコンジュゲートではなく、前記タンパク質のそれぞれがアミノ酸から成る、請求項 1 から 95 のいずれか一項に記載の分散系。

【請求項 97】

請求項 1 から 96 のいずれか一項に記載の分散系を含む医薬組成物であって、前記複数のタンパク質が、複数の薬学的に活性なタンパク質である、医薬組成物。

【請求項 98】

21 から 27 ゲージの針に取り付けられている注射器内に入っている、請求項 97 に記載の医薬組成物。

【請求項 99】

透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法であって、タンパク質ークラウダー配合液を濃縮し、それにより前記分散系を形成するステップを含み、前記分散系が複数のナノクラスターを含み、前記複数のナノクラスターのそれぞれが複数のタンパク質を含み、前記複数のタンパク質のそれぞれがアミノ酸配列同一性を共有し、前記分散系が、透明な、低粘性の分散系であり、前記分散系が、約 200 mg/mL 超の濃度の前記タンパク質を含み、前記分散系が、複数のクラウダーを含む、方法。

【請求項 100】

前記濃縮するステップに先立ち、前記タンパク質の溶液を、容器中でクラウダーと配合してタンパク質ークラウダー配合液を形成するステップを含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

前記タンパク質ークラウダー配合液が、タンパク質ナノクラスターの平均直径が、前記濃縮するステップにより形成される前記複数のタンパク質ナノクラスターの平均直径とは異なる、タンパク質ナノクラスター分散系を含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 102】

透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法であって、粉末形態のタンパク質をクラウダー及び分散液と配合し、それにより、複数の前記タンパク質を含む複数のナノクラスターを含む分散系を形成するステップを含み、前記複数のタンパク質のそれぞれがアミノ酸配列同一性を共有し、前記分散系が、透明な、低粘性の分散系であり、前記分散系が、約 200 mg/mL 超の濃度の前記タンパク質を含む、方法。

【請求項 103】

前記配合するステップに先立ち、タンパク質混合物から溶媒を除去し、それにより前記粉末形態のタンパク質を形成するステップを含む、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

前記タンパク質混合物が、タンパク質分散系又はタンパク質溶液である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 105】

前記除去するステップが、前記タンパク質混合物を粉砕、沈殿、透析、篩過、噴霧乾燥、凍結乾燥、若しくは噴霧フリーズドライ、噴霧凍結するステップを含む、又は、前記除去するステップが、前記タンパク質混合物に、渦巻き式その場凍結技術 (SWIFT) を適用するステップを含む、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 106】

前記溶媒が水である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 107】

透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法であって、粉末形態のタンパク質を分散液と配合し、それにより、複数の前記タンパク質を含む複数のナノクラスターを含む分散系を形成するステップを含み、前記複数のタンパク質のそれぞれがアミノ酸配列同一性を共有し、前記分散系が、透明な、低粘性の分散系であり、前記分散系が、約 200 mg/mL 超の濃度の前記タンパク質を含む、方法。

【請求項 108】

前記配合するステップに先立ち、タンパク質ークラウダー混合物から溶媒を除去し、それにより前記粉末形態のタンパク質を形成するステップを含む、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 109】

前記タンパク質ークラウダー混合物が、タンパク質分散系又はタンパク質溶液である、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

前記除去するステップが、前記タンパク質ークラウダー混合物を粉砕、沈殿、透析、篩過、噴霧乾燥、凍結乾燥、若しくは噴霧フリーズドライ、噴霧凍結するステップを含む、又は、前記除去するステップが、前記タンパク質ークラウダー混合物に渦巻き式その場凍結技術 (SWIFT) を適用するステップを含む、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 111】

前記溶媒が水である、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 112】

前記分散液が、水、水性液、又は非水性液である、請求項 102 又は 107 に記載の方法。

【請求項 113】

前記分散液が、安息香酸ベンジル、又は、安息香酸ベンジルと、ベニバナ油、ゴマ油、ヒマシ油、綿実油、キャノーラ油、サフラン油、オリーブ油、ピーナッツ油、ヒマワリ種子油、 α -トコフェロール、Miglyol 812、及びオレイン酸エチルから選択される 1 つ若しくは複数の油とを合わせたものである、請求項 102 又は 107 に記載の方法。

【請求項 114】

前記除去するステップが、前記混合物に渦巻き式その場凍結技術 (SWIFT) を適用

10

20

30

40

50

するステップを含む、請求項 103 又は 108 に記載の方法。

【請求項 115】

SWIFT を適用するステップが、

1. 前記混合物を含有するバイアルを、極低温剤と接触させながら回転させるステップと、
 2. 前記混合物をすべて凍結するステップであり、前記バイアルの内側表面上の前記凍結された混合物の薄いフィルム、及び、前記バイアルの中心部に向かってらせん方向に 1 つ又は複数の後続のフィルムが得られるステップと、
 3. 前記凍結された混合物を凍結乾燥するステップと
- を含む、請求項 114 に記載の方法。

10

【請求項 116】

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約 300 mg/mL 超である、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 117】

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約 400 mg/mL 超である、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 118】

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約 500 mg/mL 超である、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 119】

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約 600 mg/mL 超である、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 120】

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約 200 mg/mL から約 300 mg/mL の間である、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 121】

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約 300 mg/mL から約 400 mg/mL の間である、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 122】

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約 400 mg/mL から約 500 mg/mL の間である、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 123】

前記クラウダーが、グリセロール、エリトリトール、アラビノース、キシロース、リボース、イノシトール、フルクトース、ガラクトース、マルトース、グルコース、マンノース、トレハロース、スクロース、ポリ（エチレングリコール）、アミノ酸、ペプチド、カルボマー 1342、グルコースポリマー、シリコーンポリマー、ポリジメチルシロキサン、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-c o -グリコール酸）、ポリ乳酸、デキストラン、ポロキサマー、有機共溶媒であって、エタノール、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、PEG 300、PEG 400、PEG 200、PEG 3350、プロピレングリコール、N，Nジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ソルケタール、テタヒドロフルフリルアルコール、ジグリム、乳酸エチルから選択される有機共溶媒、それらの塩、バッファー、又は組合せである、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 124】

前記クラウダーが多糖である、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 125】

前記クラウダーがポリ（エチレングリコール）である、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 126】

前記クラウダーが NMP 又はアルコールである、請求項 99 から 115 のいずれか一項

50

に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記クラウドがアミノ酸である、請求項 9 9 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記濃縮するステップが、ろ過を用いて実施される、請求項 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記濃縮するステップが、遠心ろ過を用いて実施される、請求項 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記濃縮するステップが、正の気体圧力又は機械的圧力を用いて実施される、請求項 9 9 に記載の方法。 10

【請求項 1 3 1】

前記濃縮するステップが、接線ろ過、透析、又はバッファの吸収を用いて実施される、請求項 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

クラウド又は前記タンパク質が、前記濃縮するステップの間に前記タンパク質－クラウド配合液に加えられる、請求項 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

ろ過により前記分散系を滅菌するステップをさらに含む、請求項 9 9 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 1 3 4】

直径約 2 0 0 n m の細孔を備えるフィルターを通したろ過により前記分散系を滅菌するステップをさらに含む、請求項 9 9 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含む、前記複数のナノクラスターの平均直径が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、請求項 9 9 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含む、前記複数のナノクラスターの解凍後の平均直径が、前記複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約 1 % 以内である、請求項 9 9 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 1 3 7】

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含む、前記複数のナノクラスターの解凍後の平均直径が、前記複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約 5 % 以内である、請求項 9 9 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含む、前記複数のナノクラスターの解凍後の平均直径が、前記複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約 1 0 % 以内である、請求項 9 9 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 1 3 9】

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含む、前記分散系の粘度が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、請求項 9 9 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含む、前記分散系の解凍後の粘度が、前記分散系の凍結前の粘度の約 1 % 以内である、請求項 9 9 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含 50

み、前記分散系の解凍後の粘度が、前記分散系の凍結前の粘度の約 5 % 以内である、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 142】

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含み、前記分散系の解凍後の粘度が、前記分散系の凍結前の粘度の約 10 % 以内である、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 143】

前記分散系を凍結するステップ、前記凍結された分散系を約 1 日間貯蔵するステップ、及び前記分散系を解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの平均直径が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 144】

前記分散系を凍結するステップ、前記凍結された分散系を約 3 日間貯蔵するステップ、及び前記分散系を解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの平均直径が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 145】

前記分散系を凍結するステップ、前記凍結された分散系を約 1 週間貯蔵するステップ、及び前記分散系を解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの平均直径が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 146】

前記分散系を凍結するステップ、前記凍結された分散系を約 1 カ月間貯蔵するステップ、及び前記分散系を解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの平均直径が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 147】

前記分散系を凍結するステップ、前記凍結された分散系を約 1 年間貯蔵するステップ、及び前記分散系を解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの平均直径が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、請求項 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 148】

当該治療を必要とする患者における疾患を治療する方法であって、有効量の請求項 1 から 96 のいずれか一項に記載の分散系を前記患者に投与するステップを含む方法。

【請求項 149】

前記投与される分散系が、前記患者の体重 1 kg 当たり約 0.5 mg、約 1 mg、約 2 mg、約 4 mg、約 6 mg、約 8 mg、約 10 mg のタンパク質を含む、請求項 148 に記載の方法。

【請求項 150】

透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系のタンパク質ナノクラスターの平均直径を修正する方法であって、前記分散系中のクラウダー又は前記タンパク質の濃度を増加又は減少させるステップを含み、前記分散系が複数のナノクラスターを含み、前記複数のナノクラスターのそれぞれが複数のタンパク質を含み、前記複数のタンパク質のそれぞれがアミノ酸配列同一性を共有し、前記分散系が、透明な、低粘性の分散系であり、前記分散系が、約 200 mg/mL 超の濃度の前記タンパク質を含む、方法。

40

【請求項 151】

請求項 1 から 96 のいずれか一項に記載の分散系又は請求項 97 若しくは 98 に記載の医薬組成物を備えるキット。

【請求項 152】

粉末形態のタンパク質又は粉末形態のタンパク質ークラウダー混合物と分散液とを備え

50

るキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国特許仮出願第61/587,648号(2012年1月17日出願、発明の名称「HIGH PROTEIN CONCENTRATION NANOPARTICLE DISPERSIONS」)及び米国特許仮出願第61/451,571号(2011年3月10日出願、発明の名称「LOW VISCOSITY HIGH CONCENTRATION NANOPARTICLE ANTIBODY DISPERSIONS」)の優先権を主張するものである。ここに言及した各出願の開示内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発下でなされた発明への権利に関する声明

本発明は、国立科学財団により授与された助成金NSFSTC-CHE-9876674号、CBET-0968038号、CBET-1065357号の下に政府支援を受けてなされたものである。政府は、本発明における一定の権利を有する。

【0003】

本発明は、一般には、高濃度のタンパク質分散系の分野、及び、タンパク質ナノ粒子分散系を作製する方法に関する。

20

【背景技術】

【0004】

当技術分野においては、様々な用途(例えば、皮下投与用の医薬製剤など)のための高度に濃縮されたタンパク質分散系が必要とされている。本発明は、当技術分野におけるこのような様々な必要性に取り組むものである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

第1の態様において、透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系が提供される。分散系は、複数のナノクラスターを含む。複数のナノクラスターのそれぞれは複数のタンパク質を含み、複数のタンパク質のそれぞれはアミノ酸配列同一性を共有する。

30

【0006】

第2の態様において、本明細書(実施形態を含む)に記載の分散系のいずれかを含む医薬組成物であって、複数のタンパク質が、複数の薬学的に活性なタンパク質である医薬組成物が提供される。

【0007】

第3の態様において、本明細書(実施形態を含む)に記載の分散系又は医薬組成物を備えるキットが提供される。

【0008】

第4の態様において、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法であって、タンパク質ークラウダー配合液(protein-crowder liquid combination)を濃縮し、それにより分散系を形成することを含む方法が提供される。分散系は複数のナノクラスターを含み、複数のナノクラスターのそれぞれは複数のタンパク質を含み、複数のタンパク質のそれぞれはアミノ酸配列同一性を共有する。分散系は、透明な、低粘性の分散系であり、分散系は、約200mg/mL超(例えば、200mg/mL超)の濃度のタンパク質を含み、分散系は、複数のクラウダーを含む。

40

【0009】

第5の態様において、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法であって、粉末形態のタンパク質をクラウダー及び分散液と配合し、そ

50

れにより、複数のタンパク質を含む複数のナノクラスターを含む分散系を形成するステップを含む方法が提供される。複数のタンパク質のそれぞれは、アミノ酸配列同一性を共有する。分散系は、透明な、低粘性の分散系であり、分散系は、約 200 mg/mL 超（例えば、 200 mg/mL 超）の濃度のタンパク質を含む。

【0010】

第6の態様において、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法であって、粉末形態のタンパク質を分散液と配合し、それにより、複数のタンパク質を含む複数のナノクラスターを含む分散系を形成するステップを含む方法が提供される。複数のタンパク質のそれぞれは、アミノ酸配列同一性を共有する。分散系は、透明な、低粘性の分散系であり、分散系は、約 200 mg/mL 超（例えば、 200 mg/mL 超）の濃度のタンパク質を含む。

10

【0011】

第7の態様において、当該治療を必要とする患者における疾患を治療するための方法であって、有効量の本明細書（実施形態を含む）に記載の分散系のうちいずれか1つを患者に投与することを含む方法が提供される。

【0012】

第8の態様において、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系のタンパク質ナノクラスターの平均直径を修正するための方法であって、分散系中のクラウダー又はタンパク質の濃度を増加又は減少させることを含む方法が提供される。分散系は複数のナノクラスターを含み、複数のナノクラスターのそれぞれは複数のタンパク質を含む。複数のタンパク質のそれぞれは、アミノ酸配列同一性を共有する。分散系は、透明な、低粘性の分散系であり、分散系は、約 200 mg/mL 超（例えば、 200 mg/mL 超）の濃度のタンパク質を含む。

20

【0013】

さらなる一態様において、粉末形態のタンパク質又は粉末形態のタンパク質-クラウダー混合物と分散液とを備えるキットが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】本発明の透明分散系のデジタル画像である。図1Aは、 157 mg/mL - $0.08 \phi_p / 0.16 \phi_N$ であり、図1Bは、 275 mg/mL である。表1における分散系は全て、見た目が非常に似ている。

30

【図2】ナノクラスターの動的光散乱（DLS）水力学的直径を示す図である。図2A：トレハロースが、唯一の外因性クラウダー（extrinsic crowder）であり、トレハロース対タンパク質の質量比は、1：1である（ 142 mg/mL 、 $\phi_T = 0.09$ における）。図2B： $\phi_p = 0.16$ 又は 0.24 による 157 mg/mL IgG分散系。さらなる試料情報は、表1に見ることができる。

【図3】タンパク質溶解度を決定するための、一定の外因性クラウダー濃度におけるDLS水力学的直径対タンパク質を示す図である。図3A： 250 mg/mL トレハロース（ $\phi_T = 0.15$ ）による、pH 6.4バッファーにおける最初の 250 mg/mL IgG。タンパク質単量体溶解度は、約 $31 \sim 50 \text{ mg/mL}$ の間である。図3B： $0.16 \phi_N / 0.08 \phi_p$ 及び 200 mg/mL トレハロース（ $\phi_E = 0.34$ ）による、pH 6.4バッファーにおける最初の 200 mg/mL IgG。タンパク質単量体溶解度は、約 $1.5 \sim 2.5 \text{ mg/mL}$ の間である。

40

【図4】表1における 157 mg/mL - $0.08 \phi_p / 0.16 \phi_N$ IgG分散系の代表的な低温SEM（cryo-SEM）（図4a）及びSTEM（図4b）画像である。

【図5A】図5Aは、 50 mg/mL の一定のIgG濃度におけるタンパク質ナノクラスターの水力学的直径を示す図である。経路1において、一定のIgG濃度を維持するためのIgG：トレハロース（1：1w/w）の 200 mg/mL IgGの少量の分散系と共に、pH 6.4リン酸バッファーにおける 500 mg/mL トレハロースを用いてトレハロース濃度を増加させた。糖濃度セットを減少させるため、同じ仕方で一定のIgG濃

50

度を維持しつつ純粋バッファーを添加した。経路 2 において、 50 mg/ml I g G 溶液に固体の糖結晶を添加して、糖濃度を増加させた。経路 3 において、純粋な $\text{pH } 6.4$ リン酸バッファー及び重量によって 1 : 1 の I g G : トレハロースによる 200 mg/mL I g G 分散系を用いて、経路 1 における減少と同様の仕方でトレハロース濃度を減少させた。理論から得られるクラスター直径の値もプロットに重ねる。

【図 5 B】図 5 B は、両者共に 30 mg/ml で一定の I g G 及びトレハロース濃度を示す図である。一定の I g G 及びトレハロース濃度を維持するための 1 : 1 重量比の I g G 及びトレハロースを含む凍結乾燥粉末と共に、1 : 2 容量の PEG 300 : NMP 溶液を添加することにより、PEG 300 及び NMP の体積分率を増加させた。

【図 6】図 5 A における異なる溶液調製経路の異なる濃度のトレハロースにおける、図 5 A から選択された試料に関する DLS から得られた水力学的直径分布のプロットを示す図である。

【図 7】増加トレハロース濃度（プラス符号）純粋糖クラウダーによる、図 5 A におけるデータの DLS により測定された水力学的直径の普遍的スケーリングを示す図である。（菱形）図 5 B の条件における増加 NMP / PEG 300 による、一定の $\phi_T = 0.018$ 。

【図 8】一定の $0.08 \phi_p / 0.16 \phi_N$ によるタンパク質 / トレハロースナノクラスター分散系の希釈における静的光散乱 (SLS) データを示す図である。

【図 9】図 9 A : 静電的に安定化されたタンパク質単量体と添加クラウダー、図 9 B : pI 付近の不安定なタンパク質単量体と添加クラウダー、図 9 C : pI 付近の静電的に安定化されたタンパク質ナノクラスター（1 電荷 / タンパク質分子を仮定）と添加クラウダー及び図 9 D : pI 付近の静電的に安定化されたタンパク質ナノクラスター（2 電荷 / タンパク質分子を仮定）と添加クラウダーに対する、総ポテンシャル (potential) ($V_{\text{tot}}(r)$)、ファンデルワールスからの引力ポテンシャル $V_{\text{vdw}}(r)$ 、特定短距離引力 (specific short-range attraction) $V_{\text{sr}}(r)$ 、 0.5 nm 半径クラウダーの枯渇引力 (depletion-attraction) $V_{\text{dep}}(r)$ 、及び静電反発ポテンシャル $V_{\text{静電}}$ を示す図である。

【図 10】本明細書に記載されている理論に基づくタンパク質分散系の状態図である。急勾配の実線はゲル線であり、それより上で溶液がゲル相を形成する。各線は、同一サイズ又は凝集数のクラスターを示す。レジェンドにおける数値は、この特定の曲線のクラスター直径（ナノメートル）である。

【図 11 A】図 11 A は、本発明に係る 300 mg/ml のトレハロースによる 200 mg/ml の BSA の透明分散系のデジタル画像を示す。

【図 11 B】図 11 B は、1 B7 ナノクラスター（11 B）の SEM 画像を示す。この図において、その周りにトレハロース分子のハローを有する球状のタンパク質単量体を観察できる。

【図 11 C】図 11 C は、ヒツジ I g G ナノクラスター（11 C）の SEM 画像を示す。この図において、その周りにトレハロース分子のハローを有する球状のタンパク質単量体を観察できる。

【図 11 D】図 11 D は、濃縮ナノクラスター分散系及び一定のクラウダー（トレハロース）濃度 270 mg/ml におけるタンパク質希釈の DLS による水力学的直径の分布を示す。ナノクラスターのサイズは、濃度が 50 mg/ml タンパク質に降下するまで殆ど一定であることが分かる。

【図 11 E】図 11 E は、I g G 対トレハロースの質量比 1 : 0.5 におけるヒツジ I g G の高濃度分散系の DLS から得られる水力学的直径の分布を示し、この結果は、より高濃度における概念を立証する。

【図 12 A】図 12 A は、様々な範囲の糖濃度に対する DLS から得られる 1 B7 クラスターの水力学的直径の分布を示す。1 B7 の濃度は、これら分散系の全てに対し 70 mg/ml に一定に維持される。

【図 12 B】図 12 B は、本明細書に記載されている理論に基づく理論的予測及び実際の

10

20

30

40

50

実験により観察されたサイズから得られる平均クラスターサイズ対クラウド濃度を示す。

【図 1 2 C】図 1 2 C は、図 1 0 におけるプロットと同様のプロットであり、これは、m A b 1 B 7 の状態図をもたらしクラスターサイズの理論的予測である。これは、外因性クラウドの体積分率に対するタンパク質体積分率を示す。ゲル線は、それより上では分散系がゲル化する (gel up) と予測されるポイントの座位を示し、一方、プロットにおける他の曲線は、一定のクラスターサイズを示す曲線である。

【図 1 2 D】図 1 2 D は、タンパク質ナノクラスター間のポテンシャルを示すプロットである。静電反発力及び引力、即ち、特定短距離力、枯渇力及びファンデルワールス力は共に、約 1 9 k T のポテンシャル障壁を生じる。この障壁は、タンパク質ナノクラスターが一体に凝集するのを妨げるよう作用する。

【図 1 3】異なる投与方法によりマウスに投与された 1 B 7 の薬物動態を示す図である。異なる時点における抗体の濃度を E L I S A によりモニターした。分散系は、溶液における 2 3 5 m g / m l トレハロースによる 2 3 5 m g / m l 1 B 7 であった。

【図 1 4】荒削りの (coarse grained) モデルからの計算に基づくタンパク質の体積分率に応じた、フォールディングしたタンパク質の分率を示す図である。高体積分率において、タンパク質は自己群集 (self-crowded) し、これによりタンパク質分子はフォールディング形態をとり易くなる。

【図 1 5】緩慢凍結し凍結乾燥したヒツジ I g G を凍結乾燥した後の、タンパク質対トレハロースの重量比 1 : 1 により 2 0 m g / m l で凍結した乾燥 I g G 粉末の S E M 顕微鏡写真 (図 1 5 A ~ C) を示す図である。

【図 1 6】小型の円錐状バイアルにおける様々な溶液標準を用いた粘度測定のための較正曲線を示す図である。D I 水 ($\eta_0 = 1 \text{ c P}$)、P E G 2 0 0 ($\eta_0 = 5 0 \text{ c P}$)、P E G 3 0 0 ($\eta_0 = 7 0 \text{ c P}$)、P E G 4 0 0 ($\eta_0 = 9 0 \text{ c P}$) 及び安息香酸ベンジル ($\eta_0 = 8.8 \text{ c P}$)。毎秒 3 0 画像の大量に積み重ねられた画像へと変換された溶液のビデオから、小型の円錐状バイアルにおいて 0.4 " から 0.1 " へと液面が引く時間を測定した。

【図 1 7】ヒツジ I g G 溶液の I E F 解析を示す図であり、レーンは左から右に、I E F マーカー (B i o - R a d)、2 μ g ヒツジ I g G 及び 1 μ g ヒツジ I g G である。B) ヒツジ I g G 溶液におけるゼータ電位測定値を示す図である。

【図 1 8】水力学的直径分布を示す図である。図 1 8 A は、2 9 8 n m 球体の濃縮 (1 0 % 固体重量) ポリスチレン標準における、D L S から得られる水力学的直径分布であり、一方、図 1 8 B は、A における試料、生データ (G 2 (R a w)) 及び C O N T I N アルゴリズムを用いた適合 (G 2 (R e c)) の相関関数である。

【図 1 9】ナノクラスターのフラクタル次元を決定するための、様々な角度における静的光散乱測定値を示すプロットである。図 1 9 A は、2 5 0 m g / m l トレハロースによる 5 0 m g / m l のナノクラスターに関し、図 1 9 B は、8 % P E G 3 0 0 / 1 6 % N M P による 1 0 m g / m l のナノクラスターに関する。

【図 2 0】様々な濃度の尿素における I g G 試料から測定された最大発光波長のプロットを示す図である。

【図 2 1】リン酸緩衝溶液 p H 6.4 を用いて系列希釈した、I g G 対トレハロース重量比 1 : 1 のヒツジ I g G 分散系の D L S から得られる水力学的直径分布のプロットを示す図である。サイズは、溶液が希釈されるにつれ減少することが分かる。

【図 2 2】クラスターの形態を示す、1 B 7 クラスターの S E M 画像である。

【図 2 3】その p I 付近のタンパク質の単量体間 (inter-monomer) 距離に応じた 2 個の単量体タンパク質分子間のポテンシャルのプロットを示す図である。

【図 2 4】4 0 0 m g / m l 及び 3 5 0 m g / m l の高濃度の B S A のナノクラスターの D L S から得られる水力学的直径の分布を示す図である。

【図 2 5】S W I F T 凍結工程の模式図である。円柱状バイアル内に未凍結タンパク質溶液を横倒しにして置き、液体窒素に曝露しつつ転がす。この操作により、バイアル内部の

10

20

30

40

50

縁においてタンパク質溶液の薄いフィルムが凍結し、続いて、後続のフィルムがバイアル中央に向かって形成されてタンパク質溶液の凍結した弁輪を生じ、これを凍結乾燥機に置いて水を除去する。

【図26】mAb 1B7の等電点(pI)を決定するための、等電点電気泳動(IEF)ゲルの画像である。レーン1: IEF標準、4.45~9.6の範囲(BioRad); 2: 1mg/ml 1B7; 3: 2mg/ml 1B7; 4: 5mg/ml 1B7。

【図27A】図27Aは、抗百日咳毒素活性ELISAの校正データである。図27Aは、SpectraMax ProソフトウェアにおいてEC₅₀を決定するための、100μg/mlスパイク血清標準に適合された平行線を用いて解析された試料スパイク血清百日咳ELISAアッセイを示す: 100μg/mlスパイク血清標準のEC₅₀で割った試料EC₅₀の自然対数、対、スパイク血清濃度。試料毎に、EC₅₀/100μg/ml標準のEC₅₀の自然対数を用いて、血清mAb 1B7濃度を決定する。

【図27B】図27Bは、抗百日咳毒素活性ELISAの校正データである。図27Bは、標準間の相関の測定を示す: 100μg/mlスパイク血清標準のEC₅₀で割った試料EC₅₀の自然対数、対、スパイク血清濃度。試料毎に、EC₅₀/100μg/ml標準のEC₅₀の自然対数を用いて、血清mAb 1B7濃度を決定する。

【図28】SWIFT凍結工程の模式図及び乾燥粉末SEMである。A) 円柱状バイアルにおける未凍結タンパク質溶液を横倒しにして置き、液体窒素に曝露しつつ転がす。この操作により、バイアル内部の縁においてタンパク質溶液の薄いフィルムが凍結し、続いて、後続のフィルムがバイアル中央に向かって形成されてタンパク質溶液の凍結した弁輪を生じ、これを凍結乾燥機に置いて水を除去する。B) SEMによる、凍結乾燥後のSWIFT粉末の形態。

【図29】DLSによる未加工、凍結乾燥及び分散1B7の比較を示す図である。全試料を5mg/mlとなるようPBSにおいて希釈した。

【図30】抗体活性をモニターするための、PTx ELISAによる未加工、凍結乾燥及び分散1B7の比較を示す図である。

【図31】バイアル内部におけるリゾチーム溶液(10mg/ml)のSWIFT凍結温度プロファイルを示す図である。15mm直径を有するバイアルにおける4ml及び2.6mlの総液体体積に対応する、異なるフィルム厚2.6mm及び0.6mmに溶液を凍結した。冷却材温度は80Kであり、バイアル回転速度は30rpmであった。

【図32】分散バッファー中の粒子サイズにおける抗体濃度の効果を示す図である。分散バッファーにおける高濃度(200mg/ml)では、動的光散乱(DLS)は、約200nmの大型の粒子のみを検出する。分散バッファーにおいて5mg/mlとなるよう希釈すると、ナノ粒子は、大型の200nmとより小型の50nmナノクラスターとの間で平衡する。溶解度限界(2.5及び5mg/ml)を下回るように分散バッファーでさらに希釈すると、単量体IgGに予想されるサイズである、約10nmサイズの粒子しか検出しない。

【図33】分散系の外観を示す図である。図33Aは、懸濁された粒子のデジタル画像であり、図33Bは、分散バッファーにおいて100mg/mlとなるよう希釈し、凍結乾燥により水を除去しつつ急速に凍結したmAb 1B7分散系(200mg/ml)のSEM画像である。

【図34】分散系から回収された抗体の特性評価を示す図である。図34Aは、未加工の、精製mAb 1B7(レーン1)及びPBSにおいて200から1mg/mlへと希釈された分散系(レーン2)を比較するSDS-PAGEゲルの画像であり、図34Bは、抗体活性をモニターするための、PTx ELISAによる未加工、凍結乾燥及び分散1B7の比較を示す。

【図35】終末(terminal)血清試料におけるデオチン化1B7を検出するための非還元ウェスタンブロットを示す図である。血清試料から得られた4μgの1B7を、非還元SDS-PAGEローディングバッファーと組み合わせ、煮沸し、4~20%SDS-PAGEゲルにアプライした。分離し、PVDFメンブレンに転写した後、ブロットを5%B

10

20

30

40

50

SAでブロッキングし、SA-HRPをプローブとして、mAb 1B7インタクト及び断片を検出した。レーンは、次のマウス試料を含有する。1：IV溶液、マウス#2；2：IV溶液#5；3：SQ溶液#7；4：SQ溶液#10；5：SQ低用量分散系#13；6：SQ低用量分散系#17；7：SQ高用量分散系#20；8：SQ高用量分散系#24；9：SQ分散バッファーのみ#18。レーン9に用いた血清の量は、最も薄い試料（SQ低用量分散系#13）において用いた血清の量に対応した。

【図36】トレハロースを外因性クラウダーとして用いた1B7抗体のナノクラスター形態を示す図である。A. タンパク質クラスターの模式図であり、図中、大きな丸はタンパク質を表し、小さいドットは対イオンを表し、中程度の丸は外因性クラウダーを表す。同様のクラスターは、有機溶媒におけるコロイドに観察される。B. $c = c_E = 220 \text{ mg/ml}$ における透明分散系。C. 密に集合した自己群集性タンパク質を示す、36BのSEM画像（構成粒子における「ハロー」は、試料調製の際のトレハロース沈着のアーチファクトである）。D. 一定の縮尺で描いたナノクラスターの分散系の模式図。

【図37】外因性クラウダーとしてトレハロースを用いた1B7抗体及びポリクローナルヒツジIgGのDLSによる水力学直径を示す図である。A. 1B7； $c/c_E = 1$ となるよう、バッファーにおいて系列希釈。B. 1B7；図36aの通り出発 $c = c_E = 220 \text{ mg/ml}$ によるpH7.2リン酸バッファーにおける希釈（正方形）及び出発 c_E が 270 mg/ml である、 70 mg/ml の一定の c による減少 c_E （菱形）。エラーバーは、ピーク幅における $\pm s.d.$ を示す。Eq. 14の予測は、定性的に一致している。C. 1B7； 70 mg/ml の一定の c において、レジェンドに示す270から150 mg/ml へとトレハロース c_E を減少させ、続いて、 $270 \text{ mg/ml} - 2$ として表示する、 c_E が 270 mg/ml へと再度上昇する最終点に向かう。D. ポリクローナルヒツジIgG； 50 mg/ml の一定の c において、増加（菱形）、続いて減少（正方形）するトレハロース濃度。可逆性は、平衡クラスター挙動を示唆する。Eq. 14の理論的予測は、データと定性的に一致している。

【図38】高タンパク質濃度に対するBSAナノクラスターサイズを示す図である。 $c = 400 \text{ mg/ml}$ 及び $c_E = 240 \text{ mg/ml}$ にて処方された高濃度BSA分散系は、40 nmの水力学直径を有するナノクラスターを形成する。より低濃度のBSA及び/又はトレハロースで処方された分散系は、漸進的に小さいナノクラスターを生じる。3~4 nm直径のBSA単量体も示されている。

【図39】抗体立体構造及び活性を示す図である。A. モノクローナル抗体1B7対照及び 267 mg/ml 分散系の円二色性スペクトル。全試料を 0.1 mg/ml となるようPBSに希釈し、Jasco J-815CD分光計において解析した。B. 抗体ナノクラスターに見られる $\Phi_{int} = 0.6$ において天然状態が有利であることを示唆する、フォールディングタンパク質分率の理論的予測（Shen、Cheungら、2006）。

【図40A】ナノクラスター分散系におけるタンパク質-タンパク質、タンパク質-クラスター及びクラスター-クラスター階層的相互作用を示す図である。（A）平均力のポテンシャルは、特定短距離（ ssr ）、枯渇引力（ dep ）及び静電気（ el ）構成成分を包含する： $V(r) = V_{ssr}(r) + V_{dep}(r) + V_{el}(r)$ 。

【図40B】ナノクラスター分散系におけるタンパク質-タンパク質、タンパク質-クラスター及びクラスター-クラスター階層的相互作用を示す図である。（B）pIにおける及びpIから3pH単位離れたタンパク質単量体の $V(r)$ の構成成分。B. 予測されるクラスター直径等高線（contour）。三角形は、表16に示す通り、1B7の $c = 235 \text{ mg/ml}$ における、マウスに注射された分散系の条件を表示する。対角パスウェイは、分散系の希釈を表す（図37a）。

【図40C】ナノクラスター分散系におけるタンパク質-タンパク質、タンパク質-クラスター及びクラスター-クラスター階層的相互作用を示す図である。（C）ポリクローナルIgGの実験的ゼータ電位に基づく2個の50 nmナノクラスターの $V(r)$ 。挿入図：弧は、2個のクラスターの縁における長距離（long-ranged）反発の範囲を示し、丸の周りの環は、短距離クラスター間（inter-cluster）引力を示す。

10

20

30

40

50

【図 4 1】濃縮された 1 B 7 分散系及び溶液対照の薬物動態を示す図である。静脈内溶液、皮下溶液又は皮下分散系の投与後の、用量により正規化された血清抗体濃度の経時的変化。尾静脈から血清試料を回収し、1 B 7 濃度を E L I S A により決定した。

【図 4 2】溶液におけるクラウダー（小さな丸）の存在により誘導された、2 個のタンパク質粒子（大きな灰色の丸）間の枯渇引力の模式図である。引力は、このようにクラウダーの中心に排除された体積が重複領域のサイズにより低下される等、立体配置のエントロピー優先度を反映する。

【図 4 3】外因性クラウダーとしてトレハロースを有する抗体ナノクラスターの S E M 画像を示す図である。A、 $c = c_E = 220 \text{ mg/ml}$ （図 3 6 c のものと同一条件）における 1 B 7 抗体ナノクラスターの複数の S E M 画像の再現性。S E M 顕微鏡写真は、4 個のクラスターに対し、分散系における約 300 nm クラスターのサイズにおける優れた再現性を明らかに示し、これは図 3 7 a における D L S 結果と一致する。画像は、ナノクラスターを銅メッシュに載せた通常の炭素膜銅 T E M グリッドから得た。およそ 10 nm の個々のタンパク質単量体は、その周りにハローを有するよう見える。このハローは、S E M の試料調製における凍結及び凍結乾燥の際に沈着したトレハロースの層である。B、 $c = c_E = 260 \text{ mg/ml}$ におけるポリクローナル I g G ナノクラスター。画像処理はレイシー炭素（lacey carbon）T E M グリッドにおいて行い、ナノクラスターはレイシー炭素の鎖の上に載っている。

【図 4 4】フラクタル次元を決定するための静的光散乱を示す図である。 $c = 70 \text{ mg/ml}$ I g G 及び $c_E = 270 \text{ mg/ml}$ トレハロースにおいて、80 nm のヒツジ I g G ナノクラスターが形成された。測定された計数率として見積もられる強度を、 $45^\circ \sim 90^\circ$ の様々な角度における散乱ベクトル $4\pi \sin(\theta/2)/\lambda$ に対してプロットした。線の傾きは、-1 を乗じたデータにより適合する、即ち、2.6 がフラクタル次元である（H i e m e n z and R a j a g o p a l a n 1997）。静的光散乱において、本出願人は、構造因子は散乱ベクトルの関数ではなく、したがって、強度はフラクタル次元による散乱ベクトルに関連していると仮定する。

【図 4 5】バッファー希釈後のポリクローナル I g G ナノクラスターの D L S による水学的直径（ $c/c_E = 1$ ）を示す図である。タンパク質濃度をレジェンドに示す。一定の c/c_E におけるリン酸バッファーによる連続希釈は、 $c = c_E = 47 \text{ mg/ml}$ において約 10 nm の水学的直径を有する単量体タンパク質が観察されるまで、漸進的に小さいナノクラスターを生じる。ナノクラスター解離の挙動及び機序は、図 3 7 a 及び b におけるモノクローナル抗体 1 B 7 に観察されるものと同様のものである。

【図 4 6】高濃度におけるポリクローナル I g G ナノクラスターサイズを示す図である。トレハロースによる $c/c_E = 1:0.5$ の 300 及び 350 mg/ml タンパク質によりポリクローナルヒツジ I g G 分散系を処方し、得られたナノクラスター水学的直径を D L S により測定した。

【図 4 7】分散系希釈後の単量体濃度の H P L C S E C を示す図である。全試料を 1 mg/ml となるよう P B S に希釈し、T O S O H B i o s c i e n c e s T S K ゲル G 2000 S W 及び G 3000 S W_{XL} カラムを備える W a t e r s B r e e z e H P L C により解析した。移動相は、100 mM リン酸ナトリウム及び 300 mM 塩化ナトリウムバッファー（pH 7.0）を含み、吸光度 214 nm により溶出液をモニターした。A.（1）溶液対照 1 B 7、（2）凍結乾燥し、再構成した 1 B 7 並びに（3）260 mg/ml 1 B 7 及び 260 mg/ml トレハロースにより処方された分散系のクロマトグラフを示す。分散系形成、クラスター希釈及びトレハロースによるクラスター再編成を通して凝集体濃度の増加は見られなかった。B. 図 3 7 a 及び 3 7 b に示す、広範囲の表示実験の % 単量体値をここに示す。表示されている誤差は $\pm s.d.$ である。

【図 4 8】S D S - P A G E ゲルの図である。非還元 S D S - P A G E により評価した、より大きい分子量の凝集体の非存在を示す。解析に先立ち全分散系を 1 mg/ml となるよう P B S で希釈した。5 μg の各試料を非還元ローディングバッファーと組み合わせ、プレキャスト 4~20% S D S - P A G E ゲル（B i o R a d）にロードした。レーン

10

20

30

40

50

(1) 分子量マーカー (S p e c t r a B R) ; (2) 溶液対照 1 B 7 ; (3) および (4) 1 B 7 凍結乾燥後 ; (5) 分子量マーカー (S p e c t r a B R) ; (6) および (7) 希釈した 2 6 0 m g / m l 1 B 7 分散系 ; (8) および (9) さらに希釈した、7 5 m g / m l となるよう希釈した 2 6 0 m g / m l 分散系。いずれの試料も、いかなる分子量変化又はより高分子量の凝集体の形成も示さなかった。

【図 4 9】小型の円錐状バイアルによる測定粘度校正曲線を示す図である。次の溶液標準を用いて校正曲線を作成した : D I 水 ($\eta_0 = 1 \text{ c P}$)、安息香酸ベンジル ($\eta_0 = 8.8 \text{ c P}$)、P E G 2 0 0 ($\eta_0 = 5 0 \text{ c P}$)、P E G 3 0 0 ($\eta_0 = 7 0 \text{ c P}$) 及び P E G 4 0 0 ($\eta_0 = 9 0 \text{ c P}$)。小型の円錐状バイアル (0.1 m L V-バイアル、W h e a t o n) において液面が 0.4 " から 0.1 " に引く時間を、I m a g e J ソフトウェアを用いて毎秒 3 0 画像の大量に積み重ねられた画像に変換した、溶液のビデオ (K o d a k E a s y S h a r e Z 8 1 2 I S により撮影) から測定した。プランジャーの端を 1 m l マークに維持しつつ、0.05 秒以内まで少なくとも 3 回、時間を測定して平均した。注射器内の空洞の 1 0 % の最大容積に分散系を充填して、圧力降下における変動を最小化した。

【図 5 0】遠心ろ過濃縮方法使用前後 — 凍結前後の分散系特徴を示す図である。2 1 7 m g / m L I g G 及び 7 0 m g / m L トレハロースにより分散系を処方し、1 カ月間凍結した。

【図 5 1】変動する波長における分散系濁度を示す図である。C a r y 3 E U V / V i s 分光光度計において濁度を測定した。濁度はろ過前分散系のものを提示する。

【図 5 2】外因性クラウダーとしてアルギニンを用いた抗体ナノクラスターの S E M 画像である。レイシー炭素膜を備える銅 T E M グリッド上に滴下する前に、クラウダーとして N M P を用い、0.077 の一定のクラウダー体積分率において分散系を 4 倍希釈した。各画像は、レイシー炭素グリッドの上に単一のナノ粒子を含有しており、これは 5 0 ~ 1 0 0 n m の間の直径である。

【図 5 3】遠心ろ過濃縮により分散系を形成するための模式図である。タンパク質を添加してタンパク質溶液を形成する。このタンパク質溶液に、クラウダーを添加する。この溶液を遠心ろ過濃縮のためのチューブに移す。フィルター通過の際にクラウダーを一部失いつつ、遠心分離後に濃縮を達成する。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明の多様な実施形態の実施及び使用について以下に詳細に論ずるが、本発明が、多種多様な特定の場面において具現できる多くの応用可能な発明概念を提供することは理解されるべきである。本明細書において論ずる特定の実施形態は、本発明を実施及び使用する特定の方式を単に例証するものであるにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

【0016】

I. 定義

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語を以下に定義する。

【0017】

本明細書において使用する場合、用語「ナノクラスター」は、不可逆的に凝集していない 1 0 個以上のタンパク質又はペプチドを指し、直径が 2 0 から 1, 0 0 0 ナノメートルの間であり、場合により、追加的な化合物、成分、又は組成物と物理的に結び付いていてもよい。いくつかの実施形態において、直径は、水力学的直径である。いくつかの実施形態において、ナノクラスターは、より大きいクラスターを形成する、タンパク質又はペプチドのサブクラスターを含んでもよい。いくつかの実施形態において、ナノクラスターは、自己群集していてもよく、この場合の群集は、タンパク質又はペプチドが原因で生じるものである。いくつかの実施形態において、ナノクラスターは、外因性クラウダーの存在下で形成してもよい。いくつかの実施形態において、ナノクラスターは、大部分が自己群集していてもよい。用語「ナノクラスター」には、タンパク質やペプチドの結晶は含

まれない。

【0018】

本明細書において使用する場合、用語「注射器使用可能な(syringable)」及び「注射可能な(syringeable)」は、互換的に使用され、対象に送達するための最終組成物で、注射器(例えば、21から27ゲージの針の付いた注射器)を通して流動可能なだけ十分に流動性であるものを指す。例えば、「注射器使用可能な」組成物は、過度の力をかけずに注射器に装填し注射器から対象に注射するだけ十分に粘度が低く、この場合の過度の力とは、送達に際してかけられる力が単独の原因となって患者に有害作用が及ぶことなく、注射器(例えば、21から27ゲージの針の付いた注射器)を通して組成物を患者に送達する(例えば、iv注射、SQ注射により)ために医療分野の当業者(例えば、医師、看護師)が加える力を超える量である。

10

【0019】

本明細書において使用する場合、用語「底に沈まない」又は「再分散可能な(redispersible)」は、組成物が、長期間、例えば、1時間、2時間、1日、3日、5日、1週間、1カ月、3カ月、6カ月、1年、又はそれを超える期間を経ても溶液相中に留まっている(すなわち、沈降しない)ことを指す。例えば、ある組成物が、再分散時に、薬物投与が可能な状態に戻せないほど急速に軟凝集しない場合、その組成物は「再分散可能な」ものである。

【0020】

本明細書において使用する場合、用語「添加物(複数可)」は、塩、糖、有機物、バッファー、ポリマーなどの組成物を指し、そのような組成物としては以下が挙げられる：エドト酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、グルコヘプトン酸ナトリウム、ナトリウムアセチルトリプトファン、炭酸水素ナトリウム、カプリル酸ナトリウム、過テクネチウム酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、クエン酸アンモニウム、塩化カルシウム、カルシウム、塩化カリウム、酒石酸カリウムナトリウム、酸化亜鉛、亜鉛、塩化第一スズ、硫酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、二酸化チタン、DL-乳酸/グリコール酸、アスパラギン、L-アルギニン、塩酸アルギニン、アデニン、ヒスチジン、グリシン、グルタミン、グルタチオン、イミダゾール、プロタミン、硫酸プロタミン、リン酸、トリ-*n*-ブチルホスフェート、アスコルビン酸、塩酸システイン、塩酸、クエン酸水素、クエン酸三ナトリウム、塩酸グアニジン、マンニトール、ラクトース、スクロース、アガロース、ソルビトール、マルトース、トレハロース、界面活性剤、ポリソルベート80、ポリソルベート20、ポロキサマー188、ソルビタンモノオレエート、トリトンn101、*m*-クレゾール、ベンジルアルコール、エタノールアミン、グリセリン、ホスホリルエタノールアミン、トロメタミン、2-フェニルオキシエタノール、クロロブタノール、ジメチルスルホキシド、*N*-メチル-2-ピロリドン、プロピレングリコール、ポリオキシシル35ヒマシ油、ヒドロキシ安息香酸メチル、トロメタミン、コーン油-モノジ-トリグリセリド、ポリオキシシル40硬化ヒマシ油、トコフェロール、*n*-アセチルトリプトファン、オクタフルオロプロパン、ヒマシ油、ポリオキシエチル化オレイン酸グリセリド、ポリオキシエチル化ヒマシ油、フェノール(消毒薬)、グリシルグリシン、チメロサル(消毒薬、抗真菌薬)、パラベン(保存剤)、ゼラチン、ホルムアルデヒド、ダルベッコ変法イーグル培地、ヒドロコルチゾン、ネオマイシン、フォンウィルブランド因子、グルタルアルデヒド、塩化ベンゼトニウム、白色ワセリン、*p*-アミノフェニル-*p*-アニセート、グルタミン酸-ナトリウム、 β -プロピオラクトン、酢酸塩、クエン酸塩、グルタミン酸塩、グリシン酸塩、ヒスチジン、乳酸塩、マレイン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、トリス、カルボマー1342(アクリル酸と長鎖メタクリル酸アルキルとのコポリマーで、ペンタエリトリールのアリルエーテルで架橋されたもの)、グルコースの星型ポリマー、シリコーンポリマー、ポリジメチルシロキサン、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)、ポリ乳酸、デキストラン40、ポロキサマー(

20

30

40

50

酸化エチレンと酸化プロピレンとのトリブロックコポリマー)。

【0021】

用語「a」又は「an」は、本明細書において使用する場合、1つ又は複数を意味する。加えて、語句「[n]で置換されている」は、本明細書において使用する場合、特定された基が、そこに名前の挙げられた置換基の任意のもののうち1つ若しくは複数又はその置換基すべてで置換されていてもよいことを意味する。例えば、アルキル基又はヘテロアリール基などの基が「置換されていない $C_1 \sim C_{20}$ アルキル又は置換されていない2から20員のヘテロアルキルで置換されている」場合、当該基は、1つ又は複数の置換されていない $C_1 \sim C_{20}$ アルキル及び／又は1つ若しくは複数の置換されていない2から20員のヘテロアルキルを含有してもよい。さらに、ある部分がR置換基で置換されている場合、当該基は「Rで置換されている」と呼ぶことがある。ある部分がRで置換されている場合、当該部分は、少なくとも1つのR置換基で置換されており、各R置換基は異なっている。 10

【0022】

「有効量」は、表明された目的（例えば、投与の目的である効果を達成する、疾患を治療する、酵素活性を低下させる、又は疾患若しくは病態の1つ若しくは複数の症状を低減させる）を達成するだけ十分な量である。「有効量」の例は、疾患の1つ又は複数の症状の治療、予防、又は低減に寄与するだけ十分な量であり、「治療的有效量」と呼ぶこともできよう。1つ又は複数の症状の「低減」（及び、この語句と文法的に等価な語句）は、症状（複数可）の重症度若しくは頻度の低下、又は症状（複数可）の消失を意味する。薬物の「予防的有效量」は、対象に投与されると、意図された予防的效果、例えば、傷害、疾患、病状、若しくは病態の発生（若しくは再発）を予防する若しくは遅らせる効果、又は、傷害、疾患、病状、若しくは病態、若しくはそれらの症状の発生（若しくは再発）の可能性を低下させる効果があると考えられる薬物の量である。完全な予防的效果は、1回分の用量の投与によって必ずしも起こるものではなく、一連の用量を投与した場合にのみ生じることがある。したがって、予防的有效量は、1回又は複数回投与の形で投与してもよい。「活性を低下させる量」は、本明細書において使用する場合、酵素の活性を、ある組成物（例えば、拮抗薬）の不在下と比較して低下させるために必要とされる当該組成物（例えば、拮抗薬、タンパク質、低分子量化合物）の量を指す。「機能を崩壊させる量」は、本明細書において使用する場合、酵素又はタンパク質の機能を、ある拮抗薬の不在下と比較して崩壊させるために必要とされる当該拮抗薬の量を指す。正確な量は、治療の目的によって決まるであろうし、公知の手法を用いて当業者が確認できよう（例えば、Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (第1～3巻、1992)；Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding、(1999)；Pickar, Dosage Calculations、(1999)；及びRemington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、2003、Gennaro編、Lippincott、Williams & Wilkinsを参照のこと）。 20 30

【0023】

「対照」又は「対照実験」は、そのごく普通の意味に従って使用され、実験の対象又は試薬が、当該実験の手順、試薬、又は変数の省略以外は、並行した実験と同様に扱われる実験を指す。場合により、対照は、実験効果を評価する際の比較の標準として用いられる。 40

【0024】

「接触すること」は、そのごく普通の意味に従って使用され、少なくとも2つの別個の種（例えば、生体分子、タンパク質、抗体、又は細胞などの化合物）を、反応し、相互作用し、又は物理的に触れるほど近位になるようにするプロセスを指す。但し、結果として得られる反応生成物は、添加された試薬間の反応により直接生成されることもあれば、反応混合物中で生成する可能性がある、添加された試薬の1つ若しくは複数に由来する中間 50

体から生成されることもあることは理解されるべきである。

【0025】

本明細書において定義するように、用語「阻害」、「～を阻害する」、「～を阻害すること」などは、タンパク質－阻害薬間の相互作用について言及する場合、タンパク質の活性又は機能に、阻害薬の不在下での当該タンパク質の活性又は機能と比較して負の方向に影響すること（例えば、低下させること）を意味する。いくつかの実施形態において、阻害は、疾患又は疾患の症状の低減を指す。いくつかの実施形態において、阻害は、疾患に関係のあるタンパク質の存在の低減を指す。したがって、阻害には、少なくとも部分的に、部分的に、又は完全に、刺激を遮断すること、活性化を減少させる、予防する、若しくは遅らせること、又は、シグナル伝達若しくは酵素活性若しくはタンパク質の量を、不活性化させる、感度低下させる、若しくは下方調節させることが含まれる。同様に「阻害薬」は、タンパク質の活性又はタンパク質の産生を、例えば、結合すること、刺激（例えば、産生）を部分的若しくは完全に遮断すること、活性化を減少させる、防止する、若しくは遅らせること、又は、シグナル伝達若しくは酵素活性を不活性化させる、感度低下させる、若しくは下方調節させることにより阻害する化合物である。阻害は、タンパク質の量を、当該タンパク質のクリアランス又は分解を促進することにより減少させる場合もある。いくつかの実施形態において、阻害薬は、抗体である。

10

【0026】

用語「モジュレーター」は、標的分子のレベル又は標的分子の機能を向上又は低下させる組成物を指す。

20

【0027】

「薬学的に許容される添加剤」及び「薬学的に許容される担体」は、活性剤の対象への投与及び対象による吸収を助け、患者に著しい有害な毒物学的作用を及ぼす原因となることなく本発明の組成物中に含ませることができる物質を指す。薬学的に許容される添加剤の非限定的な例としては、水、NaCl、通常生理食塩溶液、乳酸加リンゲル液、通常スクロース、通常グルコース、結合剤、充填剤、崩壊剤、滑沢剤、コーティング、甘味料、香味料、塩溶液（リンゲル液など）、アルコール、油、ゼラチン、炭水化物（ラクトース、アミロース、又はデンプンなど）、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリジン、及び色素などが挙げられる。そのような調製物は、滅菌でき、必要に応じ、本発明の組成物（例えば、タンパク質、クラウダー、ナノクラスター、分散系）と有害に反応しない補助剤、例えば、滑沢剤、保存剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、バッファー、着色剤、及び／又は芳香族物質などと混合することができる。当業者には、本発明において、他の医薬用添加剤も有用であることが認識されよう。

30

【0028】

用語「調製物」は、封入材料を担体として用いた活性組成物（例えば、タンパク質ナノクラスター、タンパク質－クラウダーナノクラスター、分散系）の製剤を包含することが意図されており、この封入材料は、活性成分（他の担体を伴うか否かを問わない）が担体により取り巻かれており、それにより活性成分が担体と結び付いているカプセルをもたらす。同様に、カシェ剤及びロゼンジ剤が包含される。錠剤、散剤、カプセル剤、丸剤、カシェ剤、及びロゼンジ剤は、経口投与に適した固形剤形として使用できる。

40

【0029】

本明細書において使用する場合、用語「薬学的に許容される」は、「生理学的に許容される」及び「薬理学的に許容される」と同義的に使用される。医薬組成物は、一般に、緩衝化及び貯蔵時における保存のための薬剤を含むであろうし、投与経路によっては、適切な送達のためのバッファー及び担体を含むことができる。

【0030】

用語「単離された」、「精製された」、又は「生物学的に純粋な」は、本来の状態で見出された場合には伴っていることが普通である成分を実質的又は本質的に含んでいない材料を指す。生体分子（例えば、核酸又はタンパク質）の純度及び均質性は、典型的には、

50

ポリアクリルアミドゲル電気泳動又は高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学手法を用いて決定される。調製物中に存在する支配的な種であるタンパク質は、実質的に精製されたものである。用語「精製された」は、核酸又はタンパク質が電気泳動ゲルにおいて本質的に1本のバンドを生じさせることを表すことがある。いくつかの実施形態において、核酸又はタンパク質は、少なくとも50%の純度、場合により少なくとも65%の純度、場合により少なくとも75%の純度、場合により少なくとも85%の純度、場合により少なくとも95%の純度、及び場合により少なくとも99%の純度である。例として、単離された細胞又は単離された試料細胞は、それらの細胞が本来の状態にあるとき又は本来の状態から最初に取り出されたときには伴っていることが普通である成分の多くを実質的に含んでいない単一の細胞型である。ある特定の実施形態において、単離された細胞試料は、細胞を所望の状態で維持するために必要となる、その本来の状態由来の成分を保持する。いくつかの実施形態において、単離された（例えば、精製された、分離された）1つ又は複数の細胞は、試料中で実質的に唯一の細胞型である細胞である。精製された細胞試料は、少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の、1種類の細胞を含有し得る。単離された細胞試料は、細胞マーカー又は細胞マーカーの組合せを用いて入手し得るが、そのようなマーカーはいずれも、未精製の細胞試料中の1つの細胞型に特有のものである。いくつかの実施形態において、細胞は、細胞選別機を用いて単離される。いくつかの実施形態においては、細胞は、細胞タンパク質に対する抗体を使用して単離する。

【0031】

用語「水力学的直径」は、化学分野におけるそのごく普通の意味を有し、観察下での（例えば、動的光散乱法により測定した場合の）、分子と同じスピードで媒体を通して拡散する仮想的な剛体球の見かけの直径を指す。

【0032】

本明細書において使用する場合、用語「透明な」は、材料が光を通過させる物理的特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が所与の波長（複数可）の入射光の大半を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光（例えば、可視光、600nm、400~700nm）の約75%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約80%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約85%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約90%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約95%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約96%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約97%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約98%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約99%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約99.5%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約99.6%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約99.7%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約99.8%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、材料が特定の波長の入射光の約99.9%超を通過させる特性を指す。いくつかの実施形態において、タンパク質ナノクラスター分散系の透明性に言及するとき、前記の百分率（%）（例えば、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%のうちいずれか1つの値）は、当該タンパク質を欠く対照試料（この対照試料の値を、特定の波長の入射光が材料を通過する値100%と決める）と比較した値であ

る。いくつかの実施形態において、透明性は、光減衰量により測定され、用語「光減衰量」は、本明細書において使用する場合、入射光の角度から0度での入射光の吸収量と散乱量とを合わせた量を指す。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約 0.05 cm^{-1} 未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約 0.1 cm^{-1} 未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約 0.25 cm^{-1} 未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約 0.5 cm^{-1} 未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約1%未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約2%未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約3%未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約4%未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約5%未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約10%未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約15%未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約20%未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、「透明な」は、光減衰量が約25%未満であることを意味する。いくつかの実施形態において、光減衰量に関連してタンパク質ナノクラスター分散系の透明性に言及するとき、前記の比率(%) (例えば、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、又は25%のうちいずれか1つの値)は、当該タンパク質を欠く対照試料(この対照試料の値を、光減衰量の値0%と決める)と比較した値である。「光減衰量測定値」は、当業者により物理的に測定された光減衰値を指す。

10

20

【0033】

用語「粘性、粘度、粘稠性 (viscosity)」は、液体及び流体に適用される場合、化学分野におけるそのごく普通の意味を有する。

【0034】

本明細書において使用する場合、用語「低粘性 (viscosity)」は、粘度が約100センチポアズ未満であることを指す。いくつかの実施形態において、「低粘性」は、粘度が約90センチポアズ未満であることを指す。いくつかの実施形態において、「低粘性」は、粘度が約80センチポアズ未満であることを指す。いくつかの実施形態において、「低粘性」は、粘度が約70センチポアズ未満であることを指す。いくつかの実施形態において、「低粘性」は、粘度が約60センチポアズ未満であることを指す。いくつかの実施形態において、「低粘性」は、粘度が約50センチポアズ未満であることを指す。いくつかの実施形態において、「低粘性」は、粘度が約40センチポアズ未満であることを指す。いくつかの実施形態において、「低粘性」は、粘度が約30センチポアズ未満であることを指す。いくつかの実施形態において、「低粘性」は、粘度が約20センチポアズ未満であることを指す。いくつかの実施形態において、「低粘性」は、粘度が約10センチポアズ未満であることを指す。いくつかの実施形態において、低粘性は、粘度計、レオメーター、又は、本明細書に記載の注射器装填法 (syringe loading method) を用いて測定される。いくつかの実施形態において、低粘性は、約100秒⁻¹、約200秒⁻¹、約300秒⁻¹、約400秒⁻¹、約500秒⁻¹、約600秒⁻¹、約700秒⁻¹、約800秒⁻¹、約900秒⁻¹、約1000秒⁻¹、約2000秒⁻¹、約3000秒⁻¹、約4000秒⁻¹、約5000秒⁻¹、約6000秒⁻¹、約7000秒⁻¹、約8000秒⁻¹、約9000秒⁻¹、約10000秒⁻¹、約20000秒⁻¹、約30000秒⁻¹、約40000秒⁻¹、約50000秒⁻¹、約60000秒⁻¹、約70000秒⁻¹、約80000秒⁻¹、約90000秒⁻¹、又は約100000秒⁻¹のせん断速度で測定される。いくつかの実施形態において、せん断速度の平均値は、本明細書に記載の注射器装填法を用いて、流量及び幾何学的特性から決定し得る。いくつかの実施形態において、「低粘性」は、以下の表／マトリックスに示す粘度とせん断速度との組合せ(1から280の番号を付けてある)の任意の1つを指し、表／マトリックスの各セルは、その列の粘度及びその行のせん

30

40

50

断速度に対応している：

【 0 0 3 5 】

【表 1】

粘度[約(センチポ アズ)未満]/せん断 速度[約(秒 ⁻¹)]	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10
100	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
200	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
300	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
400	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
500	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
600	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
700	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
800	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
900	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
1000	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
2000	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
3000	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
4000	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
5000	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
6000	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
7000	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
8000	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
9000	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
10000	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
20000	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
30000	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
40000	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
50000	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
60000	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
70000	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
80000	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
90000	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
100000	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280

いくつかの実施形態において、粘度は先頭列に記載の値、せん断速度は先頭行に記載の値であり、それが共に、直前に掲げた表のセル番号 1 から 2 8 0 のいずれか 1 つに対応している。いくつかの実施形態において、前表における粘度とせん断速度との組合せは、本明細書に記載の注射器装填法により測定される。

【 0 0 3 6 】

本明細書において使用する場合、用語「高タンパク質濃度」又は「高タンパク質」は、タンパク質濃度が約 2 0 0 m g / m L 超であることを指す。いくつかの実施形態において、タンパク質濃度は、約 3 0 0 m g / m L 超である。いくつかの実施形態において、タンパク質濃度は、約 4 0 0 m g / m L 超である。いくつかの実施形態において、タンパク質濃度は、約 5 0 0 m g / m L 超である。いくつかの実施形態において、タンパク質濃度は、約 6 0 0 m g / m L 超である。いくつかの実施形態において、タンパク質濃度は、約 7 0 0 m g / m L 超である。いくつかの実施形態において、タンパク質濃度は、約 8 0 0 m g / m L 超である。いくつかの実施形態において、タンパク質濃度は、約 9 0 0 m g / m L 超である。いくつかの実施形態において、タンパク質濃度は、約 1 0 0 0 m g / m L 超

である。いくつかの実施形態において、タンパク質濃度は、1つのタンパク質種（実質的に同一のタンパク質）の濃度である。いくつかの実施形態において、タンパク質濃度は、混合物中のすべてのタンパク質の濃度である。いくつかの実施形態において、「高タンパク質濃度」又は「高タンパク質」は、タンパク質濃度が約200mg/mL超、約300mg/mL超、約400mg/mL超、約500mg/mL超、約600mg/mL超、約700mg/mL超、約800mg/mL超、約900mg/mL超、又は約1000mg/mL超であることを指す。いくつかの実施形態において、「高タンパク質濃度」又は「高タンパク質」は、タンパク質濃度の範囲を指し、この範囲は、全体で、約200mg/mL超、約300mg/mL超、約400mg/mL超、約500mg/mL超、約600mg/mL超、約700mg/mL超、約800mg/mL超、約900mg/mL超、又は約1000mg/mL超である。

10

【0037】

本明細書において使用する場合、用語「分散系」は、化学の分野におけるそのごく普通の意味を有し、異なる組成の連続相中に粒子が分散されている（例えば、液相中にナノ粒子又はナノクラスターが分散されている）系を指す。いくつかの実施形態において、分散系は懸濁液であってもよく、この場合の懸濁液は、化学分野におけるそのごく普通の意味を有し、連続液相中に固体粒子を有する分散系を指しており、この場合の固体粒子は、沈降するだけ十分に大きい。いくつかの実施形態において、分散系はコロイドであってもよく、この場合のコロイドは、化学分野において使用されるそのごく普通の意味を有する。いくつかの実施形態において、分散系は、連続液相中に分散されているナノ粒子を含む。いくつかの実施形態において、分散されている粒子は、タンパク質ナノクラスターである。いくつかの実施形態において、異なる組成の連続相は、溶液中にタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、溶液中のタンパク質は、分散系（すなわち、粒子と連続相とが合わさったもの）中の総タンパク質の約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0.5%未満、約0.4%未満、約0.3%未満、約0.2%未満、約0.1%未満である。

20

【0038】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、本明細書においては互換的に使用されてアミノ酸残基のポリマーを指し、この場合のポリマーは、アミノ酸から成っていない部分（例えば、小分子量化合物）と場合によりコンジュゲートされていてもよい。これらの用語は、1つ又は複数のアミノ酸残基が、対応する天然型アミノ酸の人工的な化学的模倣体であるアミノ酸ポリマーだけでなく、天然型アミノ酸ポリマー及び非天然型アミノ酸ポリマーにも適用される。いくつかの実施形態において、タンパク質は、アミノ酸残基のポリマーとコンジュゲートされている（例えば結合されている）非タンパク質組成物（例えば、低分子量化合物）を含む（「コンジュゲート」又は「コンジュゲートタンパク質」と総称される）。いくつかの実施形態において、タンパク質は、アミノ酸のポリマーから成る（「非コンジュゲートタンパク質」）。いくつかの実施形態において、タンパク質は、約10個、約20個、約30個、約40個、約50個、約60個、約70個、約80個、約90個、約100個、約200個、約300個、約400個、約500個、約600個、約700個、約800個、約900個、約1000個、約2000個、約3000個、約4000個、又は約5000個のアミノ酸残基から成るポリマーである。いくつかの実施形態において、タンパク質は、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、又は20個のアミノ酸残基から成るポリマーである。

30

40

【0039】

用語「アミノ酸」は、天然型アミノ酸及び合成アミノ酸、並びに、天然型アミノ酸と類似した様式で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体を指す。天然型アミノ酸は、遺伝コードによりコードされるもの、並びに、後で修飾された天然型アミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタミン酸、及びO-ホスホセリンである。アミノ

50

酸類似体は、天然型アミノ酸と同じ基本的化学構造、すなわち、水素と結合しているα炭素、カルボキシル基、アミノ基、及びR基（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）を有する化合物を指す。そのような類似体は、修飾されたR基（例えば、ノルロイシン）又は修飾されたペプチド骨格を有するが、天然型アミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然型アミノ酸と類似した様式で機能する、化学化合物を指す。

【0040】

本明細書においては、アミノ酸を、広く公知の3文字の記号、又は、IUPAC-IUB生化学命名法委員会が推奨する1文字の記号、そのいずれかで呼ぶことがある。同様に、ヌクレオチドも、広く受け入れられている単一文字のコードで呼ぶことがある。

【0041】

「保存的に修飾されたバリエーション」は、アミノ酸配列と核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関しては、保存的に修飾されたバリエーションは、同一の又は本質的に同一のアミノ酸配列をコードする当該核酸を指す、又は、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一の配列を指す。遺伝コードは縮重していることから、多数の機能的に同一の核酸が、任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、GCA、GCC、GCG、及びGCUというコドンはすべて、アラニンというアミノ酸をコードする。したがって、コドンによりアラニンが特定されるすべての位置において、コドンは、コードされたポリペプチドを変えることなく、記載された対応するコドンのいずれにも変わる可能性がある。そのような核酸の変異が「サイレント変異」であり、これは、1種の保存的に修飾された変異である。ポリペプチドをコードする、ここでいうすべての核酸配列には、当該核酸のすべての可能性のあるサイレント変異も記載されている。当業者には、核酸中の各コドン（但し、普通はメチオニンの唯一のコドンであるAUG、及び、普通はトリプトファンの唯一のコドンであるTGGを除く）を修飾して、機能的に同一の分子を得ることができることは認識されよう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、発現産物に関する各配列の記載には潜在しているが、実際のプローブ配列に関しては潜在していない。

【0042】

アミノ酸配列に関して、当業者には、コードされた配列における単一のアミノ酸又はわずかな百分率のアミノ酸を改変、付加、又は削除する、核酸、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質配列への個々の置換、削除、又は付加は、改変の結果、あるアミノ酸を化学的に類似したアミノ酸に置換する「保存的に修飾されたバリエーション」であることは認識されよう。機能的に類似したアミノ酸を示してある保存的置換表は、当技術分野において周知である。そのような保存的に修飾されたバリエーションは、本発明の多形バリエーション、種間相同体、及び対立遺伝子に追加されるものであり、それらを排除するものではない。

【0043】

次の8つの群には、それぞれ、互いに保存的置換されるアミノ酸が入っている：1）アラニン（A）、グリシン（G）；2）アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；3）アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；4）アルギニン（R）、リジン（K）；5）イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、バリン（V）；6）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）；7）セリン（S）、トレオニン（T）；及び8）システイン（C）、メチオニン（M）（例えば、Creighton、Proteins、（1984）を参照のこと）。

【0044】

「同一の」、又は配列「同一」率、又は「アミノ酸配列同一性を共有する」という用語は、2つ以上の核酸又はポリペプチド配列に関する場合、2つ以上の配列又は部分配列（subsequence）について、それらが同じであること、又は、それらが、特定の領域にわたり同じであるアミノ酸（amino acid）残基若しくはヌクレオチドをある百分率で有すること、又は、それらが、同じであるアミノ酸残基若しくはヌクレオ

チドを特定の百分率で有すること（すなわち、比較ウィンドー（comparison window）又は指定された領域にわたり最大一致度（maximum correspondence）について比較及びアラインメントを行った際、特定の領域にわたり、約60%の同一性、好ましくは、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.1%、約99.2%、約99.3%、約99.4%、約99.5%、約99.6%、約99.7%、約99.8%、約99.9%、又はより高い同一性を有すること）を指し、この測定は、以下に記載の初期設定パラメータを有するBLAST若しくはBLAST2.0配列比較アルゴリズムを用いて、又は、手動アラインメント及び目視検査により行われる〔例えば、NCBIのウェブサイト（アドレスは、ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）などを参照のこと〕。この場合、そのような配列を「実質的に同一」とであると言う。また、この定義は、試験用配列の相補体（complement）を指す、又はそれに適用されることがある。また、この定義には、削除及び／又は付加が行われている配列、並びに、置換が行われている配列も含まれる。用いられるアルゴリズムにより、ギャップなどを説明できる。

【0045】

配列比較の場合、典型的には、1つの配列が参照配列の役を果たし、試験用配列は、これと比較される。配列比較アルゴリズムを使用する際は、試験用配列及び参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムのパラメータを指定する。好ましくは、初期設定のプログラムのパラメータを使用でき、又は、代替的なパラメータを指定できる。次いで、プログラムのパラメータに基づき、配列比較アルゴリズムが、参照配列に対する試験用配列の配列同一率を計算する。

【0046】

「比較ウィンドー」は、本明細書において使用する場合、20個から600個、一般的には約50個から約200個、さらに一般的には約100個から約150個で成る群から選択される隣接する位置の番号のうち任意の1つのセグメントへの言及を含んでおり、比較ウィンドー内では、ある配列を、隣接する位置の同じ番号の参照配列と比較し得るが、その前に、2つの配列を最適にアラインメントさせておく。比較のための配列のアラインメントの方法は、当技術分野において周知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math., 2, 482 ページ、(1981)の局地的相同性アルゴリズム、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol., 48, 443 ページ、(1970)の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 85, 2444 ページ、(1988)の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行（GAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA、提供先：Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI）、又は、手動アラインメント及び目視検査（例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、1995、補遺)を参照のこと）により、実行できる。

【0047】

配列同一率及び配列類似率の決定に適したアルゴリズムの好ましい例は、BLAST及びBLAST2.0アルゴリズムであり、これらのアルゴリズムは、Altschulら、Nuc. Acids Res., 25, 3389～3402 ページ、(1977)及びAltschulら、J. Mol. Biol., 215, 403～410 ページ、(1990)にそれぞれ記載されている。

【0048】

アプタマーは、非ワトソン・クリック様式で多種多様な標的と結合するように設計される核酸である。したがって、アプタマーを使用して、自己免疫疾患、炎症性の自己免疫疾患、癌、感染性疾患などの疾患に関連するタンパク質など、ほぼすべての対象とする分子

を検出又は他の形で標的化することができる。アプタマーの結合の特徴を構築及び決定する方法は、当技術分野において周知である。例えば、そのような手法は、米国特許第5,582,981号、同第5,595,877号、及び同第5,637,459号に記載されている。アプタマーは、典型的には、少なくとも5ヌクレオチド、10ヌクレオチド、20ヌクレオチド、30ヌクレオチド、又は40ヌクレオチドの長さであり、安定性を向上させるために修飾核酸から構成することができる。構造を安定化させるには、例えば、アプタマー中で三次元構造を形成するために、フランキンギング配列を加えることができる。

【0049】

本明細書において使用する場合、用語「クラウド」は、溶媒（例えば、分散液）中に濃縮されたタンパク質と共に存在すると、非不可逆的に凝集したタンパク質のナノクラスターを含有する安定なコロイド状の分散系の形成を助ける化合物を指す。いくつかの実施形態において、クラウドは、タンパク質自体（例えば、自己群集性のタンパク質）であってもよい。いくつかの実施形態において、クラウドは、アミノ酸であってもよい。いくつかの実施形態において、クラウドは、第2のタンパク質種（例えば、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、コンジュゲートタンパク質、非コンジュゲートタンパク質）であってもよい。いくつかの実施形態において、クラウドは、非タンパク質クラウド、例えば、多糖、多価電解質、ポリ酸、デキストラン、ポロキサマー、界面活性剤、グリセロール、エリトリトール、アラビノース、キシロース、リボース、イノシトール、フルクトース、ガラクトース、マルトース、グルコース、マンノース、トレハロース、スクロース、ポリ（エチレングリコール）、カルボマー1342、グルコースポリマー、シリコーンポリマー、ポリジメチルシロキサン、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-c o -グリコール酸）、ポリ乳酸、デキストラン、ポロキサマー、有機共溶媒であり、エタノール、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、PEG300、PEG400、PEG200、PEG3350、プロピレングリコール、N,Nジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ソルケタール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ジグリム、乳酸エチルから選択される有機共溶媒、塩、バッファー、又はそれらの組合せであってもよい。

【0050】

用語「多糖」、「多価電解質」、「ポリ酸」、「ポラキサマー」、「界面活性剤」、「バッファー」は、化学の分野におけるそのごく普通の意味を有する。

【0051】

本明細書において使用する場合、用語「デキストラン」は、グルコース分子を含む分枝多糖を指す。いくつかの実施形態において、デキストランの分子量は、約1から2000キロダルトンの間である。いくつかの実施形態において、デキストランは、1キロダルトンである。いくつかの実施形態において、該分子量は、約1から10キロダルトンの間である。いくつかの実施形態において、該分子量は、約1から100キロダルトンの間である。いくつかの実施形態において、該分子量は、約1から1000キロダルトンの間である。いくつかの実施形態において、該分子量は、約10から100キロダルトンの間である。いくつかの実施形態において、該分子量は、約10から50キロダルトンの間である。いくつかの実施形態において、該分子量は、約10から2000キロダルトンの間である。いくつかの実施形態において、該分子量は、約100から2000キロダルトンの間である。いくつかの実施形態において、該分子量は、約100から500キロダルトンの間である。

【0052】

本明細書において使用する場合、用語「約」は、数値（例えば、量、測定値、サイズ、粘度、直径、濃度）を修飾するときは、ある範囲の値（その数値、並びに、その数値より大きい及び／又は小さい値を含む）を指し、この場合の範囲は、ちょうどその数値の場合に適用される機能と比較したとき、本明細書（その実施形態を含む）に記載の組成物又は方法の機能又は使用に影響しないと思われる量である。いくつかの実施形態において、その範囲は、機能にあまり影響しないと思われる。いくつかの実施形態において、その範囲

は、機能に実質的に影響しないと思われる。いくつかの実施形態において、組成物は、本明細書（その実施形態を含む）に記載のナノクラスターである。いくつかの実施形態において、組成物は、本明細書（その実施形態を含む）に記載のナノクラスター分散系である。いくつかの実施形態において、組成物は、本明細書（その実施形態を含む）に記載の医薬組成物である。いくつかの実施形態において、組成物は、本明細書（その実施形態を含む）に記載のキットである。いくつかの実施形態において、本方法は、本明細書（その実施形態を含む）に記載の分散系を作製する方法である。いくつかの実施形態において、本方法は、本明細書（その実施形態を含む）に記載の、疾患を治療する方法である。いくつかの実施形態において、本方法は、本明細書（その実施形態を含む）に記載の、ナノクラスター分散系を改変する方法である。いくつかの実施形態において、「約」には、その数値の0.1倍、0.2倍、0.3倍、0.4倍、0.5倍、0.6倍、0.7倍、0.8倍、又は0.9倍高い値、低い値、又は両方が含まれる。いくつかの実施形態において、「約」は、ちょうどその数値である。いくつかの実施形態において、「約」は、当該測定値を得るための一般的な手法又は装置を用いて数値測定の当業者が測定したときの、その数値の標準偏差である。いくつかの実施形態において、「約」には、その数値の0.1倍、1.0倍、又は10倍が含まれる。いくつかの実施形態において、「約」には、その数値のプラスマイナス0.1倍が含まれる（例えば、約200mg/mLは、180～220mg/mLである）。

10

【0053】

本明細書において使用する場合、用語「平均直径」は、ナノクラスターに適用されるときは、試料中のナノクラスターの平均直径を指す。いくつかの実施形態において、平均直径は、水力学的直径の平均値である。いくつかの実施形態において、平均直径は、ナノクラスターの最長軸の長さの平均値である。いくつかの実施形態において、平均直径は、動的光散乱法により測定される。いくつかの実施形態において、平均直径は、静的光散乱法により測定される。いくつかの実施形態において、平均直径は、サイズ排除クロマトグラフィーにより測定される。いくつかの実施形態において、平均直径は、顕微鏡観察法により測定される。いくつかの実施形態において、平均直径は、走査型電子顕微鏡法により測定される。いくつかの実施形態において、平均直径は、低温電子顕微鏡法により測定される。いくつかの実施形態において、平均直径は、透過型電子顕微鏡法により測定される。いくつかの実施形態において、平均直径は、X線散乱法（例えば、小角X線散乱法）により測定される。

20

30

【0054】

本明細書において使用する場合、用語「複数」は、2つ以上を指す。

【0055】

本明細書において使用する場合、用語「不可逆的に凝集している」は、液体媒体を含む混合物中でタンパク質が物理的に結び付き合っていることを指し、この状況で、混合物がクラウダーを含有する場合にタンパク質の濃度又はクラウダーの濃度を希釈すると、タンパク質は凝集体から解離せず、そのため、媒体、及び、タンパク質がそれまで凝集していなかった場合のタンパク質の濃度にとって適切な二次、三次、及び四次構造を有する機能的なタンパク質は形成されない。不可逆的に凝集しているタンパク質は、「不安定な」タンパク質と称されることもある。「安定な」タンパク質（例えば、抗体）は、クラウダーが存在する場合にタンパク質濃度又はクラウダー濃度のいずれかを希釈するとタンパク質凝集体又はタンパク質クラスターから解離するタンパク質であり、タンパク質凝集体又はタンパク質クラスターの形成を促進して、媒体、及び、タンパク質がそれまで凝集していなかった場合のタンパク質の濃度にとって適切な二次、三次、及び四次構造を有する機能的な（例えば、活性な、酵素的に活性な）タンパク質を形成した。

40

【0056】

本明細書において使用する場合、用語「低分子量化合物」は、分子量が1キロダルトン未満の組成物を指す。いくつかの実施形態において、低分子量化合物は、診断剤、医薬剤、造影剤、発蛍光団、常磁性剤（paramagnetic agent）、ペプチド、

50

又は毒素であってもよい。いくつかの実施形態において、低分子量化合物は、別の組成物（例えば、タンパク質、抗体）とコンジュゲートして（例えば、結合して）いてもよい。

【0057】

本明細書において使用する場合、用語「診断剤」は、疾患状態又は疾患状態の症状の有無の検出に有用な組成物を指す。いくつかの実施形態において、診断剤は、標識又は検出可能な部分であってもよい。

【0058】

「標識」又は「検出可能な部分」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的、又は他の物理的な手段により検出可能な組成物である。例えば、有用な標識としては、 ^{32}P 、蛍光色素、高電子密度の試薬、酵素（例えば、ELISAにおいて一般的に使用されるもの）、ビオチン、ジゴキシゲニン、又はハプテン、及びタンパク質などの実体で、例えば放射性標識を標的ペプチドと特異的に反応するペプチド又は抗体中に組み込むことにより、検出可能にすることができるものが挙げられる。抗体を標識とコンジュゲートさせるための当技術分野において公知の任意の方法を用いてもよく、例えば、Hermanson、Bioconjugate Techniques、1996、Academic Press, Inc.、San Diegoに記載されている方法を用いる。

【0059】

本明細書において使用する場合、「医薬品」は、疾患又は疾患の症状の治療において有用な組成物を指す。

【0060】

本明細書において使用する場合、「薬学的に活性なタンパク質」は、疾患又は疾患の症状の治療において有用なタンパク質を指す。

【0061】

用語「治療すること」又は「治療」は、傷害、疾患、病状、又は病態の治療又は回復が上首尾であることの何らかの徴候を指し、その例としては、何らかの客観的又は主観的なパラメータ、例えば、軽快；寛解；症状の軽減、又は、傷害、病状、若しくは病態に対する患者の忍容性を高めること；変性又は減退の速度を低下させること；変性の最終点の衰弱度を抑えること；患者の身体的又は精神的な幸福の改善が挙げられる。症状の治療又は回復は、客観的又は主観的なパラメータに基づくものであってもよく、そのようなパラメータとしては、理学的検査、神経精神医学的検査、及び／又は精神医学的な評価の結果が挙げられる。例えば、本明細書に示す方法であれば、癌の発現率を減少させること、及び／又は、癌の寛解の原因となることにより、首尾よく癌を治療することができよう。用語「治療すること」及びその活用形には、傷害、病状、病態、又は疾患の予防が含まれる。

【0062】

「疾患」又は「病態」は、本明細書において提供される組成物、分散系、又は方法を用いて治療することが可能な患者又は対象の生命の状態又は健康状態を指す。

【0063】

本明細書において使用する場合、用語「造影剤」は、対象に投与されると、医療用の画像化のための方法、手法、又は装置（例えば、X線写真の機器、X線、CT、PET、MRI、超音波）の検出限界又は検出能力を高める組成物を指す。造影剤は、対象内の異なる構造又は体液と関係のあるシグナルの対比を増強し得る。

【0064】

「患者」又は「その必要がある対象」は、本明細書において提供される医薬組成物の投与により治療できる疾患又は病態に罹患している又は罹りやすい生体を指す。非限定的な例としては、ヒト、他の哺乳動物、ウシ亜科の動物、ラット、マウス、イヌ、サル、ヤギ、ヒツジ、ウシ、シカ、及び他の非哺乳動物が挙げられる。いくつかの実施形態において、患者は、ヒトである。

【0065】

本明細書において使用する場合、用語「発蛍光団」は、化学分野におけるそのごく普通の意味を有し、分光法の蛍光画像化において使用される発色団を指す。発蛍光団は、第1

10

20

30

40

50

の波長範囲内の光を吸収し、第2の波長範囲内の光を放射する。

【0066】

本明細書において使用する場合、用語「せん断速度」は、化学分野及び流体力学におけるそのごく普通の意味を有し、せん断のかかる速度（例えば、 秒^{-1} ）を指し、この場合のせん断は、物体（例えば、変形可能な物体、液体、固体の物体）にかけられる、所与の軸に対して垂直方向の力又は圧力であり、軸の一方の側に、他方と比較してより大きい値でかかるもの（すなわち、より大きい力又は圧力）を指す。円筒を通る流れの場合、壁面でのせん断速度は、流量を半径の三乗で割った値に比例する。

【0067】

本明細書において使用する場合、用語「注射器装填法」は、注射器に取り付けられた針の中の同じ圧力低下を用いることにより液体（例えば、分散系、溶液、懸濁液、混合物）の粘度を測定する方法を指し、この方法では、注射器のピストンは一定量だけ動かされて、直径及び長さが既知である針を通る流れを生じさせる。測定対象である液体の未知の粘度を、この測定とまったく同じ方式で、粘度が既知である液体に対して行われた複数の測定による値と比較する。いくつかの実施形態において、針のゲージは21から27の間である。いくつかの実施形態において、針は、25ゲージ針である。いくつかの実施形態において、注射器は、1 mL注射器である。いくつかの実施形態において、針は、1.5インチの長さである。いくつかの実施形態において、円錐形のバイアル中のある高さ（液体メニスカスから円錐の底までの距離は0.4インチである）から、ある高さ（液体メニスカスから円錐の底までの距離は0.1インチである）まで、48マイクロリットルの体積に相当する液体（例えば、分散系）を引きこむ時間を測定する。いくつかの実施形態において、注射器装填法は、本出願の実施例VIに記載のパラメータを用いる、本明細書に先に記載の方法である。

【0068】

本明細書において使用する場合、用語「充填率」は、第1の物体又は複数の物体及び第2の物体又は複数の物体を含有する規定空間の体積に対する第1の物体又は複数の第1の物体により占有される体積の比率を指す。いくつかの実施形態において、充填率は、ナノクラスターの体積に対するナノクラスター内のタンパク質の比率である。いくつかの実施形態において、充填率は、ナノクラスターの体積に対するナノクラスター内のタンパク質の体積の複数の比率の平均値である。

【0069】

本明細書において使用する場合、用語「制御放出成分」は、本明細書（実施形態を含む）に記載の組成物と配合されると、制御された速度で組成物を患者体内に放出する化合物を指す。そのような化合物としては、高分子量の、陰イオン性の粘液模倣（*mucomimetic*）ポリマー、ゲル化する多糖、及び微粉化された薬物担体基質が挙げられる。これらの成分は、米国特許第4,911,920号、同第5,403,841号、同第5,212,162号、及び同第4,861,760号に、より詳細に論じられている。これらの特許の全体の内容は、すべての目的について、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、制御放出成分は、持続放出、持続作用、長期放出、時間放出、時限放出、制御放出、調節放出、又は連続放出化合物であってもよい。いくつかの実施形態において、該化合物は、該化合物及び組成物が経口投与された場合、投与部位（例えば、皮下、静脈内）又は消化管（例えば、胃、腸）内で、患者により分解される。いくつかの実施形態において、制御放出成分は、ポリマーであり、「制御放出ポリマー」と呼ばれることもある。

【0070】

本明細書において使用する場合、用語「常磁性剤」は、画像診断法（例えば、磁気共鳴画像化法）において造影剤として有用な常磁性の化合物を指す。いくつかの実施形態において、常磁性剤は、ガドリニウム、酸化鉄、鉄、白金、又はマンガンを含む。

【0071】

本明細書において使用する場合、用語「等張の」は、2つの液体が同じ浸透圧を有する

ことを指す。ある液体が、所与の細胞種の膜を隔てた細胞内部の液体と同じ有効浸透圧を有する場合、その液体はもう1つの液体と等張である。いくつかの実施形態において、分散系は、血液と等張である。いくつかの実施形態において、分散系は、患者における分散系の投与部位と等張である。いくつかの実施形態において、分散系は、分散系の皮下投与部位と等張である。

【0072】

本明細書において使用する場合、用語「抗体」は、抗原と特異的に結合し抗原を認識する免疫グロブリン遺伝子又はその断片由来のフレームワーク領域を含むポリペプチドを指す。認識されている免疫グロブリン遺伝子としては、 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 、及び μ 定常領域遺伝子、並びに、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。軽鎖は、 κ 又は λ のいずれかに分類される。重鎖は、 γ 、 μ 、 α 、 δ 、又は ϵ に分類され、これらの重鎖により、免疫グロブリンクラスである I g G、I g M、I g A、I g D、及び I g E がそれぞれ規定される。典型的に、抗体の抗原結合領域は、結合の特異性及び親和性において最も決定的なものであろう。いくつかの実施形態において、抗体又は抗体の断片は、異なる生物、例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ラクダなどに由来するものであってもよい。本発明の抗体としては、1つ又は複数のアミノ酸位置で修飾又は変異導入されており、抗体の所望の機能（例えば、グリコシル化、発現、抗原認識、エフェクター機能、抗原結合、特異性など）を改善又は調節する抗体を挙げることができる。

【0073】

例示的な免疫グロブリン（抗体）の構造単位は、四量体を含む。各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖対から構成され、各対は、1つの「軽」鎖（約25 kD）と1つの「重」鎖（約50～70 kD）とを有する。各鎖のN末端は、抗原認識に主に関与している約100から110個以上のアミノ酸から成る可変領域を規定する。用語「可変軽鎖（V_L）」及び「可変重鎖（V_H）」は、それぞれ、このような軽鎖及び重鎖を指す。

【0074】

抗体は、例えば、完全型免疫グロブリン、又は、多様なペプチダーゼでの消化により産生されるいくつかのよく特徴付けられた断片として存在する。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合下の抗体を消化して、F（a b）'₂、すなわち、それ自体がジスルフィド結合によりV_H-C_H1と接合されている軽鎖であるF a bの二量体を産生する。F（a b）'₂を穏やかな条件下で還元して、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合を破壊し、それにより、F（a b）'₂二量体をF a b'単量体に変換させてもよい。F a b'単量体は、本質的には、ヒンジ領域の一部を有するF a bである[Fundamental Immunology（Paul編、第3版、1993）を参照のこと]。多様な抗体断片は、完全型抗体の消化に関連して定義されるが、当業者には、そのような断片は、化学的に、又は、組換えDNAの方法論を用いて、そのいずれかにより新規に合成してもよいことは理解されよう。したがって、用語「抗体」には、本明細書において使用する場合、完全な状態の抗体の改変により産生された抗体断片、組換えDNAの方法論（例えば、単鎖Fv）を用いて新規に合成された抗体断片、ファージディスプレイライブラリーを用いて同定された抗体断片、そのいずれも含まれる（例えば、McCaffertyら、Nature、348、552～554ページ、（1990）を参照のこと）。

【0075】

非ヒト抗体をヒト化又は霊長類化する（primatizing）ための方法は、当技術分野において周知である（例えば、米国特許第4,816,567号、同第5,530,101号、同第5,859,205号、同第5,585,089号、同第5,693,761号、同第5,693,762号、同第5,777,085号、同第6,180,370号、同第6,210,671号、及び同第6,329,511号；WO87/02671；欧州特許出願0173494；Jonesら、（1986）、Nature、321、522ページ；及びVerhoyenら、（1988）、Science、239、1534ページ）。ヒト化抗体は、例えば、Winter及びMilstein、（19

10

20

30

40

50

91)、Nature、349、293ページにさらに記載されている。一般に、ヒト抗体は、非ヒトである供給源から導入された1つ又は複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、移入残基(import residue)と呼ばれることが多く、典型的に、移入された可変ドメインから取り出される。ヒト化は、本質的には、Winterらの方法(例えば、Morrisonら、PNAS USA、81、6851~6855ページ、(1984); Jonesら、Nature、321、522~525ページ、(1986); Riechmannら、Nature、332、323~327ページ、(1988); Morrison及びOi、Adv. Immunol.、44、65~92ページ、(1988); Verhoeyenら、Science、239、1534~1536ページ、(1988); 及びPresta、Curr. Op. Struct. Biol.、2、593~596ページ、(1992); Padlan、Molec. Immun.、28、489~498ページ、(1991); Padlan、Molec. Immun.、31(3)、169~217ページ、(1994)を参照のこと)に従って、齧歯動物のCDR又はCDR配列を、ヒト抗体の対応する配列と置換することにより実施することができる。したがって、そのようなヒト化抗体は、キメラ抗体であり(米国特許第4,816,567号)、実質的に比較的少ない完全型のヒト可変ドメインが、非ヒト種由来の対応する配列で置換されている。実際、ヒト化抗体は、典型的に、いくつかのCDR残基及び場合によってはいくつかのFR残基が、齧歯動物抗体中の類似部位由来の残基で置換されているヒト抗体である。例えば、ヒト化免疫グロブリンのフレームワーク領域をコードする第1の配列と、所望の免疫グロブリンの相補性決定領域をコードする第2の配列セットとを含むポリヌクレオチドは、合成により、又は、適切なcDNAとゲノムDNAのセグメントとを組み合わせることにより、作製することができる。ヒト定常領域のDNA配列は、様々なヒト細胞から、周知の手順によって単離できる。

【0076】

「キメラ抗体」は、(a)定常領域若しくはその一部が、変性、置換え、若しくは交換されており、そのため、抗原結合部位(可変領域)が、異なる若しくは改変されているクラス、エフェクター機能、及び／又は種の定常領域と連結する、又は、そのキメラ抗体に新しい特性を授けるまったく異なる分子、例えば、酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬物などと連結する;或いは(b)可変領域若しくはその一部が、異なる若しくは変性されている抗原特異性を有する可変領域で変性、置換え、若しくは交換されている、抗体分子である。本発明の好ましい抗体、及び、本発明による使用のための好ましい抗体としては、ヒト化されている及び／又はキメラのモノクローナル抗体が挙げられる。

【0077】

一実施形態において、抗体は、「エフェクター」部分とコンジュゲートされている。エフェクター部分は、任意の数の分子(放射性標識若しくは蛍光標識などの標識化部分を含む)であってもよく、又は、治療的な部分であってもよい。一態様において、抗体は、タンパク質の活性を調節する。そのようなエフェクター部分としては、抗腫瘍薬、毒素、放射性の薬剤、サイトカイン、二次抗体、又は酵素が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、プロドラッグを細胞傷害性の薬剤に変換させる酵素と連結される。

【0078】

免疫複合体は、エフェクター部分を標的分子又は標的分子陽性細胞(target molecule positive cell)に標的化するために使用できる。そのような相違は、試験試料及び対照試料がほぼ同様に担持されているゲルのバンドを見れば容易に明らかにできる。細胞傷害性の薬剤(例えば、毒素)の例としては、リシン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、臭化エチジウム、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラセンジオン、アクチノマイシンD、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素(PE)A、PE40、アブリン、及びグルココルチコイド、及び他の化学療法薬、並びに放射性同位体が挙げられるが、これらに限定されない。適当な検出可能なマーカーとしては、放射性同

位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤、又は酵素が挙げられるが、これらに限定されない。

【0079】

治療剤を抗体とコンジュゲートするための手法は、周知である（例えば、Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、収録先：Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら（編）、243～56ページ（Alan R. Liss, Inc.、1985）；Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、収録先：Controlled Drug Delivery（第2版）、Robinsonら（編）、623～53ページ（Marcel Dekker, Inc.、1987）；Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、収録先：Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications、Pincheraら（編）、475～506ページ、（1985）；及びThorpeら、「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev.、62、119～58ページ、（1982）を参照のこと）。

【0080】

抗体と「特異的に（若しくは選択的に）結合する」、又は「～と特異的に（若しくは選択的に）免疫反応性の」という語句は、タンパク質又はペプチドに言及する場合、多くの場合はタンパク質及び他の生物学的薬剤の不均一集団における、タンパク質の有無を決定する結合反応を指す。したがって、指定されたイムノアッセイの条件下では、特定された抗体は、特定のタンパク質と、バックグラウンドの少なくとも2倍、より典型的にはバックグラウンドの10から100倍を超えて、結合する。そのような条件下での抗体との特異的結合は、特定のタンパク質に対する特異性を有することで選択される抗体を必要とする。例えば、選択された抗原と特異的に免疫反応性であり他のタンパク質とは免疫反応性ではないポリクローナル抗体のみが得られるように、ポリクローナル抗体を選択できる。この選択は、他の分子と交差反応する抗体を除外することにより達成してもよい。特定のタンパク質と特異的に免疫反応性である抗体を選択するには、様々なイムノアッセイフォーマットを使用し得る。例えば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質と特異的に免疫反応性である抗体を選択するために常法に従って使用される（例えば、特定の免疫反応性を決定するために使用できるイムノアッセイのフォーマット及び条件の説明については、Harlow & Lane、Using Antibodies, A Laboratory Manual、（1998）を参照のこと）。

【0081】

タンパク質レベルは、当該タンパク質、天然のリガンド、小分子、アプタマーなどに特異的な抗体又は抗体断片を使用して検出することができる。

【0082】

抗体ベースの手法は、当技術分野において公知であり、例えば、Harlow & Lane、（1988）、Antibodies: A Laboratory Manual；及び、Harlow、（1998）、Using Antibodies: A Laboratory Manual；Wild、The Immunoassay Handbook、第3版、（2005）；及び、Law、Immunoassay: A Practical Guide、（1996）に記載されている。アッセイは、分子標的（例えば、タンパク質若しくは抗原）、又は、細胞、組織、生体試料、液体試料、又は、抗体若しくは抗体標的を有していると思われる表面の検出を目的に行うことができる。

【0083】

イムノアッセイの非網羅的なリストとしては以下が挙げられる：競合的及び非競合的な

フォーマット、酵素結合免疫吸着法（ELISA、enzyme linked immunosorption assay）、マイクロスポットアッセイ、ウェスタンブロット、ゲルろ過及びクロマトグラフィー、免疫クロマトグラフィー、免疫組織化学、フローサイトメトリー又は蛍光活性化細胞選別法（FACS）、マイクロアレイ、他。そのような手法は、例えば画像診断のために、in situ、ex vivo、in vitro、又はin vivoでも使用できる。

【0084】

本明細書において使用する場合、用語「タンパク質ークラウダー配合液」は、複数のタンパク質と複数のクラウダーとを含む液体混合物を指す。いくつかの実施形態において、タンパク質ークラウダー配合液は、タンパク質ナノクラスター分散系である。いくつかの実施形態において、タンパク質ークラウダー配合液は、複数のタンパク質と複数のクラウダーとを含むナノクラスター分散系である。いくつかの実施形態において、タンパク質ークラウダー配合液は、複数のタンパク質を含むナノクラスターの懸濁液である。いくつかの実施形態において、タンパク質ークラウダー配合液は、複数のタンパク質と複数のクラウダーとを含む溶液である。

【0085】

本明細書において使用する場合、用語「タンパク質ークラウダー混合物」は、タンパク質とクラウダーとの混合物を指し、場合により、追加的な成分又は化合物を含んでもよい。いくつかの実施形態において、「タンパク質ークラウダー混合物」は、「タンパク質ークラウダー配合液」である。

【0086】

本明細書において使用する場合、用語「分散液」は、分散系の連続的な液体混合物を指す。いくつかの実施形態において、分散液は、タンパク質ナノクラスターが分散されている液体の溶液である。いくつかの実施形態において、分散液は、タンパク質ナノクラスターが分散されている非水性液である。いくつかの実施形態において、分散液は、タンパク質ナノクラスターが分散されている水性液である。

【0087】

本明細書において使用する場合、用語「極低温剤（cryogenic agent）」は、温度が摂氏−150度未満である組成物を指す。いくつかの実施形態において、極低温剤は、液体窒素である。いくつかの実施形態において、極低温剤は、液体ヘリウムである。

【0088】

本明細書において使用する場合、用語「遠心ろ過」は、混合物の1つ又は複数の（但し、すべてではない）成分を、フィルターを通して流すことにより、混合物中の成分をろ過又は分離するプロセスを指し、このプロセスにおいては、成分は、遠心力によりフィルターを通り抜ける。いくつかの実施形態において、混合物及びフィルターは、遠心分離機中で回される。いくつかの実施形態において、ろ過は、Amicon、Microcon、又はCentriconの器具（Milliporeから入手可能）を用いて実施される。

【0089】

本明細書において使用する場合、用語「接線ろ過（tangential flow filtration）」は、フィルターを通過する前の液体混合物の動きの大半が、フィルターの表面に対して接線方向である、ろ過の方法を指す。用語「交差ろ過（filtration）」は、「接線ろ過」と互換的に使用してもよい。

【0090】

本明細書において使用する場合、用語「タンパク質溶液」は、液体媒体（例えば、水、バッファー）中の複数のタンパク質の混合物を指し、この場合のタンパク質は、平均直径が20から1000nmのナノクラスターを形成しない。いくつかの実施形態において、タンパク質溶液は、液体中で混合されるタンパク質の解離定数（dissociate constant）及びタンパク質の濃度に適した四次状態（quaternary s

t a t e) を有するタンパク質を含んでおり、10個以上のタンパク質から成るクラスターを形成しない。いくつかの実施形態において、タンパク質分散系は、タンパク質溶液中にタンパク質ナノクラスター分散系を含んでもよい。

【0091】

本明細書において使用する場合、用語「薄膜凍結 (thin film freezing)」は、冷却された固体表面上で液体を凍結することを含む方法であって、液体が、表面上に、厚さが500マイクロメートル未満で表面積対体積比が25から500 cm⁻¹の間の薄いフィルムを形成する方法を指す。いくつかの実施形態において、液体の温度と表面の温度とは摂氏約30度以上異なる。液体は、冷却された固体表面に小滴として送達してもよい。いくつかの実施形態において、この小滴は、冷却された固体表面への接触の50ミリ秒以内、75ミリ秒以内、100ミリ秒以内、125ミリ秒以内、150ミリ秒以内、175ミリ秒以内、200ミリ秒以内、250ミリ秒以内、500ミリ秒以内、1,000ミリ秒以内、又は2,000ミリ秒以内に凍結する。いくつかの実施形態において、小滴の平均直径は、室温で0.1 mmから5 mmであってもよい。いくつかの実施形態において、小滴の冷却速度は、50から250 K/秒の間であろう。冷却された固体表面は、バイアル、ベルト、プラテン、皿、ローラー、大皿、又はコンベアーの表面の内部表面であってもよい。

10

【0092】

本出願を通じて、当該の代用可能なものはマーカッシュ群の形式で書かれている（例えば、2つ以上のアミノ酸を含有する可能性のある各アミノ酸位置）ことに注意すべきである。マーカッシュ群の各構成要素は、別々に考慮されるべきであり、それにより別の実施形態を含むこと、及び、マーカッシュ群は単一の単位として読まれるべきではないことは、特に企図される。

20

【0093】

II. 組成物

第1の態様において、透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系が提供される。該分散系は、複数のナノクラスターを含む。該複数のナノクラスターのそれぞれは複数のタンパク質を含み、該複数のタンパク質のそれぞれは、アミノ酸配列同一性を共有する。

【0094】

いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、完全なアミノ酸配列同一性を共有する。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、実質的に同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約75%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約80%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約85%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約90%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約95%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約96%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約75%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約97%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約98%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約99%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約99.5%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約99.6%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約99.7%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約99.8%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、約99.9%同一である。いくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、転写又は翻訳における誤りに起因する配列のずれを除いて同一である。いくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターは、異なるアミノ酸配列を有するタンパク質の混合物を含む。

30

40

【0095】

本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターのそれぞれの平均直

50

径は、約20から約1,000ナノメートルの間である。本分散系のいくつかの実施形態において、該平均直径は、水力学的直径の平均値である。本分散系のいくつかの実施形態において、該平均直径は、該複数のナノクラスターの最長寸法の平均値である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスター中の複数のタンパク質の5%未満は、不可逆的に凝集している。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスター中の複数のタンパク質の2%未満は、不可逆的に凝集している。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスター中の複数のタンパク質の1%未満は、不可逆的に凝集している。

【0096】

いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、約1センチポアズから約1000センチポアズの間（例えば、1センチポアズから1000センチポアズの間）である。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、約1センチポアズから約500センチポアズの間（例えば、1センチポアズから500センチポアズの間）である。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、約1センチポアズから約250センチポアズの間（例えば、1センチポアズから250センチポアズの間）である。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、約1センチポアズから約100センチポアズの間である。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、約1センチポアズから約90センチポアズの間（例えば、1センチポアズから90センチポアズの間）である。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、約1センチポアズから約80センチポアズの間（例えば、1センチポアズから80センチポアズの間）である。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、約1センチポアズから約70センチポアズの間（例えば、1センチポアズから70センチポアズの間）である。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、約1センチポアズから約60センチポアズの間（例えば、1センチポアズから60センチポアズの間）である。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、約1センチポアズから約50センチポアズの間（例えば、1センチポアズから50センチポアズの間）である。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、約1センチポアズから約40センチポアズの間（例えば、1センチポアズから40センチポアズの間）である。いくつかの実施形態において、粘度（例えば、分散系の粘度）は、注射器装填法により測定される。いくつかの実施形態において、粘度（例えば、分散系の粘度）は、粘度計（例えば、Stormer粘度計、震動式粘度計（vibrating viscometer）、回転式粘度計、Marshファンネル粘度計、U字管粘度計、落球粘度計、落下式ピストン粘度計（falling piston viscometer）、振動式ピストン粘度計（oscillating piston viscometer）、Stabinger粘度計、泡粘度計、又はCannon-Fenske粘度計）を用いて測定される。いくつかの実施形態において、粘度（例えば、分散系の粘度）は、レオメーターを用いて測定される。いくつかの実施形態において、粘度（例えば、分散系の粘度）は、ザーンカップを用いて測定される。いくつかの実施形態において、粘度（例えば、分散系の粘度）は、フォード粘度カップを用いて測定される。いくつかの実施形態において、粘度（例えば、分散系の粘度）は、注射器（例えば、サイズが21ゲージから27ゲージの間の針、又は25ゲージ針、又は1.5インチの長さの針、又は25ゲージで1.5インチの長さの針が装着されている注射器）を用いて測定される。いくつかの実施形態において、粘度（例えば、分散系の粘度）は、可塑性計を用いて測定される。いくつかの実施形態において、分散系の粘度は約50センチポアズであり、分散系のせん断速度は約1000秒⁻¹である（例えば、50センチポアズ及び1000秒⁻¹）。いくつかの実施形態において、分散系の粘度は、約25センチポアズから約75センチポアズの間であり、分散系のせん断速度は、約1000秒⁻¹である（例えば、25センチポアズから75センチポアズの間、及び、1000秒⁻¹）。いくつかの実施形態において、分散系の粘度は約10センチポアズから約90センチポアズの間であり、分散系のせん断速度は、約1000秒⁻¹である（例えば、10センチポアズから90センチポアズの間、及び、1000秒⁻¹）。いくつかの実施形態において、分散系の粘度は約50センチポアズであり、分散系のせん断速度は約

10

20

30

40

50

100 秒⁻¹から約50000 秒⁻¹の間である（例えば、50センチポアズ、及び、100 秒⁻¹から50000 秒⁻¹の間）。いくつかの実施形態において、分散系の粘度は約25センチポアズから75センチポアズの間であり、分散系のせん断速度は約100 秒⁻¹から約50000 秒⁻¹の間である（例えば、25センチポアズから75センチポアズの間、及び、100 秒⁻¹から50000 秒⁻¹の間）。いくつかの実施形態において、分散系の粘度は約25センチポアズから75センチポアズの間であり、分散系のせん断速度は約1000 秒⁻¹から約10000 秒⁻¹の間である（例えば、25センチポアズから75センチポアズの間、及び、1000 秒⁻¹から10000 秒⁻¹の間）。いくつかの実施形態において、本分散系は注射可能であるが、同一濃度の該複数のタンパク質の水溶液は注射可能ではない。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、同一濃度の該複数のタンパク質の水溶液の粘度の約2分の1（例えば、1.6分の1、1.7分の1、1.8分の1、1.9分の1、2分の1、2.1分の1、2.2分の1、2.3分の1、2.4分の1）である。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、同一濃度の該複数のタンパク質の水溶液の粘度の約5分の1（例えば、4.6分の1、4.7分の1、4.8分の1、4.9分の1、5分の1、5.1分の1、5.2分の1、5.3分の1、5.4分の1）である。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、同一濃度の該複数のタンパク質の水溶液の粘度の約10分の1（例えば、9.6分の1、9.7分の1、9.8分の1、9.9分の1、10分の1、10.1分の1、10.2分の1、10.3分の1、10.4分の1）である。

10

【0097】

20

いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、直後に掲げる表／マトリックス中の、1から240の番号を有するセルの任意の1つに対応する約2つの粘度の値（すなわち、列の粘度1つと行の粘度1つ）の間であり、その間には、2つの粘度の値のうちいずれかが含まれる：

【0098】

【表 2】

粘度(cP)/粘度(cP)	90	80	70	60	50	40	30	20	10	1
100	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
95	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
90	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
85	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
80	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
75	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
70	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
65	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
60	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
55	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
50	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
45	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
40	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
35	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
30	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
25	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
20	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
15	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
10	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
9	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
8	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
7	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
6	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
5	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240

いくつかの実施形態において、本分散系は、約 200 mg/mL から約 600 mg/mL の間のタンパク質（例えば、200 mg/mL から 600 mg/mL の間）を含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、約 200 mg/mL から約 400 mg/mL の間のタンパク質（例えば、200 mg/mL から 400 mg/mL の間）を含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、約 200 mg/mL から約 300 mg/mL の間のタンパク質（例えば、200 mg/mL から 300 mg/mL の間）を含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、約 200 mg/mL から約 250 mg/mL の間のタンパク質（例えば、200 mg/mL から 250 mg/mL の間）を含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、約 200 mg/mL 超のタンパク質（例えば、200 mg/mL 超）を含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、約 300 mg/mL 超のタンパク質（例えば、300 mg/mL 超）を含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、約 400 mg/mL 超のタンパク質（例えば、400 mg/mL 超）を含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、約 500 mg/mL 超のタンパク質（例えば、500 mg/mL 超）を含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、約 600 mg/mL 超のタンパク質（例えば、600 mg/mL 超）を含む。

10

【0100】

いくつかの実施形態において、本分散系は、光減衰量測定値が約 0.05 cm⁻¹ 未満、約 0.1 cm⁻¹ 未満、約 0.25 cm⁻¹ 未満、又は約 0.5 cm⁻¹ 未満であり、該光減衰量測定値が、波長 400 nm から 700 nm の間での平均の光減衰量（例えば、0.05 cm⁻¹ 未満、0.1 cm⁻¹ 未満、0.25 cm⁻¹ 未満、又は 0.5 cm⁻¹ 未満）を含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、光減衰量測定値が約 0.05 cm⁻¹ 未満、約 0.1 cm⁻¹ 未満、約 0.25 cm⁻¹ 未満、又は約 0.5 cm⁻¹ 未満であり、該光減衰量測定値が、波長 600 nm で得られるもの（例えば、0.05 cm⁻¹ 未満、0.1 cm⁻¹ 未満、0.25 cm⁻¹ 未満、又は 0.5 cm⁻¹ 未満）である。いくつかの実施形態において、本分散系は、光減衰量測定値が約 0.05 cm⁻¹ 未満、約 0.1 cm⁻¹ 未満、約 0.25 cm⁻¹ 未満、又は約 0.5 cm⁻¹ 未満であり、該光減衰量測定値が、波長 400 nm から 700 nm の間（例えば、0.05 cm⁻¹ 未満、0.1 cm⁻¹ 未満、0.25 cm⁻¹ 未満、又は 0.5 cm⁻¹ 未満であり、波長 400 nm、450 nm、500 nm、550 nm、600 nm、650 nm、若しくは 700 nm、又は任意の他の介在する波長）で得られるものである。

20

30

【0101】

本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの平均直径は、約 20 ナノメートルから約 800 ナノメートルの間（例えば、20 ナノメートルから 800 ナノメートルの間）である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの平均直径は、約 20 ナノメートルから約 600 ナノメートルの間（例えば、20 ナノメートルから 600 ナノメートルの間）である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの平均直径は、約 20 ナノメートルから約 400 ナノメートルの間（例えば、20 ナノメートルから 400 ナノメートルの間）である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの平均直径は、約 20 ナノメートルから約 200 ナノメートルの間（例えば、20 ナノメートルから 200 ナノメートルの間）である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの平均直径は、約 20 ナノメートルから約 100 ナノメートルの間（例えば、20 ナノメートルから 100 ナノメートルの間）である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの平均直径は、約 20 ナノメートルから約 75 ナノメートルの間（例えば、20 ナノメートルから 75 ナノメートルの間）である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの平均直径は、約 20 ナノメートルから約 50 ナノメートルの間（例えば、20 ナノメートルから 50 ナノメートルの間）である。

40

【0102】

本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの充填率の平均値は、約 30 % から約 80 % の間（例えば、30 % から 80 % の間）である。本分散系のいく

50

つかの実施形態において、該複数のナノクラスターの充填率の平均値は、約30%から約70%の間（例えば、30%から70%の間）である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの充填率の平均値は、約30%から約60%の間（例えば、30%から60%の間）である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの充填率の平均値は、約30%から約50%の間（例えば、30%から50%の間）である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの充填率の平均値は、約50%から約60%の間（例えば、50%から60%の間）である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの充填率の平均値は、約60%から約74%の間（例えば、60%から74%の間）である。

【0103】

いくつかの実施形態において、本分散系は、クラウダーを含む。いくつかの実施形態において、クラウダーは単糖である。いくつかの実施形態において、クラウダーは、グルコース、マンノース、フルクトース、アラビノース、キシロース、リボース、及びガラクトースから選択される単糖である。いくつかの実施形態において、クラウダーは二糖である。いくつかの実施形態において、クラウダーは、トレハロース、ラクツロース、ラクトース、セロビオース、マルトース、又はスクロースから選択される二糖である。いくつかの実施形態において、クラウダーは多糖である。いくつかの実施形態において、クラウダーは多価電解質である。いくつかの実施形態において、クラウダーはポリ酸である。いくつかの実施形態において、クラウダーはポリ（エチレングリコール）である。いくつかの実施形態において、クラウダーは、PEG 200からPEG 5000の間の分子量を有するポリ（エチレングリコール）である。いくつかの実施形態において、クラウダーは塩である。いくつかの実施形態において、クラウダーはデキストランである。いくつかの実施形態において、クラウダーはポラキサマーである。いくつかの実施形態において、クラウダーはアルコールである。いくつかの実施形態において、クラウダーはアミノ酸又はタンパク質である。いくつかの実施形態において、クラウダーは、ジペプチド、トリペプチド、4個のアミノ酸から成るペプチド、5個のアミノ酸から成るペプチド、又はオリゴペプチドである。いくつかの実施形態において、クラウダーは、コンジュゲートタンパク質である。いくつかの実施形態において、クラウダーは、非コンジュゲートタンパク質である。いくつかの実施形態において、クラウダーは、非タンパク質クラウダーである。いくつかの実施形態において、クラウダーは界面活性剤である。いくつかの実施形態において、本分散系は、トレハロース、ポリ（エチレングリコール）、エタノール、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、バッファー、又はそれらの組合せから成る群から選択されるクラウダーを含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、タンパク質対クラウダーを約1：1の重量比（例えば、1：1の重量比）で含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、タンパク質対クラウダーを約2：1の重量比（例えば、2：1の重量比）で含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、タンパク質対クラウダーを約3：1の重量比（例えば、3：1の重量比）で含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、タンパク質対クラウダーを約4：1の重量比（例えば、4：1の重量比）で含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、タンパク質対クラウダーを約5：1の重量比（例えば、5：1の重量比）で含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、タンパク質対クラウダーを約6：1の重量比（例えば、6：1の重量比）で含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、タンパク質対クラウダーを約10：1の重量比（例えば、10：1の重量比）で含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、タンパク質対クラウダーを約1：2の重量比（例えば、1：2の重量比）で含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、タンパク質対クラウダーを約1：3の重量比（例えば、1：3の重量比）で含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、タンパク質対クラウダーを約1：4の重量比（例えば、1：4の重量比）で含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、タンパク質対クラウダーを約1：5の重量比（例えば、1：5の重量比）で含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、タンパク質対クラウダーを約1：10の重量比（例えば、1：10の重量比）で含む。

10

20

30

40

50

【0104】

本分散系のいくつかの実施形態において、分散系のpHは、該複数のタンパク質のほぼ等電点の値である（例えば、等電点の値である）。本分散系のいくつかの実施形態において、分散系のpHは、該複数のタンパク質の等電点とは異なる、約2.5未満、約2.0未満、約1.5未満、約1.0未満、約0.8未満、約0.75未満、約0.5未満、約0.3未満、約0.2未満、約0.1未満、又は約0.05未満のpH単位（例えば、2.5未満、2.4未満、2.3未満、2.2未満、2.1未満、2.0未満、1.9未満、1.8未満、1.7未満、1.6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、0.95未満、0.9未満、0.85未満、0.8未満、0.75未満、0.7未満、0.65未満、0.6未満、0.55未満、0.5未満、0.45未満、0.4未満、0.35未満、0.3未満、0.25未満、0.2未満、0.15未満、0.1未満、0.09未満、0.08未満、0.07未満、0.06未満、0.05未満、0.04未満、0.03未満、0.02未満、又は0.01未満のpH単位）である。いくつかの実施形態において、分散系のpHは、約4、約4.5、約5、約5.5、約6、約6.5、約7、約7.5、約8、約8.5、約9、又は約9.5である。いくつかの実施形態において、本分散系は、ヒト血液に対して等張である。いくつかの実施形態において、本分散系は、ヒト血液に対して低張である。いくつかの実施形態において、本分散系の容量オスモル濃度は、約300mOsmol/L（例えば、300mOsmol/L）である。いくつかの実施形態において、本分散系の容量オスモル濃度は、約250mOsmol/Lから約350mOsmol/L（例えば、250mOsmol/Lから350mOsmol/L）の間である。いくつかの実施形態において、本分散系の容量オスモル濃度は、約150mOsmol/Lから約450mOsmol/L（例えば、150mOsmol/Lから450mOsmol/L）の間である。いくつかの実施形態において、本分散系の容量オスモル濃度は、約150mOsmol/Lから約600mOsmol/Lの間（例えば、150mOsmol/Lから600mOsmol/Lの間）である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のタンパク質のそれぞれは、抗体、抗体断片、ペグ化タンパク質、脂質付加タンパク質、成長因子若しくは成長因子拮抗薬、サイトカイン若しくはサイトカイン拮抗薬、受容体若しくは受容体拮抗薬、抗原、ワクチン、又は抗炎症剤である。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は複数のコンジュゲートであり、該コンジュゲートのそれぞれは、低分子量化合物と結合しているタンパク質であり、該低分子量化合物は、診断剤、医薬剤、造影剤、発蛍光団、放射性同位体、毒素、常磁性剤、又はアプタマーである。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は、自己群集している。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のタンパク質は複数のコンジュゲートではなく、該タンパク質のそれぞれはアミノ酸から成る（すなわち、非コンジュゲートタンパク質）。

【0105】

いくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターは、多数の異なるタンパク質種を含む。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターは第1の複数のナノクラスターであり、該複数のタンパク質は第1の複数のタンパク質であり、本分散系は第2の複数のナノクラスターをさらに含み、該第2の複数のナノクラスターのそれぞれは第2の複数のタンパク質を含み、該第2の複数のタンパク質のそれぞれはアミノ酸配列同一性を共有し、該第2の複数のタンパク質は該第1の複数のタンパク質とは異なる。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターは、制御放出ポリマーをさらに含む。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターは、制御放出成分をさらに含む。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターのそれぞれは、低分子量化合物をさらに含み、該低分子量化合物は、診断剤、医薬剤、造影剤、発蛍光団、放射性同位体、毒素、常磁性剤、金属、金属酸化物、又はアプタマーである。本分散系のいくつかの実施形態において、該分散系は、複数のナノ粒子をさらに含む。本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノ粒子は、Au、磁性剤（magnetic agent）、光学剤（optical agent）、診断剤、医

薬剤、造影剤、発蛍光団、放射性同位体、毒素、常磁性剤、金属、金属酸化物、又はアプタマーから選択される複数の化合物を含む。

【0106】

第2の態様において、本明細書（実施形態を含む）に記載の分散系のいずれかを含む医薬組成物であって、該複数のタンパク質が、複数の薬学的に活性なタンパク質である医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態において、本医薬組成物は、21から27ゲージの針に取り付けられている注射器内に入っている。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、浸透圧ポンプ内に入っている。いくつかの実施形態において、本医薬組成物は、制御放出成分、リポソーム、又は微小球内に入っている。

【0107】

第3の態様において、本明細書（実施形態を含む）に記載の分散系又は医薬組成物を備えるキットが提供される。いくつかの実施形態において、本キットは、キットに備えられている分散系又は医薬組成物を使用するための取扱説明書を備える。いくつかの実施形態において、本キットは、本明細書（実施形態を含む）に記載の分散系又は医薬組成物を含有する容器を備える。

【0108】

さらなる一態様において、粉末形態のタンパク質又は粉末形態のタンパク質ークラウダー混合物と分散液とを備えるキットが提供される。いくつかの実施形態において、本キットは、本明細書（実施形態を含む）に記載の分散系又は医薬組成物を作製する方法において使用してもよい。いくつかの実施形態において、本キットは、本明細書（実施形態を含む）に記載の分散系を作製するための取扱説明書を備える。いくつかの実施形態において、本キットは、粉末形態のタンパク質と分散液とを備える。いくつかの実施形態において、本キットは、粉末形態のタンパク質ークラウダー混合物と分散液とを備える。いくつかの実施形態において、本キットは、注射器及び針を備える。いくつかの実施形態において、本キットは、粉末形態のタンパク質又は粉末形態のタンパク質ークラウダー混合物を分散液と混合するための取扱説明書を備える。いくつかの実施形態において、本キットは、粉末形態のタンパク質又は粉末形態のタンパク質ークラウダー混合物を分散液と混合して、その結果得られる分散系を自己投与するための取扱説明書を備える。

【0109】

本発明は、サブミクロンの抗体粒子分散系を含む新規の組成物、及びその作製方法を開示する。本明細書に記載の組成物は、実質的に透明であり、高度に濃縮された抗体（約200mg/ml）の皮下注射を可能にする。モノクローナル抗体（例えば、1B7）の溶液を、新規の渦巻き式その場凍結技術法（spiral wound in situ freezing technology technique、SWIFT）を用いて、速やかに凍結し、凍結乾燥して、非晶質粒子を発生させた。穏やかに攪拌すると、1つ又は複数の薬学的に許容される群集化剤（crowding agent）、トレハロース、ポリエチレングリコール、及びn-メチル-2-ピロリドン（NMP）を含有するバッファー中で、透明なタンパク質分散系が速やかに形成された。抗体の等電点に近い製剤は1分子当たりの帯電を最小化させることから、引力は、大きい粒子、具体的には、タンパク質分子で構成されるクラスター（直径約200nm）で見かけの粘性が低い（約24cp）ものを形成するだけ十分であった。

【0110】

いくつかの実施形態において、各粒子内では抗体の三次構造に検出可能な変化はないが、その理由は、タンパク質の本来の状態がタンパク質の自己群集化により安定化されており、アンフォールディングによる凝集が限定されるからである。いくつかの実施形態において、本分散系をin vitroで希釈すると、動的光散乱法及びELISAによりモニタリングした場合、粒子は、完全な活性を有するモノマータンパク質に戻る。いくつかの実施形態において、静脈内用の溶液として、皮下用の溶液として、又は皮下用の分散系として、類似の用量（4.6～7.3mg/kg）でマウスに投与すると、分布及び排泄動態は類似したものとなった。いくつかの実施形態において、分散系製剤は超高用量での

10

20

30

40

50

投与を可能にした（ 51.6 mg/kg ）が、この製剤は、類似した薬物動態プロファイルも呈した。さらに、*in vitro*での結合及び細胞中和アッセイによる消失相の血清試料の分析から、皮下の分散系として送達された抗体は、14日間の試験期間にわたり完全な活性を保持することが示される。

【0111】

本明細書に記載の、高濃度、低粘性の、サブミクロンの抗体粒子分散系を発生させる方法は、容易に一般化可能であり、投与及び患者コンプライアンスの改善に繋がり、バイオテクノロジー産業に新しい機会をもたらす可能性があると考えられる。

【0112】

モノクローナル抗体は、大きな市場シェアを占め続けており、様々な治療適応のための臨床試験が行われているものが多数ある。これらのモノクローナル抗体は、治療薬として相当な関心を生んできたが、その理由は、モノクローナル抗体は、別個の抗原を特異的に標的とし、好ましい薬物動態学的プロファイル、産生プロファイル、及び安全性プロファイルを有するからである。現在、28種類のモノクローナル抗体が、多種多様な疾患の治療用としてFDA認可を受けており、年間の市場規模は200億ドルを超えている。多くの場合、治療有効性を得るために必要とされる用量は高用量であり、抗体の送達及び投与の選択肢は限られている。組換えDNA手法によって、溶解性、安定性、及び結合親和性など鍵となる生物物理学的特性の調整を可能にするタンパク質薬の開発（Maynard、Maassenら）において進歩が見られるにも関わらず、これらの巨大分子を所望の用量（体重 1 kg 当たり抗体 2 mg 超）で送達するための選択肢はほとんど開発されていない。典型的に、化学的及び物理的な不安定化、並びに、その結果としての、高濃度製剤に伴うタンパク質活性の低下を回避するために、大量の希薄なタンパク質溶液が静脈内に送達される。自己投与される皮下注射には、利便性及び患者コンプライアンスの向上、並びに疼痛及びコストの低下など、静脈内注入を上回るいくつかの主要な利点がある。しかし、必要とされる治療用量は、皮下注射の場合の最大体積を 1.5 ml と仮定した場合、 100 mg/ml を超えるタンパク質濃度となるであろう。

【0113】

このような高濃度での治療用タンパク質の製剤化は、本来は困難であり、新しい製品それぞれに合わせて作られた溶液を要する。多くの場合、高濃度での製剤化は、タンパク質溶解性の低さ、タンパク質の不安定性、及び、短距離引力によるタンパク質-タンパク質相互作用に起因する溶液粘性の高さから不可能である。このような相互作用としては、疎水性相互作用、水素結合、及び双極子の電荷の揺らぎが挙げられ、これらは最大約 1 nm の距離を超えて作用する。高タンパク質濃度（ 150 mg/ml 超）では、個々の抗体分子間の平均分離距離は、 10 nm 未満に減少する（Miller、2011）。したがって、2つのタンパク質分子が 1 nm 未満離れる確率は高く、タンパク質分子間の短距離引力相互作用の効果は著しいものとなる。このことは、タンパク質活性、薬物動態、及び免疫原性に有害作用を及ぼす可能性がある可逆的及び不可逆的な凝集体の濃度依存的な形成に繋がる。最も厄介なものは、本来の構造が改変され活性が低下しているモノマーから成っている不可逆的な凝集体、高分子量の凝集体であり、このような凝集体は、混濁した溶液又は沈殿を生じさせる可能性がある。このような凝集体の形成は、タンパク質にきわめて特有のものであり、露出された疎水性残基を有する部分的にアンフォールディングしたモノマーを介した物理学的な機序により、又は、システイン残基又はメチオニン残基上での反応性チオールにより媒介された分子間結合の形成を介した化学的な機序により、形成される可能性がある。

【0114】

低粘性の製剤におけるタンパク質の構造及び活性は、このような短距離の相互作用の効果をも最小化することにより、高タンパク質濃度で保存できる。例えば、タンパク質微小粒子を非水溶性の有機溶媒に懸濁させた濃縮懸濁液、及び、タンパク質結晶の水性懸濁液で低粘性のものが報告されている。これらの製剤は、タンパク質モノマーではなくミクロンサイズの（ $5 \sim 20 \mu \text{ m}$ ）タンパク質粒子を用い、それによりタンパク質粒子間の平均距

離を増加させて所与のタンパク質濃度とすることにより、首尾よく得られる。しかし、タンパク質を有機溶媒に溶解した製剤は、患者にやさしいものではない場合があり、その理由は、そのような製剤は、大口径の針を必要とし、余計な副作用（注射部位の発赤及び腫脹など）を招く可能性があるからである。加えて、高度に濃縮された水性の結晶インスリン懸濁液には臨床使用歴があるものの、免疫グロブリンなどの大きいタンパク質分子は、高分子量であること、表面にオリゴ糖があること、及びセグメントの柔軟性が高いことから、常法に従って結晶化させることが難しい。同様に、非水性又は水性の媒体を有するポリマー性マトリックス中にタンパク質が封入されている制御放出製剤も探索されている。これらの場合、粒子内のタンパク質の担持率が低い（約15～20質量%）ことから、多くの場合、粒子体積分率が高くても、送達可能な用量は低くなる。さらに、大半のポリマー性の送達系は、不妊、タンパク質の安定性、不完全なタンパク質放出、及び免疫原性の増加の面で難題を抱えている。

10

【0115】

本発明者らは、これまでに、非晶質のタンパク質ナノクラスターを有する濃縮分散系の形態において、低粘性を達成しつつ高濃度の条件でタンパク質活性を保存するための新規のアプローチを報告した（Miller、2011）。「クラウド」分子としてトレハロースを添加すると、大きな体積が占有され、短距離のタンパク質－タンパク質引力の相互作用が増加する（Miller、2011）。結果的に、タンパク質分子の大半は、濃縮されて、高密度に詰まった平衡ナノクラスターとなる（Miller、2011）。ナノクラスターの形成及び安定化の機序は、弱い静電反発力とのバランスが保たれた特定の短距離引力、ファンデルワールス引力、及び枯渇引力に関連して説明された。弱い静電反発力は、タンパク質がわずかに帯電しているにすぎないタンパク質等電点（pI）近くでの製剤化により得られた。同時に、ナノクラスターは凝集しなかったが、その理由は、ナノクラスターのサイズが大きいことから、ナノクラスター間の短距離引力相互作用の影響が低下するからである。さらに、数百から数千のわずかに帯電しているタンパク質モノマーの累積効果から、静電反発力が増加する（Miller、2011）。このような引力と反発力との相互作用が階層的に生じる結果、低粘性を有するコロイド状に安定なタンパク質ナノクラスター分散系が得られる。加えて、ナノクラスター内のタンパク質の体積分率の高さは、タンパク質溶液を用いた場合に可能な値よりはるかに高く、自己群集、エントロピーの安定化機序により、タンパク質の本来の構造を維持する（Shen、Chenら、2006）。今日まで、治療用タンパク質のナノクラスターの形成、及び、当該製剤の薬物動態については、単一の外因性（extrinsic）クラウド、すなわちトレハロースが報告されているのみである（Miller、2011）。

20

30

【0116】

本発明には、高度に濃縮された活性なモノクローナル抗体粒子の安定な分散系を創出するために使用し得る3つの群集化剤から成る多成分混合物についての記載が含まれているが、この多成分混合物は、マウスに皮下投与した際に高い活性及びバイオアベイラビリティを保持する。群集化剤の多成分混合物は、特定のタンパク質の具体的な生化学的特徴（高いタンパク質溶解性など）に応じて、製剤に柔軟性をもたらす。

【0117】

本発明は、サブミクロンの抗体粒子分散系を含む新規の組成物、及びその作製方法を開示する。本明細書に記載の組成物は、実質的に透明であり、高度に濃縮された抗体（約200mg/ml）の皮下注射を可能にする。モノクローナル抗体（例えば、1B7）の溶液を、新規の渦巻き式その場凍結技術法（SWIFT）を用いて、速やかに凍結し、凍結乾燥して、非晶質粒子を発生させた。穏やかに攪拌すると、1つ又は複数の薬学的に許容される群集化剤、トレハロース、ポリエチレングリコール、及びn-メチル-2-ピロリドン（NMP）を含有するバッファー中で、透明なタンパク質分散系が速やかに形成された。抗体の等電点に近い製剤は1分子当たりの帯電を最小化させることから、引力は、大きい粒子、具体的には、タンパク質分子で構成されるクラスター（直径約200nm）で見かけの粘性が低い（約24cP）ものを形成するだけ十分であった。

40

50

【0118】

本発明の新規の低粘性、高濃度のタンパク質分散系の例として、サブミクロンの抗体粒子製剤2種類を調製した：(i)従来のトレー凍結式の凍結乾燥により発生させた非晶質のタンパク質粒子を含むポリクロナルヒツジIgG分散系、及び(ii)新しい凍結方法、すなわち、渦巻き式その場凍結法(SWIFT)を介して発生させた非晶質のタンパク質粒子を含むネズミIgG2aモノクローナル抗体1B7。

【0119】

診断と療法との組合せ(セラノスティクス)

いくつかの実施形態において、本明細書(実施形態を含む)に記載の組成物(例えば、タンパク質分散系)は、医薬剤及び診断剤を含んでもよい。用語「セラノスティクス」は、治療剤と診断剤の両方を含む単一の組成物を記載するために一般的に使用される。治療とモニタリング又は診断との間の相乗作用は、治療をより有効に標的化するため、及び、適切な用量を選択するために有用であると考えられる。いくつかの実施形態において、本組成物は、高用量のタンパク質治療薬と、高量でありながら非毒性量の診断剤(例えば、画像化剤、造影剤)とを含んでもよい。画像化剤は、タンパク質と化学的に結び付いているもの(例えば、コンジュゲート)であってもよく、又は、タンパク質と共に分散していてもよい。いくつかの実施形態において、画像化剤は、それ自体がナノ粒子、例えば、光学的画像化のためのAu、又は、磁気画像化のための酸化鉄であってもよい。いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、ナノクラスター中のタンパク質と化学的に結び付いていてもよく、又は、ナノクラスターは、非コンジュゲートタンパク質及び診断剤、又は、診断剤を含むナノ粒子を含んでもよい。本明細書に記載の組成物のいくつかの実施形態において、分散系は、複数のタンパク質ナノクラスター及び複数の診断剤(例えば、Au、造影剤、常磁性剤、磁性剤、光学剤)ナノ粒子を含む。

【0120】

磁性を有するナノ粒子の使用に際しては、タンパク質の治療的機能性と共に、MRIなどの磁気画像化法を用いてもよい。光学的手法において有用なナノ粒子の使用に際しては、タンパク質の治療的機能性と共に、光音響画像化、蛍光画像化、又は光干渉断層撮影法などの方法を用いてもよい。本明細書に記載の組成物又は方法のいくつかの実施形態において、多数の機能性、例えば、光学的及び磁気画像化の機能性を組み合わせて、本タンパク質分散系から二機能性だけでなく多機能性の製剤を創出してもよい。

【0121】

本明細書に記載の組成物のいくつかの実施形態において、コンジュゲートタンパク質(すなわち、コンジュゲートされたタンパク質)分散系は、タンパク質で架橋されたアプタマー(例えば、前立腺癌のためのアプタマージェロニン治療薬(Chura(2006)))を含んでもよい。いくつかの実施形態において、アプタマーは、タンパク質(例えば、ジェロニン)が重大な毒性を有していても、標的化能力(例えば、前立腺特異性の膜抗原と結合すること)を示す。本明細書に記載の組成物のいくつかの実施形態において、化学療法薬とコンジュゲートされたmAb(モノクローナル抗体)(例えば、Hamblettr(2004)とKropら(2010)の両方に記載されているもの)は、多様な癌の治療に使用できる。コンジュゲートのいくつかの実施形態において、mAbは、腫瘍細胞の表面上に唯一、又は過剰に、そのいずれかの形態で発現されるタンパク質のための標的化剤であり、コンジュゲートされた細胞傷害性の薬剤として用いられる。アブラキサンは、臨床用の非経口ナノ粒子癌療法薬であり、このような療法薬では、パクリタキセルを血清アルブミンと複合体化させ、それによりアルブミンがアブラキサンの送達を助ける。

【0122】

本明細書(実施形態を含む)に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、該分散系が凍結、貯蔵、及び解凍されている場合、複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じである(例えば、同じである)。凍結、貯蔵、及び解凍されている本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの解凍後の平均直径は、該複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約1

%以内（例えば、1%以内）である。凍結、貯蔵、及び解凍されている本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの解凍後の平均直径は、該複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約5%以内（例えば、5%以内）である。凍結、貯蔵、及び解凍されている本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの解凍後の平均直径は、該複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約10%以内（例えば、10%以内）である。本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、該分散系が凍結及び解凍されている場合、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じである（例えば、同じである）。凍結及び解凍されている本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの解凍後の平均直径は、該複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約1%以内（例えば、1%以内）である。凍結及び解凍されている本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの解凍後の平均直径は、該複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約5%以内（例えば、5%以内）である。凍結及び解凍されている本分散系のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの解凍後の平均直径は、該複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約10%以内（例えば、10%以内）である。本明細書において使用する場合、用語「～を貯蔵する」又は「～を貯蔵すること」は、凍結された分散系に適用される場合、分散系を凍結状態で維持することを指す。いくつかの実施形態において、「～を貯蔵する」又は「～を貯蔵すること」は、本分散系を摂氏約-40度の温度で維持することを指す。いくつかの実施形態において、「～を貯蔵する」又は「～を貯蔵すること」は、本分散系を摂氏約-40度未満の温度で維持することを指す。いくつかの実施形態において、「～を貯蔵する」又は「～を貯蔵すること」は、本分散系を摂氏約-80度の温度で維持することを指す。いくつかの実施形態において、「～を貯蔵する」又は「～を貯蔵すること」は、本分散系を摂氏約-20度の温度で維持することを指す。

10

20

【0123】

本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、該分散系が凍結、貯蔵、及び解凍されている場合、本分散系の粘度は、解凍後と凍結前とでほぼ同じである（例えば、同じである）。凍結、貯蔵、及び解凍されている本分散系のいくつかの実施形態において、該分散系の解凍後の粘度は、該分散系の凍結前の粘度の約1%以内（例えば、1%以内）である。凍結、貯蔵、及び解凍されている本分散系のいくつかの実施形態において、該分散系の解凍後の粘度は、該分散系の凍結前の粘度の約5%以内（例えば、5%以内）である。凍結、貯蔵、及び解凍されている本分散系のいくつかの実施形態において、該分散系の解凍後の粘度は、該分散系の凍結前の粘度の約10%以内（例えば、10%以内）である。凍結及び解凍されている、本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、解凍後と凍結前とでほぼ同じである（例えば、同じである）。凍結及び解凍されている本分散系のいくつかの実施形態において、該分散系の解凍後の粘度は、該分散系の凍結前の粘度の約1%以内（例えば、1%以内）である。凍結及び解凍されている本分散系のいくつかの実施形態において、該分散系の解凍後の粘度は、該分散系の凍結前の粘度の約5%以内（例えば、5%以内）である。凍結及び解凍されている本分散系のいくつかの実施形態において、該分散系の解凍後の粘度は、該分散系の凍結前の粘度の約10%以内（例えば、10%以内）である。

30

40

【0124】

本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、該分散系は、約1日（例えば、1日）間凍結され、複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、該分散系は、約3日（例えば、3日）間凍結され、複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施

50

形態において、該分散系は、約 1 週間（例えば、1 週間）凍結され、複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、該分散系は、約 1 カ月（例えば、1 カ月）間凍結され、複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、該分散系は、約 1 年（例えば、1 年）間凍結され、複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。

【0125】

本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、該分散系は、凍結された固体として（例えば、摂氏−40度で）約 1 日（例えば、1 日）間維持（例えば、貯蔵）され、複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、該分散系は、凍結された固体として（例えば、摂氏−40度で）約 3 日（例えば、3 日）間維持（例えば、貯蔵）され、複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、該分散系は、凍結された固体として（例えば、摂氏−40度で）約 1 週間（例えば、1 週間）維持（例えば、貯蔵）され、複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、該分散系は、凍結された固体として（例えば、摂氏−40度で）約 1 カ月（例えば、1 カ月）間維持（例えば、貯蔵）され、複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。本明細書（実施形態を含む）に記載の透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系のいくつかの実施形態において、該分散系は、凍結された固体として（例えば、摂氏−40度で）約 1 年（例えば、1 年）間維持（例えば、貯蔵）され、複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。

【0126】

III. 分散系を作製する方法

第 4 の態様において、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法であって、タンパク質−クラウド配合液を濃縮し、それにより該分散系を形成するステップを含む方法が提供される。該分散系は複数のナノクラスターを含み、該複数のナノクラスターのそれぞれは複数のタンパク質を含み、該複数のタンパク質のそれぞれはアミノ酸配列同一性を共有する。該分散系は、透明な、低粘性の分散系であり、該分散系は、約 200 mg/mL 超（例えば、200 mg/mL 超）の濃度のタンパク質を含み、該分散系は、複数のクラウドを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、濃縮するステップに先立ち、タンパク質の溶液を、容器中でクラウドと配合してタンパク質−クラウド配合液を形成するステップを含む。本方法のいくつかの実施形態において、タンパク質−クラウド配合液は、タンパク質ナノクラスターの平均直径が、濃縮するステップにより形成される複数のタンパク質ナノクラスターの平均直径とは異なる、タンパク質ナノクラスター分散系を含む。透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する本方法のいくつかの実施形態において、該分散系は、本明細書（実施形態を含む）に記載の分散系から選択される。

【0127】

第 5 の態様において、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法であって、粉末形態のタンパク質をクラウド及び分散液と配合し、それにより、複数の該タンパク質を含む複数のナノクラスターを含む分散系を形成するステップを含む方法が提供される。該複数のタンパク質のそれぞれは、アミノ酸配列同一性を共有する。該分散系は、透明な、低粘性の分散系であり、該分散系は、約 200 mg/m

L超（例えば、200mg/mL超）の濃度の該タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、該配合するステップに先立ち、タンパク質混合物から溶媒を除去し、それにより粉末形態のタンパク質を形成するステップを含む。本方法のいくつかの実施形態において、該タンパク質混合物は、タンパク質分散系又はタンパク質溶液である。本方法のいくつかの実施形態において、該除去するステップは、該タンパク質混合物を粉碎、沈殿、透析、篩過、噴霧乾燥、凍結乾燥、若しくは噴霧フリーズドライ、噴霧凍結するステップを含む、又は、該除去するステップは、該タンパク質混合物に渦巻き式その場凍結技術（SWIFT）を適用するステップを含む。本方法のいくつかの実施形態において、該除去するステップは、薄膜凍結を含む。本方法のいくつかの実施形態において、溶媒は、水である。透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する本方法のいくつかの実施形態において、該分散系は、本明細書（実施形態を含む）に記載の分散系から選択される。

10

【0128】

第6の態様において、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法であって、粉末形態のタンパク質を分散液と配合し、それにより、複数の該タンパク質を含む複数のナノクラスターを含む分散系を形成するステップを含む方法が提供される。該複数のタンパク質のそれぞれは、アミノ酸配列同一性を共有する。該分散系は、透明な、低粘性の分散系であり、該分散系は、約200mg/mL超（例えば、200mg/mL超）の濃度の該タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、該配合するステップに先立ち、タンパク質ークラウダー混合物から溶媒を除去し、それにより粉末形態のタンパク質を形成するステップを含み、これは、場合により、クラウダーを含有していてもよい。本方法のいくつかの実施形態において、該タンパク質ークラウダー混合物は、タンパク質分散系又はタンパク質溶液である。本方法のいくつかの実施形態において、該除去するステップは、該タンパク質ークラウダー混合物を粉碎、沈殿、透析、篩過、噴霧乾燥、凍結乾燥、若しくは噴霧フリーズドライ、噴霧凍結するステップを含む、又は、該除去するステップは、該タンパク質ークラウダー混合物に渦巻き式その場凍結技術（SWIFT）を適用するステップを含む。本方法のいくつかの実施形態において、溶媒は、水である。透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する本方法のいくつかの実施形態において、該分散系は、本明細書（実施形態を含む）に記載の分散系から選択される。

20

30

【0129】

本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法のいくつかの実施形態において、分散液は、水、水性液、又は非水性液である。本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法のいくつかの実施形態において、分散液は、安息香酸ベンジル、又は、安息香酸ベンジルと、ベニバナ油、ゴマ油、ヒマシ油、綿実油、キャノーラ油、サフラン油、オリーブ油、ピーナッツ油、ヒマワリ種子油、 α -トコフェロール、Miglyol 812、及びオレイン酸エチルから選択される1つ又は複数の油とを合わせたものである。

【0130】

本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法のいくつかの実施形態において、該除去するステップは、該混合物に渦巻き式その場凍結技術（SWIFT）を適用するステップを含む。本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法のいくつかの実施形態において、SWIFTを適用するステップは、（1）該混合物を含有するバイアルを、極低温剤と接触させながら回転させるステップと、（2）該混合物をすべて凍結するステップであり、該バイアルの内側表面上の該凍結された混合物の薄いフィルム、及び、該バイアルの中心部に向かってらせん方向に1つ又は複数の後続のフィルムが得られるステップと、（3）該凍結された混合物を凍結乾燥するステップとを含む。いくつかの実施形態において、SWIFTは、バイアルを、

40

50

極低温剤の代わりに低温の物質（例えば、ドライアイス）と接触させるステップを含んでもよい。

【0131】

本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法のいくつかの実施形態において、該分散系中のタンパク質の濃度は、約300mg/mL超（例えば、300mg/mL超）である。本方法のいくつかの実施形態において、該分散系中のタンパク質の濃度は、約400mg/mL超（例えば、400mg/mL超）である。本方法のいくつかの実施形態において、該分散系中のタンパク質の濃度は、約500mg/mL超（例えば、500mg/mL超）である。本方法のいくつかの実施形態において、該分散系中のタンパク質の濃度は、約600mg/mL超（例えば、600mg/mL超）である。本方法のいくつかの実施形態において、該分散系中のタンパク質の濃度は、約200mg/mLから約300mg/mLの間（例えば、200mg/mLから300mg/mLの間）である。本方法のいくつかの実施形態において、該分散系中のタンパク質の濃度は、約300mg/mLから約400mg/mLの間（例えば、300mg/mLから400mg/mLの間）である。本方法のいくつかの実施形態において、該分散系中のタンパク質の濃度は、約400mg/mLから約500mg/mLの間（例えば、400mg/mLから500mg/mLの間）である。

10

【0132】

本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法のいくつかの実施形態において、クラウダーは、グリセロール、エリトリトール、アラビノース、キシロース、リボース、イノシトール、フルクトース、ガラクトース、マルトース、グルコース、マンノース、トレハロース、スクロース、ポリ（エチレングリコール）、カルボマー1342、グルコースポリマー、シリコーンポリマー、ポリジメチルシロキサン、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-c o -グリコール酸）、ポリ乳酸、デキストラン、ポロキサマー、有機共溶媒であり、エタノール、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、PEG300、PEG400、PEG200、PEG3350、プロピレングリコール、N,Nジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ソルケタール、テタヒドロフルフリルアルコール、ジグリム、乳酸エチルから選択される有機共溶媒、塩、バッファー、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、又はそれらの組合せである。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーは多糖である。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーはポリ（エチレングリコール）である。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーはNMP又はアルコールである。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーはアミノ酸である。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーはペプチドである。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーは、2から100個の間のアミノ酸から成るペプチドである。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーは、2から75個の間のアミノ酸から成るペプチドである。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーは、2から50個の間のアミノ酸から成るペプチドである。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーは、2から25個の間のアミノ酸から成るペプチドである。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーは、2から10個の間のアミノ酸から成るペプチドである。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーは、2個の間のアミノ酸から成るペプチドである。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーは、3個の間のアミノ酸から成るペプチドである。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダーは、4個の間のアミノ酸から成るペプチドである。

20

30

40

【0133】

本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法のいくつかの実施形態において、該濃縮するステップは、ろ過を用いて実施される。本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、

50

高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法のいくつかの実施形態において、該濃縮するステップは、遠心ろ過を用いて実施される。本方法のいくつかの実施形態において、該濃縮するステップは、正の気体圧力 (positive gas pressure) 又は機械的圧力を用いて実施される。本方法のいくつかの実施形態において、該濃縮するステップは、接線ろ過、透析、又はバッファの吸収を用いて実施される。本方法のいくつかの実施形態において、該濃縮するステップは、液体を吸収する能力がある化合物 (例えば、分子篩) を用いて実施される。本方法のいくつかの実施形態において、該濃縮するステップは、タンパク質-クラウダー混合物に化合物 (例えば、分子篩) を加えるステップを含み、このとき加えられる化合物は、液体を吸収する。本方法のいくつかの実施形態において、該濃縮するステップは、タンパク質-クラウダー混合物に化合物 (例えば、分子篩) を加えるステップを含み、このとき加えられる化合物は、タンパク質-クラウダー混合物中の水を、バルク溶液から除去することにより減少させる。本方法のいくつかの実施形態において、クラウダー又はタンパク質は、該濃縮するステップの間にタンパク質-クラウダー配合液に加えられる。

【0134】

いくつかの実施形態において、本明細書 (実施形態を含む) に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を滅菌するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、本明細書 (実施形態を含む) に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、ろ過により該分散系を滅菌するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、本明細書 (実施形態を含む) に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、直径約 200 nm (例えば、直径 200 nm) の細孔を備えるフィルターを通したろ過により該分散系を滅菌するステップをさらに含む。

【0135】

いくつかの実施形態において、本明細書 (実施形態を含む) に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含み、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じである (例えば、同じである)。本分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含む本方法のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの解凍後の平均直径は、該複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約 1 % 以内 (例えば、1 % 以内) である。本分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含む本方法のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの解凍後の平均直径は、該複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約 5 % 以内 (例えば、5 % 以内) である。本分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含む本方法のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの解凍後の平均直径は、該複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約 10 % 以内 (例えば、10 % 以内) である。いくつかの実施形態において、本明細書 (実施形態を含む) に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を凍結するステップ及び解凍するステップをさらに含み、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じである (例えば、同じである)。本分散系を凍結するステップ及び解凍するステップをさらに含む本方法のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの解凍後の平均直径は、該複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約 1 % 以内 (例えば、1 % 以内) である。本分散系を凍結するステップ及び解凍するステップをさらに含む本方法のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの解凍後の平均直径は、該複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約 5 % 以内 (例えば、5 % 以内) である。本分散系を凍結するステップ及び解凍するステップをさらに含む本方法のいくつかの実施形態において、該複数のナノクラスターの解凍後の平均直径は、該複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約 10 % 以内 (例えば、10 % 以内) である。本明細書におい

て使用する場合、用語「～を貯蔵する」又は「～を貯蔵すること」は、凍結された分散系に適用される場合、該分散系を凍結状態で維持することを指す。いくつかの実施形態において、「～を貯蔵する」又は「～を貯蔵すること」は、本分散系を摂氏約－４０度の温度で維持することを指す。いくつかの実施形態において、「～を貯蔵する」又は「～を貯蔵すること」は、本分散系を摂氏約－４０度未満の温度で維持することを指す。いくつかの実施形態において、「～を貯蔵する」又は「～を貯蔵すること」は、本分散系を摂氏約－８０度の温度で維持することを指す。いくつかの実施形態において、「～を貯蔵する」又は「～を貯蔵すること」は、本分散系を摂氏約－２０度の温度で維持することを指す。

【０１３６】

いくつかの実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含み、本分散系の粘度は、解凍後と凍結前とでほぼ同じである（例えば、同じである）。本分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含む本方法のいくつかの実施形態において、該分散系の解凍後の粘度は、該分散系の凍結前の粘度の約１％以内（例えば、１％以内）である。本分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含む本方法のいくつかの実施形態において、該分散系の解凍後の粘度は、該分散系の凍結前の粘度の約５％以内（例えば、５％以内）である。本分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含む本方法のいくつかの実施形態において、該分散系の解凍後の粘度は、該分散系の凍結前の粘度の約１０％以内（例えば、１０％以内）である。いくつかの実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を凍結するステップ及び解凍するステップをさらに含み、本分散系の粘度は、解凍後と凍結前とでほぼ同じである（例えば、同じである）。本分散系を凍結すること及び解凍することをさらに含む本方法のいくつかの実施形態において、該分散系の解凍後の粘度は、該分散系の凍結前の粘度の約１％以内（例えば、１％以内）である。本分散系を凍結するステップ及び解凍するステップをさらに含む本方法のいくつかの実施形態において、該分散系の解凍後の粘度は、該分散系の凍結前の粘度の約５％以内（例えば、５％以内）である。本分散系を凍結するステップ及び解凍するステップをさらに含む本方法のいくつかの実施形態において、該分散系の解凍後の粘度は、該分散系の凍結前の粘度の約１０％以内（例えば、１０％以内）である。

【０１３７】

いくつかの実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を約１日（例えば、１日）間凍結するステップ及び該分散系を解凍するステップをさらに含み、このとき、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。いくつかの実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を約３日（例えば、３日）間凍結するステップ及び該分散系を解凍するステップをさらに含み、このとき、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。いくつかの実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を約１週間（例えば、１週間）凍結するステップ及び該分散系を解凍するステップをさらに含み、このとき、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。いくつかの実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を約１カ月（例えば、１カ月）間凍結するステップ及び該分散系を解凍するステップをさらに含み、このとき、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。いくつかの実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質

ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を約1年（例えば、1年）間凍結するステップ及び該分散系を解凍するステップをさらに含み、このとき、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。

【0138】

いくつかの実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を、凍結された固体として（例えば、摂氏−40度で）約1日（例えば、1日）間維持するステップ（例えば、貯蔵するステップ）、次いで、該分散系を解凍するステップをさらに含み、このとき、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。いくつかの実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を、凍結された固体として（例えば、摂氏−40度で）約3日（例えば、3日）間維持するステップ（例えば、貯蔵するステップ）、次いで、該分散系を解凍するステップをさらに含み、このとき、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。いくつかの実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を、凍結された固体として（例えば、摂氏−40度で）約1週間（例えば、1週間）維持するステップ（例えば、貯蔵するステップ）、次いで、該分散系を解凍するステップをさらに含み、このとき、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。いくつかの実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を、凍結された固体として（例えば、摂氏−40度で）約1カ月（例えば、1カ月）間維持するステップ（例えば、貯蔵するステップ）、次いで、該分散系を解凍するステップをさらに含み、このとき、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。いくつかの実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法は、該分散系を、凍結された固体として（例えば、摂氏−40度で）約1年（例えば、1年）間維持するステップ（例えば、貯蔵するステップ）、次いで、該分散系を解凍するステップをさらに含み、このとき、該複数のナノクラスターの平均直径は、解凍後と凍結前とでほぼ同じ（例えば、同じ）である。

【0139】

IV. 疾患を治療する方法

第7の態様において、当該治療を必要とする患者における疾患を治療するための方法であって、有効量の本明細書（実施形態を含む）に記載の分散系のうちいずれかひとつを該患者に投与するステップを含む方法が提供される。疾患を治療する本方法のいくつかの実施形態において、該投与される分散系は、患者の体重1kg当たり約0.5mg、約1mg、約2mg、約4mg、約6mg、約8mg、約10mgのタンパク質（例えば、体重1kg当たり0.5mg、1mg、2mg、4mg、6mg、8mg、10mgのタンパク質）を含む。

【0140】

本発明の組成物（例えば、タンパク質ナノクラスター、タンパク質ークラウダーナノクラスター、分散系）は、患者に、単独で投与できる、又は、共投与できる。共投与は、本組成物を個々に又は組み合わせ（2つ以上の組成物）、同時又は逐次的に投与することを包含することを意味している。したがって、調製物は、必要に応じ、他の活性物質と組み合わせる（例えば、代謝による分解を抑制するために）こともできる。本明細書に記載の組成物は、疾患の治療において有用であることが公知の他の活性剤と、又は、単独では有効ではないことがあるが活性剤の有効性に寄与し得る助剤と、又は、診断剤と、互いに組み合わせ使用できる。

【0141】

いくつかの実施形態において、共投与は、1つの活性剤を、第2の活性剤投与の0.5

時間以内、1時間以内、2時間以内、4時間以内、6時間以内、8時間以内、10時間以内、12時間以内、16時間以内、20時間以内、又は24時間以内に投与することを含む。共投与は、2つの活性剤を、同時に、ほぼ同時に（例えば、互いに約1分以内、約5分以内、約10分以内、約15分以内、約20分以内、若しくは約30分以内）、又は逐次的に任意の順序で投与することを含む。いくつかの実施形態において、共投与は、共製剤、すなわち、両方の活性剤を含む単一の医薬組成物を調製することにより実現することができる。他の実施形態において、活性剤は、別々に製剤化できる。別の実施形態において、活性剤及び／又は助剤は、互いに連結又はコンジュゲートしていてもよい。

【0142】

本発明の組成物（例えば、タンパク質ナノクラスター、タンパク質ークラウダーナノクラスター、分散系）は、多種多様な経口、非経口、及び局所的な剤形で調製及び投与することができる。経口の調製物としては、錠剤、丸剤、散剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ロゼンジ剤、カシェ剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤など、患者による摂取に適したものが挙げられる。本発明の組成物は、注射により、つまり、静脈内、筋肉内、皮内、皮下、十二指腸内、又は腹腔内に、投与することもできる。また、本明細書に記載の組成物は、吸入により、例えば、鼻腔内に投与できる。加えて、本発明の組成物は、経皮投与できる。本明細書（実施形態を含む）に記載の組成物を投与するための多数の投与経路（例えば、筋肉内、経口、経皮）を用いることができることも想定される。したがって、本発明は、薬学的に許容される添加剤と1つ又は複数の本発明の組成物とを含む医薬組成物も提供する。本明細書において開示する組成物は、当技術分野において公知の任意の手段により投与できる。例えば、組成物は、静脈内に、皮内に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に（*intraprostatically*）、胸膜内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、局所的に、腫瘍内に、筋肉内に、くも膜下腔内に、皮下に、結膜下に、小胞内に（*intravesicularly*）、粘膜に、心膜内に、臍帯内に（*intraumbilically*）、眼内に、経口的に、局所的に、吸入により、注射により、注入により、連続的な注入により、局所的な灌流により、カテーテルを介して、洗浄液を介して、クリーム剤中で、又は脂質組成物中で、対象に投与することを含んでもよい。投与は、局所投与、例えば、疾患部位（例えば、癌の場合は腫瘍）への投与又は全身投与であってもよい。

【0143】

本明細書（実施形態を含む）に記載の組成物から医薬組成物を調製するために、薬学的に許容される担体は、固体又は液体のいずれであってもよい。固形の調製物としては、散剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、カシェ剤、坐剤、及び分散性の顆粒剤が挙げられる。固体担体は、1つ又は複数の物質であってもよく、このような担体は、賦形剤、香味剤、結合剤、保存剤、錠剤崩壊剤、又は封入材料としても作用し得る。

【0144】

散剤の場合、担体は、混合物中の微粉化された固体であり、これに、微粉化された活性成分が加えられる（例えば、本明細書において提供される組成物）。錠剤の場合、活性組成物は、必要な結合特性を有する担体と、適当な割合で混合し、所望の形状及びサイズに圧縮される。散剤及び錠剤は、約5%から約70%の活性組成物を含有し得る。

【0145】

適当な固体の添加剤としては以下が挙げられるが、これらに限定されない：炭酸マグネシウム；ステアリン酸マグネシウム；タルク；ペクチン；デキストリン；デンプン；トラガント；低融点ワックス；ココアバター；炭水化物；糖（ラクトース、スクロース、マンニトール、又はソルビトールなどであるが、これらに限定されない）、デンプン（トウモロコシ、コムギ、イネ、パレイショ、又は他の植物に由来するもの）；セルロース、例えば、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、又はカルボキシメチルセルロースナトリウム；及びガム（アラビアガム及びトラガントガムなど）；並びに、タンパク質（ゼラチン及びコラーゲンなどであるが、これらに限定されない）。必要に応じ、崩壊剤又は可溶化剤、例えば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、又はその

塩（アルギン酸ナトリウムなど）を加えてもよい。

【0146】

糖衣錠のコアは、適当なコーティング、例えば、濃縮糖溶液を施して提供され、そのようなコーティングは、アラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポールゲル、ポリエチレングリコール、及び／又は二酸化チタン、ラッカー溶液、及び適当な有機溶媒又は溶媒混合物を含有することもできる。製品の識別用に、又は活性化化合物の量（すなわち、用量）を特徴付けるために、染料又は顔料を錠剤又は糖衣錠コーティングに加えてもよい。医薬調製物は、経口でも使用でき、その場合は、例えば、ゼラチン製のプッシュフィットカプセル（push-fit capsule）、並びに、ゼラチン製の密封型の軟カプセル及びコーティング（グリセロール又はソルビトールなど）を使用する。

10

【0147】

坐剤の調製には、低融点ワックス（脂肪酸グリセリドの混合物又はココアバターなど）をまず溶融し、その中に、攪拌しながら、活性組成物を均質に分散させる。次いで、溶融された均質な混合物を、手頃なサイズの型の中に注ぎ、冷却させ、それにより固化させる。

【0148】

非経口の用途が必要又は所望の場合、本組成物に特に適した混合物は、注射可能な滅菌済の溶液、好ましくは油性又は水性溶液、並びに、分散系、懸濁液、エマルション、又はインプラント（坐剤を含む）である。とりわけ、非経口投与のための担体としては、デキストロースの水溶液、生理食塩水、純水、バッファー、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、ピーナッツ油、ゴマ油、ポリオキシエチレンブロックポリマーなどが挙げられる。アンプルは、便利な単位剤形（unit dosage）である。本組成物は、リポソーム中に組み込む又は経皮用のポンプ又はパッチ剤を介して投与することもできる。使用に適した医薬混合物は、当業者に周知であり、例えば、Pharmaceutical Sciences（第17版、Mack Pub. Co.、Easton、PA）及びWO 96/05309に記載されており、これら両文献の教示は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0149】

経口使用に適した水溶液は、活性成分を水に溶解し、必要に応じ、適当な着色料、香味料、安定化剤、及び増粘剤を加えることにより調製できる。経口使用に適した水性懸濁液は、微粉化された活性成分を粘稠性の材料と共に水に分散させることにより作製でき、このような材料は、例えば、天然又は合成のガム、樹脂、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガントガム及びアラビアガム、及び分散剤又は湿潤剤、例えば、天然型のホスファチド（例えば、レシチン）、酸化アルキレンと脂肪酸との縮合生成物（例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン）、酸化エチレンと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール（oxycetanol））、酸化エチレンと脂肪酸及びヘキシトール由来の部分エステルとの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート）、又は酸化エチレンと脂肪酸及びヘキシトール無水物由来の部分エステルとの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）である。水性懸濁液は、1つ又は複数の保存剤（エチル又はn-プロピルp-ヒドロキシベンゾエートなど）、1つ又は複数の着色剤、1つ又は複数の香味剤、及び1つ又は複数の甘味剤（スクロース、アスパルテム、又はサッカリンなど）を含有することもできる。製剤は、容量オスモル濃度について調節できる。水性懸濁液又は分散系は、水にクラウダーを加えて、又は、非水性溶媒を加えて（クラウダーは加えても加えなくてもよい）、作製できる。

30

40

【0150】

使用直前に経口投与用の液体形態の調製物に変換させることを意図された固体形態の調製物も包含される（例えば、粉末形態のタンパク質又は粉末形態のタンパク質-クラウダー混合物、又は別の固体形態）。そのような液体形態としては、分散系、懸濁液、及びエ

50

マルションが挙げられる。これらの調製物は、活性成分に加え、着色料、香料、安定化剤、バッファー、人工甘味料及び天然甘味料、分散系、増粘料、可溶化剤などを含有してもよい。

【0151】

油性懸濁液は、増粘剤、例えば、蜜蝋、固形パラフィン、又はセチルアルコールを含有できる。甘味剤を加えて味のよい経口調製物を得ることができ、このような甘味剤は、グリセロール、ソルビトール、又はスクロースなどである。これらの製剤は、酸化防止剤（アスコルビン酸など）の添加により保存することができる。注射用の油性ビヒクルの例としては、Minto、J. Pharmacol. Exp. Ther.、281、93～102ページ、1997を参照のこと。医薬製剤は、水中油エマルションの形態であってもよい。油性相は、前述の植物油又は鉱油であってもよく、これらの混合物であってもよい。適当な乳化剤としては、天然型のガム（アラビアガム及びトラガントガムなど）、天然型のホスファチド（大豆レシチンなど）、脂肪酸とヘキシトール無水物とに由来するエステル又は部分エステル（ソルビタンモノオレエートなど）、及びこれらの部分エステルと酸化エチレンとの縮合生成物（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートなど）が挙げられる。エマルションは、シロップ剤及びエリキシル剤の製剤と同様に、甘味剤及び香料剤を含有することもできる。そのような製剤は、粘滑剤、保存剤、又は着色剤を含有することもできる。

【0152】

本医薬調製物は、好ましくは、単位剤形の形態である。そのような形態において、該調製物は、適切な量の活性成分を含有する単位用量に細分化される。単位剤形は、パッケージ化された調製物であってもよく、このパッケージは、量が分かれている調製物、例えば、小さな包みになった錠剤、カプセル剤、及び、バイアル又はアンプルに入った散剤を含有する。また、単位剤形は、それ自体がカプセル剤、錠剤、カシェ剤、若しくはロゼンジ剤であってもよく、又は、これらのうち任意のものが適切な数だけパッケージ化された形態になっているものであってもよい。単位剤形は、凍結された分散系であってもよい。

【0153】

本明細書（実施形態を含む）に記載の組成物は、加えて、持続放出及び／又は快適性をもたらすための成分を含んでもよい。そのような成分としては、高分子量の、陰イオン性の粘液模倣ポリマー、ゲル化する多糖、及び微粉化された薬物担体基質が挙げられる。これらの成分は、多数の機能を果たし得るが、その理由は、このような成分は、ナノクラスターの形成を助けるクラウダーとしても作用し得るからである。これらの成分は、米国特許第4,911,920号、同第5,403,841号、同第5,212,162号、及び同第4,861,760号に、より詳細に論じられている。これらの特許の全体の内容は、すべての目的について、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本ナノクラスター分散系は、薬物送達分野における当業者に公知の実体に担持させて、制御（例えば、持続）放出をさらに可能にしてもよく、そのような実体の例としては、リポソーム、微小球、カプセル、浸透圧ポンプ、ポリマーシェルのコーティング、マトリックス、及び埋込み可能な器具が挙げられる。別の実施形態において、本ナノクラスター分散系は、乾燥させ、次いで、これらの実体に担持させてもよい。

【0154】

本明細書（実施形態を含む）に記載の組成物は、局所的な経路により経皮送達することができ、アプリケーションスティック、分散系、懸濁剤、乳剤、ゲル剤、クリーム剤、軟膏剤、ペースト剤、ゼリー剤、ペイント、散剤、及びエアゾール剤として製剤化できる。

【0155】

本明細書（実施形態を含む）に記載の組成物は、体内でゆっくり放出させるために、微小球として送達させることもできる。例えば、微小球は、皮下にゆっくり放出する薬物を含有する微小球を皮内注射することにより、投与することができる（Rao、J. Biomater Sci. Polym.、第7版、623～645ページ、1995を参照のこと）、又は、生分解性の注射用ゲル製剤として（例えば、Gao、Pharm. Res

、12、857～863ページ、1995を参照のこと）、又は、経口投与用の微小球として（例えば、Eyles、J. Pharm. Pharmacol.、49、669～674ページ、1997を参照のこと）投与できる。経皮経路及び皮内経路はいずれも、数週間又は数カ月わたる一定の送達をもたらす。

【0156】

本医薬組成物は、塩として提供することができ、限定されるものではないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸など多くの酸を用いて形成できる。塩は、対応する遊離塩基形態である水性又は他のプロトン溶媒によりよく溶解する傾向がある。

【0157】

別の実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の組成物は、非経口投与、例えば、静脈内（IV）投与、又は、体腔、若しくは器官の管腔中への投与に有用である。用いることができる、許容されるビヒクル及び溶媒には、水及びリンゲル液、等張性の塩化ナトリウムがある。加えて、滅菌済の固定油は、溶媒又は懸濁媒として慣用的に用いることができる。この目的のために、合成のモノグリセリド又はジグリセリドなど、任意の無刺激性の固定油を用いることができる。加えて、オレイン酸などの脂肪酸も、注射剤の調製において同様に使用できる。これらの溶液は、滅菌済であり、一般に、望ましくない物が含まれていない。これらの製剤は、従来の周知の滅菌法（例えば、ろ過）により滅菌し得る。IV投与の場合は、製剤は、滅菌済の注射用調製物、例えば、滅菌済の注射用の水性分散系であってもよい。

【0158】

別の実施形態において、本明細書（実施形態を含む）に記載の組成物の製剤は、細胞膜と融合する、又はエンドサイトーシスされるリポソームの使用により、すなわち、リポソームに結び付いている、又はオリゴヌクレオチドと直接結び付いており、細胞表面の膜タンパク質受容体と結合してエンドサイトーシスをもたらすリガンドを用いることにより、送達できる。リポソームを使用することにより、特に、リポソーム表面が、標的細胞に特異的なリガンドを有している、又は、他の形で優先的に特定の器官に向けられている場合には、本発明の組成物の送達先の焦点を *in vivo* の標的細胞に合わせることができる（例えば、Al-Muhammed、J. Microencapsul.、13、293～306ページ、1996；Chonn、Curr. Opin. Biotechnol.、6、698～708ページ、1995；Ostro、Am. J. Hosp. Pharm.、46、1576～1587ページ、1989を参照のこと）。

【0159】

医薬組成物は、活性成分が、治療の有効量で、すなわち、その意図された目的を達成するのに有効な量で含有されている組成物を含む。特定の用途に有効な実際の量は、とりわけ、治療が行われている条件によって決まるであろう。疾患を治療する方法において投与される際、そのような組成物は、所望の結果、例えば、標的分子の活性の調節、及び／又は、疾患の症状の低減、消失、若しくはその進行速度の低下を達成するのに有効な量の活性成分を含有するであろう。本発明の化合物の治療の有効量の決定は、特に、本明細書における詳細な開示に照らせば、十分に、当業者の能力の範囲内である。

【0160】

哺乳動物に投与される投与量及び頻度（単回又は複数回投与の用量）は、様々な因子によって変化する可能性があり、そのような因子としては、例えば、当該哺乳動物が別の疾患に罹患しているかどうか、及びその投与経路；投与を受ける者のサイズ、年齢、性別、健康、体重、体格指数、及び食餌；治療対象となっている疾患の性質及び症状の程度、併用治療の種類、治療対象となっている疾患に由来する合併症、又は他の健康に関係した問題がある。他の治療計画又は薬剤を、本明細書（実施形態を含む）に記載の方法及び組成物と共に使用できる。確立されている投与量（例えば、頻度及び継続期間）の調節及び操作は、十分、当業者の技量の範囲内である。

【0161】

本明細書に記載のすべての組成物について、治療の有効量は、最初は細胞培養アッセイ

10

20

30

40

50

により決定することができる。標的濃度は、本明細書に記載の又は当技術分野において公知の方法を用いて測定した、本明細書に記載の方法を達成する能力のある活性化合物（複数可）の当該濃度となろう。

【0162】

当技術分野において周知のように、ヒトにおける使用のための治療の有効量は、動物モデルにより決定することもできる。例えば、動物において有効であることが見出されている濃度を達成するように、ヒト用の用量を製剤化できる。ヒトにおける投与量は、前述のように、化合物の有効性をモニタリングし、その投与量を上方又は下方調節することにより、調節できる。前述した方法及び他の方法に基づいて、ヒトにおける最大有効性を達成するための用量を調節することは、十分、当業者の能力の範囲内である。

10

【0163】

投与量は、患者の要件、及び、用いられている化合物に応じて変化させてもよい。患者に投与される用量は、時間の経過と共に当該患者における有益な治療応答をもたらすだけ十分なものであるべきである。用量サイズは、有害な副作用の有無、性質、及び程度によっても決定されよう。特定の状況の場合の適切な投与量の決定は、専門家の技能の範囲内である。一般に、治療は、当該化合物の最適な用量を下回る、より少量の投与量で開始される。その後、投与量は、状況下での最適効果に達するまで、少しずつ増加させる。

【0164】

投与量及び投与間隔は、投与される化合物のレベルが、治療対象である特定の臨床適応症に有効なものとなるように、個々に調節できる。これにより、当該個体の疾患状態の重症度と釣り合う治療計画が得られよう。

20

【0165】

本明細書において提供される教示を利用して、実質的な毒性の原因とならず、さらには特定の患者が示す臨床症状を治療するのに有効である、有効な予防的又は治療的な治療計画を策定することができる。この計画策定には、化合物の効力、相対的バイオアベイラビリティ、患者の体重、有害な副作用の存在及び重症度、好ましい投与様式、及び、選択された薬剤の毒性プロファイルなどの因子を考慮することにより活性化合物を慎重に選ぶことが含まれるべきである。

【0166】

V. ナノクラスターサイズを修正する方法

30

第8の態様において、透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系のタンパク質ナノクラスターの平均直径を修正するための方法であって、該分散系中のクラウダー又はタンパク質の濃度を増加又は減少させるステップを含む方法が提供される。該分散系は複数のナノクラスターを含み、該複数のナノクラスターのそれぞれは複数のタンパク質を含む。該複数のタンパク質のそれぞれは、アミノ酸配列同一性を共有する。該分散系は、透明な、低粘性の分散系であり、該分散系は、約200mg/mL超（例えば、200mg/mL超）の濃度の該タンパク質を含む。

【0167】

VI. 追加的な組成物及び方法

40

別の態様において、低粘性、高濃度の抗体分散系、並びに、その作製方法が提供される。別の態様において、*in vivo*及び*in vitro*両方における治療活性を保持する、実質的に透明な、立体配座的に安定化されているタンパク質ナノクラスターを有する組成物が提供される。いくつかの実施形態において、希釈されると、クラスターは可逆的に解離して、生物活性が高く粘性が低い本来のモノマータンパク質分子となる。いくつかの実施形態において、このアプローチは、アミノ酸配列の修飾を要せずに、広範なクラスのタンパク質に広く適用可能である。

【0168】

別の態様において、分散媒中に、実質的に透明な、低粘性、高濃度のナノクラスター分散系を有する組成物であって、該ナノクラスターがタンパク質又はペプチドを含み、ナノクラスターの平均直径が20から1,000ナノメートルの間であり、該タンパク質又は

50

ペプチドが、安定であり、クラスター化されてナノクラスターになっている組成物が提供される。

【0169】

いくつかの実施形態において、本明細書においてこれまで開示した組成物は、グリセロール、エリトリトール、アラビノース、キシロース、リボース、イノシトール、フルクトース、ガラクトース、マルトース、グルコース、マンノース、トレハロース、スクロース、ポリ（エチレングリコール）、カルボマー1342、グルコースポリマー、シリコーンポリマー、ポリジメチルシロキサン、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-c o -グリコール酸）、ポリ乳酸、デキストラン、ポロキサマー、有機共溶媒であり、エタノール、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、PEG300、PEG400、PEG200、PEG3350、プロピレングリコール、N,Nジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ソルケタール、テタヒドロフルフリルアルコール、ジグリム、乳酸エチルから選択される有機共溶媒、塩、バッファー、又はそれらの組合せから成る群から選択される1つ又は複数のクラウダーを含む。いくつかの実施形態において、ナノクラスターは、2つ以上の異なるペプチド又はタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、本分散系は、第1のナノクラスター分散系と第2のナノクラスター分散系との混合物であり、この場合の第1のナノクラスター及び第2のナノクラスターは、それぞれ、異なるタンパク質又はペプチドを有する。いくつかの実施形態において、本分散系は、それぞれが2つ以上の異なるペプチド又はタンパク質を有するナノクラスターを含む。いくつかの実施形態において、分散媒は、該タンパク質又はペプチドの等電点又はそれに近い。いくつかの実施形態において、分散媒は、該タンパク質又はペプチドの等電点である、2.5以内、2.0以内、1.5以内、1.0以内、0.8以内、0.75以内、0.5以内、0.3以内、0.2以内、0.1以内、0.05以内のpH単位である。いくつかの実施形態において、本組成物は、ろ過により滅菌される。いくつかの実施形態において、本組成物は、長期放出組成物である。

【0170】

いくつかの実施形態において、ナノクラスター中のタンパク質は、タンパク質濃度、クラウダー、又はその両方が低下／減少すると、生物学的に安定なモノマーになる。いくつかの実施形態において、本低粘性、高濃度の分散系中のペプチド及びタンパク質の総濃度は、25mg/mL以上、50mg/mL以上、100mg/mL以上、150mg/mL以上、200mg/mL以上、250mg/mL以上、300mg/mL以上、350mg/mL以上、400mg/mL以上、500mg/mL以上である。いくつかの実施形態において、本低粘性、高濃度の分散系の粘度は、100センチポアズ未満、90センチポアズ未満、80センチポアズ未満、70センチポアズ未満、60センチポアズ未満、50センチポアズ未満、40センチポアズ未満、30センチポアズ未満、20センチポアズ未満、又は10センチポアズ未満である。いくつかの実施形態において、ナノクラスターの直径は、およそ20nm、30nm、40nm、50nm、75nm、100nm、150nm、250nm、300nm、400nm、600nm、800nm、又は1000nmである。いくつかの実施形態において、ナノクラスターの直径は、水力学的直径である。

【0171】

いくつかの実施形態において、1つ又は複数のタンパク質又はペプチドは、抗体、抗体断片（例えば、Fab、Fc、Fv、Fab'）、ペグ化タンパク質、脂質付加タンパク質、成長因子又は拮抗薬、サイトカイン又は拮抗薬、受容体若しくは受容体拮抗薬、抗原、ワクチン、抗炎症剤、治療用のポリペプチド若しくはペプチド、又はそれらの組合せから選択される。いくつかの実施形態において、本発明の分散系の粘度は、等価濃度の該タンパク質又はペプチドの溶液の粘度を下回る。いくつかの実施形態において、タンパク質又はペプチドは、等価濃度の該タンパク質又はペプチドの溶液が不安定な濃度で安定である。いくつかの実施形態において、ナノクラスターは、非経口投与されると解離して安定なモノマータンパク質となる、一次タンパク質粒子を有する可逆性のクラスターである。

いくつかの実施形態において、タンパク質は、クラスター内で自己群集して、安定な立体配座を維持する。いくつかの実施形態において、本低粘性、高濃度の分散系は、21から27ゲージの針を通して注射可能である。

【0172】

別の態様において、1つ又は複数のタンパク質又はペプチドは、粉碎、沈殿、透析、篩過、噴霧乾燥、凍結乾燥、渦巻き式その場凍結技術（S W I F T）、噴霧フリーズドライ、液体中への噴霧凍結、薄膜凍結、及び投与容器中での直接凍結から成る群から選択される1つ又は複数の手法により、ミクロン又はサブミクロンサイズの粒子になる。また別の態様において、本低粘性、高濃度の分散系は、該ミクロン又はサブミクロンサイズの粒子を分散媒に分散させることにより作製される。いくつかの実施形態において、分散媒としては、薬学的に許容される溶媒、例えば、薬学的に許容される水性溶媒、薬学的に許容される非水性溶媒、又は組合せが挙げられる。いくつかの実施形態において、本発明において使用してもよい薬学的に許容される溶媒としては、安息香酸ベンジル、又は、安息香酸ベンジルと、ベニバナ油、ゴマ油、ヒマシ油、綿実油、キャノーラ油、サフラン油、オリーブ油、ピーナッツ油、ヒマワリ種子油、 α -トコフェロール、M i g l y o l 8 1 2、及びオレイン酸エチルから選択される1つ又は複数の油とを合わせたものが挙げられる。いくつかの実施形態において、本明細書に先に記載した組成物は、安定化剤、界面活性剤、乳化剤、塩、バッファー、アミノ酸、小ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ポリマー、共溶媒、及びそれらの組合せから成る群から選択される1つ又は複数の添加物を含んでもよい。いくつかの実施形態において、タンパク質又はペプチドは、自己群集している。いくつかの実施形態において、タンパク質又はペプチドの少なくとも半分は、溶液中にはない。いくつかの実施形態において、分散媒からの希釈に続いて、ナノクラスター中のタンパク質又はペプチドは、モノマー形態に戻る。いくつかの実施形態において、タンパク質又はペプチドは、分散媒から希釈されると、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、及び100%の活性を保持する。

【0173】

本明細書において先に開示した組成物中のタンパク質の安定性は、サイズ排除クロマトグラフィー、分析用超遠心分離、CD分光法、F T I R分光法、動的光散乱法、静的光散乱法、E L I S A、n a t i v e - P A G Eゲル、又は生物活性アッセイにより測定してもよい。いくつかの実施形態において、本組成物（例えば、分散系）は、該タンパク質又は該ペプチドの注射用溶液と比較した場合、注射時に、実質的に類似した薬物動態学的な特性を呈し、この場合の薬物動態学的な特性としては、最高血清中濃度（ C_{max} ）、注射後の最高濃度到達時間 t_{max} 、曲線下面積（AUC）に代表される利用可能な最大用量、組織分布（ $t_{1/2} - \alpha$ ）、及び消失時間（ $t_{1/2} - \beta$ ）、又はそれらの組合せが挙げられる。いくつかの実施形態において、注射される投与量は、哺乳動物の体重1kg当たり、0.1mg、0.3mg、0.5mg、1mg、2mg、4mg、6mg、8mg、10mgである。いくつかの実施形態において、曲線下面積（AUC）／血中用量は、終了時を2から30日の間とした場合、静脈内送達の場合に観察される値の50%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%、300%である。いくつかの実施形態において、AUC／血中用量は、終了時を2から14日の間とした場合、静脈内送達の場合に観察される値の50%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%、300%である。いくつかの実施形態において、合計AUCは、終了時を2日、5日、7日、10日、14日、21日、28日、及び30日とした場合、皮下用の（SQ）溶液の場合の合計AUCの値の1倍、2倍、5倍、6倍、8倍、10倍である。

【0174】

いくつかの実施形態において、20日間の合計AUCは、SQ溶液の場合の合計AUCの値の1倍、2倍、5倍、6倍、8倍、10倍であり、14日間の合計AUCは、SQ溶液の場合の合計AUCの値の1倍、2倍、5倍、6倍、8倍、10倍であり、又は10日間の合計AUCは、SQ溶液の場合の合計AUCの値の1倍、2倍、5倍、6倍、8倍、

10倍である。いくつかの実施形態において、本組成物の C_{max} は、S Q溶液注射の場合の C_{max} の0.5倍、0.7倍、0.9倍、1.5倍、2倍、4倍、6倍、8倍に達する。いくつかの実施形態において、 t_{max} は、静脈内の、経口の、非経口の、又はS Q溶液の場合の t_{max} の1.2倍、1.4倍、1.6倍、1.8倍、2.0倍遅れる。いくつかの実施形態において、タンパク質又はペプチドは、分散媒から希釈されると、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、及び100%の活性を保持する。

【0175】

いくつかの実施形態において、合計AUCの半分の値は、1日、2日、3日、5日、10日、20日、又は30日にわたり、血中で観察される。いくつかの実施形態において、治療用タンパク質は、30日のうち1日、2日、3日、5日、10日、20日にわたり、血清中で完全な生物活性を保持する。いくつかの実施形態において、 c/c_{max} は、2日、5日、10日、20日、若しくは30日時点で0.5以上、 c/c_{max} は、2日、5日、10日、20日、若しくは30日時点で0.3以上、又は、 c/c_{max} は、2日、5日、10日、20日、若しくは30日時点で0.1以上である。いくつかの実施形態において、本組成物は、静脈内投与、皮下投与、非経口投与、又は経口投与用に構成される。

【0176】

別の態様において、哺乳動物を治療するための方法であって、本明細書に先に記載の治療的有効量の本組成物（例えば、分散系）を該哺乳動物に投与するステップを含み、該哺乳動物が、製剤中のタンパク質での治療を必要とする障害を有する、方法が提供される。いくつかの実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。

【0177】

別の態様において、その必要がある患者に治療的有効量の本明細書に記載の製剤を投与することにより百日咳を治療する方法が提供される。

【0178】

別の態様において、その必要がある患者に治療的有効量の前述の製剤を投与し、抗生物質を共投与する、百日咳の治療方法が提供される。

【0179】

別の態様において、組成物（例えば、分散系）を作製する方法であって、分散媒中の高濃度のナノクラスター分散系を形成するステップを含み、該ナノクラスターがタンパク質又はペプチドを含み、該ナノクラスターの平均直径が20から1,000ナノメートルの間であり、該タンパク質又はペプチドが安定であり、該組成物が、実質的に透明な、高濃度、低粘性のタンパク質又はペプチド分散系である方法が提供される。本方法のいくつかの実施形態において、ナノ粒子は、粉碎、沈殿、透析、篩過、噴霧乾燥、凍結乾燥、渦巻き式その場凍結技術（SWIFT）、噴霧フリーズドライ、液体中への噴霧凍結、薄膜凍結、及び投与容器中での直接凍結から成る群から選択される1つ又は複数の手法によりさらに加工される。いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、1つ又は複数の添加物を該1つ又は複数のサブミクロン又はミクロンサイズの粒子に加えることにより、さらに加工される。いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、1つ又は複数の添加物を水性媒体中の該1つ又は複数のサブミクロン又はミクロンサイズの粒子に加えることにより、さらに加工される。本明細書に先に記載した本方法のいくつかの実施形態において、ナノ粒子のサイズを所望の水力学的直径に調節することは、所定のクラウダー濃度を加え、*in situ*で穏やかに混合して該サイズを調節することにより行われる。本明細書に先に記載した本方法のいくつかの実施形態において、ナノ粒子のサイズを所望の水力学的直径に調節することは、所定のクラウダー濃度を加え、*in situ*で水性媒体と穏やかに混合して該サイズを調節することにより行われる。いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、同じバイアル中で作製及び貯蔵され、組成物は、ろ過により滅菌され、又は、タンパク質若しくはペプチドは、安定で自己群集している。

【0180】

いくつかの実施形態において、本発明の方法において用いられるクラウダーとしては、グリセロール、エリトリトール、アラビノース、キシロース、リボース、イノシトール、

フルクトース、ガラクトース、マルトース、グルコース、マンノース、トレハロース、スクロース、ポリ（エチレングリコール）、カルボマー1342、グルコースポリマー、シリコーンポリマー、ポリジメチルシロキサン、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-c o -グリコール酸）、ポリ乳酸、デキストラン、ポロキサマー、有機共溶媒であり、エタノール、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、PEG300、PEG400、PEG200、PEG3350、プロピレングリコール、N,Nジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ソルケタール、テタヒドロフルフリルアルコール、ジグリム、乳酸エチルから選択される有機共溶媒、塩、バッファー、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、コンジュゲートタンパク質、非コンジュゲートタンパク質、又はそれらの組合せが挙げられる。別の実施形態において、それぞれのナノクラスターは、2つ以上の異なるペプチド又はタンパク質を含む。本方法の別の実施形態において、本分散系は、それぞれが2つ以上の異なるペプチド又はタンパク質を有するナノクラスターを含む。別の実施形態において、本方法は、分散媒のpHを、個々のタンパク質又はペプチドの等電点又は近くに調節して、1つ又は複数のナノクラスターの形成を支援するステップをさらに含む。別の実施形態において、分散媒は、タンパク質又はペプチドの等電点又は近くである。別の実施形態において、分散媒は、タンパク質又はペプチドの等電点である、2.5、2.0、1.5、1.0、0.8、0.75、0.5、0.3、0.2、0.1、0.05のpH単位内である。

【0181】

別の実施形態において、本発明の方法の分散媒としては、薬学的に許容される溶媒、例えば、薬学的に許容される水性溶媒、薬学的に許容される非水性溶媒、又は組合せが挙げられる。いくつかの実施形態において、薬学的に許容される溶媒としては、安息香酸ベンジル、又は、安息香酸ベンジルと、ベニバナ油、ゴマ油、ヒマシ油、綿実油、キャノーラ油、サフラン油、オリーブ油、ピーナッツ油、ヒマワリ種子油、 α -トコフェロール、M i g l y o l 1812、及びオレイン酸エチルから選択される1つ又は複数の油とを合わせたものが挙げられる。いくつかの実施形態において、本組成物は、安定化剤、界面活性剤、乳化剤、塩、アミノ酸、小ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ポリマー、共溶媒、及びそれらの組合せから成る群から選択される1つ又は複数の添加物を含むことができる。いくつかの実施形態において、タンパク質濃度が低下する又はクラウダーが減少すると、ナノクラスター中のタンパク質は、生物学的に安定なモノマーとなる。いくつかの実施形態において、本低粘性、高濃度の分散系の濃度は、25mg/mL超、50mg/mL超、100mg/mL超、150mg/mL超、200mg/mL超、250mg/mL超、300mg/mL超、350mg/mL超、400mg/mL超、500mg/mL超である。いくつかの実施形態において、本低粘性、高濃度の分散系の粘度は、100センチポアズ未満、90センチポアズ未満、80センチポアズ未満、70センチポアズ未満、60センチポアズ未満、50センチポアズ未満、40センチポアズ未満、30センチポアズ未満、20センチポアズ未満、又は10センチポアズ未満である。いくつかの実施形態において、ナノクラスターの水力学的直径は、およそ20nm、30nm、40nm、50nm、75nm、100nm、150nm、250nm、300nm、400nm、600nm、800nm、又は1000nmである。いくつかの実施形態において、ナノクラスターの直径は、およそ20nm、30nm、40nm、50nm、75nm、100nm、150nm、250nm、300nm、400nm、600nm、800nm、又は1000nmである。

【0182】

いくつかの実施形態において、本発明の方法において使用される1つ又は複数のタンパク質又はペプチドは、抗体、抗体断片（例えば、Fab、Fc、Fv、Fab'）、ペグ化タンパク質、脂質付加タンパク質、成長因子又は拮抗薬、サイトカイン又は拮抗薬、受容体若しくは受容体拮抗薬、抗原、ワクチン、抗炎症剤、治療用のポリペプチド若しくはペプチド、又はそれらの組合せから選択される。いくつかの実施形態において、本分散系の粘度は、等価濃度の該タンパク質又はペプチドの溶液の値を下回る。いくつかの実施形

態において、タンパク質又はペプチドは、等価濃度の該タンパク質又はペプチドの溶液が不安定である濃度で安定である。いくつかの実施形態において、ナノクラスターは、非経口投与されると解離して安定なモノマータンパク質となる、一次タンパク質を含む可逆性のクラスターである。いくつかの実施形態において、本低粘性、高濃度の分散系は、21から27ゲージの針を通して注射可能である。

【0183】

本明細書において開示する方法のいくつかの実施形態において、タンパク質又はペプチドの1つ又は複数のミクロン又はサブミクロンサイズの粒子は、トレー凍結乾燥により形成される。本明細書において開示する方法のいくつかの実施形態において、タンパク質又はペプチドの1つ又は複数のミクロン又はサブミクロンサイズの粒子は、SWIFTにより形成される。いくつかの実施形態において、SWIFTによりタンパク質又はペプチドの1つ又は複数のミクロン又はサブミクロンサイズの粒子を形成するステップは、(i)濃縮され精製されたタンパク質又はペプチドのバッファー溶液を用意するステップであり、この場合のバッファーが、凍結の間、タンパク質又はペプチドの完全性、安定性、及び活性を維持するように選択されるステップと、(ii)該精製されたタンパク質又はペプチド溶液に凍結保護剤を加えるステップと、(iii)該タンパク質又はペプチド溶液を膜ろ過により滅菌するステップと、(iv)固定された体積の該滅菌されたタンパク質又はペプチド溶液を、滅菌済の凍結用バイアルに移すステップと、(v)横置きにした該凍結用バイアルを、底部を液体窒素又は任意の他の適当な極低温剤と接触させながら回転させるステップと、(vi)全体積の該タンパク質又はペプチド溶液を凍結して粉末を形成するステップであり、該バイアルの内側表面上で、該凍結されたタンパク質又はペプチド溶液の最初の薄いフィルムが形成され、及び、該バイアルの中心部に向かってらせん方向に1つ又は複数の後続のフィルムが形成されるステップと、(vii)該凍結された粉末に、1回又は複数回の凍結乾燥サイクルを実施するステップとを含む。

【0184】

別の実施形態において、本方法は、凍結された粉末をバッファーに再構成させた後のタンパク質又はペプチドの活性を検証するステップを含む。本方法のいくつかの実施形態において、タンパク質又はペプチドは、自己群集している。本方法のいくつかの実施形態において、タンパク質又はペプチドは、溶液中にはない。本方法のいくつかの実施形態において、タンパク質又はペプチドは、分散媒から希釈されると、モノマー形態に戻る。本方法のいくつかの実施形態において、タンパク質又はペプチドは、分散媒から希釈されると、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、及び100%の活性を保持する。本方法のいくつかの実施形態において、本組成物は、該タンパク質又は該ペプチドの注射用溶液と比較した場合、注射時に、実質的に類似した薬物動態学的な特性を呈し、この場合の薬物動態学的な特性としては、最高血清中濃度(C_{max})、注射後の最高濃度到達時間(t_{max})、曲線下面積(AUC)に代表される利用可能な最大用量、組織分布($t_{1/2-\alpha}$)及び消失時間($t_{1/2-\beta}$)、又はそれらの組合せが挙げられる。別の実施形態において、本組成物は、哺乳動物の体重1kg当たり、0.1mg、0.3mg、0.5mg、1mg、2mg、4mg、6mg、8mg、10mgの注射される投与量をもたらすように製剤化される。別の実施形態において、本組成物は、終了時を2から30日の間とした場合、静脈内送達の場合に観察される値の50%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%、300%の曲線下面積(AUC)/血中用量をもたらす。

【0185】

本方法のいくつかの実施形態において、本組成物は、終了時を2から14日の間とした場合、静脈内送達の場合に観察される値の50%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%、300%のAUC/血中用量をもたらす。本方法のいくつかの実施形態において、本組成物は、2日、5日、7日、10日、14日、21日、28日、及び30日間にわたり、皮下の(SQ)溶液の場合の合計AUCの値の1倍、2倍、5倍、6倍、8倍、10倍の合計AUCをもたらす。本方法のいくつかの実施形態にお

いて、本組成物は、(i) 20日間でS Q溶液の場合の合計A U Cの値の1倍、2倍、5倍、6倍、8倍、10倍、(i i) 14日間でS Q溶液の場合の合計A U Cの値の1倍、2倍、5倍、6倍、8倍、10倍、又は(i i i) 10日間でS Q溶液の場合の合計A U C 10の値の1倍、2倍、5倍、6倍、8倍、10倍の合計A U Cをもたらす。本方法のいくつかの実施形態において、本組成物は、S Q溶液注射の場合の C_{max} の0.5倍、0.7倍、0.9倍、1.5倍、2倍、4倍、6倍、8倍に達する C_{max} をもたらす。本方法のいくつかの実施形態において、本組成物は、静脈内の、経口の、非経口の、又は皮下の溶液の場合の t_{max} の1.2倍、1.4倍、1.6倍、1.8倍、2.0倍遅れる t_{max} をもたらす。

【0186】

本方法のいくつかの実施形態において、分散媒から希釈されると、タンパク質又はペプチドは、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、及び100%の活性を保持する。本方法のいくつかの実施形態において、本組成物は、1日、2日、3日、5日、10日、20日、又は30日にわたり、血中で観察される合計A U Cの1/2を示す。本方法のいくつかの実施形態において、タンパク質又はペプチドは、1日、2日、3日、5日、10日、20日、又は30日にわたり血清中で完全な生物活性を保持する、治療用タンパク質又はペプチドである。本方法のいくつかの実施形態において、本組成物は、(i) 2日、5日、10日、20日、若しくは30日時点で0.5以上、(i i) 2日、5日、10日、20日、若しくは30日時点で0.3以上、又は(i i i) 2日、5日、10日、20日、若しくは30日時点で0.1以上の c/c_{max} をもたらす。本方法のいくつかの実施形態において、本組成物は、静脈内、皮下、非経口、又は経口投与用に構成される。本方法のいくつかの実施形態において、タンパク質は、本分散系内で、また、希釈後、内在性トリプトファン蛍光、FTIR (フーリエ変換赤外分光法 (fourier transmission infra-red spectroscopy))、SEC、AUC、HPLC、光散乱、質量分析法、SEC、DLS、ゲル電気泳動、抗原特異的な又はポリクローナルELISA、及び特定のin vitro活性アッセイにより測定した場合に、本来の立体配座及び活性を保持する。本方法のいくつかの実施形態において、本組成物は、本明細書に先に記載の方法により作製し得る。

【0187】

別の態様において、1つ又は複数の選択された薬物動態学的な特性を必要とする用途に向けたタンパク質又はペプチドナノクラスター組成物を投与するための方法であって、該薬物動態学的な特性が、所与の媒体中で測定され、所与の経路により施される方法が提供される。本方法は、(i) 該1つ又は複数の選択された薬物動態学的な特性の同定可能な値を有するタンパク質又はペプチド分子を、媒体内で、また、可溶性の形態で用意するステップと、(i i) 1つ又は複数のタンパク質又はペプチドナノクラスター、及び、0、1つ、又は複数のクラウダーを有するタンパク質又はペプチドナノクラスター組成物を分散媒中で形成するステップであり、該ナノクラスターが、タンパク質又はペプチドを含み、該ナノクラスターの平均直径が20から1,000ナノメートルの間であり、該タンパク質又はペプチドが、安定であり、クラスター化されてナノクラスターになっているステップと、(i i i) 該タンパク質又はペプチドナノ粒子組成物を対象に投与するステップであり、該ナノ粒子組成物の、該選択された薬物動態学的な特性の値が、媒体中で測定されたとき及び所与の経路により投与されたときの同定可能な値と実質的に同じであるステップとを含む。

【0188】

別の態様において、1つ又は複数の選択された薬物動態学的な特性を必要とする用途に向けたタンパク質又はペプチドナノ粒子組成物を投与するための方法であって、該薬物動態学的な特性が、所与の媒体中で測定され、所与の経路により施され、(i) 該1つ又は複数の選択された薬物動態学的な特性の同定可能な値を有するタンパク質又はペプチド分子を、媒体内で、また、可溶性の形態で用意するステップと、(i i) 1ナノ粒子当たり80から250個の間のタンパク質又はペプチドを含む1つ又は複数の自己群集性のタン

10

20

30

40

50

パク質又はペプチドナノ粒子を含むタンパク質又はペプチドナノ粒子組成物を分散媒中で形成するステップであり、該ナノ粒子が、溶液中にはなく、該タンパク質又はペプチドが、その個々の等電点又は近くであるときには安定で自己群集し、クラスター化されており、該組成物が、注射時に、少なくとも200mg/mLの該タンパク質又はペプチドをもたらすステップと、(iii)該タンパク質又はペプチドナノ粒子組成物を対象に投与するステップであり、該ナノ粒子組成物の、該選択された薬物動態学的な特性の値が、媒体中で測定されたとき及び所与の経路により投与されたときの同定可能な値と実質的に同じであるステップとを含む方法が提供される。

【0189】

別の態様において、タンパク質又はペプチドから成る1つ又は複数のナノ粒子を分散媒中で形成するプロセスにより作製される滅菌済のナノクラスター分散系であって、水力学的直径の平均値が20から1,000ナノメートルの間であるタンパク質又はペプチドナノクラスターを形成する条件下で、場合によりクラウダーを含み、タンパク質又はペプチドが安定であり、組成物が実質的に透明な、高濃度、低粘性のタンパク質又はペプチド分散系である分散系が提供される。

【実施例】

【0190】

実施例 I

Sigma-Aldrich, Inc. (ミズーリ州セントルイス) からポリクロナルヒツジ IgG (製品番号15131) を購入し、分子篩、高速 (fast) タンパク質液体クロマトグラフィー (FPLC) によりさらに精製した。α-αトレハロース、平均分子量300のポリエチレングリコール (PEG300)、n-メチル2-ピロリドン (NMP) 及び他のあらゆる化学薬品は、Fisher Chemicals (ニュージャージー州フェアローン) から購入した。

【0191】

粉末及び分散系形成: pH 5.5、6.4及び7.4の20mMヒスチジンバッファーにおけるゼータ電位から、タンパク質のpIが6.4であると決定し、等電点ゲル電気泳動により確認した (図17)。1:1wt比のα-αトレハロースによるヒスチジンバッファーpH 5.5における初濃度20mg/mLのFPLC精製IgG溶液を、-40°Cにおいて予冷した凍結乾燥機トレイ上の8mLバイアルにおいて6時間かけて徐々に凍結させた (VirTis Advantage Plus Benchtop Freeze Dryer)。次に、100mLにおける-40°C、12時間の一次乾燥と、続いて6時間かけて25°Cへと傾斜させ、25°Cにおけるさらに6時間の二次乾燥により、試料を凍結乾燥させて乾燥粉末を生成した。凍結乾燥により生成した粉末の走査型電子顕微鏡画像を (図15A~15C) に示す。0.039~0.08g±0.0005gの間の粉末を0.1mL円錐状バイアル (Wheaton Science製品番号986211) にスパチュラを用いて詰め込んだ。20~200µLマイクロピペットを用いて100+1µLの水性ベースのバッファーを円錐状バイアルに添加して、約0.1mLの総分散系容量を得た。50mM pH 6.4リン酸バッファー (ヒツジIgG38のpI) にNaClを添加して、154mMの総イオン強度を得た。粉末及びバッファーの混合物を、低いせん断で25g針の先端を用いて穏やかに攪拌して、エア・ポケットを除去し、肉眼に見えるいかなる不均質性も出現しない透明分散系を生成した (図1A及び1B)。粉末における高度に可溶性のトレハロースが溶解し、分散系における外因性群集化剤となった。特定の試験において、水性バッファーは、追加的なクラウダーとして公知の容量のPEG300又はPEG300とNMPの混合物を含有した。IgG及びトレハロースの公知の質量及び密度 (部分モル体積から) 並びに他の (液体) 構成成分の公知の添加容量に基づく、濃縮分散系における様々な構成成分の総容量を表1に示す。構成成分の体積分率 ($\phi = \Phi$ 、IはIgG、Tはトレハロース、PはPEG300、NはNMP) を表1に示す。この基礎手順も用いて、試験全体にわたり体積分率を決定した。

【0192】

水性クラウダー溶液におけるナノクラスター及び／又はタンパク質単量体の水力学的直径、 $D_h = D_c$ は、他に断りがなければ、様々な散乱角で約23℃の温度にて632.8 nmレーザー、光ファイバー検出器及びアバランシェフォトダイオード (avalanche photodiode) を備える特注の (Brookhaven) 装置において、様々な濃度における動的散乱 (DLS) により測定した。0.12～0.21にわたる高 ϕ における測定を160～165°散乱角で行って、特殊化した約60 μ l 試料セル (Beckman Coulter Part #A54094) による多重散乱 (Horn 2000) を最小化して、必要とされるタンパク質の量を最小化した。濃縮分散系の多重散乱の最小化を確実にするため、第2の散乱角135°における追加的な測定を行い、160°における測定値の10%以内の D_h を生じることを見出した。デジタル自己相関器 (Brookhaven BI-9000AT) を用いたCONTINによりデータ解析を行った。表1におけるDLS測定値は、3回複製して行った。報告された平均直径は、DV50に相当、或いは累積的試料容量が50%を下回る直径であった。全試料は、20%未満のピーク幅における相対標準偏差を生じる、狭い分布の1個のピークを含有した (詳細な解析は表6を参照)。NMPなしでPEG300を含有する特定の試料 (表1における列3及び4) は、同セルを用いたが、散乱角165°においてDelsaナノ粒子サイズ分析計 (Beckman Coulter、カリフォルニア州フラートン) により測定した。図18A及び18Bに示す通り、ポリスチレン標準 ($\phi = 0.3$) によりこの技法を検証した。2 mlアンプル (Wheaton Scientific製品#176776) におけるさらに低い濃度のタンパク質 (1 mg/ml) により、以前に報告された通り30°～90°の散乱角で種々の試験を行った。その上、より大容量の低濃度分散系の平均計数率を静的散乱 (SLS) の測定された強度として記録して、空隙率及び第2の浸透圧ビリアル係数を決定した。

【0193】

走査型電子顕微鏡 (SEM) 及び走査型透過電子顕微鏡 (STEM) により粒子形態をさらに特徴付けるため、水性分散系を40 mg/mlとなるよう希釈し、凍結乾燥した。濃縮し分散した粒子内のIgGのフォールディングの程度を、完全にアンフォールディングしたタンパク質 (350 nm) 対フォールディングしたタンパク質 (336 nm) におけるトリプトファン残基の λ_{max} 蛍光からモニターした。25. ヒツジIgGのアンフォールディング対変性剤である尿素の濃度の検量線を図20に示す。10 μ lの分散系を1 mg/mlとなるようリン酸バッファーに希釈した後、ポリクローマル捕捉用酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) によりタンパク質活性を特徴付けた。これらの試料を30°におけるDLSによっても測定してタンパク質単量体ピークを特徴付け、あらゆる不可逆的凝集体の存在を同定した。DLSにより得られた単量体ピークは、本明細書及び表5に記載されている通り、分子篩クロマトグラフィー (SEC) によっても検証した。

【0194】

粘度測定: IgGナノクラスター分散系の見かけ上の粘度は、1 ml ツベルクリンスリップチップ (slip tip) 注射器に取り付けた25ゲージ (ID=0.1 mm) 1.5" 長の針を用いて、ハーゲン・ポアズイユ (Hagen-Poiseuille) 方程式に従って、10%相対標準偏差により3回複製して測定した。ビデオカメラ (Image Jソフトウェア) により、錐体の底からの高さ0.4" から高さ0.1" (50 μ l) まで分散系を引く時間に基づいて、針を通る速度を決定した。プランジャーの端を1 ml マークに保持することにより殆ど一定の吸引力 (suction force) を維持しつつ、0.05秒以内まで少なくとも3回時間を測定し、平均化した。注射器内の空洞の10%の最大容量に分散系を充填して、圧力降下における変動を最小化した。円錐状バイアルから0.05 ml 引く時間と、様々な較正流体の粘度との間の直線相関を図16に示す (Miller 2011)。キャノン・フェンスケ (Cannon-Fenske) 較正した粘度計チューブ (Fishersbrandカタログ番号13-617B) を用いて、混合した水性ベースの溶媒混合物の粘度 (タンパク質なし) を少なくとも3回測定し、平均化した。

【0195】

10

20

30

40

50

高度に濃縮されたナノクラスター分散系の形成：水性 pH 6.4 リン酸バッファーにおける高濃度の凍結乾燥 IgG：トレハロース（1：1）粒子の穏やかな攪拌により透明分散系を生成した（図 1 A 及び 1 B）。この透明な外観は、高タンパク質濃度、150～275 mg/ml の $c_i = c$ にもかかわらず、タンパク質（約 1.42）と水性溶媒（約 1.33～1.37）との間の屈折率における差が異常に低いことの結果である。低い濁度は、あらゆる場合において巨視的粒子が存在しないことを目視により観察できるようにし、これは、非経口的治療法におけるこれらの分散系の使用のための重要な発見的問題解決法となるであろう。

【0196】

DL S 結果は、表 1 において高度に濃縮された分散系を先ず提示し、次に、IgG の「DL S 溶解度」を決定し、パスウェイを変動させて平衡に達したクラスターを証明するためのより特化した試験を示す。散乱角 160° において、タンパク質ナノクラスターの D_h は、個々の IgG 分子の値 10 nm よりもおよそ一桁大きかった（表 1）。最初の 2 列における唯一の外因性クラウダーとしてトレハロースを用いる最も単純な事例に関して、214 及び 275 mg/ml の c_i では $D_h = 85 \sim 88$ nm であった（図 2 A 及び表 1）。角度 145° 及び 135° における追加的な測定により、散乱角 160° における D_h を正確に測定する能力を決定して、10% 以内の粒子サイズを確認した。代表的な 1 回の DL S ランに関する図 2 A において、サイズ分布におけるより大きな凝集体及び 10% 未満の相対標準偏差を有するピークは観察されない。表 1 に報告されている全 D_h 値は、3 回以上の個々のランの平均及び標準偏差である。より低濃度のクラウダーとしてのトレハロース及び 142 mg/ml の c_i ($\phi_T = 0.09$) では、より小型の 58 nm クラスターが形成された（図 2 A）。PEG 300 を添加して、総外因性クラウダー体積分率 Φ_E を 0.25 及び 0.34 に上昇させた場合 ($\phi_N = 0.16 \sim 0.24$)、 D_h は 111 nm へと若干増加した（図 2 B）。NMP なしの場合と同様の総 Φ_E 、0.33 であったにもかかわらず、 $\phi_p = 0.08$ 及び $\phi_N = 0.16$ の混合物により幾分より大型の 258 nm クラスターが観察された。

【0197】

図 3 A 及び 3 B に示す通り、分散系における IgG 濃度 c_i を、一定の組成の全外因性クラウダーにおいて希釈して、「DL S 溶解度」を定義した。 D_h が約 50 nm 超から IgG の水力学半径、11 nm へとシフトした c_i を、外因性クラウダー溶液における IgG の溶解度であると定義した。この DL S 溶解度技法により、250 mg/ml トレハロース ($\phi_T = 0.15$) による pI (pH 6.4) における IgG 溶解度は、31～50 mg/ml の間の c_i であったが、その理由は、50 mg/ml において依然として大型のクラスターが見られたが、31 mg/ml において可溶性の単量体しか見られなかったためである（図 3 A）。200 mg/ml トレハロースにより 0.16 ϕ_N 及び 0.08 ϕ_p をクラウダー ($\phi_E = 0.34$) として組み合わせて用いる場合、IgG 溶解度は 1.25～2.5 mg/ml の間へと 1 桁減少した（図 3 B）。PEG 300 及びトレハロースの外因性クラウダー組み合わせ等、他のクラウダー条件における DL S 溶解度も調査した（表 1）。DL S IgG 希釈方法を用いて、添加した 0.24 ϕ_p の溶解度が 1 mg/ml 未満であると検出した（表 1）。散乱レーザー光の強度が弱過ぎたため、1 mg/ml 未満の溶解度は、DL S により検出できなかった。

【0198】

急速に凍結及び凍結乾燥した濃縮ナノクラスター分散系の SEM 及び STEM 画像は、粒子サイズを裏付け、添加された外因性クラウダー 0.16 ϕ_N 及び 0.08 ϕ_p により形成されたクラスターの形態を示す ($\phi_E = 0.33$ 、図 4 A 及び 4 B)。SEM (図 4 A 1) 及び STEM (図 4 B) の両方により分かる通り、粒子は、約 50 nm からなる一次粒子より低いクラスターである。様々な散乱角 (30°、45°、75° 及び 90°) における DL S と同時発生的に測定された SL S から、ナノクラスターのフラクタル次元を、散乱ベクトル及び SL S 強度の $\log - \log$ プロットから指数部として決定することができる。クラスターのフラクタル次元、 δ_f は、粒子における固体の体積分率、 ϕ_I を、

一次粒子直径、 D 及びクラスター直径、 D_c と関連させることにより凝結粒子の構造を特徴付ける。

【0199】

【数1】

$$\phi_i = \left(\frac{D_c}{D}\right)^{\delta_f - 3} \quad (1)$$

【0200】

高密度に充填された粒子で構成されるクラスターに関して、 δ_f は3に接近する。250 mg/mlトレハロース ($\phi_T = 0.15$) で形成されたナノクラスターに関して、2.4の δ_f が実験的に測定され (図19A)、0.29の個々のタンパク質の ϕ_i を生じた。0.16 ϕ_N 及び0.08 ϕ_P ($\phi_E = 0.34$) で形成されたクラスターに関して、2.6の測定された δ_f を用いて0.29の ϕ_i が計算された (図19B)。

【0201】

平衡ナノクラスター直径におけるクラウド濃度の効果：一定の c_i において種々の経路により ϕ_E を増加及び減少させることにより、タンパク質ナノクラスターのサイズにおける総外因性クラウド体積分率 (ϕ_E) の効果を決定した (図5A)。図5A経路1において、トレハロースの濃縮溶液 (500 mg/mlトレハロース) からトレハロースを添加することにより、 ϕ_T は50 mg/mlから最大300 mg/mlへと増加した。 D_h の測定に先立ち少容量の200 mg/ml濃縮タンパク質分散系を200 mg/mlトレハロースと同時に添加することにより、各ポイントにおいて c_i を50 mg/mlに維持した。DLSによると、50 mg/mlトレハロース濃度において、約10 nmの D_h から分かる通りタンパク質は単量体として存在しており、この状態はトレハロース濃度150 mg/mlまで続く。トレハロースが150 mg/mlを超えると、増加する D_h により示される通り、タンパク質はクラスターを形成した。タンパク質クラスター直径は、トレハロース濃度と共に直線的に増加し、300 mg/mlのトレハロース濃度において約80 nmに達した (図6)。図7において、トレハロースの質量密度 (1.64 g/ml) を用いることにより、トレハロースの質量を ϕ_T に変換した。クラスターサイズの再現性を別個のパスウェイにより検証するため、300 mg/mlから出発するトレハロース濃度を、純粋バッファー溶液を添加することにより減少させた。この場合も先と同様に、上述の少量の濃縮タンパク質分散系を添加することにより、 c_i を50 mg/mlに維持した。実験により測定したクラスターサイズは、 ϕ_T に基づく、トレハロースを添加しつつ増加させた場合と同じ速度で減少した (図5A、経路1後の糖濃度減少)。別個の実験において (図5A経路2)、代替法を用いて、トレハロース濃度を増加させた。50 mg/ml I g G及び50 mg/mlトレハロースのタンパク質溶液にトレハロース結晶を直接的に溶解して、トレハロース濃度を増加させた。各トレハロース濃度において、両方の方法により作製されたタンパク質クラスターのサイズは、増加トレハロース濃度であれ減少トレハロース濃度であれ、密接に一致した。さらに、トレハロース濃度300 mg/ml及び一定のI g G濃度50 mg/mlにより試験を開始し、pH 6.4リン酸バッファーと、50 mg/mlのI g G濃度を維持するための必要な少量の200 mg/ml I g G分散系を用いることにより、これを100 mg/ml I g Gに希釈して、経路3を試みた。これらの異なる経路は全て、試行した異なるトレハロース濃度において互いに十分に一致するサイズを生じ、同一直線上に位置するように見える。

【0202】

第2のクラウド組成、1:2容量のPEG 300及びNMPの溶液も用いて、様々な総 ϕ_E における粒子サイズを決定した。この場合、少量の1:1 wt比のタンパク質:トレハロース凍結乾燥粉末の添加により一定のタンパク質及びトレハロース濃度30 mg/mlを維持しつつ、測定された容量の1:2容量のPEG 300及びNMPの溶液を添加して、総 ϕ_E を増加させた。PEG 300及びNMPの ϕ_E が0.15及びそれ以上へと増加するにつれ、クラスター成長が観察された。0.3のPEG 300及びNMPの ϕ_E において、約180 nmの最も大型の粒子が観察された。

【0203】

図5AにおけるDLSにより得られた選択された一部の試料の実際の水力学的直径分布を図6に示す。図から分かる通り、分布は相当に狭く、平均値にまたがり10%未満の相対標準偏差を有する。また、図5Aに示す通り異なる経路のクラスターサイズが十分にマッチするだけでなく、図6から分かる通り、分布も十分にマッチすることが判明する。図7において、トレハロースクラウダーのみ及び1:2のPEG300:NMPクラウダー系の両方に対して形成されたタンパク質クラスターのサイズを、総外因性クラウダー体積分率に対しプロットした。いずれの種類のクラウダー系も、図7に示す通り、タンパク質クラスターサイズの非常に同等な線形成長を生じる。実際に、どちらのクラウダー系も殆ど同じ線上に位置する。

10

【0204】

ナノクラスター分散系の特性（低い粘度及び高い分子安定性）：204mg/ml IgG (0.08φ_p/0.16φ_N)による最後の列を除く表1における全条件に対し、注射器使用できる(Syringable)粘度(例えば、<50cP)を得た。0.16~0.24の間のφ_pを有する試料の粘度は、NMP-PEG混合物の粘度よりもやや高かった。PEG300のさらにより高い体積分率、0.50は、150mg/ml IgGにおいて注射器使用(syringeable)できなくなるポイントまで粘度を増加させた。外因性群集化剤としてトレハロースのみを使用する場合、214mg/mlにおけるタンパク質分散系の粘度は、37cPであった。このような高濃度の治療タンパク質のこのように低い粘度は、仮に報告されたとしても滅多にない。さらに、多くの場合、200~300mg/mlにおいて溶液は形成されないが、その理由として、タンパク質溶解度がこれほど高くないためである。

20

【0205】

見かけ上の分散系粘度は通常、クリーガー・ドアティ(Krieger-Dougherty)の方程式(Eq. 2)を用いた、固有粘度[η]、粒子の最大体積分率、φ_{max}及び溶媒粘度η₀の関数として説明される。

【0206】

【数2】

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \left[1 - \left(\frac{\phi_i}{\phi_{\max}} \right) \right]^{-[\eta]\phi_{\max}} \quad (2)$$

30

【0207】

η₀又は[η]（剛体球コロイドに対し最小2.5である）を低くし、φ_{max}を増加させることにより、ηを低下させることができる。表1において、φ_iは、タンパク質の体積分率であり、φ_{max}=0.55である。溶媒中に存在するタンパク質と等しい質量のトレハロースを有するため、可溶性糖が原因で溶媒粘度は増加する。PEG-NMP製剤のそれぞれに対し、[η]は、13~16の間と相当に低かった。クラウダーとして唯一の糖を有する275mg/ml濃度のIgGにおいて、タンパク質分散系の[η]は、ほぼ同一値の14である。添加クラウダーとしてPEGのみを有する3種の試験に関して、[η]値は、NMP-PEG試料のものよりもやや大きい(19~20)が、100もの高さの固有粘度を有する多くの報告されたタンパク質のものよりも依然として小さい。

40

【0208】

分散系が、高濃度で低い粘度を生じることを考慮して、分散系内及び希釈後のタンパク質安定性を検査する。クラウダーが存在する濃縮分散系から希釈された100mg/mlのc_iにおいて、蛍光アッセイを利用して、濃縮分散系におけるタンパク質フォールディングを示した。単離されたタンパク質アミノ酸側鎖のトリプトファンと、それよりも低い程度ではあるがチロシンは、295nmで励起すると、350nmの最大シグナルを放射する。完全にフォールディングしたタンパク質内の局所環境により、ヒツジIgGの最大発光波長(λ_{max})は、336nmへとシフトする(図20)。タンパク質が完全にアン

50

フォールディングすると、アミノ酸残基の局所環境が変化し、 $\lambda_{\max}$ は350 nmへと増加する。よって、336～350の間の波長における発光のスキューは、分散した粒子を295 nmで励起し、最大発光波長を記録することにより、ナノクラスター内のタンパク質のフォールディングを示すであろう。純粋糖クラウダー及びNMPとPEG両方の分散系に対し、336 nmの $\lambda_{\max}$ は、タンパク質の完全にフォールディングした状態を示す（表2）。水性分散系から1 mg/mlとなるようpH 7.0リン酸バッファーに希釈・溶解したタンパク質における、単量体タンパク質の高い保持率及び抗体活性を表2に示す。これらの初期試験において用いたヒツジ IgGは単一の標的と結合しないため、ポリクローナル抗ヒツジ IgG捕捉 ELISAを用いて、変性による立体構造エピトープの損失をモニターした。約1.1の相対EC₅₀は同様の標準IgG結合を示し、実験誤差内である（表2）。1に近い相対EC₅₀値は、無視できる活性変化を示す。1 mg/mlのナノクラスターからの溶解IgGのDLS測定によると、タンパク質は、ヒツジIgGのD_hである約10 nmのD_hまで溶解する（表2）。pH 7.0バッファー希釈後のタンパク質の%単量体を定量化するための、追加的な分子篩クロマトグラフィーを本明細書に記す（表5）。

【0209】

タンパク質ナノクラスター相互作用：静的光散乱（SLS）により第2のビリアル係数、 B_2 を測定することにより、分散系におけるナノクラスターの粒子間（Interparticle）相互作用を定量化した。濃縮分散系を希釈して、多重散乱を除去することが必要であったため、NMP-PEG系のみを利用した。 $KcP(\theta)/R\theta$ 対 c のプロットを用いて、以下の関係性により B_2 を決定した。

【0210】

【数3】

$$\frac{Kc}{R_{\theta}} = \frac{1}{P(\theta)} \left(\frac{1}{M_w} + 2B_2c \right) \quad (3)$$

（式中、 K は光学定数である）

【0211】

【数4】

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2}{N_A \lambda^4} \quad (4)$$

【0212】

ここで、 n_0 は、溶媒の屈折率であり、 λ は、入射ビームの波長である）。追加的なクラウダー及びナノクラスターの形成は dn/dc の値に影響を及ぼすとは予測されないため、ナノクラスターの屈折率増分（ dn/dc ）は、タンパク質水溶液（0.185 ml/g）のものと同一であると解釈した。ナノクラスターにおいて、粒子内（intraparticle）干渉は、測定された強度に影響を与える。この効果を低下させるため、追加的な因子、 $P(\theta)$ をEq. 3に加えて、純粋レイリー散乱からデバイ（Debye）散乱への変化を説明した（Eq. 5）。

【0213】

【表 3】

表 1: pH6.4 50mM リン酸バッファーにおけるクラスターの水力学的直径、DLS 希釈によるタンパク質単量体溶解度及び粘度

IgG(c _i)又はトレハロース濃度 (mg/ml)	φ ₁	φ _T	φ _P	φ _N	φ _E (総外因性ク ラウダー)	水力学的 直径	DLS 溶解度 (mg/ml)	分散系粘 度 (cP)	溶媒粘度 (cP)	固有粘度
214	0.16	0.13	0	0	0.13	85 ± 25	31-50	37	1.5	17
275	0.21	0.17	0	0	0.17	88 ± 9	31-50	63	2.1	14
157	0.12	0.09	0.16	0	0.25	111 ± 10	ND	51 ± 7	3.4	20
162	0.12	0.10	0.24	0	0.34	111 ± 10	<1	48 ± 1	3.5	19
157	0.12	0.10	0.08	0.16	0.33	258 ± 24	1.25-2.5	25 ± 5	4.3	13
204	0.15	0.12	0.07	0.14	0.34	ND	1.25-2.5	102	5.6	16

【表 4】

表 2: タンパク質安定性の特性評価。濃縮タンパク質分散系のトリプトファン蛍光からの最大発光波長(λ_{max})。完全にフォールディングしたタンパク質の λ_{max} は、336nm であり、完全にアンフォールディングしたタンパク質の λ_{max} は、349nm である。ELISA 及び DLS のため、pH7.0 バッファアーにおいて 1mg/ml となるよう分散系を希釈した。

分散系名	SLS から得られるナノクラスター内の ϕ タンパク質	ϕ_E (外因性)	TRP λ_{max}	ELISA 相対 EC_{50}^*	DLS - 水力学的直径
275 mg/ml	0.29	0.17	336 ± 1	1.1 ± 0.1	9 ± 2
157 mg/ml - $0.08 \phi_P/0.16 \phi_N$	0.29	0.33	336 ± 1	1.1 ± 0.2	10 ± 1

*相対 EC_{50} は、再構成した乾燥粉末と、加工前の本来の(original)精製溶液との間の差として計算した。

【数 5】

$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{16\pi^2 R_g^2}{3\lambda^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (5)$$

【0216】

小さい散乱角、30°を選んで、1/P(θ) 方程式 (Eq. 5) の第2の項を低下させた。図7における傾きは、 $6.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{ml} / \text{g}^2$ の正の B_2 を示し、よって、ナノクラスター粒子間相互作用が、僅かに反発的であることを示す。ナノクラスター粒子間相互作用の反発的な性質は、他の間接的特性評価技法により支持される。仮にナノクラスター粒子間相互作用が誘引性であるとすれば、本出願人らは、SEM又はDLSにより別々の個々の粒子を観察できないであろう。

10

【0217】

単分散系タンパク質ナノクラスターの非ゲル化分散系の集合は、適切に均衡を保つ階層的マルチスケール相互作用に依存する。タンパク質分子は、互いに引き合うべきであり（クラスター形成に有利）、個々のタンパク質は、クラスターと中立的に相互作用するべきであり（Groenewold and Kegel 2001）（クラスターサイズを制限）、ナノクラスターは、互いに反発し合うべきである（ゲル化を回避）。

【0218】

本出願人らは、ナノクラスターについて論じる前に、先ず2個のタンパク質間の平均力のポテンシャルの分子レベルでの検査から始める。図40aは、2個の1B7分子の平均力のポテンシャル $V(r)$ に対する寄与の見積もりを示す（この事例において用いたパラメータを表14に記す）。pIからpH3単位離れると、 $V_{el}(r)$ は強く反発的になる。予想して然るべきことに、これらの条件において、リゾチームで観察された通りに非常に小型のクラスターしか観察されなかった（Stradner、Sedgwickら、2004）。pI付近では、 V_{el} は、非常に弱くなり、よって $c_E = 220 \text{ mg/ml}$ の強い V_{dep} により、 $V(r)$ は誘引性である。すると、平衡自由エネルギーモデルによって説明される通り、この引力は、クラスターを形成させることが示される。

20

【0219】

クラスター形成機序を理解するために、タンパク質のpI付近の条件におけるタンパク質及び相対的に濃縮されたクラウダー分子の水溶液を考慮する。弱く荷電した単量体間の静電反発力の大きさは、短距離枯渇引力と比較して無視できるほどに小さいため、この系における2個のタンパク質分子は、互いに強く引き合うであろう（図36A及び40A）。しかし、単量体は、短距離枯渇引力に加えて、クラスター内の荷電タンパク質からの多くの弱いより長距離反発の正味の影響を感知するため、タンパク質単量体とタンパク質クラスターとの間の相互作用はより複雑である。この相互作用は、クラスターのサイズに依存して引力的とも反発的ともなり得る（Groenewold and Kegel 2001; Groenewold and Kegel 2004）。クラスターが十分に大きい場合、このような反発は枯渇引力と釣り合い、さらなるクラスター成長を制限する（図36A）。平衡クラスターサイズは、タンパク質単量体間の枯渇相互作用の強さが増加するにつれて（例えば、クラウダー濃度が増加するにつれ）増加し、反発的相互作用の強さが増加するにつれて（例えば、pIからpH単位数が離れるにつれて）減少する。その集団的な静電反発力のため、溶液における完全に成長したクラスターは互いに引き合わないことが示されよう。

30

40

【0220】

図40Bに示すタンパク質クラスター直径、 D_c の等高線は、有機溶媒におけるポリマー型コロイドのクラスタリングを理解するために以前に適用された（Sedgwick、Egelhaafら、2004）単純平衡自由エネルギーモデル（Groenewold and Kegel 2001; Groenewold and Kegel 2004）の拡張からコンピュータ処理した。このモデルにおいて、短距離粒子間引力と、弱い

50

より長距離の静電反発力との間の均衡により D_c が決定される。

【0221】

平衡モデルを理解するために、図36Aに示す通り、溶液において半径 R_c のクラスターを形成する半径 R の n_c のタンパク質を考慮する。本出願人らの解析において、本出願人らが明確に考慮する唯一の引力は、（上に説明する通り）強いクラスタリング条件下における優勢な引力相互作用であるクラウド媒介性枯渇相互作用である。2個のタンパク質間の枯渇相互作用が $-\varepsilon$ であり、各タンパク質がクラスター内部において C 最短距離を有する場合、クラスター内部におけるタンパク質1分子当たりの自由エネルギーに対する有効枯渇の寄与は、 $-\varepsilon C/2$ となるであろう。クラスター表面におけるタンパク質の枯渇相互作用の「喪失」は、有効表面エネルギー項 $(4\pi R_c^2 \gamma)$ （式中、表面張力は、 $\gamma = \varepsilon / 4\pi R^2$ として近似される）の追加により説明される。即ち、枯渇引力は、次式においてクラスター自由エネルギーに寄与する。

【0222】

【数6】

$$F_{att} = -\frac{\varepsilon C n_c}{2} + 4\pi R_c^2 \gamma \quad (6)$$

【0223】

クラスター内で、電荷が無視できるほど僅かに遮蔽（screen）されると仮定すると（本明細書の他の部分に記す通り）、その反発的自己エネルギーは、クラスター半径 R_c を有する球体の体積における点電荷の均一な分布のエネルギーで近似され得る。即ち、

【0224】

【数7】

$$F_{rep} = \frac{3\lambda k_B T n_c^2 q^2}{5R_c} \quad (7)$$

（式中、 λ は、ビエルム（Bjerrum）長（ $\lambda = e^2 / 4\pi \varepsilon_r \varepsilon_0 k_B T$ ）であり、 ε_r は、培地の相対誘電率であり、 q は、タンパク質当たりの電荷である）。 R_c （又は n_c ）に関する $F = F_{att} + F_{rep}$ の最小化を次に記す。

【0225】

【数8】

$$n_c = \frac{10\pi\gamma R^3}{3k_B T \lambda q^2} \quad (8)$$

この単純な結果は、平衡 n_c が、引力と共に増加し、静電反発力と共に減少することを例証する。

【0226】

タンパク質分子から解離する対イオンの並進運動（translational）及びコンビナトリアル（combinatorial）エントロピーの観点からクラスター自由エネルギーをさらに理解するためには、次式が有益である（Groenewold and Kegel 2001）。

【0227】

【数9】

$$F_{entropic} = 2n_c q \left[\ln \left(\frac{q}{q_0} \right) - 1 \right] \quad (9)$$

量 q_0 は、非常に小さい値の ζ ポテンシャルに対応する条件のための全体的なクラスター自由エネルギー（下の E_q 、10も参照）を最小化する、タンパク質当たりの電荷 q を表す（式中、 $\lambda / R_c \rightarrow 0$ ；即ち、ここで対象とする弱く荷電した系）。これは、次の通りに表すことができる。

10

20

30

40

50

【 0 2 2 8 】

【 数 1 0 】

$$q_0 = (4\pi n_d / 3\phi)^{1/2} (R/b)^{3/2} e^{-\lambda/(2b-1)} \quad (10)$$

(式中、 n_d は、タンパク質表面における解離できる部位の数であり、 b は、対イオンとタンパク質表面における電荷との間の最接近距離であり、 Φ は、溶液におけるタンパク質の体積分率である)。より多くのタンパク質が系に存在すると、対イオン並進運動エントロピーにおいて同量の増加を達成するために解離する必要があるタンパク質当たりの対イオンがより少なくなるため、他の文献において詳しく記されている通りに (Groenewold and Kegel 2001)、より大きい値の Φ は一般に、より小さい q_0 を生じる。項を組み合わせ、(Groenewold and Kegel 2004)により提示された、クラスターのタンパク質当たりの自由エネルギーを次に示す。

【 0 2 2 9 】

【 数 1 1 】

$$\frac{f_c}{k_B T} = -\frac{\varepsilon C}{2k_B T} + \frac{4\pi R_c^2 \gamma}{k_B T n_c} + \frac{3\lambda n_c q^2}{5R_c} + 2q \left[\ln\left(\frac{q}{q_0}\right) - 1 \right] \quad (11)$$

【 0 2 3 0 】

タンパク質クラスターの空隙率を考慮に入れるため、本出願人らは、クラスター半径を次の通りに表すことにより、元々のモデルを修正する。

【 0 2 3 1 】

【 数 1 2 】

$$R_c = \left(\frac{n_c}{k}\right)^{\frac{1}{\delta_f}} R \quad (12)$$

(式中、 δ_f は、フラクタル次元である(2.6、図44から))。得られた修正自由エネルギー方程式を次に示す。

【 0 2 3 2 】

【 数 1 3 】

$$\frac{f_c}{k_B T} = \frac{\varepsilon C}{2k_B T} + \frac{\varepsilon n_c \left(\frac{2}{\delta_f} - 1\right)}{k_B T k^{2/\delta_f}} + \frac{3\lambda n_c \left(1 - \frac{1}{\delta_f}\right) q^2}{5R_c k^{1/\delta_f}} + 2q \left[\ln\left(\frac{q}{q_0}\right) - 1 \right] \quad (13)$$

$q = q_0$ における n_c に関する f_c 最小化により、平衡凝集数(n^*)の次の見積もりが得られる。

【 0 2 3 3 】

【 数 1 4 】

$$n^* = k^{\frac{3}{3-2\delta_f}} \left\{ \frac{5(\delta_f - 2)\varepsilon R}{3(\delta_f - 1)k_B T \lambda q_0^2} \right\}^{\frac{\delta_f}{2\delta_f - 3}} \quad (14)$$

予想される通り、クラスターサイズは、引力、 ε の強さが増加するにつれて増加する。そこで本出願人らは、 V_{ssr} (水素結合、疎水性相互作用等)の大きさが、クラウド媒体性枯渇引力よりも小さい場合(図40A)に興味があるため、 $E q. 16$ [$-\varepsilon(\phi_E, R/R_E) = V_{dep}(r=2R)$]における枯渇ポテンシャルの接触値と ε を近似させる。 $\delta_f = 3$ を有する固体クラスターの限界において、 $E q. 14$ は、Groenewold and Kegelにおける $E q. 23$ (Groenewold and Kegel 2001)と基本的に同じ $E q. 8$ となる。唯一の差は、他の文献で説明されている係

10

20

30

40

50

数にある (Arfken and Weber 1995)。

【0234】

表15は、図40Bにおける R_c 等高線を決定するためのモデルに対する本出願人らの入力変数をまとめる。 R_c は、Eq. 9からEq. 7への設定 n^* から決定される。所定のpH下のタンパク質単量体における解離できる部位の総数、 n_d は、以前の見積もりに基づき50を選んだ (Charl, Jerathら、2009)。フラクタル次元は、SEM画像及びSLS測定に基づき2.6を選んだ (図44)。本明細書の他の部分で詳細に説明する通りに、クラスター内側の ϵ_r は、25を選んだ。イオン結合における反対の電荷間の距離を約0.1nmと解釈し、タンパク質直径は11nmとする (表15) (Harn, Spitznagelら、2010)。

10

【0235】

R_c における Φ 及び Φ_E の効果を、クラスターのフラクタル次元を説明するよう拡大されたコロイドクラスタリングの平衡モデルから、図40Bにおいて例証する (Groenewold and Kegel 2001; Groenewold and Kegel 2004) (Eq. 14を参照)。本出願人らは、図40Aに基づき、タンパク質間の短距離引力相互作用が、接触において明らかな通り、高い値の Φ_E における枯渇引力 (Eq. 16) により優位に立つことを仮定した。この引力は、高密度のクラスター内の無視できる静電的遮蔽を有する弱い長距離反発により均衡を保つ (本明細書の他の部分において記載)。図40Bにおける水平パスウェイにおいて、固定 Φ における増加 Φ_E は、 V_{dep} (群集) を強化し、したがって、 R_c を増加させる。このパスウェイは、タンパク質単量体間の枯渇引力を上昇させ (より高い ϵ)、したがって、Eq. 14 (同様にEq. 8) における分数の分子 (numerator) を大きくし、これにより R_c を増加させる。モデルの予測は、クラスターサイズが c_E の増加と共に増加するという、図37B及び図37Dに示す実験データと理にかなって一致する。その上、垂直パスウェイにおいて、固定 Φ_E における増加 Φ は、系におけるエントロピーとエネルギーとの間で同一バランスを得るために、タンパク質当たりの対イオンの解離がより少なくなる必要があるため (Groenewold and Kegel 2001)、クラスターにおけるタンパク質当たりの電荷を少なくし、これは R_c も増加させる。対角傾斜に沿って希釈後に Φ 及び Φ_E を減少させる複合的变化のため、 R_c が減少する (図40B)。そこで、枯渇引力の減少及びより低い Φ と電荷におけるその効果の両方は、 R_c の減少を生じる。先と同様に、この予測は、図37A~Dに示す実験データと一致する。本出願人らの新たなモデルは、(Groenewold and Kegel 2001; Groenewold and Kegel 2004) に基づくモデルと共に、単に定性予測を提供することを目的とする。モデルは、クラスター内電荷遮蔽、クラスターの内側及び外側における ϵ_r の差及び r との引力相互作用における変動を考慮しない。しかし、単純な平衡モデルは、可逆性平衡ナノクラスターの新規の実験的発見を実証し、 D_c における実験的傾向を定性的に予測する。

20

30

【0236】

図40AにおけるそのpI付近の個々のタンパク質間の主たる引力相互作用とは対照的に、得られたナノクラスター相互作用は、高度に反発的である (図40C)。クラスター間反発の優占は、クラスター当たりの多数の弱く荷電したタンパク質 (>1000タンパク質/クラスターであり、約1素電荷/タンパク質) と、 R_c と共に増減する (scale) より長距離の V_{el} (Eq. 19) によるものである。対照的に、 V_{dep} 及び V_{ssr} (Eq. 16及び17) の範囲は、<1nmであり、よって、クラスター間間隔に対して殆ど無視できる (図40C挿入図)。

40

【0237】

引力の均衡を保つには静電反発力が不十分な (即ち、非常に高いクラウド又はタンパク質濃度) 条件下において、タンパク質はゲルを形成し得る (Lu, Zaccarelliら、2008)。クラスタリングモデル (Groenewold and Kegel 2004) の文脈におけるこの遷移に関連するスピノーダル不安定性は、 $d^2 f_{cl}/dq^2 = 0$ のポイントの座位として定義することができる (図40Bにおける灰色の線を参

50

照)。実験データ及び理論的クラスターサイズ等高線によると、様々なサイズを有する平衡クラスターがゲル相境界前に形成され得ることに留意されたい。

【0238】

周囲の培地の存在下における2個のタンパク質間の平均力のポテンシャル

培地における他の分子の存在下において、タンパク質単量体であれナノクラスターであれ2個のタンパク質粒子間の平均力のポテンシャル $V(r)$ は、関連するマルチスケール相互作用を理解するための基盤を提供する。これは通常、枯渇(dep)相互作用、特定短距離(ssr)相互作用及びファンデルワールス(vdw)相互作用と共に静電(el)相互作用を包含する構成成分の和としてモデル化することができる。即ち、

$$V(r) = V_{dep}(r) + V_{ssr}(r) + V_{vdw}(r) + V_{el}(r) \quad (15)$$

(式中、 r は、粒子中心間の分離距離である)である。枯渇引力(Asakura and Oosawa 1958; Minton 2007; Zhou 2008; Zhou、Rivasら、2008)(通常、「群集」と称される)は、溶液におけるより小さな共溶質(cosolute)又は「外因性クラウダー」(本明細書において、トレハロース分子)の存在により粒子が経験する有効(浸透圧)相互作用である。エントロピーは、タンパク質粒子が互いに近い微小状態(microstates)、即ち、より小さなクラウダーが利用できる体積がさらに多くなる立体配置を好むため、この構成が生じる(図42)。図42において、タンパク質の近接により、2個の大きい灰色の丸の間にある暗灰色の陰付き部分によって表される実際には三次元の体積(二次元の図で示す)は、トレハロース分子に利用できるようになる。

【0239】

枯渇引力は、多くの場合、朝倉・大沢(Asakura-Oosawa)ポテンシャル(S. Asakura 1954; Asakura and Oosawa 1958)によって説明される。

【0240】

【数15】

$$\frac{V_{dep}}{k_B T} = -\frac{\phi_E}{2} \left(1 - \frac{r-2R}{2R_E}\right)^2 \left(2 + \frac{3R}{R_E} + \frac{r-2R}{2R_E}\right) \quad (16)$$

(式中、 R は、タンパク質粒子半径であり、 Φ_E 及び R_E は、外因性(extrinsic)クラウダーのそれぞれ体積分率及び半径を表す)(Tuinier、Riegerら、2003)。枯渇引力の強さは、 Φ_E に比例するため、クラウダー濃度を改変することにより実験的に調整することができる。この引力の範囲は、 R_E (トレハロース約0.5nm)と共に増減するため、 R (タンパク質単量体約5.5nm)よりも相当に小さい。

【0241】

本出願人らがタンパク質粒子間の特定短距離引力と命名したものは、水素結合、露出した無極性タンパク質パッチ間の疎水性相互作用及び揺らぐ電荷双極子を包含する分子スケールの相互作用の組み合わせを表す(ten Wolde and Frenkel 1997; Curtis、Prausnitzら、1998; Rosenbaum、Kulkarniら、1999; Kulkarni、Dixitら、2003)。単純化のために、これは多くの場合、井戸型(asquare-well)ポテンシャルとしてモデル化される。

【0242】

【数16】

$$V_{ssr}/k_B T = \begin{cases} \infty & r < 2R \\ -V_0/k_B T & 2R \leq r \leq 2R(1+\Delta) \\ 0 & r > 2R(1+\Delta) \end{cases} \quad (17)$$

(式中、 $V_0/k_B T$ は、井戸の深さ(モノクローナル抗体の $V_0/k_B T$ は約2.7(Bajaj、Sharmaら、2007))であり、幅($2R\Delta$)は約1nmである)(te

n W o l d e a n d F r e n k e l ; C u r t i s , P r a u s n i t z ら ; R o s e n b a u m , K u l k a r n i ら ; K u l k a r n i , D i x i t ら ; S t r a d n e r , S e d g w i c k ら , 2 0 0 4) 。 特定短距離相互作用の範囲 ($2R\Delta$) が一定であり、よって粒子サイズ (R) と無関係である、即ち、 Δ はほぼ R^{-1} であると仮定することは妥当である (C u r t i s , P r a u s n i t z ら ; K a n a i , L i u ら ; Y a d a v , L i u ら) 。 よって、 1 nm ssr 相互作用の影響の範囲は、 10 nm タンパク質分子に対する 100 nm タンパク質コロイドを無視できるようになり、これは、ナノクラスター分散系の低粘性の鍵となる役割を果たすことが示されよう。

【0243】

2 粒子間のファンデルワールス引力は、(H i e m e n z a n d R a j a g o p a l a n 1 9 9 7) の通り、水 A_{pwp} による 2 タンパク質間のハマカー (Hamaker) 定数の観点から表すことができる。

【0244】

【数17】

$$\frac{V_{vdw}}{k_B T} = \frac{-A_{pwp}}{6k_B T} \left[\frac{2R^2}{(r-2R)(r+2R)} + \frac{2R^2}{r^2} + \ln \left[\frac{(r-2R)(r+2R)}{r^2} \right] \right] \quad (18)$$

これは、本試験において考慮される他の相互作用と比較して相対的に弱く (水における $A_{pwp}/k_B T$ は、約 0.04 しかない) 、したがって、これは、本出願人らの解析において明確に考慮されない。

【0245】

粒子間の静電反発力は、(H i e m e n z a n d R a j a g o p a l a n 1 9 9 7) により提示されている。

【0246】

【数18】

$$\frac{V_{EL}}{k_B T} = \frac{64\pi R \Gamma_0^2 \eta_\infty}{\kappa^2} \exp(-\kappa[r-2R]) \quad (19)$$

(式中、 Γ_0 は、 ψ_0 粒子表面ポテンシャルの関数であり (H i e m e n z a n d R a j a g o p a l a n 1 9 9 7) 、 η_∞ は、バルクイオン (bulk ion) 濃度 (50 mM) であり、 κ は、逆 (inverse) デバイ長 (バルクバッファー (bulk buffer) 溶液の $\kappa^{-1} = 0.7\text{ nm}$) である) 。 静電反発力の大きさは、粒子の電荷及びサイズの両方に依存することに留意されたい。

【0247】

I g G クラスターの表面ポテンシャル及びゼータ電位

$c = 50\text{ mg/ml}$ 及び $c_E = 270\text{ mg/ml}$ による図 47 のものと同じの粉末の分散系から生成されたポリクロールヒツジ I g G の 50 nm クラスターのゼータ電位を測定したところ、 $pI 6.4$ 付近の $pH 6.4$ において $3.9 \pm 0.75\text{ mV}$ であった。この値及びデバイ長 2 nm から、本出願人らは、各タンパク質分子表面における約 $1 \sim 2$ 有効電荷を次の関係性から見積もった。

【0248】

【数19】

$$\zeta = \frac{Q}{4\pi\epsilon R_s(1+\kappa R_s)} \quad (20)$$

(式中、 Q は、粒子における表面電荷であり、 R_s は、せん断面における粒子の半径であり、これは、粒子の半径 (R_c) に等しいものとして近似され、 κ は、逆デバイ長である) 。 この Q に基づき、I g G ナノクラスターに対し 64 mV の表面ポテンシャルを計算した。

10

20

30

40

50

【0249】

【数20】

$$\psi_0 = \frac{Q}{4\pi\epsilon R_c} \quad (21)$$

この表面ポテンシャルは、凝集に対しクラスターを安定化する、図4cに示す2個のタンパク質クラスターの平均力のポテンシャルにおける約15 k_BTのポテンシャル障壁を生じる。この測定に必要とされる大量のタンパク質を考慮すると、1B7に対するこれらの測定は実行できなかった。しかし、タンパク質の同様の分子量並びにn_c及び他の特性に関する同様の結果を考慮すると、本出願人らは、同様の大きな表面ポテンシャルが、1B7クラスターを安定化するのであろうと考える。

10

【0250】

クラスター内の低い有効比誘電率

平衡クラスター形成の概念は、低い比誘電率に好まれる、クラスターにおける長距離静電力を仮定する (Groenewold and Kegel 2001)。クラスター内の水の比誘電率は、タンパク質表面間の閉じ込め (confinement) により影響され得る。これと類似して、各高密度タンパク質クラスター内の不均一環境は、バルク水の不均一環境とは大幅に異なる。本文に記す通り、本出願人らは、IgGクラスターにおけるSEM画像及びSLM測定値に基づき、クラスターにおけるΦ_{int}が約0.60であると見積もった。

20

【0251】

【数21】

$$\phi_{int} = \left(\frac{D_c}{D_m} \right)^{(\delta_f - 3)} \quad (22)$$

(式中、D_mは、タンパク質単量体の直径である)。有効媒質理論に従ったクラスターにおける比誘電率Eを次の通りに記す (Bottcher 1945; Reynolds and Hough 1957)。

【0252】

30

【数22】

$$\frac{\epsilon - \epsilon_2}{3\epsilon} = \phi_1 \frac{\epsilon_1 - \epsilon_2}{\epsilon_1 + 2\epsilon} \quad (23)$$

(式中、E₁は、タンパク質比誘電率(5)であり、E₂は、水の比誘電率(80)であり、Φ₁は、媒質におけるタンパク質の体積分率である)。計算されたEは、0.6のΦ₁に対し20である。この値は、表17における25の選択と同様のものである。

【0253】

Φ_{int} = 0.6におけるR = 5.5 nmの均一な間隔の球状タンパク質の仮定は、単純幾何学から (V_{球体} = 0.6 V_{立方体}である場合、立方体に含有される各球状タンパク質と、並べて配置されるとタンパク質クラスターを形成する立方体を仮定すれば)、クラスターの内側の水が、タンパク質表面間のおよそ1 nm以下のチャンネルに局限される (Rintoul and Torquato 1998)を参照) ことを暗示する。この閉じ込めレベルにおいて (Paddison 2003; Biswas, Rohmanら、2008) (Senapati and Chandra 2001; Wang and Pan 2007; Ahmad, Guら、2011)、水の有効比誘電率は、約40に低下する (Ahmad, Guら、2011)。また、タンパク質から解離するイオンと、僅かな外来性イオンのみが、これらの極度に局限した空間に存在する傾向がある (Kralchevsky, Danovら、2011)。クラスター内のこの低いイオン濃度及び低いEは、バルク水バッファー溶液と比較してより低いデバイ遮蔽を生じるであろう。こ

40

50

の低い遮蔽レベルは、クラスターサイズに影響するより長距離静電反発力をさらに増強するであろう。

【0254】

クラスター溶解時間

ナノクラスターにおけるタンパク質の溶解時間は、*in vitro*希釈実験と、より重要なことに、*in vivo*皮下注射後のクラスター解離を理解するために興味深い。タンパク質の固体球体を仮定して、収縮する球体モデルから300nmクラスターの溶解時間 t_F を計算した(McCabe、Smithら、1985)。

【0255】

【数23】

10

$$t_F = \frac{\rho}{4D_v(c_{sat} - c_{bulk})} * \frac{1}{2} D_c^2 \quad (24)$$

(式中、 ρ は、タンパク質の密度(1.34g/ml)であり、 D_v は、水における単一タンパク質の拡散係数($4.5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、ストークス・アインシュタイン(Stokes-Einstein)方程式を用いて計算)であり、 c_{sat} は、飽和タンパク質溶液の濃度(50mg/mlであると仮定)であり、 c_{bulk} は、約0mg/mlである)。300nm直径クラスターの溶解時間は、7msであることが判明した。タンパク質単量体への急速溶解は、高いバイオアベイラビリティのための急速な薬物動態に有利である。これは、タンパク質変性が起こり得る濃縮タンパク質が流体に曝露される時間の最小化にも有益となり得る。

20

【0256】

図10は、 ϕ_c の関数としての所定の ϕ_p の20~230nmの範囲にわたるクラスターサイズの一揃いの等高線を提示する。 ϕ_p に依存する算出された $z_0 (= q_0)$ は、補足セクションに示す通り、pI付近でおよそ1電荷/タンパク質分子である(Groenewold and Kegel 2001; Chad、Jerathら、2009)。 ϵ_r 及び $z_0 (= q_0)$ における不確実性を考慮すると、 E の値は、 ϕ_c に依存するEq. 7における枯渇ポテンシャルの接触値として近似させ、一方、他の引力項は、群集により影響されないため無視した。実験的研究において用いてもよい、 ϕ_p 又は ϕ_c のいずれかを変動させるための水平及び垂直パスウェイを、図10において明確に示す。所定の ϕ_p に関して、 ϕ_c の増加は、タンパク質単量体間の枯渇引力を上昇させ、したがって、図5Aに示すデータと合理的な一致をして、クラスター直径、 D を増加させる。図5Aにおけるクラスターサイズにより示される通り、図10に示す理論から予測されるサイズは、実験と合理的な一致をし、モデルの単純さを示した。例えば、モデルは、電荷遮蔽、クラスターの内側及び外側における ϵ_r の差並びに H との引力相互作用における変動を考慮しない。同様に、 ϕ_p が増加する場合、所定の ϕ_c において、図3A及び3Bにおけるデータに対応する垂直黒破線によって示される通りに D は増加する。そこで、より大型のクラスターは、 ϕ_p による $z_0 (= q_0)$ の減少、よって、クーロン力反発の減少の結果である。数例の特定の事例も表示する。100mg/ml糖及び $\phi_p 0.037$ の事例1に関して(図10及び表3)、予測 σ は約35nmであり、一方、実験値は10nmであった。275mg/ml糖及び $\phi_p 0.037$ に関して、 σ の予測値及び測定値は、約60nmであった。事例3(列2、表1、275mg/ml糖及びタンパク質)に関して、実験による測定サイズ88nmと比較して、 σ は約140nmであった。

30

40

【0257】

【表 5】

量	事例 1 図 5A	事例 2 図 3A	Kegel の事例
δ_f	2.5	2.5	33
比誘電率(ϵ_r)	15	15	10.72
ピエルク長(λ)	3.733	3.733	5.22
コロイド表面の単位面積 当たりの解離できる部位 の数(σ) (nm^{-2})	0.2	0.2	0.15
イオン結合における反対 の電荷間の距離(b)	0.2	0.2	0.134
一次粒子の半径(R)	5.5	5.5	円盤状(Disc)(長さ 75nm 長さ、直径 15nm)
Φ_E (該当する場合)	0.061	0.167	
引力(Attractive)エネルギー (ϵ/kT)	2.63	7.26	7.5
表面張力(γ)	0.006919	0.01910	0.002122
Φ_p	0.037	0.204	0.3
q_0	0.435	0.185	0.0004
Q	9	116	80
凝集数(n_c)	21	627	200000

【 0 2 5 8 】

10

20

【表 6】

表 4: 分散系における体積分率を決定するための物質収支

試料名	1:1 の IgG: トレハロース粉末の実際の重量(mg)	添加した総溶媒の実際の容量 (mL)	添加した実際の溶媒の組成(溶解した糖を除外)	IgG の容量 (μl)	トレハロースの容量 (μl)	純粋バツファアの容量 (μl)	PEG300 の容量 (μl)	NMP の容量 (ml)	全構成成分の総容量 (μl)
214 mg/ml	60.2	0.100	50mM リン酸バツファア	23	18	100	0	0	141
275 mg/ml	79.3	0.090	50mM リン酸バツファア	30	24	90	0	0	144
157 mg/ml - 0.16 φ _p	40.4	0.100	50mM リン酸バツファアにおける 20%(v/v)PEG300	15	12	80	20	0	127
162 mg/ml - 0.24 φ _p	41.4	0.100	50mM リン酸バツファアにおける 30%(v/v)PEG300	15	13	70	30	0	128
157 mg/ml - 0.08 φ _p /0.16 φ _N	39.8	0.100	50mM リン酸バツファアにおける 20%(v/v)NMP、10%(v/v)PEG300	15	12	70	10	20	127
204 mg/ml - 0.08 φ _p /0.16 φ _N	56.5	0.100	50mM リン酸バツファアにおける 20%(v/v)NMP、10%(v/v)PEG300	21	17	70	10	20	138

【表 7】

表 5: %単量体の比較

試料名	精製後の%単量体	希釈後の%単量体
157 mg/ml - 0.08 φ PEG, 0.16 φ NMP	96.2 $\pm$ 0.6	97.0 $\pm$ 0.1

【 0 2 6 0 】

【表 8】

表 6: 表 1 における平均コロイドサイズのためにランを行った様々な個々の DLS 試料の概要

IgG 又はトレハロース濃度 (mg/ml)	追加的なクラウダー	ラン	平均直径(nm)	平均値にまたがるパーセンテージ標準偏差
214	-	ラン 1	103	9
		ラン 2	68	21
275	-	ラン 1	92	8
		ラン 2	78	8
		ラン 3	94	9
157	0.16 φ_P	ラン 1	95	9
		ラン 2	93	9
		ラン 3	140	23
162	0.24 φ_P	ラン 1	118	10
		ラン 2	103	16
157	0.08 φ_P 0.16 φ_N	ラン 1	280	8
		ラン 2	259	12
		ラン 3	256	8
		ラン 4	220	5
		ラン 5	275	6

【 0 2 6 1 】

大型のクラスターは、凝集数 < 5 、寿命約 25 ns の、等電点から離れた pH 約 8 における高電荷のリゾチーム単量体の小型のクラスターと対比することができる (Porcar, Falus ら、2010)。小型のサイズ及び短い寿命は、引力と比べて高電荷粒子の大きな反発の優占と一致する。表 3 において、結果は、数種のパラメータがタンパク質クラスターと同様のものである、オルトージクロロベンゼン ($\epsilon_r = 29$) におけるベーマイトロッドのクラスターのために示される (Groenewold and Kegel 2001)。しかし、低 $z_0 (= q_0)$ は、実験的に観察され、理論的に説明される通り、凝集数 200, 000 の大規模クラスターをもたらす (Groenewold and Kegel 2001)。現在の研究におけるナノクラスターは、これら 2 事例の中間の電荷を有し、これにより、 n が約 $10^2 \sim 10^3$ の長寿命の平衡クラスターを生じる。その上、サイズは、所定の φ_P における φ_E を変動させることにより操作することができる。

【 0 2 6 2 】

クラスター間相互作用：タンパク質単量体の数は、ゲルポイントをはるかに下回る平衡ナノクラスターに対して十分に定義されているため、ナノクラスターは、個々のコロイド粒子として考慮され得る。2個のナノクラスター間の十分な反発的 V_{tot} は、クラスターの凝集を防ぎ、低粘性を維持するのに必要とされる。図9Cに示す通り、pI付近の85nmタンパク質ナノクラスターに対し、大きな反発的障壁が存在し、表1における $\phi_c = 0.17$ の事例の安定的ナノクラスター分散系と一致する。対照的に、タンパク質単量体分散系は、次のパラメータ：1電荷／タンパク質単量体、 $\Delta\sigma = 1\text{ nm}$ 及び $\phi_c = 0.17$ が一定に保持された図9Bにおいて不安定であった。クラスター内の約277個のタンパク質分子に対し、約277の大きな電荷は、僅か0.71mVの単量体の値をはるかに上回る約24mVの表面ポテンシャルを生じる。よって、pIに近接しているにもかかわらず、 V_{EL} はナノクラスターにとって相当に大きく、同時に、単量体にとって無視できる。さらに、 V_{EL} は、反発の範囲が V_{DEP} ($< 1\text{ nm}$) 及び V_{SSR} ($\Delta\sigma$ 約1nm) よりもさらに長くなるように、 R_p と共に増減する。これらの引力の範囲は、 R_p によって有意に影響されないため、タンパク質単量体及びナノクラスターで同様である。よって、ナノクラスターの < 1.01 のこれら引力相互作用の低下した範囲、 r/σ は、タンパク質単量体の約1.1をはるかに下回る。対照的に、 V_{EL} 対 r/σ は、 R_p に対し相対的に無反応 (insensitive) である。 V_{EL} は、ナノクラスターで優勢であるため、これらは凝集せず、 4.63×10^7 のWによりコロイド的安定性を維持する。

【0263】

ナノクラスターの様々な引力相互作用のうち、VDW相互作用の範囲は、 σ と共に増減するため最長となる。しかし、ナノクラスターは、SEM及びSTEM画像 (図4A及び4B) に示す通り多孔質であるため、ハマカー定数は低下する。図9C及び9Dにおいて、ハマカー定数は、2.5kTへと2分の1に低下する。VDW引力を包含する場合であっても、静電相互作用は、総引力相互作用よりもさらに強く、より長距離であった⁸。より高い0.3のクラウド体積分率及びより大きい電荷 (表1列5における実験条件と同様) により形成される250nmタンパク質ナノクラスターに対し、静電反発力は、図9Dに示す通りさらに優勢であった。約5870個のタンパク質単量体により、より大きな電荷は、約32mVのより高い表面ポテンシャルに相当し、Wは 6×10^{16} に達した。 $6.6 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{ml} / \text{g}^2$ の B_2 により、ナノクラスター間の反発的相互作用をSLSにより測定した (図8)。

【0264】

この事例において、 V_{DEP} の貢献は非常に小さい r において発散するため、 V_{tot} から B_2 の理論的決定は、明確に定義されない。図9B及び9Cにおけるポテンシャルの直接比較は、階層的相互作用の新規概念を明らかにし、この概念において、 V_{tot} はタンパク質単量体に対し強く誘引性であり、同時にナノクラスターに対し非常に反発的であり、これは実験データと一致する。この差は主として、 V_{SSR} 及び V_{DEP} の相互作用の範囲の無視できる変化と比べた、 Q 及び R_p の増加による V_{EL} の範囲及び強さの増加によるものである。 $r/\sigma = 1.1$ における強く引きつけるクラスター内相互作用は、ナノクラスターの生成に役立つが、一方、同じ r/σ における弱いクラスター間引力は、凝集を防ぐ。階層的コロイド相互作用を制御する能力は普遍的であり、多種多様なペプチド及びタンパク質に適用できると予想することができる。

【0265】

ナノクラスター分散系対タンパク質溶液における粘度減少：最終的には、静電反発力が引力の平衡を保つには不十分となるポイントにおいて、タンパク質はゲルを形成する。ゲルポイントは、 q に関する f 電荷の二次導関数がゼロであるスピノーダル曲線により定義することができる。図10は、算出されたスピノーダル曲線及び平衡ナノクラスターのゲルを生じる実験条件 (ゲルポイント) を示す。実験ポイントと相対的なゲル曲線の位置は、モデルの単純さ及びクラスターとの静電相互作用の複雑さを考慮すると相当に合理的である。

【0266】

タンパク質安定性セクション：有害免疫原性反応を誘導せずに活性を保持する治療用タンパク質のためには、回収及び製剤の際に天然の三次元立体構造を維持することが重要である（Saluja and Kalonia）。高レベルのタンパク質可動性は、タンパク質変性及び内部疎水性パッチの露出を容易にして、可逆性分子間会合と、最終的には不可逆的凝集をもたらすため、現在、抗体を溶液として高濃度で処方する挑戦がなされている。しかし、添加した群集化剤からの排除体積相互作用は、天然タンパク質状態の安定性を熱力学的に増加させる。 ϕ_c が増加するにつれ、タンパク質分子は、アンフォールディング状態よりも、天然にフォールディングした状態の体積低下をエントロピー的に好むようになる（Zhou、Rivasら、2008）。群集化剤としての糖に関して、タンパク質と糖との間の負の選択的結合パラメータの観点から、タンパク質溶液の安定性の増加が観察された。よって、タンパク質ナノクラスターの外因により密集した溶液環境は、タンパク質分子のアンフォールディングを防ぐ又は低下させるであろう。

10

【0267】

観察された低レベルのタンパク質変性は、試料加工におけるタンパク質天然状態の安定化に役立つ。凍結乾燥は、生物製剤加工において広く用いられており、タンパク質分子を無定形固体において動力学的にトラップして、凝集を生じ得るタンパク質可動性を低下させることにより、タンパク質天然状態を安定化することが示されてきた。凍結乾燥におけるクラウダー、トレハロースの添加は、排除体積により、また、タンパク質との水素結合形成による脱水により、溶液におけるタンパク質天然状態をさらに安定化する。タンパク質ナノクラスター内において、固体状態が維持され、溶液と比べて粒子内及び粒子表面上の両方におけるタンパク質可動性を制限する。

20

【0268】

生理的バッファーにおけるタンパク質単量体の高い粒子表面積及び溶解度を考慮すると（群集化剤の希釈後）、希釈後の粒子溶解は、急速に起こる（約1秒間）。溶解バッファーにおけるトレハロース及びPEG300等、希釈クラウダーの存在は、排除体積によりエントロピー的に有利に働くことにより、天然タンパク質状態をさらに好む。

【0269】

実施例 I I

百日咳（whooping cough）感染症に関連する百日咳毒素（PTx）と結合し、これを中和するマウスIgG2aモノクローナル抗体1B7（Sutherland and Maynard）。新しい凍結方法、渦巻き式その場（spiral-wound in situ）凍結技法（SWIFT）により無定形タンパク質粒子を作製した。対照的に、以前のタンパク質ナノクラスター試験は、トレイ凍結を用いてタンパク質粒子を形成した（Miller、2011）。従来のトレイ凍結による凍結乾燥とは対照的に、さらに急速なSWIFT凍結は、噴霧フリーズドライ、液体への噴霧凍結及び薄膜凍結に対して示されてきた通り、高いタンパク質安定性を達成するための利点を提供することができる。他の急速凍結工程とは異なり、SWIFTにおいては、加工を単純化するために粒子は実際の投薬バイアルにおいて生成される。低粘性を付与し1B7溶解度を制限して粒子溶解を妨げるための3種の薬学的に許容される群集化剤、水溶性有機n-メチル-2-ピロリドン（NMP）、ポリエチレングリコール（PEG）及びトレハロースにより増大させた、およそその1B7 pIへと調整されたヒスチジンバッファーからなる分散バッファー中に無定形粒子を穏やかに分散させた。このような条件下において、DLSにより測定される通り、透明分散系は、2.5~5mg/mlの溶解1B7と平衡にある約200nmの1B7粒子により、高抗体濃度であっても低粘性を提示する（200mg/mlにおいて<50cP）。重要なことに、SDS-PAGE及びELISA解析により希釈分散系及び未処理1B7の活性を比較すると分かる通り、タンパク質天然構造は保存される。

30

40

【0270】

さらに、in vivoマウス薬物動態試験を行って、抗体溶液の従来のIV及びSQ投与により、3種の異なる皮下投与した分散系のバイオアベイラビリティを比較した。同様の投薬量における分散系及び溶液対照を比較するため、本出願人らは、大量の100

50

μl 容量における標準投薬量 (約 5 mg/k g) を投与した。1 B 7 分布及び排出半減期は、これら 3 群で非常に類似していたが、血清濃度がピークに達する時間 (t_{max}) は、S Q 注射で遅延し、この注射部位からのより遅い拡散動態の予想と一致した。続いて、分散系を高濃度 (200 mg/ml) で調製して、少容量 ($1\text{ }\mu\text{l}$) 標準用量注射及び大容量 ($100\text{ }\mu\text{l}$) 高用量 (52 mg/k g) 注射から得られる薬物動態を比較した。この場合も先と同様に、少容量注射は僅かにより短い t_{max} を有していたが、薬物動態プロファイルは、全 S Q 群で著しく類似し、小注射のより急速な拡散動態が、薬物動態全体に影響を与え得ることを示し、これは単一クラウダー、トレハロース系の結果と一致する (Miller, 2011)。ELISA による総 1 B 7 タンパク質及び特異的 P T x 結合活性に関する終末血清試料の解析並びに *in vitro* P T x 中和検定は、14 日の期間にわたり 1 B 7 活性の減少又は抗 1 B 7 免疫応答の発達を検出することができなかった。注射における高いタンパク質安定性、皮下組織における滞留及び血流への輸送は、フォールディングしたタンパク質分子が、平衡ナノクラスターの表面から急速に拡散する、以前に報告された *in vitro* データ (Miller, 2011) と一致することが示される。極度に高い投薬量の過酷な試験に対し高い安定性を達成する能力は、皮下注射における投薬量におけるより控えめな増加のための新たな機会を提供することができる。分散系は、活性を保存し、有利な薬物動態を付与する高度に濃縮された低粘性のタンパク質製剤に有望なアプローチである。さらに、分散系は、溶液により達成され得るものよりも少なくとも 10 倍高い投薬量を達成することができ、種々の薬学的に許容される薬剤と共に処方することができる。

10

20

【0271】

抗体発現、精製及びビオチン化：IgG2a 抗体 1 B 7 を産生するマウスハイブリドーマ細胞を、以前に報告された通りに (Sutherland and Maynard 2009; Miller 2011)、細胞死するまで T フラスコ内のハイブリドーマ S F M 無血清培地において 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で増殖させた。簡潔に説明すると、抗体の精製は、 3000 rpm における 20 分間の遠心分離と、続く $0.45\text{ }\mu\text{m}$ フィルターを用いたろ過滅菌、結合バッファー ($20\text{ mM pH } 7.0$ リン酸ナトリウム) による 1 : 1 希釈及び前平衡化プロテイン A カラム (GE Healthcare) における結合バッファーによるローディングからなる。ベースライン安定化後に、溶出バッファー (0.1 M グリシン $\text{pH } 2.7$) を用いて、 $1\text{ M Tris pH } 8.0$ を含有する採取チューブへと 1 B 7 を溶出させた。マイクロ (micro) ビシンコニン酸 (bicinchonoinic acid) (BCA) アッセイ (Pierce、イリノイ州ロックフォード) によりタンパク質濃度を測定しつつ、非還元 SDS-PAGE により、タンパク質標本の均一性及び純度を検証した。精製された 1 B 7 を、EZ-link (登録商標) Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce、イリノイ州ロックフォード) を用いてビオチンで標識した。ビオチン試薬の 5 mM 溶液を、5 : 1 モル比で、PBS における 1 B 7 の 1 mg/ml 溶液へと室温で添加し、30 分間反応させた。50,000 MWCO Centricon 濃縮器を用いた PBS によるバッファー交換により、過剰なビオチンを除去した。

30

【0272】

渦巻き式その場凍結技術 (SWIFT) による粒子形成：精製しビオチン化した 1 B 7 を、上述の Centricon フィルターを用いて $20\text{ mM pH } 5.5$ ヒスチジンバッファーにバッファー交換した。タンパク質濃度を再度測定し、凍結保護物質として固体 α - α トレハロースを 1 : 1 wt 比となるよう添加し、穏やかに混合して溶解させた。得られた溶液をろ過滅菌し ($0.22\text{ }\mu\text{m}$)、 20 mg/ml タンパク質となるよう希釈し、SWIFT 凍結のための無菌 8 ml ($1.9\text{ cm} \times 4.8\text{ cm}$) ガラスバイアルに移した。SWIFT の際に、バイアルを横倒しにして回転させつつ (約 1 回転/秒) バイアルの底部を液体窒素に接触させ、バイアル内部の縁に凍結溶液の薄いフィルムが生じ、後続の薄いフィルムがバイアル中心に向かって渦巻き状に凍結した。全容量を凍結させた (約 10 ~ 40 秒) 後、 -40°C に予冷した凍結乾燥機の棚に試料を直立させて置いた。次に、試料を 12 時間、 -40°C 、 100 mTorr にて凍結乾燥し、続いて 6 時間かけて 50 mTorr

40

50

ルにて25℃へと傾斜させ、二次乾燥のため25℃、50mトルにて少なくともさらに6時間維持した。凍結後のタンパク質活性を評価するため、後述する動的光散乱(DLS)及び酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)による解析のために粉末を5mg/mlとなるようPBSに再構成した。走査型電子顕微鏡(SEM)解析のため、凍結乾燥後の乾燥粉末の試料を粘着カーボンテープ(adhesive carbon tape)上に置いて、試料をSEMスタブ(stub)に固定した。Cressington 208卓上スパッタ塗布器を用いて、各SEM試料を10nm厚に白金-パラジウムスパッタコーティングした。加速電圧5kVによるZeiss Supra 40VP走査型電子顕微鏡を用いて顕微鏡写真を撮像した。

【0273】

分散系形成：分散系を形成するため、SWIFT凍結し、凍結乾燥した1B7タンパク質粉末を、総粉末重量が 0.04 ± 0.001 gとなるよう0.1ml円錐状バイアル(Wheaton Science製品番号986211)に詰め込んだ。測定された抗体pI(pH7.2、図26を参照)と一致するようpHを調整した50mMリン酸バッファにおける10%(v/v)PEG300及び20%(v/v)n-メチル-2-ピロリドン(NMP)を含有する水性ベースの溶媒分散バッファを、凍結乾燥したタンパク質に添加した。針の先端による穏やかな攪拌によりエア・ポケットを除去して、最終1B7濃度160~200mg/mlを有する、均一な光学的に透徹した分散系を得た。超音波処理も激しい混合も、均一な透明分散系の形成には必要とされなかった。

【0274】

粘度測定：1B7分散系の見かけ上の粘度は、ヒツジIgG分散系に関して以前に報告された通り、1mlツベルクリンスリップチップ注射器に取り付けた25ゲージ、1.5"長の針内へと50μlの分散系を引く時間として測定した。簡潔に説明すると、分散系を含有する円錐状バイアルのビデオを撮影し、錐体の底からの高さ0.4"から錐体の底からの高さ0.1"へと引くのにかかる時間を、Image Jソフトウェアを用いて測定した。様々な粘度を有する公知の溶液を用いた検量線は、円錐状バイアルから0.05ml引く時間と粘度との間に、0.99を超える r^2 値の直線相関を生じた。これらの結果は、指定量の試料を注射器内に引き上げる時間が粘度と直線的に相関することを見出した、モデルタンパク質の懸濁液及びタンパク質溶液による以前の研究と一致する。

【0275】

コロイドサイズ決定/特性評価：動的光散乱(DLS)を用いて、最大165°の後方散乱角を包含するよう修正された特注DLS装置を用いて、精製1B7標本、濃縮1B7分散系及び分散系の希釈液に存在する粒子のサイズを測定した(Miller, 2011)。少容量セル(60μl、Beckman Coulter #A54094)により、約23℃、160°散乱角にて濃縮分散系における粒子サイズを測定し、一方、他のあらゆる測定は、約23℃で、関連する粒子サイズを検出するよう最適化された散乱角にて標準1mlセルにおいて行った。分散バッファにおける1B7の溶解度を見積もるため、200mg/ml分散系を、分散バッファにおいて1:40、1:80及び1:160希釈し、粒子サイズを90°散乱角で測定した。DLSによりタンパク質単量体ピークが観察される1B7の濃度を溶解度として定義する(Miller 2011)。粒子サイズにおける希釈の効果を模倣して、凝集体の形成を検出するため、分散系をPBSにおいて1:40希釈して最終5mg/ml 1B7濃度とし、得られた粒子サイズを散乱角30°で測定した。PBSにおける精製1B7単量体抗体のサイズを5mg/ml、散乱角30°にて測定した。

【0276】

In vitro抗体活性及び凝集アッセイ：発光最大はトリプトファン側鎖の局所環境に基づきシフトするため、固有のトリプトファン蛍光により、分散した粒子内の1B7三次構造を評価した。SpectraMax M5分光光度計(Molecular Devices)を用いて、波長295nmにおいてタンパク質試料に蛍光を発生させ、発光スペクトル310~380nmの間を1nm増分で記録した。1B7に関して、フォー

10

20

30

40

50

ルディングしたタンパク質の342nmから、完全にアンフォールディングしたタンパク質の350nmへの発光最大のシフトが観察される。このアプローチを用いて、200mg/mlにおける200nm粒子に分散したタンパク質の三次タンパク質構造変化の証拠を定性的に探究した。その後に行われるタンパク質活性及び構造的安定性のあらゆるアッセイは、1mg/mlになるようPBSに希釈した1B7分散系において行った。対照は、凍結乾燥した1B7(1mg/mlとなるようPBSにおいて再構成)及びさらなる加工なしの精製1B7(PBSにおける1mg/ml)を包含した。まず、非還元SDS-PAGEにより不溶性かつジスルフィド結合した凝集体の形成をモニターした。簡潔に説明すると、3µgの1B7試料をローディングバッファーと組み合わせ、4~20%プレキャスト直線勾配ポリアクリルアミドゲル(Bio-Rad)において分離し、Gel-Code Blue(Bio-Rad)で染色した。

10

【0277】

リガンド結合活性をモニターするため、以前に報告された通りに間接的PTx ELISAを利用した(Sutherland and Maynard 2009; Miller 2011)。高結合ELISAプレート(Costar)を、PBSにおける0.75µg/mlの百日咳毒素(PTx, List Biological Laboratories)50µlでコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。アッセイバッファーにおける50µg/mlから出発する√10系列希釈スキームにおける1B7試料の添加に先立ち、ウェルをアッセイバッファー(PBS-1%ミルク)で1時間ブロッキングした。室温で1時間インキュベーションし、PBS-0.05%Tween 20で3回反復して洗浄した後、50µlのヤギ抗マウスIgG-西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲート(アッセイバッファーに1:2000希釈、Sigma)を1時間室温でインキュベートした。プレートを3回反復して洗浄し、テトラメチルベンジジン二塩酸塩(TMB)基質(Pierce)によりシグナルを発生させ、1N HClによりクエンチし、SpectraMax M5機器を用いて450nmにおいて得られた吸光度を記録した。用量反応曲線の線形範囲から、最大吸光度の50%に相当する抗体濃度としてEC₅₀値を計算した(Eq. 25)。

20

【0278】

【数24】

$$EC_{50} = \frac{C(A_{450, \max}) - C(A_{450, \min})}{2} \quad (25)$$

30

【0279】

試料間の比較のため、試料EC₅₀:未加工の対照抗体EC₅₀の比として相対EC₅₀を計算した。全試料のランを3回複製して行った。

【0280】

BALB/cマウスにおけるIn vivoバイオアベイラビリティ:1群当たり4~6匹の健康な24~27g、雌BALB/cマウスを用いて、1B7分散系及び対照溶液のin vivo薬物動態試験を14日の期間にわたり行った。低(4.6~7.3mg 1B7/kg体重)又は高(51.6mg/kg)用量の1B7の1又は100µl皮下(SQ)注射一回をマウスに投与した。本試験において比較する5種の試料群は、以前に報告された(Miller, 2011)100µlの1B7溶液(最終5.6mg/kg用量のための1.4mg/ml溶液)の(1)IV及び(2)SQ注射の2群と共に、(3、4)低(4.6mg/kg)及び高(51.6mg/kg)用量の100µl抗体分散系のSQ注射と、(5)分散バッファー(表7を参照)における低(7.3mg/kg)用量の抗体分散系の1µlのSQ注射を包含した。PBSに溶解した20mg/ml 1B7溶液から、1.4mg/mlとなるようPBSに希釈して、以前に報告された溶液試料(群1及び2)を調製し(Miller, 2011)、一方、分散系試料においては、群3は1.2mg/ml、群4は12.9mg/ml、群5は182mg/ml濃度となるよう、200mg/ml 1B7分散系から注射直前に分散バッファーに希釈した

40

50

。

【0281】

注射前及び12～336時間の間の追加的な8時点においてマウスを秤量し、尾静脈から血液試料（約20μl）を採取した。採取後に試料を凝血させ、5000rpmで10分間遠心分離し、血清を新しいチューブに移した。終末時点（336時間）においてマウスを麻酔し、0.2～1mlの間の血清を心穿刺により採取した。これらの試料をELISAアッセイにおいて用いて、血清における1B7の総濃度及び活性濃度を測定し、終末時点に関しては、*in vitro* 中和アッセイにより抗体活性を測定して、マウス抗1B7応答の初期見積もりを得た。本試験は、実験動物福祉局（Office of Laboratory Animal Welfare）の指針を遵守しつつ、テキサス大学オースティン校の施設内実験動物委員会（Institutional Animal Care and Use Committee）による承認の下に行った（プロトコール#AUP-2010-500070）。

10

【0282】

【表9】

表7: 様々な投与方法を比較する動物試験データ:

注射の種類	N	投薬量 (mg/kg)	C _{max} /用量 (μg/ml)/ (mg/kg)	AUC _{0~14日間} /用量 (μg*時間/ml)/(mg/kg)	t _{max} (時間)	t _{1/2,α} (時間)	t _{1/2,β} (時間)	CHO 中和アッセイ力価 (ml/μg)
IV 溶液注射	6	5.6	24.3	2073	12 ± 0	45.7 ± 22.8	227.1 ± 24.9	500
SQ 溶液注射	4	5.6	18.2	1630	21 ± 6	43.4 ± 17.3*	210.0 ± 17.4	400
SQ 1μl 注射分散系 トレハロース	6	9.4	13.8	2214	24 ± 0	42.1 ± 24.8*	243.2 ± 35.5	TBD

20

30

【0283】

血清試料における1B7の測定：血清試料における活性1B7の濃度を決定するため、以前に報告された通りに次の修正を加えつつ標準ELISAアプローチを用いた（Miller、2011）。PBSにおける1.5μg/mlのPTxでELISAプレートにコーティングした。全ステップにおいて希釈液として用いたアッセイバッファーは、PBS（pH7.4）における4%ウシ血清アルブミン、4%ウシ胎仔血清（FBS）、0.05% Tween 20からなる。アッセイバッファーでブロッキングした後、2.3μlの血清試料を、ウェル当たり50μlのアッセイバッファーにおいて系列的に1:√10希釈した。各プレートは、陰性対照としてのマウス血清（Sigma）と、マウス血清に初濃度100μg/mlとなるよう希釈した1B7検量線を包含した。ELISAプレートにおけるストレプトアビジンコーティングを用いて検出される総タンパク質に関して、追加的な試料を解析してビオチン化1B7を検出した。

40

【0284】

その結果得られた吸光度を測定した後、SoftMax Pro v5を用いて、それぞれの曲線毎に4パラメータロジスティック（4PL）モデルを用いた血清希釈に基づきEC₅₀値を計算した。検量線におけるlog[(試料EC₅₀)/(標準EC₅₀)]対公知の1B7濃度のlog間の直線相関から、各血清試料における活性1B7の濃度を計算した。少なくとも5回の独立的な検量線から適合>0.95による直線相関を決定した（図27）。

50

【0285】

CHO細胞中和アッセイによる活性抗体の測定：血清1B7の濃度を決定するための直交性活性測定は、*in vitro*においてPTx活性を中和することができるため、本出願人らは、CHO細胞中和アッセイを利用した（Sutherland and Maynard 2009）。公知の濃度の精製1B7の検量線と対比した、PTx誘導性CHO細胞クラスティングを完全に阻害した血清希釈として中和抗体の濃度を測定した。簡潔に説明すると、10%FBSを含有するダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）における1.5 ng/ml百日咳50 µlを、無菌96ウェル組織培養プレートの各ウェルに直接的に添加した。1:√10希釈スキームを用いて終末血清試料（2.3 µl）を系列希釈して、一定のPTx濃度を維持した。30分間37℃、5%二酸化炭素においてインキュベーションした後、10⁵細胞/mlの新たにトリプシン処理したCHO細胞を100 µl/ウェル、各ウェルに播種した。37℃、5%CO₂における24時間のインキュベーションの後、0が伸長（非クラスター化）、3が完全クラスター化である0～3スケールを用いて、ウェルをCHOクラスティングに関して点数化した。

10

【0286】

SWIFT凍結により作製された安定的タンパク質粒子：濃縮水性分散系の調製における第1のステップとして、タンパク質粒子の乾燥粉末を形成した。凍結方法の選択は、凍結の間の抗体構造及び活性の保護並びにコロイド的に安定的な分散系を得るための適切なサイズ及び形態の粒子の作製の両方にとって重大な意味を持つ。これらの懸案事項に取り組むため、凍結乾燥に先立ち直接的に最終包装バイアルにおいて抗体溶液を急速に凍結させる新規凍結技法、SWIFTを開発した（図25）。この技法の開発における論拠は、凍結の際のタンパク質変性の2つの主要な起源が、噴霧フリーズドライにおける液気界面への曝露と、より大容量では凍結速度が遅く、これにより凍結濃縮及びその後の濃度依存性凝集を生じ得ることである。液体窒素と接触させつつタンパク質溶液のバイアルを回転させることにより、同心円状の層それぞれが1秒未満で凍結する。残る液体を回転により穏やかに混合することにより、いかなる濃度勾配も正常化される。

20

【0287】

SWIFTを用い、続いて凍結乾燥して、分散系に用いる1B7抗体のサブミクロン粒子を形成した。凍結におけるタンパク質凝集を妨げるため、タンパク質溶液を、凍結保護物質として1:1重量比のトレハロースを含有するように調整した。選択されたバッファー、20 mMヒスチジンpH 5.5は通常、凍結乾燥ステップにおいて用いられる。凍結及び凍結乾燥した1B7のSEM解析は、最終分散系に望ましいサイズと同様の、サブミクロン粒子の存在を明らかに示す（図28）。重要なことに、この仕方で加工された抗体は、PBSにより5 mg/mlになるよう再構成した後に天然の立体構造及び活性を保持する。この濃度において、DLSは、抗体単量体に予想される、約10 nmの水力学的直径を有する単一種を検出した（図29）。より大型の粒子の非存在は、抗体が、SWIFT及び凍結乾燥において不可逆的凝集体を形成しなかったことを示す。その上、再構成した抗体の特異的PTx結合活性をモニターするためのELISAは、未処理対照と対比して、加工ステップが原因の有意な活性変化がないことを明らかにした（図30）。

30

【0288】

SWIFTプロセスを設計して、タンパク質構造及び活性を保護しつつ、所望の形態の粒子を作製した。これは、関連プロセス、薄膜凍結（TFF）から発想を得たゴールである、最小液気界面による急速な凍結により達成される。SWIFTにおいて、1回のバイアル回転に対応する各フィルム層は、約200 nmの厚さである。ヒート・シンクとしての液体窒素との間接的な接触は、約10² K/sの冷却速度を付与する。TFFにおいて、少容量のタンパク質溶液は、極低温で冷却した表面上に沈着して約210 nm厚に広がり、1秒以内に凍結する。等容量における凍結時間を比較するためにスケールアップしたところ、TFFは、タンパク質溶液1 ml当たり約5.1秒の速度で凍結し、一方、SWIFTは、同様の速度、約7.5秒/mlが得られた（図31）。

40

【0289】

50

凍結速度及びフィルム厚の類似性の結果、同様のタンパク質溶液の T F F 及び S W I F T 加工は、同様の形態の乾燥粒子を生じる（図 2 8）。T F F、ひいては S W I F T に関して、急速冷却及び凍結速度は、氷点降下効果により溶質分子を排除する多数の氷核を生じる。氷核間の薄いチャンネルに存在する残りの液体は、溶解したクラウダー分子及びタンパク質で過飽和するようになる。急速な凍結によるこれら液体チャンネルの急速なガラス化は、タンパク質及び糖分子／粒子の間の衝突頻度を減少させる。過飽和によりこれらが沈殿するにつれ、小粒子の凝固が、より大型の粒子を生じる。その上、未凍結の液体において溶解した溶質の濃度が上昇するにつれ、関連する粘度増加が、成長中の粒子核の可動性をさらに低下させるであろう。対照的に、より遅い凍結速度を用いた従来のトレ凍結の凍結乾燥は、さらにより大きな液体チャンネル及び乾燥後のより大きな最終粒子を含有する。よって、図 2 8 に示す通り、S W I F T 凍結において、標準トレ凍結の凍結乾燥と対比してより小型のサブミクロンタンパク質粒子が形成される。

10

【0290】

S W I F T 及び従来のトレ凍結乾燥のどちらによっても、凍結及び凍結乾燥における天然のタンパク質構造の動力学及び熱力学的安定化により、低レベルのタンパク質変性及び凝集が達成される。無定形固体におけるタンパク質分子の動力学的トラップによる、凝集を生じ得るタンパク質可動性の低下により、天然のタンパク質状態は、凍結乾燥において安定化される。凍結乾燥における凍結乾燥保護物質（lyoprotectant）トレハロースの添加は、凍結において天然のフォールディング状態をエントロピー的に有利にすることにより、また、脱水においてタンパク質と水素結合を形成することによりタンパク質天然状態をさらに熱力学的に安定化する。しかし、噴霧フリーズドライ（S F D）等、サブミクロンタンパク質粒子を形成するプロセスは、噴霧ステップにおける大きな気液界面のために、標準トレ凍結の凍結乾燥と対比してタンパク質凝集を増加させることを示してきた。10 μm 噴霧液滴に関する、S F D における約 6000 cm^{-1} の気液界面の大きな面積／体積は、界面におけるタンパク質吸着、変性及び凝集をもたらし得る。S W I F T の場合、液体タンパク質溶液が空気に触れる唯一の部位が、ガラスバイアルの内側の液体界面であるため、気液界面は最小化される。その結果、推定気液界面は、約 4 cm^{-1} の S F D と比較して 3 桁減少する。よって、1 B 7 は、S W I F T 凍結及び凍結乾燥後の乾燥粉末形態から単量体へと再構成した後に安定性を維持すると予測され、それは実際に判明した。

20

30

【0291】

T F F 及び S F D 等、他の急速な凍結技法と比較した S W I F T 凍結の実際的な利点の一つに、最終投薬バイアルにおいて直接的に凍結する能力がある。このアプローチは、無菌的条件を維持しつつ固体を移動する、コストのかかるステップの必要を回避する。この場合、20 mg/ml 濃度の 80 mg 投薬量のタンパク質が必要とされるのであれば、本試験において用いる 8 ml バイアルは、凍結及び再構成バイアルの両方として機能することができる。しかし、S W I F T 凍結の冷却速度は、用いる液体寒剤及びガラスバイアルの厚さ並びに用いる材料の熱伝達係数により管理されるため、バイアルは、容易にスケールアップ又はダウンして、投薬量要件を満たすことができる。その上、最終バイアルへの移動ステップを除くことにより、凍結乾燥後のタンパク質を全て回収し、最終投薬量の生成において利用することができる。

40

【0292】

分散系における 1 B 7 粒子のコロイド特性評価：コロイド的に安定的な透明分散系を形成するため、S W I F T により作製された抗体及びトレハロースの乾燥サブミクロン粒子を、特別に処方した分散バッファーと組み合わせた。タンパク質溶解度を低下させるため、このバッファーは、抗体 p I（p H 7. 2）となるよう調整した 50 mM リン酸バッファー並びに 2 種の追加的な群集化剤：容量による 20 % n -メチル-2-ピロリドン（N M P）及び 10 % ポリエチレングリコール 300（P E G 300）を包含する。S W I F T 粒子及び分散バッファーを組み合わせた後、乾燥粉末に含有されるトレハロースは溶解するであろう。トレハロースの画分は溶液中に拡散し、ヒツジ I g G に対して以前に観察

50

された通り、群集化剤の体積分率を増加させるであろう (Miller 2011)。十分な分散バッファーを乾燥粉末に添加して、群集化剤の最終体積分率 (ϕ) が 0.34 である最終抗体濃度 160~200 mg/ml を得た。

【0293】

これらの条件下において、低容量 (60 μ l) セルを用いた分散系の DLS 解析は、約 200+/-14 nm 直径を有する粒子の単一集団を同定する。各回 3 回複製して測定した 3 回の別個の試験においてこのコロイドサイズが再現され、その代表的な曲線を図 32 に示す。100 mg/ml となるよう分散バッファーに希釈し、SEM ステージ上で急速に凍結及び凍結乾燥した後の分散系の SEM 画像により、この粒子サイズをさらに確認した (図 33)。図 33 は、DLS 測定値と一致するサイズであるが、結晶化したトレハロースでコーティングされているために異なる形状のナノ粒子を示す。以前に、より低いトレハロース濃度における分散したヒツジ IgG 及び 1B7 粒子の SEM 及び STEM 画像は、より小型の粒子のクラスターとして分散した粒子を可視化した (Miller 2011)。分散バッファーを添加してトレハロース濃度を低下させ、同時に 1B7 濃度を 40 mg/ml に低下させた後、現在の製剤に対して同様の画像を得た (図 15C)。これらの結果が、1B7 ナノ粒子の溶解に影響されていないことを確認するため、以前に報告された方法を用いて、分散バッファーにおける 1B7 溶解度を測定した (Miller 2011)。200 mg/ml 分散系から出発して、添加する分散バッファーを漸進的に加えてタンパク質濃度を低下させ、得られた粒子サイズを DLS により測定した (図 32)。タンパク質濃度が 2.5 mg/ml 以下に低下するまで、約 200 nm における単一ピークが観察できた。この濃度において、単一のモノクローナル抗体分子の水力学的直径に相当する、単一の約 10 nm ピークのみ存在した。これらのデータから、この分散バッファーにおける 1B7 の溶解度が、約 2.5 mg/ml であり、トレハロース、PEG 及び NMP により形成された 1B7 ナノ粒子が、完全に可逆的であると結論することができる。

【0294】

分散した粒子を形成し、それぞれタンパク質分子及びコロイドレベルにおける分子間引力的及び反発的相互作用のバランスを取ることに由来するコロイド安定性を提示した (Miller, 2011)。簡潔に説明すると、個々のタンパク質分子は、低いタンパク質溶解度を生じる疎水性相互作用、水素結合及び電荷双極子相互作用等、高度に引力的な枯渇及び特定短距離相互作用を受ける (Miller 2011)。1B7 の pI 付近では、静電反発力は相対的に弱く、よって、個々のタンパク質分子間で引力が優位に立つ。しかし、ひとたびこれらの分子がナノクラスターに集合すると、粒子間の相互作用は僅かに反発的となり、優勢なサイズを安定化する (Miller 2011)。クラスター表面上の各タンパク質単量体は、少数の電荷を有するであろう。粒子表面における全単量体を合計すると、反発的相互作用は有意となる (Miller 2011)。クラスター間の平均距離は、コロイドサイズが増加するにつれて増加するため、クラスター間の引力特異的 (Attractive specific) 及び短距離枯渇引力相互作用は最小化されるが、これらの力が作用する距離は固定化される。同一の力を発揮するため、10 nm タンパク質単量体における 1 nm 範囲との相互作用は、200 コロイドにおける 20 nm にわたり作用する必要があるであろう。クラスター間において、短距離引力相互作用は、ヒツジ IgG に関して以前に示された通りに (Miller 2011)、タンパク質ナノクラスターのコロイド的に安定的な分散系を生じる静電反発力と相対的に無視できる。安定的な抗体分散系を処方し、斥力の平衡を保つため、枯渇引力は、群集化剤の濃度を変動させることにより調整される必要がある (Miller, 2011)。本明細書及び以前に (Miller 2011) に観察された通り、クラウダー濃度の増加は、枯渇引力相互作用により 1B7 溶解度を劇的に低下させる。1B7 及びヒツジ IgG 分散系はどちらも、単一群集化剤、トレハロースと処方することができるが、本明細書における三元クラウダー系は、溶解度を調整するため、高度に可溶性のタンパク質を有する分散系を処方するため、或いはナノクラスターサイズ、タンパク質安定性、分散系粘度及び送達の際のナノクラスター分解をさ

らに制御するためのさらなる柔軟性を提供する。

【0295】

約190 mg/ml 1B7分散系の見かけ上の低粘度、24 cPを、25ゲージ1.5インチ針を通る粘度として測定した。この粘度測定は、モノクローナル抗体及びリゾチーム (lysozyme) の非水性懸濁液の高度に濃縮された溶液の皮下注射に関して以前に特徴付けた。見かけ上の分散系粘度は通常、クリーガー・ドアティ方程式 (Eq. 26) を用いた固有粘度、 $[\eta]$ 、粒子の最大体積分率、 $\phi_{\max}$ 及び溶媒粘度、 η_o の関数として説明される。

【0296】

【数25】

10

$$\frac{\eta}{\eta_o} = \left[1 - \left(\frac{\phi}{\phi_{\max}} \right) \right]^{-[\eta]\phi_{\max}} \quad (26)$$

【0297】

η_o 又は $[\eta]$ (剛体球コロイドで最小2.5) を下げ、 $\phi_{\max}$ を増加させることにより、 η を低下させることができる。溶液における高濃度、例えば $\Phi = 0.1 \sim 0.3$ のタンパク質分子のため、強い短距離特異的引力相互作用は、多くの場合、剛体球値の5~100倍の粘度を生じる。150 mg/mL濃度のモノクローナル抗体溶液のため、100 cPを超える粘度は、分析的超遠心による測定値に基づき、タンパク質分子の可逆的自己会合に起因した。対照的に、ナノクラスター分散系の本試験において観察された低粘性は、以前に報告された通り (Miller 2011)、ナノクラスター間の弱い相互作用と一致し得る。

20

【0298】

【表10】

表8: 作製したタンパク質分散系の例

タンパク質	タンパク質濃度 (mg/ml)	トレハロース濃度	ϕ	ϕ_E	Dh
MAb 1B7	220	トレハロース	0.16	0.14	322
Sheep IgG	300	トレハロース	0.21	0.19	85
BSA	350	トレハロース	0.26	0.14	39

30

【0299】

分散系の滅菌ろ過：クラウドとしてトレハロースを用いて、160~170 mg/mL ウシ血清アルブミン分散系 (66 kDaタンパク質) を形成した。分散系は、DLSによりおよそ60 nmの水力学的半径を有することが判明した (詳細に関しては表9を参照)。次に、0.22ミクロンMillex-GV注射器フィルター (Durapore PVDFメンブレン、直径13 mm) を通してこれらの分散系をろ過した。ろ過後の濃度は、本来の分散系とは5%未満異なり、ナノクラスターはDLSにより観察することができた。

40

【0300】

【表 1 1】

表 9: 滅菌ろ過実験

分散系	ろ過前濃度 (mg/mL)	ろ過後濃度 (mg/mL)	ろ過前クラス ターサイズ (nm)	ろ過後クラス ターサイズ (nm)
200 mg/mL 1:1 BSA: Tre, 20% NMP, 10% PEG	160	161	57.7	31.9
250 mg/mL 1:1 BSA: Tre	174	168	54.5	31.9

10

【0 3 0 1】

分散系における 1 B 7 の *in vitro* 分子安定性：複数の技法を用いて、分散系内に含有される及び希釈後の抗体の立体構造を評価した。ヒツジ Ig G に関して以前に報告された (Miller 2011) トリプトファン蛍光アッセイにおいて、トリプトファン蛍光アッセイにより測定された、溶媒曝露したトリプトファンの最大発光波長の変化は観察されず、この結果は、分散した粒子内における活性タンパク質構造の保存を示唆する。200 mg/mL 分散系から PBS に 10 倍希釈した後に、DLS は、単一抗体単量体に予想される通り、約 10 nm 水力学的直径を有する単一種を測定した (図 3 2)。SWIFT 凍結し凍結乾燥した粉末から再構成された 1 B 7 と同様に、より大型の粒子の欠如は、抗体が分散後に不可逆的凝集体を形成せず、急速な希釈後にその個々の単量体サイズを回復できることを示唆する。このことは、抗体単量体に相当する約 150 kDa の分子量を有する単一バンドが観察される、非還元 SDS-PAGE によりさらに確認され (図 3 4 A)、不可逆的チオール結合した SDS 抵抗性凝集体の非存在を示す。最後に、抗体の特異的 PTx 結合活性をモニターするための ELISA は、未処理対照と対比して、分散系の形成又は希釈により活性に有意な変化がないことを明らかにする (図 3 4 B)。

20

【0 3 0 2】

in vivo 注射後に有害免疫原性応答を誘導することなく治療上の有効性を維持するため (Saluja and Kalonia)、抗体の立体構造的安定性は、乾燥、凍結乾燥した粉末の作製から、分散バッファーにおける粉末の分散までの加工及び送達ステップを経る度に維持されなければならない。タンパク質分子の不安定性は、化学的分解と物理的変性の両方を包含するが、物理的変性のタンパク質濃度におけるより高次の依存性は、安定的高タンパク質濃度製剤の開発成功のためのより過酷な課題であると予想され、よってさらに詳細に検査される (Saluja and Kalonia)。上文に記す通り、SWIFT 凍結及び凍結乾燥により形成されるタンパク質粉末は、活性を失わず、バッファーにおける再構成後に凝集体を発生しなかった。分散した粒子内におけるタンパク質の安定性は、各粒子内の高いタンパク質体積分率により維持される。高いタンパク質体積分率は、タンパク質自己群集性効果に、タンパク質の天然にフォールディングした最小表面積立体構造の熱力学的適合性を生じさせる (Shen、Cheung ら、2006; Miller 2011)。天然にフォールディングしたタンパク質の分率を増加させる自己群集性の概念は、セル内のタンパク質が、高濃度の分子群集化剤により安定化されるという考えと同様のものである。自己群集性の事例において、唯一の差は、タンパク質が、それ自身の分子群集化剤として作用することである (Shen、Cheung ら、2006)。固体タンパク質結晶と比較した場合の結果として、本明細書において形成される無定形タンパク質粒子と、結晶性タンパク質粒子との間の差は、タンパク質の天然立体構造の安定性の低下をもたらさない。自己群集性による天然タンパク質状態のエントロピー安定化は、理論的議論において以前に示されたことがあるが (Shen、Cheun

30

40

50

gら、2006)、しかし、タンパク質溶液は必要とされる高い (>0.15) 体積分率を達成できないため、これは、タンパク質分散系に対して近年ようやく実現された (Miller 2011)。その上、分散系におけるタンパク質分子のアンフォールディング及び凝集も、溶液状態と対比した、固体状態のタンパク質可動性減少により低下する。動力学的には、分散系における粒子の外側のタンパク質分子も、凝集体形成をもたらし得る衝突の低下により安定化される (Miller 2011)。

【0303】

濃縮分散系からの希釈後における活性タンパク質の保持及び検出可能なタンパク質凝集体の欠如は、潜在的な *in vivo* タンパク質安定性の重要な兆候である。50 mg/ml を超える溶解度を有する高表面/体積 200 nm 粒子の Noyes-Whitney 方程式を用いて予測される PBS における溶解時間は、1 秒未満である。以前の試験において、ミスフォールディングしたタンパク質は、遅い溶解過程においてリフォールディングしていた (Webb 2002)。本試験において、タンパク質は、フォールディング状態から始まり、急速溶解においてアンフォールディングする時間は殆どない。その上、分散系製剤に存在する分子クラウダーは、タンパク質粒子周囲の境界層においても同時に存在し、フォールディング状態の保存に役立つであろう (Zhou、Rivas ら、2008)。1B7 に関して、DLS 及び ELISA 測定により、一定のクラウダー濃度でタンパク質を希釈した後に高いタンパク質安定性が観察され、この急速な溶解/群集化機序と一致した (Miller 2011)。クラスターが天然にフォールディングし、可逆性であるという事実は、クラスターの溶解におけるタンパク質安定性の維持に非常に有益である。ヒッジ IgG により、一定のタンパク質濃度において、ナノ粒子サイズの着実な減少が、単一の低分子量クラウダー、トレハロースの希釈により達成されて、引力を弱めた (Miller 2011)。各ステップにおいて、クラスターにおけるタンパク質はフォールディングしていることが判明し、クラスターの溶解によるタンパク質の完全活性が ELISA により確認された (Miller 2011)。クラスター表面におけるタンパク質分子は内部タンパク質分子により密集され、外面においては糖分子により密集される。フォールディング分子は、クラスター表面から PBS 培地へと急速に拡散すると、DLS 及び ELISA 試験によって示される通りフォールディングを維持する。

【0304】

分散系からの安定的 1B7 の *in vivo* バイオアベイラビリティ：皮下注射後に急速に溶解する (<1 秒の予測溶解時間) 分散系の *in vivo* 溶解を模倣する、信頼における *in vitro* モデルは存在しない。よって、マウスモデルを用いて、薬物動態パラメータと共に、*in vivo* 溶解した抗体材料の比活性を測定した。5 種の処理群は、3 種の対照群を包含して、低容量、高濃度及び大容量、高濃度分散系被験群の直接的な PK 比較を可能にした。対照群に、標準抗体用量 (100 μ l における 4.6 ~ 5.6 mg/kg 送達) を与えて、抗体溶液の皮下分散系注射並びに静脈内及び皮下送達に由来する薬物動態の直接的な比較を可能にした。第 4 の群は、*in vivo* 溶解速度及び得られる薬物動態における分散系濃度及び送達容量の複合効果を評価するよう設計した。これらマウスに、少量の 1 μ l 容量における高濃度分散系 (182 mg/ml) として投与した標準用量 (7.3 mg/kg) を与えた。第 5 の群は、分散系等、高濃度、低粘性の製剤によってのみ達成できる超高用量を投与するよう設計した。これらマウスに、他の群よりも 10 倍高い用量 (100 μ l における 51.6 mg/kg) を与えた。全群に対して、14 日間にわたり尾静脈から血清試料を採取し、それぞれストレプトアビジン及び PTx 捕捉 ELISA により、各試料における合計及び活性 1B7 抗体の濃度を測定した。終末時点に存在する抗体の効力を、抗体を介した毒素活性阻害に基づく *in vitro* 活性アッセイによっても評価した。

【0305】

全体的に見て、1B7 薬物動態プロファイルは全群で非常に似ており、殆ど同一の分布及び排出動態を有する。主要な差は、注射部位及び注射容量に起因し、最大濃度に達する時間 (t_{max}) 及び最大濃度の値 (C_{max} /用量) に影響を及ぼす。3 種の対照群に先ず着

目すると、皮下分散系による送達、溶液の I V 及び S Q 送達と比較して、爆発相の低下（より低い C_{max} / 用量及び遅延した t_{max} ）をもたらした（表 7；図 13）。I V 溶液群は、第 1 の測定時点（12 時間）において最大血清濃度に達し、続いて抗体が組織全体に分布するにつれて急速に減少した（Miller 2011）。比較において、S Q 溶液群は、僅かに低下した C_{max} / 用量（24 対 18 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{mg}/\text{kg}$ ）及び統計学的に有意に遅延した t_{max} （12 対 21 時間； $p < 0.05$ ）を表示した。I V 投与した材料は、血液容量において直ちに希釈されるが、S Q 投与した材料は、注射部位から間質液を通して拡散して、血液容量における分布前にリンパ管及び血管に達して、これらの P K パラメータを遅延させるに違いない（図 15 A）（Miller 2011）。S Q 分散系注射は、S Q 溶液と同様の傾向を提示するが、S Q 溶液と比較してより低い C_{max} 及び遅延した t_{max} を有していた。効果は、100 μl 容量の代わりに 1 μl 容量として注射される S Q 分散系 2 により最小化されるため、これは、混合及び抗体拡散における分散バッファの効果を反映し得る。この試料に関して、 t_{max} は、S Q 溶液のものと同一（誤差内）であった。

【0306】

最大血清濃度が達成されると、全群は、同様の 1 B 7 薬物動態を示す。図 13 から分かる通り、これらのデータは、P T x E L I S A により測定される 1 B 7 濃度に基づき、全群で実験誤差内の α 分布及び β 排出時間定数を有する二相性指数関数的プロファイルに適合する（表 7）。総タンパク質 E L I S A アッセイ（結果図示せず）を用いて測定した場合、 β 排出半減期も全群で誤差内であった。分布相は、1 B 7 濃度勾配及び高まった血管圧により推進される、十分に混合した血液容量から他の組織への受動的抗体拡散を表すが、抗体排出速度は、F c R n 等、特異的な受容体との相互作用により制御される。とりわけ、どちらの機序も、単量体の適切にフォールディングした抗体分子を必要とする。可溶性凝集体は、より大きなサイズを有し、結果的に、より大きな拡散定数及びより遅い $t_{1/2\alpha}$ を有し、一方、ミスフォールディングした単量体又は可溶性凝集体は、F c R n に対し異なる結合動態及び異なる $t_{1/2}$ ベータを提示するであろう。活性 1 B 7 単量体が分散系希釈後に急速に回復される、本出願人らの *in vitro* 観察と同様に、全群で観察される同様の動態は、S Q 分散系として送達される抗体が、活性、単量体形態を保持しつつナノクラスターから解離し、注射部位から拡散することができることを示す。

【0307】

上文に記載されている試験をマウスにおいて行い、大量の体重当たりの注射容量（100 $\mu\text{l}/25\text{g}$ ）により、同一濃度で処方された溶液及び分散系間の直接比較を可能にした。S Q 注射は、約 1.5 ml 容量に制限されているため、ヒトにおける同様の比較は不可能である。分散系が、ヒトに適した投薬量を達成できることを立証するため、ヒト用量のスケールダウンバージョンとして群 4 を用意した。そこで、最終 7.6 mg/kg マウス投薬量のため、1 μl 容量の高度に濃縮した分散系（182 mg/ml ）を皮下投与した。ヒト投薬量を計算するためにスケールアップしてみると、182 mg/ml 分散系を 1.5 ml 容量で投与することができ、これは、現在の投薬指針（2 mg/kg ）を超える 4.3 mg/kg ヒト用量と同等である。分散系が、溶液では現在まだ達成できていない超高抗体投薬量の低頻度の投与をもたらす可能性を評価するため、群 5 マウスに、51.6 mg/kg 用量のために、大量の 100 μl 注射容量の高度に濃縮した分散系（182 mg/ml ）を与えた。この群も、同様の薬物動態（同様の t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 α 、 $t_{1/2}$ 、 β ）及び 1 B 7 バイオアベイラビリティを提示し、濃度及び用量非依存的な薬物動態を示した。

【0308】

抗体の質の直交性測定値を得て、抗原 E L I S A を補完するため、本出願人らは、終末時点から得た血清を用いた *in vitro* C H O 細胞中和アッセイによる 1 B 7 生物活性を測定した。遊離型 P T x は、細胞表面受容体と結合し、受容体介在性エンドサイトーシスと、最終的には $G_{i/o}$ カップルした受容体の A D P-リボシル化を行うであろう。これは表現型としては、接触障害の喪失を生じ、C H O 細胞はクラスター型形態へと成長

する。抗体を介したPTxの中和は、細胞への毒素侵入を遮断し、正常な成長表現型を保護する。固定されたPTx濃度の存在下で血清を希釈し、CHO細胞を添加し、24時間の成長後、正常又はクラスター化形態に関して点数化した。CHO細胞クラスターリングを完全に妨げる最高血清希釈を記録し、精製した対照1B7抗体に対して比較した。このアッセイは、1 µg抗体基盤当たりの力価において群間に統計学的有意差を生じなかった。このアッセイに基づく、注射部位（SQ対IV）又は製剤の結果による抗体効力の喪失の証拠はない（表7）。ウエスタンブロット解析を用いて、不溶性又はジスルフィド結合した凝集体の形成等、製剤及び投与経路に起因する血清抗体における肉眼的物理的变化がないことを立証した（図35）。

【0309】

in vitro及びin vivoデータの両方により示される通り、分散系内のタンパク質は、いかなる加工ステップにおいても、或いは溶解及び全身吸収後に、天然立体構造の検出可能な喪失を示さない。分散系内において以前に記載された通り、天然立体構造は、タンパク質自己群集性により維持され、群集化剤の添加は、天然立体構造をエントロピー的に安定化する（Shen、Cheungら、2009）。溶解後に凝集が起こるには、天然タンパク質が、凝集を起こし易い中間体へと可逆的にアンフォールディングし、別の凝集を起こし易いタンパク質分子と衝突する必要がある、これにより、タンパク質の不可逆的不活性化をもたらす。in vitro希釈実験と同様に、in vivoにおいて当初、分散系内のクラウダー（トレハロース、PEG及びNMP）は、粒子が溶解する際に存在し続けており、よって、タンパク質がアンフォールディングするのをエントロピー的に妨げる。速い溶解時間により、分散系由来の近くのクラウダーは、タンパク質のアンフォールディング防止に役立つであろう。in vivoにおいて、分散系由来のクラウダーは希釈されるため、SQ注射周囲の細胞外環境又は血流中における追加的なクラウダーは、タンパク質安定性の維持に役立つであろう。よって、注射部位付近における1B7のin vivo粒子溶解及び分布において、クラウダーの安定化は、注射由来であれ、体内における自然発生であれ、凝集を起こし易いタンパク質中間体の数を低下させる。さらに、速い溶解動態は、治療用タンパク質を希釈し、凝集体の形成をもたらす衝突数を減少させるであろう。溶解したクラウダーは注射後に希釈されるため、個々のタンパク質分子がin vitro試験と同様にナノクラスター表面から拡散する場合、自己群集性による安定化が、ナノクラスター中の残りのタンパク質分子に依然として存在するであろう。いずれの試料においても抗薬物抗体産生の傾向が検出されないため、予備的免疫原性試験は、この結論を支持する。したがって、CHOアッセイの結果により、分散系由来のタンパク質粒子は、in vivo注射後であっても恐らく天然抗体状態を保持するであろう。

【0310】

本明細書に記載されているナノクラスター分散系は、in vitro又はin vivoにおける抗体構造又は活性における検出可能な喪失がなく、マウスに皮下投与されると同様の薬物動態を有する、高濃度且つ低粘性のモノクローナル抗体の製剤を可能にする。治療関連の抗体、1B7（Sutherland and Maynard 2009）の高度に濃縮された約200 mg/ml水性ベースの分散系を、トレハロース、PEG及びNMP等、複数の群集化剤を有する水性バッファーにおいて1:1重量比のトレハロースを含有する安定的、サブミクロンタンパク質粒子（例えば、ナノクラスター）から形成した。渦巻き式その場フィルム技術（SWIFT）を用いた、投薬バイアルにおける急速な凍結によりこれらの粒子を作製して、タンパク質変性及び凝集を最小化した。薬学的に許容される群集化剤、PEG 300及びNMPを、トレハロースと共に乾燥粉末から添加して、分散系の形成を容易にすることにより、1B7の溶解度は、水性ベースの溶媒において低下した。

【0311】

タンパク質におけるトリプトファン残基の蛍光により示される通り、本明細書に記載されているタンパク質粒子は、分散系におけるその天然立体構造を保持した。分散系を純粋

10

20

30

40

50

バッファーに希釈した後の追加的な解析、ELISA、DLS及びSDS-PAGEは、タンパク質が、完全活性を有する単量体形態を急速に回復することを示す。同様の *in vivo* 分布及び排出半減期は、同様の用量の分散系及び溶液製剤から測定し、一方、ピーク血清濃度 (t_{max}) までの時間は、SQ注射において遅延し、この注射部位からの予想されるさらに遅い拡散動態と一致した。ELISAと、*in vitro* PTx中和検定による特異的PTx結合活性は、1B7活性又は抗1B7免疫応答発生の喪失を検出することができなかった。本発明に記載されている低粘性且つ有利なバイオアベイラビリティを有する、安定的で高度に濃縮したタンパク質療法の分散系を形成する能力は、恐らくは多くの慢性疾患の治療のための皮下注射の潜在的使用を増加させるであろう。

【0312】

実施例 I I I

細胞内の密集した巨大分子環境 (約 400 mg/ml) は、アンフォールディングした立体構造よりも、詰め込まれた天然状態のタンパク質を好むことが知られている (Hartl and Hayer-Hartl 2002; Zhou, Rivasら、2008)。スケール粒子理論 (Davis-Searles, Saundersら、2001; Zhou, Rivasら、2008)、シミュレーション (Hall and Minton 2003; Cheung and Truskett 2005; Shen, Cheungら、2006) 及び実験 (Kendrick, Carpenterら、1998; Krishnan, Chiら、2002; Cheung, Klimovら、2005; Zhou, Rivasら、2008; Dhar, Samiotakisら、2010) により記載されている通り、細胞内のみならず、*in vitro* (Hall and Minton 2003; Cheung and Truskett 2005; Cheung, Klimovら、2005; Oconnor, Debenedettiら、2007; Zhou, Rivasら、2008; Dhar, Samiotakisら、2010; Pielak and Miklos 2010) において、タンパク質は、他の巨大分子 (体積分率 Φ 約 $0.3 \sim 0.4$) の存在によりアンフォールディングに対して安定化され、これにより、より拡張した、非天然タンパク質立体構造を効果的に「締め出す (crowd out)」 (即ち、エントロピー的に不利にする)。荒削りのモデル (Cheung and Truskett 2005; Shen, Cheungら、2006) によるシミュレーション及び理論も、溶液における高濃度 ($c > 400\text{ mg/ml}$) の単一種類のタンパク質が、相互又は自己群集性機序による詰め込まれたフォールディング状態を好むことを予測する。しかし、タンパク質は、可溶性があまり高くなく、一部には特定短距離引力相互作用、特に水素結合及び疎水性相互作用により相当に低濃度でゲル化する傾向があるため、このような超高濃度の安定的タンパク質溶液は、実験により実現されていなかった (Rosenbaum, Zamoraら、1996; ten Wolde and Frenkel 1997; Shire, Shahrokhrら、2004; Zaccarelli 2007; Zhou, Rivasら、2008; Scherer, Liuら、2010)。実際には、 $100 \sim 200\text{ mg/ml}$ の濃度において、溶液におけるタンパク質は通常、不可逆的凝集 (Fields, Alonsoら、1992; Zhou, Rivasら、2008; Young and Roberts 2009; Scherer, Liuら、2010)、ゲル化及び沈殿 (Rosenbaum, Zamoraら、1996; ten Wolde and Frenkel 1997; Shire, Shahrokhrら、2004; Zaccarelli 2007) を行う。したがって、ゲル化を回避するため、自己群集性により天然立体構造を安定化するのに十分なほど高い「局所的」タンパク質濃度を同時に達成しつつ、新規の種類 of 安定的且つ可逆的タンパク質集合体 (例えば、ナノクラスター) が必要とされる。

【0313】

タンパク質溶液のナノクラスター形成及び相挙動への洞察は、モデルポリマー型コロイド懸濁液の検討から得ることがきる (Gast, Hallら、1983; Rosenbaum, Zamoraら、1996; Sedgwick, Egelhaafら、2004;

10

20

30

40

50

Stradner、Sedgwickら、2004；Lu、Conradら、2006；Zaccarelli 2007；Lu、Zaccarelliら、2008）。後者において、調節可能な短距離コロイド引力（例えば、共溶質誘導性枯渇相互作用）が多くの場合存在する（Sedgwick、Egelhaafら、2004；Lu、Zaccarelliら、2008）。このような引力の強化（例えば、共溶質濃度を増加させることによる）は、パーコレートし、続いてコロイド相分離境界付近でゲル化する高度に多分散の粒子集合体の形成をもたらす（Lu、Zaccarelliら、2008）、（Sedgwick、Egelhaafら、2004；Pan、Vekilovら、2010）。相分離及びゲル化は、高濃度の無電荷コロイド間の強い引力に起因する一方（Lu、Conradら、2006；Zaccarelli 2007；Lu、Zaccarelli 10
ら、2008）、粒子間の弱い、より長距離の静電反発力も存在する場合、物理特性は定性的に変化する（Sedgwick、Egelhaafら、2004；Zaccarelli 2007）。このような事例において、平衡モデルにより予測される通り（Groenewold and Kegel 2001；Groenewold and Kegel 2004）、一次コロイド粒子の長寿命の非常に大型のクラスター（即ち、クラスター／対粒子直径比5～10、低いクラスターサイズ多分散による）が、単相有機溶媒において観察された（図36a）（Groenewold and Kegel 2001；Groenewold and Kegel 2004；Sedgwick、Egelhaafら、2004；Stradner、Sedgwickら、2004；Zaccarelli 2007）。単量体スケールにおける短及び長距離相互作用の存在により 20
これらのクラスターが形成され、これは次に、粒子分散系の自己集合及び輸送特性の両方に影響を及ぼす多様なマルチスケール（単量体－単量体、単量体－クラスター及びクラスター－クラスター）相互作用を生じる。

【0314】

今までに観察された水におけるタンパク質のクラスターは、小さく（Stradner、Sedgwickら、2004；Porcar、Falusら、2010）（N約10、クラスター／粒子直径比2.5）、薄く（Pan、Vekilovら、2010）、短寿命（Porcar、Falusら、2010）であった。近年、水におけるAu粒子の可逆的クラスターは、弱く吸着する非電解質によりAu粒子における電荷を調整することにより、直径30～100nm（クラスター／粒子直径比6～20）で集合した（Tam、Murthyら、2010；Tam、Tamら、2010）。さらに近年、ナノクラスターはCdSeに関して報告されていた（Xia、Nguyenら、2011）。引力的及び反発的相互作用の平衡を適切に保ち、大きなタンパク質クラスターを形成することは、依然として課題である。 30

【0315】

上に記すモデルコロイド系と類似して、溶液における有効タンパク質－タンパク質引力の強さは、共溶質の存在により調整することができる。例えば、タンパク質と弱く相互作用する共溶質であっても、タンパク質－タンパク質枯渇引力を生じる（Davis－Searles、Saundersら、2001；Ping、Yangら、2006；Oconnor、Debenedettiら、2007）。これらの枯渇引力は、2個のタンパク質分子の表面が、介在するギャップから共溶質を除外するのに十分なほどに近づいて接近する時に生じる浸透圧不均衡を反映する（図42）。これは、ダイマー又は少数オリゴマーを生成するタンパク質会合の平衡挙動（Minton 1999；Zhou、Rivasら、2008）及び速度（del Alamo、Rivasら、2005；Zhou、Rivasら、2008）に強く影響することが知られている。しかし、この挙動は、タンパク質フォールディング及び／又は部位結合における低（Lee and Timasheff 1981；Kendrick、Carpenterら、1998；Davis－Searles、Saundersら、2001；Krishnan、Chiら、2002；Chi、Krishnanら、2003；Oconnor、Debenedettiら、2007）及び高（Hall and Minton 2003；Zhou、R 40
50

ivasら、2008; Dhar, Samiotakisら、2010; Pielak and Miklos 2010) 分子量共溶質 (クラウド) が有する、他の関連群集 (即ち、排除体積) 効果よりもはるかに低い注目を受けた。タンパク質間の枯渇引力の平均力のポテンシャル、 $V_{dep}(r)$ は、スケール粒子理論 (Davis-Searles、Saundersら、2001; Oconnor、Debenedettiら、2007) 又は朝倉・大沢モデル (Asakura and Oosawa 1958; Vrij 1976; Gast、Hallら、1983; Sharma and Walz 1996; Sedgwick、Egelhaafら、2004; Ping、Yangら、2006; Mutch、van Duijneveldtら、2007; Zaccarelli 2007) により説明される共溶質 (外因性クラウド) の体積分率 Φ_E に比例する。固定された高濃度におけるモデル単量体及びオリゴマー共溶質のため、 V_{dep} は、広範囲の直径において強く引きつける浸透圧性第2のビリアル係数 (外因性クラウド対タンパク質単量体の比) $0.02 \sim 1$ を生じることができる (Asakura and Oosawa 1958; Vrij 1976; Tuinier、Vliegenthartら、2000; Lu、Conradら、2006; Lu、Zaccarelliら、2008)。直径比 0.1 の一例として、 10 nm タンパク質分子及び 1 nm 二糖が挙げられる。よって、モデルコロイドの挙動と同様に、高濃度のトレハロース等、小型のクラウドによる枯渇引力は、弱い静電相互作用の平衡を保ち、大型のタンパク質クラスターを形成するのに十分な引力を生じるよう潜在的に利用することができる。

【0316】

本明細書において、本出願人らは、バッファーに希釈した後に安定的タンパク質単量体へと解離する、タンパク質 (mAb 1B7、ポリクローナルヒツジ IgG 及び BSA) の約 100 nm 平衡クラスターを集合させる。ナノクラスターは、単に、トレハロースを含有する凍結乾燥したタンパク質粉末とバッファー溶液とを、mAb 1B7 は最大 267 mg/ml 、IgG は 350 mg/ml 、BSA は 400 mg/ml のタンパク質濃度となるよう穏やかに混合することにより形成される。水における大型のクラスターを形成させるため、本出願人らは、(1) pI 付近のバッファー pH により正味のタンパク質電荷を最小化して静電反発力を弱め、(2) 高濃度の共溶質 (外因性クラウド)、トレハロースを添加して、強い枯渇引力をもたらす。クラスターのサイズは、動的光散乱 (DLS) により示される通り、共溶質 (クラウド) の濃度を変動させることにより、連続体にわたり可逆的に増加又は減少する。クラスターサイズは、より早い自由エネルギーモデルの拡張により定性的に予測され、クラスターのフラクタル次元 (δ_f) を説明する。 Φ_E 及び pH を調整することにより、本出願人らは、超高内部体積分率 ($\Phi > 0.5$ 又は $c > \text{約 } 700\text{ mg/ml}$) を有する殆ど単分散系の、弱く相互作用するタンパク質ナノクラスターの流体分散系の集合を促進するような仕方で、階層的 (タンパク質-タンパク質、タンパク質-クラスター及びクラスター-クラスター) 相互作用の平衡を保つ。高い内部 c は、理論により示される通り、自己群集性によりタンパク質をそのフォールディング状態で安定化する (Cheung and Trusket 2005; Shen、Cheungら、2006)。

【0317】

クラスターからの送達後のタンパク質の安定性は、タンパク質療法における関心事である。ナノクラスターをバッファーに希釈した後、タンパク質ナノクラスターがタンパク質単量体に解離することが、動的光散乱 (DLS) (Horn 2000)、分子篩クロマトグラフィー (SEC) 及びドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により示される。タンパク質は、円二色性 (CD) によりフォールディング型であり、見かけ上の融解温度 (T_m) の決定により熱力学的に安定的であり (Lavinder、Hariら、2009)、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) により生物活性がある (Sutherland and Maynard 2009) と立証される。最後に、弱いクラスター間相互作用に起因する 40 cP の低粘性は、最大 267 mg/ml 等の濃度の濃縮クラスターの皮下注射を可能にする。これら分散系が解離し

て活性タンパク質を送達する能力を示すため、マウスにより *in vivo* バイオアベイラビリティ試験を行う。血流におけるタンパク質の活性を ELISA 及び *in vitro* 抗体中和アッセイの両方により定量化することにより、分散したタンパク質ナノクラスター用量の薬物動態プロファイルを、希釈抗体溶液の皮下及び静脈内用量の両方と比較する (Sutherland、Changら、2011)。

【0318】

トレハロース及びバッファー希釈によるナノクラスター形態及び同調性 (tunability)

図 36b は、凍結乾燥したタンパク質粉末 (1:1 質量比のトレハロース対タンパク質を含有) を、pI (pH 7.2) のリン酸緩衝溶液に穏やかに攪拌した後直ちに生成されるモノクローナル抗体 1B7 (Sutherland and Maynard 2009) のコロイド的に安定的な透明分散系を示す。タンパク質の濃度、 c 及び外因性クラウダー、トレハロースの濃度、 c_E は、それぞれ 220 mg/ml であった。低濁度は、小さい D_c 並びに多孔質クラスター及び溶媒の屈折率の小さい差の結果である。図 36d に示す分散系におけるこれらクラスターのグラフィックによる可視化を利用して、冷凍調製後の分散系の SEM 画像は、タンパク質単量体とほぼ同じサイズである約 11 nm の一次粒子で構成された、約 300 nm ナノクラスターを明らかにした (図 36c 及び図 43)。ナノクラスターの一次粒子の「ハロー」は、SEM 試料調製におけるトレハロース沈着の結果であり、よって、大した関心事ではない。 $c = c_E = 220 \text{ mg/ml}$ に関して、動的光散乱 (DLS) によるクラスターの平均水力学的直径、 D_c は、315 nm (平均値にまたがる 6% のピーク幅の標準偏差) であり、SEM 画像と一致した (図 37a)。多孔質クラスターに関して、フラクタル次元 (δ_f) の関数としてのクラスター内のタンパク質の体積分率 Φ_{int} を測定したところ (Eq. 22)、静的光散乱 (SLS、図 44) により 0.6 であった。 δ_f は、散乱ベクトルに対する強度の $\log - \log$ プロットにおける傾きである。80 nm IgG クラスターの場合におけるフラクタル次元は、2.6 対 3、2 及び 1 (それぞれ完全に空間充填した球体、円盤及び長く細い棒) であると判明し、これは、タンパク質がナノクラスター内部に高い体積分率を有することを示唆する。

【0319】

一定の c/c_E 比を維持するよう 220 mg/ml 1B7 分散系をリン酸バッファーにおいて連続的に希釈した後、タンパク質分子がクラスター表面から離れたため、 D_c は連続して減少した (図 37a 及び 37b)。続いて、 D_c は、 $c = c_E = 75 \text{ mg/ml}$ に対し約 12.3 nm でプラトーに達し、これは抗体単量体の予想サイズであった。同様に、 c を 70 mg/ml 1B7 に固定したまま、 c_E の 270 から 150 mg/ml への希釈を用いて、それを下回ると約 10 nm の種、恐らく抗体単量体しか観察されない c_E に達するまで、クラスターサイズを調整した (図 37b 及び 37c)。pH 7.2 リン酸バッファーを、 $c = c_E = 100 \text{ mg/ml}$ の少量の分散系と共に用いて、一定の c を維持しつつトレハロース濃度を減少させた。その後、 c_E を再び 270 mg/ml に増加させることにより、本来の D_c 値約 300 nm を回復した。ポリクローナルヒツジ IgG 混合物を用いた同様の実験 (図 37d 並びに図 43b 及び 45) は、同じ傾向を生じた。図 43b は、50 mg/ml に希釈し、続いて冷凍調製した、 $c = c_E = 260 \text{ mg/ml}$ の分散系由来のヒツジ IgG のナノ (nanco) クラスターを示す。IgG ナノクラスターサイズは、 $c_E = 270 \text{ mg/ml}$ における約 80 nm から、一定の $c = 50 \text{ mg/ml}$ における $c_E = 150 \text{ mg/ml}$ の約 10 nm (単量体タンパク質) へと減少した (図 37d) (c_E を増加させる場合、pH 6.4 リン酸バッファー (IgG の pI) における 500 mg/ml トレハロース溶液を $c = c_E = 200 \text{ mg/ml}$ の少量の分散系と共に用いて、一定の c を維持する)。トレハロース濃度の増加、或いは減少により、よく似た値の D_c が観察された。自由エネルギーモデルからの予測により後にさらに説明する通り、ナノクラスターサイズにおけるこの可逆性は、ナノクラスターが平衡状態にあることを示唆する。図 45 に示す通り、分散系を pH 6.4 リン酸バッファーに、 $c = c_E = 260 \text{ mg/ml}$ から $c = c_E = 47 \text{ mg/ml}$ へと順次希釈すると、ヒツジ IgG のクラス

ターサイズも80 nmから11 nm（単量体タンパク質）に減少する。総合すると、これらのデータは、可逆的平衡挙動を有する（これは予想外であった）、水性培地における新規種類の長寿命の（数時間検査した）、十分に定義されたナノクラスターを立証する（Stradner、Sedgwickら、2004；Pan、Vekilovら、2010；Porcar、Falusら、2010）。

【0320】

この技法の普遍性をさらに立証するため、PEG（M. W. 300）、N-メチルピロリドン（NMP）及びデキストラン（M. W. 10,000）等、巨大分子クラウダーによるクラスターも形成した。162 mg/ml濃度のヒツジIgGと、162 mg/mlトレハロース及び20%（v/v）PEG-300を用いたところ、クラスター直径は110 nmであった。157 mg/ml濃度のヒツジIgGと、157 mg/mlトレハロース、10%（v/v）PEG-300及び20%（容量）NMPに関して、クラスターは直径約250 nmであった。また、315 mg/ml BSAと、5%（v/v）PEG 300及び20%（v/v）エタノールは、30 nmサイズ（BSA単量体は4~5 nm）のクラスターを生じた。巨大分子クラウダーによるこれらの例は、本技法の普遍性を例証する。それとは別に、概念実証としてより高いタンパク質濃度における本技法の使用の可能性を立証するため、より高濃度のタンパク質分散系を調製した。図38は、非常に高い c 、400 mg/ml及び $c_E = 240$ mg/mlにおける、 $D_c = 40$ nmを有するBSAのナノクラスターを示す。クラスターにおけるタンパク質単量体の数、約1000個は、mAb 1B7及びヒツジIgGから形成されたクラスターと同じ規模である。ヒツジIgGの高度に濃縮された分散系も図46に示すが、図中、トレハロースが外因性クラウダーである $c = 300$ 及び350 mg/ml並びに $c/c_E = 1:0.5$ に対し、約100 nmの D_c を有するナノクラスターが観察された。

【0321】

ナノクラスター希釈後のタンパク質安定性

高濃度のタンパク質製剤化の重大な懸念は、個々のタンパク質単量体がミスフォールディングし、不可逆的な凝集体を形成する可能性である。これらの事象は、タンパク質分子の動的性質に起因し得る。任意の所定のモーメントにおいて、同一分子の系は、関連する三次元構造のアンサンブルを示し、その一部は、正常に埋まった疎水性パッチを一過的に露出させる。タンパク質は、低濃度においては、その天然立体構造を高頻度で回復させるが、高濃度では、疎水性パッチが露出した2個のタンパク質が衝突し、不可逆的に会合する確率が高くなる（Kendrick、Carpenterら、1998）。このようなミスフォールディングし、不可逆的に凝集したタンパク質は天然構造を示さず、したがって効力低下と、その修飾された見かけ上のサイズ及び露出した表面電荷のため、薬物動態変化を提示する。さらに、このような非天然表面が免疫系に提示されると、治療用タンパク質に対する応答を誘導する可能性があり、これによりそれ自体が生物活性及び薬物動態を変化させるであろう（Tabrizi、Tsengら、2006）。

【0322】

後述する通り、以前の試験（Cheung and Trusket 2005；Shen、Cheungら、2006；Zhou、Rivasら、2008）のシミュレーション結果は、フォールディング状態が、高濃度（即ち、ナノクラスター内の局所的タンパク質濃度に匹敵する値）のモデルタンパク質に非常に好ましいことを示唆する。この仮説を調査するため、ナノクラスターにおけるタンパク質が、ナノクラスターがタンパク質単量体に解離した後にフォールディング状態であるか決定するための、実際の抗体における実験的な試験が必要とされる。不可逆的タンパク質凝集体が、267 mg/mlの本出願人らの1B7ナノクラスター分散系に存在するか決定するため、本出願人らは、一連の生物物理学的及び生化学的検定を行った。長期貯蔵安定性は本研究の範囲外であるため、製剤化の数時間後に分散系を希釈した（実用においては、分散系を生成したらその直後に患者に注射することができる）。しかし、分散系内のタンパク質は、最初の粘度検査によりストレスを加えられ、25ゲージ針を通して引かれ、9500 s⁻¹もの高さであると見

積もられるせん断速度の有意なせん断力に付されたため、ニュートン流体を仮定する。際立つことに、1 mg/ml となるよう PBS に希釈した後に、本出願人らは、溶液における対照抗体と比べて、タンパク質立体構造又は活性の変化を検出できなかった（表 10）。分散系に先立つ PBS における対照 1 B 7 抗体溶液の解析は、見かけ上の熱アンフォールディング遷移温度 (T_m) 68 °C（表 10）と、6.2 M 尿素にアンフォールディング中間点を有する、モノクローナル抗体に特有の安定性（Garber and Demarest 2007）を提示した。分散系の希釈後、 T_m を再度測定したところ 68 °C であった（表 10）。2～3 度の T_m 変化は立体構造安定性の変化を示すため、本データは、平均 1 B 7 熱安定性が変化しなかったことを立証する（Kumar, Sharma ら、2009）。円二色性（CD）を用い、特定の波長における偏光の吸収に応じて、タンパク質における二次構造要素の存在をモニターした。対照溶液及び希釈した分散系のどちらも、217 nm において同じ強い負の（negative）シグナルを保持し、抗体に特徴的なフォールディングした β シート構造を示した（図 39 a 及び表 11）（Chari, Jerath ら、2009）。表 11 は、CDSSSTR 適合アルゴリズムを用いた Dichro web により推定された二次構造を示す。＜0.1 の正規化された平均二乗偏差（NRM SD）は、優れた適合を示すと一般に受け入れられている（Wallace, Jones ら、2009）。表 11 に示す通り、計算されたパーセント β シート構造（抗体における主たる二次構造）は、1 B 7 対照溶液と希釈分散系との間で差がない。

【0323】

最後に、2通りの追加的なサイズ決定方法を用いて、ミスフォールディングした、より大きい分子量の凝集体の小集団が存在するか否かを直接的に評価した。高濃度抗体溶液の解析とは対照的に（Scherer, Liu ら、2010）、希釈した分散系の HPLC 分子篩クロマトグラフィー（HPLC-SEC）及び SDS-PAGE 解析は、初期溶液対照と比較して、より高分子量の凝集体の無視できる程度の増加しか示さない（表 10 並びに図 47 及び 48）。DL S では、鋭敏な単量体ピークにおける凝集体の存在も明らかにされなかった（図 37 a 及び 37 c）。HPLC 分子篩クロマトグラフィーは、非共有結合性及び共有結合性の凝集体から抗体単量体を識別することができ、一方、非還元 SDS-PAGE は、共有結合性マルチマーを検出する。図 47 も、図 37 a 及び 37 c において DL S により示された 1 B 7 分散系の希釈実験における中間ステップの HPLC-SEC データを示す。全事例において、初期溶液対照を超える凝集体の増加は存在しなかった。

【0324】

【表 12】

表 10. 解析に先立ち 1mg/ml になるよう PBS に希釈した、 $c=c_E=267\text{mg/ml}$ のナノクラスター分散系試料における 1B7 安定性及び活性。表示の誤差は $\pm s.d$ である。

試料	T_m (°C) [†]	%単量体(SEC)	EC ₅₀ (ELISA)
対照溶液	67.7 $\pm$ 0.3	98.88 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.24
希釈した分散系(267mg/ml から)	68.3 $\pm$ 0.3	98.59 $\pm$ 0.04	1.03 $\pm$ 0.20

【0325】

【表 1 3】

表 11. 円二色性から 1B7 二次構造の推測

試料	% α ヘリックス	% β 鎖	%ターン(Turn)及び不規則(Unordered)	NRMSD*
対照溶液	0	39	63	0.006
希釈した分散系(267mg/mL から)	1	40	60	0.006

* NRMSD は、計算及び実験 CD スペクトル間の正規化された平均二乗偏差である。全二次構造推測に対し、Dichroweb オンライン解析によるプログラム CDSSTR を用いた。

10

【0 3 2 6】

これらの生物物理学的検査 (SEC、DLS、CD 及び SDS-PAGE) は、タンパク質構造攪乱又は凝集を検出しなかったが、分散した試料が、生物活性を保持しないフォールディングした単量体タンパク質を有する可能性もある。よって、タンパク質濃度 < 10 ng/mL に求められる活性を決定するために、高感度の生物学的アッセイを用いた。リガンド結合活性をモニターするため、捕捉分子として百日咳毒素を用いた間接的 ELISA は、相対 50 % 有効濃度 (EC_{50} 、分散系 / EC_{50} 、対照) の観点から 1B7 活性を測定した。この比は、分散系 (1 mg/mL に希釈後) 対無修飾対照溶液の、最大 ELISA 応答の 50 % を生じる抗体の濃度である。すると、希釈した分散系は 1.03 ± 0.20 の相対活性を生じ、これは、溶液対照による測定値からは識別不能である (表 10) (Crowther and Editor 1995)。この結果は、タンパク質活性の有力な尺度である抗原結合能力が、分散系希釈後に回復された抗体と、溶液対照とで同一であることを立証する。

20

【0 3 2 7】

大型の自己群集ナノクラスターにおける天然タンパク質状態の実験的に立証された安定性は、荒削りの球状タンパク質モデルから予測することができる (Cheung and Trusket 2005; Shen, Cheung ら、2006) (図 39b)。具体的には、ナノクラスター内のタンパク質の極めて高い体積分率 (Φ_{int} 約 0.6) のため、フォールディングしたタンパク質の分率は、単位元 (unity) に近接する。これは、より拡張した非天然立体構造へのアンフォールディングのエントロピー自己群集性 (図 39b、36c 及び 36d における挿入図) ペナルティを反映し、これは、本来であれば低密集環境において天然状態を不安定化し得る他の要因 (例えば、アンフォールディングによる鎖立体構造的エントロピー及び有利な疎水性タンパク質-タンパク質相互作用の両方の増加) を圧倒する。重要なことに、クラスターなしの溶液中の場合タンパク質が凝集しアンフォールディングする全体的な Φ 値であっても、クラスター (> 400 mg/mL) 内の高い Φ_{int} は、自己群集性による天然状態を強く好む。

30

【0 3 2 8】

タンパク質安定性及び立体構造を考慮すると、タンパク質は、希釈後に明らかに活性があり、安定的であり、単量体である。よって、高タンパク質濃度にもかかわらず、不可逆的凝集体はナノクラスター内に存在しなかったと思われる。上に記す通り、ナノクラスター内において、天然立体構造は、タンパク質自己群集性によりエントロピー的に安定化されていると予想される。その上、約 700 mg/mL の高いクラスター内濃度を付与するクラスターにおけるタンパク質の相対的に低い可動性は、本来であれば疎水性パッチ間の接触をもたらし、非天然複合体及び凝集状態を安定化させ得るタンパク質立体構造的変化を動力学的に妨げることができる。

40

【0 3 2 9】

これらの *in vitro* 希釈実験において、急速溶解 (推定 < 1 m 秒) も、本来であれば不可逆的凝集を生じ得るタンパク質衝突の確率を下げる。希釈直後に、濃度及び溶解

50

度勾配は、クラスター内に埋まった分子の自己群集を維持しつつ、ナノクラスター表面から抗体分子を放出させ、よって、クラスター内の安定的にフォールディングしたタンパク質に有利となるであろう。この仮説は、図47及び48に示す通り、 D_c を減少させるクラスター希釈後のHPLC-SECデータ及びSDS-PAGEデータに基づく、凝集体増加の欠如により支持される。最後に、分散系内のトレハロースは、ナノクラスターが溶解する際に存在し、よって、フォールディングしたタンパク質に有利となる。

【0330】

ナノクラスター分散系の粘度

クラスター間の非常に弱い引力は、 $c = 267 \text{ mg/ml}$ の1B7の分散系に、注射器使用できる値である僅か40 cPの粘度を生じた（表12）。同様に、 $c = 275 \text{ mg/ml}$ のポリクローナルヒツジIgGの値は、63 cPであった。しかし、タンパク質がナノクラスターを形成しない $c_E = 0$ の $c = 300 \text{ mg/ml}$ において、IgG溶液の粘度は、溶液が流動しないゲル形態であったため測定できないことが判明した。このゲル化は、間隔の狭いタンパク質分子間の引力の顕在化であった。対照的に、ナノクラスター分散系は、粘度250 cPで、 $c = c_E$ である当該cにおいて流動した。将来的には、外因性クラウダーの組成を最適化することにより、粘度をさらに下げることができよう。

【0331】

【表14】

表12. モノクローナル1B7抗体及びポリクローナルヒツジIgG分散系の粘度及び水力学的直径。

タンパク質濃度 (c , mg/ml)	トレハロース濃度 (c_E , mg/ml)	粘度 (η , cP)	水力学的直径	水力学的直径標準偏差
267 (1B7)	270	40	315	17
275 (IgG)	275	63	88.0	9.0

【0332】

マウスにおけるタンパク質安定性及び薬物動態のin vivo試験

タンパク質ナノクラスター分散系の薬物送達の可能性を検査するため、本出願人は、マウスにおけるin vivo薬物動態（PK）試験を行った。対照群に、静脈内（intravenous）又は皮下注射により100 μl の希釈抗体溶液を与え、完全バイオアベイラビリティとして定義されるベースラインを得た。高度に濃縮した235 mg/ml ナノクラスター分散系を用いて、pH7.2において1 μl を皮下注射した（表13）。この分散系の粘度は、40 cPをはるかに下回り（表12を参照）、これは、皮下注射のための一般的な限界50 cPを下回る。際立つことに、正規化されたバイオアベイラビリティ（AUC/用量）、 $C_{\max}/\text{用量}$ 、 $t_{\max}$ 及び排出動態等、得られたPKパラメータは、2種の皮下群のパラメータから統計学的に識別不能であった（図41）。同様のバイオアベイラビリティは、容易に解離した（バッファーにおける予測時間は7 ms、Eq. 24）ナノクラスターにおける抗体分子が、注射部位から輸送されて血流に進入することを示唆するが、同一アルファ及びベータ率は、血液における主に単量体の抗体の存在を示す。仮に抗体が溶解の際に凝集又はミスフォールディングするとすれば、分子量及び表面特性が変化し、続いて腎臓及び肝臓クリアランス速度に影響を及ぼすであろう（Tabrizi、T sengら、2006）。最後に、in vitro毒素中和検査による終末血液試料における抗体活性の解析は、対照抗体と対比して同様の活性を示し、抗体立体構造に加えて、活性も影響を受けなかったことを示す。BSAに対し400 mg/ml 、ポリクローナルIgGに対し350 mg/ml の最大分散系濃度が達成されたことを考慮すると、このナノクラスター薬物送達概念は、さらに高い投薬量に拡張できると思われる（図38及び46）。分散系は、粉末及びバッファーを混合し、続いて長期貯蔵安定性の必

要性を回避するため、その後直ちに注射することにより生成することができた。生理的 pH から 2 単位を超えて離れた等電点のタンパク質に関して、このアプローチは、静電反発力を克服するためさらに濃い濃度のクラウダーを必要とし得る。

【0333】

【表15】

表 13. 図 41 に示す曲線の薬物動態パラメータ。誤差は $\pm$ s.d.。

製剤	$C_{\max}$ /用量 ($\mu\text{g/ml}$)/(mg/kg)	$AUC_{0-\infty}$ /用量 ($\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$)/(mg/kg)	$t_{\max}$ (時間)	$t_{1/2,\alpha}$ (時間)	$t_{1/2,\beta}$ (時間)	相対中和力価
IV 溶液	25.5 ± 3.8	3582 ± 990	15.1 ± 0.7	45.7 ± 22.8	227.1 ± 24.9	2.3 ± 1.7
SQ 溶液	18.8 ± 4.4	2699 ± 583	18.9 ± 3.1	43.4 ± 17.3	210.0 ± 17.4	1.0 ± 1.8
SQ ナノクラスター分散系	14.3 ± 3.1	3269 ± 291	21.4 ± 2.9	42.1 ± 24.8	243.2 ± 35.5	1.3 ± 0.5

【0334】

凍結乾燥したタンパク質、外因性クラウダー及びバッファーを単に混合することにより、希釈後に *in vitro* で高い立体構造的安定性及び *in vivo* で高い生物活性を有する、単分散系平衡ナノクラスターにおける濃縮タンパク質の低粘性分散系を生成した。1B7 ナノクラスターの希釈により実験的に確認された通り、異常な高濃度 700 mg/ml におけるナノクラスター内タンパク質の高度の自己群集性は、フォールディングを好むことが理論的に示される。実験及び自由エネルギーモデルの両方により示される通り、ナノクラスターのサイズは、pI 付近においてタンパク質及び外因性クラウダー濃度を調整することにより調節可能である。自己群集したクラスター及び低粘性を同時に達成する能力は、タンパク質単量体レベルで優勢の引力、クラスター間レベルの反発及び単量体-クラスター相互作用における両者の中立的なバランスによる、マルチスケール相互作用調整の一般概念に起因する。クラスター間反発は、ゲル化なしのコロイド的安定性及び低粘性を好む。際立つことに、種々の物理的、化学的及び生物学的アッセイによる解析は、ナノクラスター分散系の希釈後にタンパク質活性を全く失わない、立体構造的に安定的なタンパク質単量体を示した。分散した抗体の *in vivo* 皮下投与は、対照抗体溶液と比較して識別不能な薬物動態及び活性をもたらした。群集化剤による等電点付近の pH のタンパク質ナノクラスターの分散系を処方するためのこの一般的なアプローチは、溶液として処方すると本来であればゲル化してしまう、種々の治療用生物製剤の皮下投与の可能性を生じる。

【0335】

ナノクラスター分散系の形成

以前に報告 (Sutherland and Maynard 2009) された通りにマウス IgG2a 抗体 1B7 を発現、精製及び特性評価した後、銀染色した等電点電気泳動ゲルにより pI を決定した。凍結乾燥に先立ち、50,000 分子量カットオフ (MWCO) Centricon フィルターを用いて、1B7 溶液を 20 mM ヒスチジンバッファー (pH 5.5) へとバッファー交換し、1:1 のタンパク質:トレハロース重量比となるよう凍結保護物質として固体 α , α -トレハロースを添加した。溶液をろ過滅菌 ($0.22 \mu\text{m}$) し、 20 mg/ml タンパク質となるよう 20 mM ヒスチジンバッファー (pH 5.5) で希釈し、無菌 8 ml ガラスバイアルに移した。これを予冷した凍結乾燥機トレイにおいて -40°C で 6 時間にわたり凍結し (VirTis Advantage Plus Benchtop Freeze Dryer)、続いて、 -40°C におけ

る12時間の一次乾燥と、続く6時間かけて25℃へと傾斜させ、25℃におけるさらに6時間の二次乾燥により、150mトルで凍結乾燥した。分散系を作製するため、通常28mg±0.02mgの凍結乾燥したタンパク質を、風袋重量を計った(tared)0.1ml円錐状バイアル(Wheaton Science Products)に詰め込んだ。50mMリン酸ナトリウムバッファー(pH7.2)を添加した後、得られた分散系を25ゲージ針の先端で穏やかに攪拌した。公知の質量に基づく理想混合並びに仮説上の純粋液体タンパク質(1.35g/cm³)及びトレハロース(1.64g/cm³)密度を仮定して、無限希釈におけるそれらの部分モル体積(Pilz、Puchweinら、1970; Miller、de Pabloら、1997)及び公知のバッファー容量から構成成分の総体積及び体積分率を計算した。BCAアッセイ又は質量消衰(mass extinction)係数1.37L/g・cmによる280nmにおける吸光度を用いて(Nanodrop、Thermo Scientific)、最終タンパク質濃度が、予測値の実験誤差内であることを検証した。

10

【0336】

ナノクラスター分散系の特性評価

CONTIN(Brookhaven BI-9000AT)を用いた約23℃における632.8nm(赤色)レーザー及びアバランシェフォトダイオードによる動的光散乱(DLS)により、タンパク質単量体及びナノクラスターの水力学的直径を測定した。60μl試料セル(Beckman Coulter)を用いて、散乱角は、多重散乱を最小化するために135°から165°の範囲に及んだ(Horn 2000)。本技法の精度を検証するために、298nmポリスチレン標準の水力学的直径をΦ約0.1において測定したところ、実際のサイズの5%以内であることが判明した。タンパク質単量体又はナノクラスターの試料毎に、135°、150°又は165°からなる2つの別個の角度で散乱測定を行ったところ、サイズは、2つの角度で5~10%以内であることが判明した。濃縮コロイドのDLS及びレオロジーの試験によると、溶媒粘度に基づくストークス・アインシュタイン方程式からの水力学的直径の計算は、本出願人らの最高Φ0.25において比較的正確である(Horn 2000)。より高いΦにおいて、測定の時間スケールにおける粒子間の相互作用は、ストークス・アインシュタイン方程式からのさらに大きな逸脱を生じ得る。このような複雑性を回避するため、粒子サイズは、小角X線散乱から決定することができる(Roosen-Runge、Hennigら、2011)。

20

30

【0337】

走査型電子顕微鏡(SEM、Hitachi S-5500、30KV)のための試料を調製するため、分散系を希釈して、クラウドとしてPEG300を用いて、一定のクラウド体積分率0.18(220mg/mlの本来の分散系に相当)における40mg/mlとし、ホルムバル(formvar)でコーティングした炭素膜を備える銅TEMグリッド上に置き、過剰な液体を拭き取って除去し、液体窒素中に浸漬することにより急速に凍結し、凍結乾燥した。ハーゲン・ポアズイユの方程式に従い、1ml注射器に取り付けた25ゲージ(ID=0.1mm)1.5"の長さの針を用いて、ナノクラスター分散系の粘度を3回複製して測定した。デジタルビデオの解析から、約50μLの容量に相当する、錐体の底からの高さ0.4"から0.1"へと分散系を引く時間を決定した(Miller、Engstromら、2010)。様々な校正流体を円錐状バイアルから0.05ml引く時間と粘度との間の直線相関を図49に示す(Liu、Nguyenら、2005; Miller、Engstromら、2010)。変化したせん断速度は、粘度と共に減少し、50cpの粘度で1000s⁻¹であった。トレハロース溶液の粘度は、Uchidaら(Uchida、Nagayamaら、2009)から計算した。

40

【0338】

タンパク質構造及び活性の特性評価

50

抗体構造及びリガンド結合活性をモニターするため、溶液対照抗体と対比する一連の生物物理学的及び生化学的アッセイによる解析に先立ち、凍結乾燥し分散させたタンパク質を1mg/mlとなるようPBSに希釈した。通常、希釈は、分散系形成の約4～6時間以内に行った。Jasco J-815 CD分光計を用いて、260～185nmの円二色性(CD)測定値を0.1nm刻みで収集した。希釈タンパク質の5μg試料の4～20%非還元SDS-PAGEゲルにおける解析により、不溶性のジスルフィド結合した凝集体の形成をモニターした。非共有結合性凝集体の形成をSECによりモニターし、20μgの希釈分散系をWaters Breeze HPLCにより解析した。リガンド結合活性を解析するため、以前に記載された通りに(Sutherland、Changら、2011)、間接的PTx ELISAを行い、試料対溶液対照の50%有効濃度値(EC₅₀)の比として報告した。Applied Biosystems製7900HTサーモサイクラー(thermocycler)及びSYPRO Orange Protein Gel Stain(Sigma-Aldrich)を用いることにより、熱融解温度(T_m)を定量化した(Lavinder、Hariら、2009)。

10

【0339】

BALB/cマウスにおけるin vivoバイオアベイラビリティ

14日の期間にわたり、24～27g、雌BALB/cマウスを用いて、1B7分散系及び対照溶液のin vivo薬物動態試験を行った。3種の試料群は、(1)100μlの希釈1B7溶液の静脈内(IV)及び(2)皮下(SQ)対照注射並びに(3)検査条件、抗体分散系(1μl容量における235mg/mlとして、9.4mg/kg用量を得る)のSQ注射を包含した。注射前と、12～336時間の間の8つの追加的な時点において、尾静脈から血清試料(約20μl)を採取した。終末時点において、マウスを麻酔し、心穿刺により血清を採取した。本試験は、テキサス大学オースティン校の施設内実験動物委員会(プロトコール#AUP-2010-00070)の承認の下、実験動物福祉局の指針を遵守しつつ行われた。各血清試料における活性1B7の濃度を決定するため、以前に記載された通りに(Sutherland and Maynard 2009)間接的PTx ELISAを行った。各プレートは、陰性対照としてのマウス血清(Sigma)と、マウス血清に希釈した1B7検量線を包含した。SoftMax Pro v5を用いて、4パラメータロジスティック(4PL)モデルを用いた血清希釈と、検量線から計算した血清試料に存在する活性1B7の総濃度に基づきEC₅₀値を計算した。終末時点の血清を用いて、PTxのin vitro CHO細胞中和に基づく直交性抗体活性アッセイを行った(Sutherland and Maynard 2009)。

20

30

【0340】

【表16】

表14. 平均力のポテンシャルを決定するために図40a及び40cにおいて用いたパラメータ

量	pIにおける単量体(図39a)	pIから3pH単位離れた単量体(図39a)	クラスター(図39c)
タンパク質当たりの電荷	1	25	0.6
デバイ長(κ^{-1})	0.7	0.7	0.7
Γ_0	0.036	0.72	0.76
ϕ_E	0.17	0.17	0.17

40

【0341】

【表 1 7】

表 15. 図 40b におけるクラスター直径等高線を計算するための一般パラメータ

量	1B7 の値 (図 37b 及び 39b)	IgG の値 (図 37c)
フラクタル次元(δ_f)	2.6	2.6
比誘電率(ϵ_r)	25	15
粒子表面の単位面積当たりの解離できる部位数(σ , nm^{-2})	0.2	0.2
イオン結合における反対の電荷間の距離(b , nm)	0.1	0.2
一次粒子の半径(R , nm)	5.5	5.5

10

【 0 3 4 2】

【表 1 8】

表 16. 図 40b における特定の事例のクラスター直径を計算するための特別なパラメータ

量	事例 1
外因性クラウダーの濃度(c_E , mg/ml)	220
引力(Attractive)エネルギー($\epsilon/k_B T$)	6.52
タンパク質体積分率(ϕ)	0.16
タンパク質の濃度(c , mg/ml)	220
タンパク質単量体における電荷(q_0)	0.09
凝集数(n_c)	4500
予測されるクラスター直径(D_c , nm)	280
実際のクラスター直径(D_c , nm)	320

20

30

【 0 3 4 3】

実施例 I V

所望の分散バッファーにおいてポリクローナルヒツジ IgG (IgG と省略、Sigma Aldrich 又は Rockland Immunochemicals) の溶液 (通常 50 mg/mL) を調製した。バッファーは、150 mM イオン強度、タンパク質の pI の範囲内、通常 1 又は 2 pH 単位以内の pH となるよう処方した。質量消衰係数 1.37 L/g・cm により 280 nm における吸光度を用いて濃度を検証した (Nanodrop、Thermo Scientific)。一部の事例において、後述する通りに FPLC によりタンパク質を精製した。

40

【 0 3 4 4】

水性培地の除去によるナノクラスターの形成

50

遠心分離フィルターアセンブリ (Millipore Microcon, Ultra
cel YM-50 メンブレン、50 kD の名目上の分子量限界、フィルター直径 0.2
5" 直径) の風袋重量を計った。必要量のクラウダー (例えば、トレハロース、スクロ
ース、低分子量ポリエチレングリコール、デキストラン又はアミノ酸) をフィルターアセン
ブリのリテンテート (retentate) チャンバー内で秤量した。所望の容量のタンパク質溶
液をピペット採取してリテンテートチャンバーに入れ、ピペット先端で溶液を混合して、
クラウダーの溶解を確実にした。次に、10,000 rcf にて通常 1 時間未満である一
定量の時間、フィルターアセンブリを遠心分離した (Eppendorf 遠心分離機 54
15 D)。遠心分離後に、透過チューブの秤量により、或いは透過チューブ又はフィルタ
ーカプセルそれ自体におけるメニスカス (meniscus) 高さのコンピュータ支援画像解析に
より、フィルターを通った流動量を測定した。遠心分離を反復して、所望の濃度レベルを
得た。

10

【0345】

十分な水溶液が除去されて、所望の濃度に達したら、フィルターアセンブリを反転して
リテンテート回収チューブに入れ、3~4 分間、1,000 rcf で遠心分離することによ
り、リテンテートにおける分散されたタンパク質を回収した。得られた分散系を、0.
1 mL 円錐状バイアル (V-バイアル、Wheaton) に移し、280 nm における吸
光度を用いて分光光度計により (spectrophotometrically) 濃度を検証した。クラウダー
の濃度は、出発濃度として表示することになる。

20

【0346】

粘度測定

ハーゲン・ポアズイユ方程式に従い、1 mL 注射器 (Luer-Lok (商標) チップ
を備える Becton Dickinson & Co. 1 mL 注射器) に取り付けられた 25 ゲ
ージ (ID=0.1 mm) 1.5" 長の針 (Becton Dickinson & Co.
Precision Glide Needle) を用いて、ナノクラスター分散系の粘
度を 3 回複製して測定した。48 μ L の容量に相当する、錐体の底からの高さ 0.4" か
ら 0.1" へと分散系 (0.1 mL 円錐状バイアルにおける) を引く時間を、デジタルビ
デオから決定した。この時間は、表 19 に示す通り、公知の粘度を有する一連の標準に由
来する較正曲線の粘度と相関した。

30

【0347】

水力学的直径の測定

CONTIN アルゴリズム (Brookhaven BI-9000AT) を用いた 6
32.8 nm レーザー及びアバランシェフォトダイオードによる約 23 °C における、13
5° の角度における動的光散乱 (DLS) により、タンパク質単量体及びナノクラスター
の水力学的直径を測定した。試料を 60 μ L 試料セル (Beckman Coulter
) 内に置いた。

【0348】

非共有結合性凝集体の解析のために、試料を移動相 (100 mM リン酸ナトリウム、3
00 mM 塩化ナトリウム、pH 7) において 1 mg/mL となるよう希釈した。TOSO
H Biosciences TSK gel 3000 SWXL 及び直列の TSK gel 2
000 SW カラムを用いた Waters Breeze HPLC により、吸光度 21
4 nm により溶出液をモニターしつつ、20 μ g のタンパク質を含有する希釈した分散系
の体積を解析した。

40

【0349】

緊張度

注射可能な投与における課題の一つは、材料が等張性である必要があることである。培
地は、所定の種類の細胞の膜を隔てた細胞内部の液体と同じ有効浸透圧を有する場合、そ
れと等張性である。この緊張度は、特定の溶質分子に対する細胞膜の透過性の関数であり
、したがって、関与する細胞の種類及び溶質分子の正体に依りて変動する。等張溶液 (血
液と比較して) は一般に、溶液 100 mL につき 0.9 g の NaCl を含有する塩化ナト

50

リウム溶液と同一の束一的特性を有する溶液として定義される。Merck Index (第12版) 及びSinko 2006における、生体膜を通した相対透過性に応じて一覧表にした塩化ナトリウム均等物に基づき、等張性条件における重量オスモル濃度と比べた、その賦形剤を含有する所定の製剤の重量オスモル濃度を計算した。重量オスモル濃度は、個々の構成成分に対し直線的に相加的であると仮定された。

【0350】

皮下投与用のタンパク質ナノクラスター分散系の形成に用いることのできる多糖等の群集化剤は、溶液の緊張度に影響を及ぼすであろう。身体への注射のため、一部の実施形態において、製剤は、注射による苦痛を回避するため、可能な限り等張性に近づかなければならない。低張性流体に関して、膜輸送は、流体に隣接する細胞のサイズに影響を及ぼすであろう。このような変化は、免疫原性に潜在的に影響を及ぼし得る。したがって、群集化剤は、粘度を50 cP又は100 cP又は150 cPを超えて上昇させることなく、緊張度及びクラスターサイズの制御に対し最適化することができる。最後に、一部の実施形態において、製剤は、投与により免疫原性の原因とならず、タンパク質は、所望の薬物動態及び生物活性を有する。

【0351】

100 mg/ml以上のトレハロースによる、水を除去することによる高張性タンパク質分散系の形成

対応する量のトレハロースで処方した、表20に記載されているタンパク質濃度の分散系を以前に記載された遠心分離方法により調製し、注射器を用いてその粘度を測定した。粘度がより低いことが観察され、表20の最初の3列における5～6の範囲内の固有粘度である。その中により多量の凝集体を有する(より高い粘度を説明できる)、異なるサプライヤー(Rockland Immunochemicals)から得たヒツジIgGを用いた列番号4及び5の事例において、固有粘度はより高かった。これらの低い固有及び溶液粘度は、分散系を作製するための新たな技法の結果であった。溶液におけるより少量のトレハロースは、より低い溶媒粘度をもたらした。この方法は、凍結乾燥により作製されたタンパク質粉末の分散に基づく方法に優る利点を提供することができる。凍結乾燥粉末の溶解ステップを回避する能力は、より高い粘度を生じ得る潜在的な複合コロイド状ゲル状態を回避することができる。この新たな技法は、凍結乾燥ステップを回避し、タンパク質濃度を徐々に増加させることにより、タンパク質に加えるストレスも少ない。新たな技法は、凍結保護物質分子が必要とされないため、製剤における柔軟性も生じる。

【0352】

これらのナノクラスターの水力学的直径は、30～35 nm前後であることが観察され(表20)、これは、本明細書に記載されている通りに形成されたヒツジIgGナノクラスターに観察される約80 nm直径よりもさらに小さい。より小さいサイズは、分散系に存在するより低レベルのトレハロースの結果であると思われ、これは、より規模の小さい誘引的な枯渇引力をもたらし、より小さいクラスターサイズのクラスターを形成させる。クラスターが滅菌フィルターをより容易に通過でき、分散系をより容易に滅菌できるとの観点から、より小さいクラスターは有益である。その上、SECデータは、タンパク質分子の間で不可逆的凝集が殆どないとの証拠を提供する。Sigma Aldrichから提供される無修飾ポリクローナルヒツジIgGは、92.63%単量体であり、表20から分かる通り、遠心分離によるクラスター形成のプロセスと、その後の粘度測定のための注射器の針を通したせん断は、溶液における単量体タンパク質量の有意な減少を生じない。したがって、クラスターリングプロセスは、タンパク質の不可逆的凝集を生じず、タンパク質は、in vitroにおける希釈後に単量体に再び解離する。

【0353】

凍結乾燥により形成された、低張性又は等張性の、低濃度の群集化剤による高濃度又は中濃度分散系：溶液及びより大型のクラスターとの比較

表21における列1～3に対して、凍結乾燥したタンパク質粉末と、凍結保護物質、トレハロースから、本明細書に記載されている通りにナノクラスターを作製した。表21に

おける列 1、2 及び 3 に示す 350 mg/ml のタンパク質ナノクラスターの分散系を作製するために、Sigma Aldrich ヒツジ IgG の凍結乾燥粉末を、溶解トレハロースを含有するバッファーにおいて直接的に分散させた。これらの分散系の濃度を重量及び容量により決定した。ナノクラスターは、列 2 及び 3 において安定的コロイド分散系を形成した。これらの実験において、本出願人らは、タンパク質の立体構造的安定性又はタンパク質凝集体の形成を測定しなかった。列 1 に対しては、トレハロース又は他の群集化剤を添加せず、その結果タンパク質は溶液となり、注射器使用できない高度に粘稠性のゲルを形成した。ナノクラスターは形成されなかった。この場合、溶液におけるタンパク質分子間の引力がゲル化を生じた。しかし、表 2 1、列 2 及び 3 に示す通り、トレハロースの添加によりナノクラスターが形成され、分散系は注射器使用でき、さらにより低く測定可能な粘度を有した。ナノクラスターのより低い粘度は、コロイド力に基づいて予想される。表 2 1、列 2 及び 3 に示す DLS により測定されるクラスター水力学的直径に証明される通り、トレハロースは、タンパク質をクラスターに集合させる。これら 2 事例において、重量オスモル濃度／等張性条件における重量オスモル濃度は、単位元より低かった。

10

【0354】

通常、凍結保護物質：タンパク質の比は、凍結乾燥プロセスにより作製された粒子の重量／重量で 1：1 である。 200 mg/ml のタンパク質に関して、この比は、 200 mg/ml トレハロースに相当し、等張性条件の約 100 mg/ml の限界を優に超える（スクロース及びラクトース等の二糖に関して、等張性溶液の濃度は、それぞれ 92.5 mg/ml 及び 97.5 mg/ml である（Sinko 2006、Merck Index））。緊張度の問題は、より高いタンパク質濃度に対しさらにより過酷なものとなる。この高緊張度を回避するための一方法は、凍結乾燥においてより少ない凍結保護物質（又は凍結乾燥保護物質）を用いることであろう。しかし、凍結保護物質が少ないと、タンパク質は凍結乾燥プロセスにおいて変性を生じ得る。表 2 1 の列 1～3 において、凍結乾燥プロセスにおいて凍結保護物質を用いなかった。

20

【0355】

水の除去により形成された、低濃度の群集化剤による高濃度又は中濃度の、低張性又は等張性分散系

表 2 1 における凍結乾燥した粉末から形成された列 2～3 におけるこれら分散系の高粘性は、ナノクラスターを作製するために代替プロセスが有益であることを示す。タンパク質粉末作製における大量の凍結保護物質の必要を克服するための別の方法は、混合によるナノクラスターの形成であり、これならば、凍結乾燥又は他のフリーズドライプロセスを回避できるであろう。この例において、単量体タンパク質溶液から水を除去することにより、水性培地における分散系としてのナノクラスターを形成した。本出願人らは、水及びトレハロース等の小分子の通過が可能な遠心ろ過を用いて、これによりタンパク質濃度を増加させることにより、これを立証する。タンパク質が濃縮されるにつれ、溶液における群集化剤の量及びタンパク質濃度に応じてナノクラスターが形成される。凍結乾燥による粉末作製に凍結乾燥保護物質を必要としないこの種のプロセスにおいて、群集化剤対タンパク質の比は、さらにより小さくすることができ、これは即ち、1：2 から、さらには 1：5 重量／重量以下となる。そこで、ナノクラスターの希釈後にタンパク質が安定的である場合、凍結又は凍結乾燥による粉末形成プロセスにおける凍結乾燥保護物質の必要を迂回することができる。

30

40

【0356】

溶液におけるより少量の凍結保護物質は、より低い溶媒粘度をもたらす。より低い溶媒粘度 η_0 は、方程式 2 5 に基づきより低い有効分散系粘度を生じるであろう。また、この方法において、凍結乾燥のステップと、ナノクラスターを形成するための凍結乾燥した粉末の分散を回避することが可能になる。粉末の分散において、タンパク質は、高度に濃縮した粉末形態から開始する。これが水性溶媒と混合されるにつれ、粘度を上昇させる可能性のある複合コロイド状ゲル状態が形成される（表 2 1 の列 1～3 を参照）。

50

【0357】

水性培地を除去してタンパク質を濃縮する新たなプロセスにおいて、物質移動経路は、水性培地による混合能力の事例とは反対である。上述の通り、水性溶媒を添加するのではなく、遠心分離により除去している。水性溶媒の除去により、タンパク質濃度が、最終分散系におけるタンパク質濃度を上回ることはない。この新たな技法は、凍結乾燥ステップを回避し、タンパク質濃度を徐々に増加させることにより、タンパク質に加えるストレスも少ない。

【0358】

本明細書に記載されている実験及び自由エネルギーモデルにより示される通り、ナノクラスターの形成は、関連するコロイド相互作用に依存する。最終タンパク質濃度は、300 mg/ml であると想定される。続いて、表21の列4～11における実際の実験による具体例と、本明細書において先に提示したコロイド理論に示される通り、多くの場合僅か100 mg/ml 又はそれ以下のクラウド濃度であっても、依然としてナノクラスターの形成をもたらす。これらの実験において、クラウド濃度は、本明細書に記載されている多くの先の例よりも低い。

【0359】

列4において、重量オスモル濃度／等張性条件における重量オスモル濃度の比は、単位元を大きく上回る値ではなく、一方、列5においては、基本的に単位元であり、その後の列6～11において、比は単位元を下回った。列5～8の分散系は、DLSにより28～45 nm 範囲の水力学的直径のクラスターを有することが判明し、タンパク質単量体は直径僅か11 nm であるため、この結果は、これら全事例においてタンパク質がナノクラスターの形態で存在することを証明する。よって、列5～11におけるコロイド的に安定的なナノクラスター分散系は、極度に高いタンパク質濃度を維持しながら、等張性又は等張性よりも低かった。低張性条件に関しては、さらにバッファー又は塩を添加して、分散系等張性を達成するのが単純明快であろう。

【0360】

これら実施例全体における先の事例の一リン酸ナトリウム及び重リン酸ナトリウムバッファーの50 mM と対比して、より低い総塩濃度20 mM を有するバッファーにおいて、列6及び7における分散系を作製した。このより低濃度のバッファーは、分散系を依然として等張性に維持しつつ、より高いクラウド濃度の使用を可能にする。さらに、表20と比べて表21におけるより低いクラウド濃度の使用は、緊張度を下げる。

【0361】

タンパク質の濃度は、列4～5、7及び9～10において290 mg/ml を上回る。列9及び10において、相対的に低いクラウド濃度は、相対的に低い溶媒粘度を生じる。さらに、固有粘度は、8を下回る。これらの要因は、非常に高いタンパク質濃度にもかかわらず溶液粘度が120 cP を下回るという事実に寄与する。

【0362】

クラウドの濃度を、50 mg/ml まで減少させた（表21の列12を参照）。この分散系は、高度に粘稠性であり、光を十分に散乱せず、この結果は、均一なナノクラスターを形成していないことを示した。しかし、僅かに高濃度のクラウドによる同様の濃度の分散系（表21の列4）は、およそ50%低い粘度を有し、均一なクラスターを形成した。よって、都合よい粘度のナノクラスターの分散系を形成するには、十分量のクラウドが必要とされる。より低いクラウド濃度において、形態は、文献におけるコロイド状ゲルでよく知られている通り、制御できない形態の溶液からゲル化したタンパク質のものである。

【0363】

クラスターの形態、コロイド特性並びに貯蔵安定性の意味における凍結融解又は凍結、貯蔵及び解凍後のタンパク質安定性。臨床用途に受け入れられるためには、これら高濃度製剤は、調製時から注射される時まで安定的である必要がある。そこで、製剤を冷凍庫における貯蔵によって安定化させる。分散系（表21における列6）を凍結し、気密となる

よう密封したガラス円錐状バイアルにおいて -40°C で1週間貯蔵した。1週間経過後、分散系を冷蔵庫において 4°C で、数時間の経過にわたり徐々に解凍し、次に、解凍した分散系を特性評価した。バイアルは攪拌も振盪もしなかった。かき混ぜる必要なく、分散系においてナノクラスターを発見した。分散系の粘度、水力学的直径及び濃度を定量化したところ（表22を参照）、第1の例の分散系の凍結前に測定された値と同一であることが判明した。その次の2例に関して、サイズは凍結後のみ示され、 100nm をはるかに下回ることが判明した。この結果は、分散系が、凍結、貯蔵及び解凍後に安定的であることを立証する。凍結状態でのタンパク質貯蔵に関する最先端の知識を考慮すると、貯蔵時間数カ月からさらには1年間でこのアプローチを用いることができると考え得る。さらに、凍結ナノクラスターとしてのタンパク質の貯蔵は、タンパク質を溶液として貯蔵する場合よりもさらに高い安定性をもたらす可能性がある。

10

【0364】

粘度及び他の特性における、より小さいクラスターサイズの効果及びより高い充填率効果
次の実験は、ナノクラスターの分散系粘度と形態を関連付ける。表21の列8及び9において、トレハロースの濃度は僅か 70mg/ml であり、高タンパク質濃度にもかかわらず、各事例において低粘性の等張性分散系をもたらした。水力学的直径は、表21の列8において 40nm であることが観察される。このサイズは、トレハロース濃度がさらに高い本明細書に記載されているヒツジIgGナノクラスターで観察される約 80nm 直径よりもさらに小さい。本明細書において自由エネルギーモデルにより説明される通り、より少量の外因性群集化剤トレハロースを考慮すると、表21におけるナノクラスターのより小さいサイズが予想された。表20及び表21の列8～10に示すナノクラスターの固有粘度並びにこれらの事例及び表21の列11における分散系粘度値は、凍結乾燥／混合プロセスによる同等のタンパク質濃度により達成される値よりも低かった。

20

【0365】

物理学的議論を用いて、クラスターサイズ及びクラスター内のタンパク質の充填率（packing fraction）が、どのようにナノクラスターの分散系の粘度に影響を及ぼすか説明することができる。粘度は、表19に示す Φ_{max} に対するナノクラスター体積分率 Φ の値と他の要因によって決まる。タンパク質がナノクラスターの形態である分散系における所定のタンパク質濃度に関して、次に、有効体積分率 Φ_{eff} は、各ナノクラスターの密度又は充填率により決まることが示される。充填率増加は、クラスターにおける空間全体を占有しないタンパク質の結果である。タンパク質に占有されない体積がクラスター内に存在する。非占有体積には水が存在する。充填率は、クラスター形態によって決まり、クラスター形態は、タンパク質分子の形状及び分散系の組成によって決まる。単一ナノクラスター内のタンパク質の内部体積分率 Φ_{int} は、次式により得られる。

30

【0366】

【数26】

$$\phi_{\text{int}} = \left(\frac{D_c}{D_m} \right)^{(\delta_f - 3)} \quad (27)$$

40

（式中、 D_c は、クラスター直径であり、 D_m は、タンパク質単量体直径であり、 δ_f は、クラスターのフラクタル次元である）。クラスター体積分率の有効値 Φ_{eff} は、 Φ/Φ_{int} として定義できる。eq. 26における粘度は、本事例においてはナノクラスターであるコロイド粒子に占有された体積分率に依存するため、 Φ ではなく Φ_{eff} の関数である。

【0367】

Φ_{int} の増加は、ナノクラスター分散系における所定の全タンパク質濃度に対する Φ_{eff} の減少に用いることができる。 Φ_{eff} の減少は、eq 26によればより低い分散系粘度を好むであろう。さらに、 Φ_{eff} の減少は、クラスター間のより大きい間隔に相当するであろう。より大きな間隔は、より弱い相互作用、したがってより弱い固有粘度を好み、これもまた分散系粘度を下げるであろう。要約すると、 Φ_{int} を上昇させる能力は、eq. 2

50

6によればより低い分散系粘度を好むという理論的観点から予想することができる。

【0368】

有効クラスター体積分率 Φ_{eff} の値は、本明細書に記載されている通りに得られるSLSによる Φ_{int} 、約0.6に基づいて、 Φ/Φ_{int} として定義された。これは、小角X線散乱及び小角中性子散乱によって測定することもできる。所定のタンパク質及び δf に関して、クラスターサイズ、 D_c が増加するにつれ、 Φ_{int} 。フラクタル物体に関して、充填率は、物体の中心から外側へと減少する。よって、 Φ_{int} は、小型のクラスターに対してより低くなると予想することができる。したがって、クラスター間の短距離引力が十分に弱ければ、小型のナノクラスターを形成するより少量の群集化剤の使用は、より低い粘度を好むであろう。最終的に、群集化剤の量が少な過ぎる場合、表21の列1に示す通り分散系はゲル化する。よって、群集化剤の濃度を群集化剤の組成と共に最適化して、最低分散系粘度を達成することができる。例えば、30～40nm前後のクラスターサイズは、本明細書に記載されているサイズ80nmの一定のクラスターに対する約8の相対的により高い値と比較して、固有粘度がより低い（6～7、表20における列1～3及び表21における列8～11）。

10

【0369】

群集化剤の分子量を変動させることにより、ナノクラスターサイズと緊張度に関して群集のバランスを取る。高濃度且つ低粘性の分散系の形成は、自由エネルギーモデルに基づき群集化剤濃度及び分子量に高度に依存性である。枯渇引力におけるクラウダーサイズの効果は、方程式6により説明される。クラウダーサイズの増加は、枯渇引力の範囲を増加させ、これは、タンパク質単量体間の引力全体をさらに増加させることができる。枯渇引力の増加は、クラスターサイズを増加させる。クラウダーの分子量及び組成は、緊張度と溶媒粘度にも影響を及ぼす。

20

【0370】

表21における列10に示す通り、クラウダーとして100mg/mlの1kD分子量デキストランを用いてナノクラスター分散系を生成した。分散系の緊張度は、表20及び21における他の事例の大部分よりも低く、より高分子量のクラウダーの利益を示す。固有粘度は、表20により作製された分散系と同じ範囲内であることが判明した。したがって、溶液においてクラスターを形成させるために、溶液において他の群集化剤を用いることが可能である。多糖デキストランも、群集化剤として作用する。デキストランは、自由エネルギーモデルに示す通り、タンパク質分子間の枯渇引力を生じることによりクラスターを形成させる。デキストラン溶液の溶液粘度は、同じ質量濃度のトレハロース溶液の粘度と比べてより高い。しかし、所定の質量濃度において、デキストランは、そのより高い分子量、したがってより少ない数の粒子により、より低い程度で溶液の重量オスモル濃度に寄与するであろう。よって、分子量を上昇させることにより、等張性条件を維持しつつ、外因性クラウダーの濃度を増加させることができる。最終的に、分子量が大きくなり過ぎるにつれて、溶媒粘度は、桁違いに大きくなるであろう。よって、群集化剤分子量は、緊張度、クラスターサイズ、溶媒粘度及び分散系粘度の制約を満足させるよう最適化されなければならない。これは、タンパク質安定性にも影響するであろう。

30

【0371】

クラウダー濃度を上昇させてクラスターを形成することにより、溶液と比べて粘度が低下することの立証。粘度を下げ分散系を安定化するための、賦形剤としての界面活性剤の使用。表21の列11において、クラウダーとしてトレハロースを包含した分散系は、賦形剤として1%ポリソルベート80（PS80）も含有していた。タンパク質分子は、その表面に疎水性、親水性又は電荷のあるパッチを有する。疎水性パッチ間の相互作用は短距離且つ誘引性であり、溶液におけるタンパク質又はクラスター間の引力を増加させ、より高い固有粘度、したがって有効粘度増加をもたらす（方程式26）。PS80等の界面活性剤は、疎水性パッチをコーティングし、これを親水性パッチに変換するであろう。疎水性のマスキングは、引力低下、したがって分散系粘度低下をもたらす得る。これに加えて、特定短距離引力低下により、界面活性剤の利用は、分散系における遊離タンパク質単

40

50

量体の凝集傾向を低下させるであろう。特定短距離力は、疎水性パッチ相互作用によるクラスター間を架橋せず、固有粘度を増加させるため、タンパク質単量体間の特定短距離引力低下は、溶液粘度の減少にも有用である。これらの概念は、表 2 1 における列 1 1 に示す通り、タンパク質ナノクラスターの約 3 5 0 m g / m l 分散系で測定された約 1 5 0 c P の極度の低粘性と一致する。列 1 3 において、同様の効果を達成できるとの考えから、トレハロースに加えてエタノールを添加した。

【 0 3 7 2 】

【表 1 9】

表 17: 2 通りの異なる順序の混合により凍結乾燥粉末をバッファーと混合することにより形成された、pH6 におけるヒツジ IgG のナノクラスター

10

No.	最終濃度 IgG mg/ml	トレハロース mg/ml	粘度 cp	固有粘度	方法
1	400	200	598	6.41	粉末にバッファーを添加
2	350	175	269	7.36	粉末にバッファーを添加
3	350	175	248	7.24	粉末にバッファーを添加
4	300	300	304	9.17	粉末にバッファーを添加
5	275	275	63.0	7.42	粉末にバッファーを添加
6	214	214	37.0	9.47	粉末にバッファーを添加
7	334	150	604	9.25	バッファーに粉末を添加
8	306	175	321	9.55	バッファーに粉末を添加
9	310	125	94	7.83	バッファーに粉末を添加
10	190	125	25	10.5	バッファーに粉末を添加

20

【 0 3 7 3 】

表 1 7 におけるデータは、実施例 I と同様の仕方で製造された分散系から得た。表中の濃度により示される通り、I g G は、凍結保護物質としての所望の量のトレハロース（質量比 1 : 1 のタンパク質対トレハロース、或いは 1 : 0. 5 のタンパク質対トレハロースのいずれか）と共に凍結乾燥される。凍結乾燥したら、タンパク質-トレハロース粉末をバイアル内で秤量し、バッファー溶液（上述の p H）を添加して、分散系を作製する。列 2 及び 3 は、粘度測定に関してこれらの分散系が再現性を有することを立証する。第 2 の方法において、バッファー溶液に粉末を添加する。いずれの方法においても、1 0 を下回る固有粘度を達成することが可能であった。

30

【 0 3 7 4 】

実施例 V

タンパク質-クラウダー液体組み合わせが濃縮される濃縮プロセス（より具体的にはろ過プロセスとなり得る）における反復回数。濃縮プロセスとして、遠心ろ過、機械的ろ過、接線ろ過及び透析が挙げられる。濃縮（例えば、ろ過）プロセスは、一回反復して行うことができる。或いは、複数回反復して行ってもよい。濃縮（例えば、ろ過）プロセスにおいて種々の戦略を行って、このプロセスにより作製される分散系の特性を制御することができる。これらの差異は、濃縮（例えば、ろ過）プロセスにおける物質移動経路に影響を及ぼすであろう。供給口（feed）（例えば、ろ過プロセスにおけるフィルター）に様々な薬剤を添加してよい。薬剤は、連続的に添加しても、少しずつ添加してもよい。濃縮（例えば、ろ過）は、1 回反復して行うことができる。或いは、複数回反復（iteration）して行ってもよい。複数回反復して行われる場合、薬剤（例えば、クラウダー）は、反復と反復の間に添加しても、反復において添加しても、或いはその両方であってもよい。

40

【 0 3 7 5 】

50

濃縮（例えば、ろ過）において添加される薬剤は、ナノクラスター形態に影響を及ぼすクラウダーとなることのできる。或いは、薬剤は、濃縮（例えば、ろ過）補助剤（例えば、ろ過（filtration）におけるタンパク質によるフィルターの汚れを最小化するための）であってもよい。クラウダーの添加によるクラスターサイズの調整は、 Φ が Φ_E に対しプロットされる図12の概念に基づき設計することのできる。これら含量のいずれかの増加は、ナノクラスターサイズを上昇させる。これらは、クラスターの充填率にも影響を及ぼすであろう。濃縮（例えば、ろ過）プロセスにおけるクラスターサイズ及び充填率の変化は、最終クラスターサイズ及び充填率に影響を及ぼすであろう。これらの形態学的側面は、外因性クラウダー及び自己クラウダーに影響されるタンパク質フォールディングにも影響を及ぼすであろう。

10

【0376】

分散系における構成成分は、濃縮（例えば、ろ過）プロセス（例えば、ろ過のためのフィルターを通した浸透）におけるその保持又は低下に影響を与えるよう設計することのできる。多糖やアミノ酸やペプチドやタンパク質等、外因性群集化剤は、濃縮（例えば、ろ過）プロセス（例えば、ろ過におけるバッファーによるフィルターを通した透過）において保持されるよう、或いは保持されないように設計することのできる。薬剤は、アルコール、nmp又は別の有機溶媒若しくは塩等、タンパク質に対し非溶媒となることのできる。これは、pHを変化させる薬剤となることのできる。薬剤は、濃縮（例えば、ろ過）プロセスにおいて除去されない又は減少しない（例えば、ろ過の場合はフィルターを通過しない）、より高分子のデキストラン若しくはポリエチレングリコール、又はペプチド及びタンパク質並びにアルギン酸塩やキトサン等の天然ポリマー等、他のポリマー型クラウダーであってもよい。

20

【0377】

濃縮（例えば、ろ過）プロセスにおいて低下する（例えば、ろ過用フィルターを通過する）クラウダーに関して、 Φ の増加は、ナノクラスターサイズを上昇させる。この場合、タンパク質の体積分率全体が増加するため、クラウダーの濃度は、濃縮（例えば、ろ過）プロセスにおいて減少する。濃縮（例えば、ろ過）プロセスにおいて保持される（例えば、フィルターを通過しない）クラウダーに関して、その濃度は、バッファーが透過するにつれて高まるであろう。よって、図12における概念から明らかな通り、この非透過型クラウダーの場合、ナノクラスターサイズはさらに増加するであろう。一方が低下し、もう一方が保持される（例えば、それぞれろ過において一方が透過し、もう一方が透過しない）クラウダーの混合物の製剤を作製してもよい。

30

【0378】

出発材料が単体のタンパク質溶液である場合の濃縮（例えば、ろ過）プロセスにおけるタンパク質の出発及び終点濃度

出発及び終点タンパク質濃度 Φ は、ナノクラスター特性に影響を与えるであろう。小さい Φ における所定の Φ_E において、タンパク質は、単体から出発することのできる。ろ過等、濃縮プロセスにおいて、 Φ が増加するにつれて、クラスターは、図12の通りに形成されるであろう。 Φ 若しくは Φ_E のいずれか又はその両方の増加は、クラスターサイズを上昇させるであろう。出発 Φ 及び最終 Φ の間の差並びにろ過の際の Φ における経路の変化は、ナノクラスター形態及びタンパク質安定性に影響を与えるであろう。

40

【0379】

出発材料が既にナノクラスター分散系である場合のろ過プロセスにおけるタンパク質の出発及び終点濃度

出発材料は、最初からナノクラスター分散系であってもよい。この場合、濃縮、例えばろ過における Φ 又は Φ_E の増加は、ナノクラスター形態に影響を与え、ナノクラスターサイズを上昇させるであろう。

【0380】

希釈によるナノクラスターサイズの低下

バッファー（例えば、水性バッファー）を添加して、タンパク質及び／又は外因性クラ

50

ウダー濃度を下げて、出発サイズよりもナノクラスターサイズを下げるができる。

【0381】

実施例 V I

【0382】

【表20】

表 18. 表 19 から粘度及び流速が決定された、長さ 1.5" の 0.1mm(25 ゲージ)注射器におけるニュートン流体の粘度に応じた理論的せん断速度

分散系の粘度(cP)	流速($\mu\text{L/s}$)	注射器針におけるせん断速度(s^{-1})
50	9.602	906
100	4.833	456
300	1.614	152

10

【0383】

注射器粘度計の原理は、ピストンを一定量変位することにより、針における圧力降下における相対的に小さい変動を生じ、公知の直径の針を通じた流動を生じることである。分散系容量は一般に、流動において 1 mL 注射器容量の < 5 % を要するため、圧力降下は、ほんの少量変化する。注射器プランジャーは、各実験で同一量変位されるため、圧力降下は一定である。流速及び粘度は、本明細書に記載されている通り、較正により関連付けられ、そのデータを表 18 に示す。粘度に関しては、表 18 に収載されており（粘度標準を表 19 に収載する）、較正により流速を決定する。針は円柱であるため、壁にスリップが保持されていない管を通る流動の方程式を仮定し、該粘度から計算された流速に基づき、壁におけるせん断速度を計算する。せん断速度は、流体の流動速度の関数であり、したがってより高い粘稠性の流体は、流動に対しより強い抵抗を有し、その結果、流体はより遅く流動し、したがって針においてより低いせん断速度を生じる。ニュートン挙動から逸脱した流体であっても、およそそのせん断速度を表 18 に示す。

20

【0384】

【表21】

30

表 19. 注射器粘度計方法の標準

試料	公知の粘度(cP)	48 μL を引く平均時間(s, $\pm$, range)	方程式により計算された平均粘度(cP $\pm$ s. d.)
脱イオン水	1	0.20 $\pm$ 0.04	1.8 $\pm$ 0.4
安息香酸ベンジル	8.8	0.81 $\pm$ 0.11	8.3 $\pm$ 1.1
PEG 200	50	4.65 $\pm$ 0.21	48.5 $\pm$ 2.3
PEG 300	70	6.88 $\pm$ 0.66	71.8 $\pm$ 6.9
PEG 400	90	8.55 $\pm$ 0.45	89.4 $\pm$ 4.7

40

【0385】

【表 2 2】

表 20: ナノクラスタの分散系特性。本明細書に記載されている注射器粘度方法を用いることにより、分散系粘度を決定した。動的光散乱(DLS)を行って、クラスタの水力学的直径を決定し、分子篩クロマトグラフィー(SEC)を行って、不可逆的凝集体の存在を点検した。SEC の試料は、300mM 塩化ナトリウムを含む 100mM リン酸ナトリウムバンプアーにおいて 1mg/mL 溶液となるよう、解析に先立ち分散系から希釈した。

No.	タンパク質の初期濃度 (mg/ml)	タンパク質溶液の初期容量 (μl)	遠心分離の時間(分)	タンパク質の最終濃度 (mg/ml)	トレハロースの濃度の (mg/ml)	重量オスモル濃度/等張性濃度における重量オスモル濃度	粘度 (cP)	固有粘度	DLS による水力学直径 (nm)	SEC による%単量体
1	33	498	80	220	100	1.19	12.70	6.63	33.50	91.0
2	51	499	80	260	125	1.41	13.16	5.25	30.07	92.3
3	67	250	40	268	125	1.41	20.73	6.00	32.27	92.6
4	42	353	60	310	125	1.41	94.28	7.83	-	-
5	40	370	82	300	100	1.19	193.8	9.06	-	-

【表 2 3】

表 21. ヒッジ IgG のナノクラスターの等張性分散系。本明細書に記載されている通りに注射器を用いることにより、分散系粘度を決定した。動的光散乱(DLS)を行って、クラスターの水力学的直径を決定し、分子篩クロマトグラフィー(SEC)を行って、不可逆的凝集体の存在を点検した。列 1~3 において、分散系は、凍結乾燥により形成された。その他全列において、分散系は、水を除去するための遠心分離により形成された。比較のため、星印の付いた値以外の全 SEC 試料は、単量体含有量 99.9%の精製 IgG を用いている。

表 21.

No.	タンパク質の初期濃度 (mg/ml)	タンパク質溶液の初期容量 (μl)	遠心分離の時間(分)	バッファの総濃度(mM)	タンパク質の最終濃度 (mg/ml)	トレハロースの濃度 (mg/ml)	重量オスモル濃度/等張性濃度における重量オスモル濃度	粘度 (cP)	固有粘度	水力学的直径(nm)	SEC による希釈試料の%単量体
1	トレハロースのバッファ溶液に直			50	350	0	0.30	ゲル	-	-	-
2	接的に分散させた凍結乾燥タンパク			50	350	35	0.61	591.13	8.92	21	-
3	質粉末			50	350	70	0.92	873.27	9.24	24	-
4	189	210	80	50	331	100	1.19	368.44	8.75	-	-
5	67	517	202	50	335	80	1.01	397.73	8.79	45	-
6	34	678	25	20	215	100	1	28.07	8.38	28	-
7	36	525	40	20	296	100	1	227.19	9.45	42	98.2
8	90	190	35	50	276	70	0.92	42.93	7.48	40	93.4*
9	37	530	35	50	317	70	0.92	91.80	7.26	22**	99.9
10	49	500	45	50	292	100 (1kD デキストラン)	0.33	110.48	7.38	48**	98.0
11	37	486	55	50	348	70 (+1% PS80)	0.94	146.88	-	-	99.5
12	36	-	50	50	333	50	0.74	552.50	9.51	-	99.7
13	40	528	65	20	326	70 (2%エタノール)	2.19	608.59	9.80	-	98.8
14	88	234	40	50	324	70	0.94	228.81	8.32	-	-

【0 3 8 7】

* Sigma Aldrich 未精製タンパク質使用 — 処理前では 92.6% 単量体。 ** 凍結、貯蔵及び解凍後に測定。列 6~14 は、f p l c により精製され、R o c k

10

20

30

40

50

land 製である。本文書におけるその他全ては、未精製である。列 4 及び 5 は、Rockland 製の未精製である。これら以外の表 20 及び 21 におけるその他全ては、sigma 製の fplc なしである。

【0388】

【表 24】

表 22: 分散系を約 1 週間凍結する前後における、重要な分散系特徴の記述。%単量体は、同一ロット由来の精製 IgG のアリコートの 99.9%単量体と比較することができる。

分散系の状態	粘度	固有粘度	水力学的直径	希釈した試料の%単量体
215mg/mL、100mg/mL トレハロース - 列 6 表 21 の凍結前	28.07	8.38	27.57	98.7
215mg/mL、100mg/mL トレハロース - 列 6 表 21 の凍結後	25.37	8.84	25.8	99.0
列 9、凍結後			24	-
列 10、凍結後			48	-

10

20

【0389】

実施例 V I I

群集化剤としてのアミノ酸によるヒツジ IgG ナノクラスターと、群集化剤としてのトレハロースによるナノクラスターの滅菌ろ過

【0390】

群集化剤としてのアミノ酸の使用：表 23 の列 1 において、群集化剤として 100 mg/mL アルギニンを用いて 298 mg/mL IgG の分散系を作製した。アミノ酸及びペプチドは、タンパク質製剤において用いられることが多い。その上、アルギニンは、タンパク質溶液における安定化効果を有することが示されており {Timasheff、2006、Biophys Chem}、タンパク質クラスターにおいても同じ効果を有しているに相違ない。298 mg/mL と非常に高いタンパク質濃度であるにもかかわらず、粘度は僅か 73 cP であった。この概念は、クラウダーとしての多種多様なアミノ酸、ジペプチド、トリペプチド及びオリゴペプチドに利用することができる。mg/mL 単位の所定のアミノ酸又はペプチド質量濃度において、緊張度 (tonicity) は、ペプチドの分子量と共に減少する筈である。

30

【0391】

ナノクラスター分散系の滅菌ろ過：表 23 の列 2 a 及び 2 b において、群集化剤として 70 mg/mL トレハロースを用いて、223 mg/mL IgG の分散系を作製した。ナノクラスターのサイズは、表 21 における同様のナノクラスター形成条件に基づき、40 nm よりも小さいと見積もることができる。次に、分散系を、Millex PVDF 0.22 µm 注射器フィルター (4 mm 直径) を通してろ過して容器に入れ、透過した濃度を測定した。ろ液を収容する容器は少量の水を含有しており、これはごく僅かな濃度減少の原因となった。この実験は、これらの分散系を非無菌的環境で作製し、続いて滅菌ろ過 (例えば、充填プロセスの一部として) できることを示し、このことは、製造コストを減少させることができる。フィルターを通した後の最終濃度は、199 mg/mL であり、ろ過において少量のタンパク質しか失われなかったことを示す。

40

【0392】

荷電群集化分子。表 23 の列 3 において、群集化剤として 100 mg/mL クエン酸ナ

50

トリウムを用いて、 238 mg/mL IgGの分散系を作製した。クエン酸ナトリウムは、クラウドーとして作用できるトレハロースと同様のサイズの荷電分子であり、ナノクラスターの分散系が、荷電及び非荷電分子の両方により形成され得ることを規定する。

【0393】

【表 2 5】

表 23. アルギニンにより形成されたヒツジ IgG ナノクラスターと、滅菌ろ過のためにろ過されたナノクラスター

No.	タンパク質の 初期濃度 (mg/ml)	タンパク質溶液の 初期容量(μl)	遠心分離の 時間(分)	バッファー の総濃度 (mM)	タンパク 質の最終 濃度 (mg/ml)	トレハロー スの濃度 (mg/ml)	重量オスモ ル濃度/等張 性濃度にお ける重量オ スモル濃度	粘度 (cP)	固有粘 度
1	52	503	20	20	298	100 (アルギ ニン)	1.89	73.36	7.21
2a (ろ過 前)	5	25.84 mL	40*	50	217	70	0.92	46.89	10.39
2b (ろ過 後)	5	25.84 mL	40*	50	200	70	0.92	26.27	9.91
3	44	609	66	20	238	100 (クエン 酸ナトリウ ム)	3.56	391	11.7

*より大量の試料容量が必要とされるため、4500rcfで行った。

実施例 V I I

これらの実験は、他に断りがなければ実施例 4 及び 6 における実験と同様に行った。全試料は、使用前に F P L C により精製（99.9%単量体）されたポリクローナルヒツジ Ig G（Rockland Immunochemicals 製造）を用いた。遠心分離後の濃度を次の通りに測定した。2.00 μ l の分散系を、分散系が存する緩衝溶液の塩濃度に対応して、20 mM 又は 50 mM リン酸バッファー（pH 6.4）998 μ l に希釈した。手動で振盪することにより試料を十分に混合し、続いて 1 mL Hellma QS 10 mm セルに移した。Cary 3E UV/VIS 分光光度計により 280 nm における吸光度を測定し、続いて、Rockland Immunochemicals により提供された消衰係数（ $E^{0.1\%}$ ）1.43 により Beers の法則を用いて濃度に変換した。

10

【0395】

$E^{0.1\%}$ 消衰係数は、1 mg/mL タンパク質溶液の参照状態により一般に用いられるモル濃度消衰係数である。この正規化は、モル濃度消衰係数、 ϵ の $M^{-1} cm^{-1}$ から、 $E^{0.1\%}$ 係数の $(mg/mL)^{-1} cm^{-1}$ への単位の変化として現れる。これら 2 種の含量は、式 $\epsilon = (E^{0.1\%}) MW$ により関連付けられる。Beers の法則における $E^{0.1\%}$ 消衰係数の使用は、タンパク質濃度を mg/mL で直接的に示し、一方、モル濃度消衰係数 ϵ は、モル濃度を生じる。特に分子量が正確に知られていない場合、 $E^{0.1\%}$ 消衰係数は、直接質量濃度測定に対してより実用的である。

【0396】

20

クラウダーとしてトレハロースを用いて、表 2 4 及び表 2 5 に結果を示す遠心ろ過濃縮によりヒツジ Ig G のナノクラスターを生成した。以前に記載された通りに注射器を用いることにより、分散系粘度を決定した。動的光散乱（DLS）を用いて、クラスターの水力学的直径を決定し、分子篩クロマトグラフィー（SEC）を用いて、不可逆的凝集体の存在を点検した。等張性である表 2 5 における列 3 を例外として、各事例において、分散系は僅かに低張性であった。提示されている通り、より長い遠心分離時間は、その結果、より濃縮された分散系と同等であり、粘度を増加させた。分散系の粘度及び水力学的直径を報告する。

【0397】

【表 2 6】

表 24: 遠心ろ過濃縮方法により形成されたヒツジ IgG のナノクラスターの分散系特性

No.	タンパク質の 初期濃度 (mg/ml)	タンパク質溶液 の初期容量(μl)	遠心分離の 時間(分)	トレハ ロース の濃度 (mg/ml)	重量オスモル 濃度/等張性 濃度における 重量オスモル 濃度	タンパク質 の最終濃度 (mg/ml)	溶媒粘 度(cP)	粘度 (cP)	固有粘 度	DLS による水 力学的直径 (nm)
1	43	473	22	70	0.92	233	1.13	33	9	30

【表 2 7】

表 25: 遠心ろ過濃縮方法により形成されたヒツジ IgG のナノクラスターの等張性分散系

No.	タンパク質の 初期濃度 (mg/ml)	タンパク質溶 液の初期容量 (μ l)	遠心分離の 時間(分)	トレハ ロース の濃度 (mg/ml)	重量オスモ ル濃度/等張 性濃度にお ける重量オ スモル濃度	タンパク 質の最終 濃度 (mg/ml)	溶媒粘 度(cP)	粘度 (cP)	固有粘 度	水力学的直 径 (nm)
1	46	547	46	70	0.92	312	1.13	393	10	30
2	48	568	46	70	0.92	321	1.13	389	9	31
3	48	598	37	100	1.0	254	1.22	128	11	40

アルギニンは、タンパク質溶液における安定化効果を有することが示されたため (T i m a s h e f f、2006、B i o p h y s C h e m)、クラウドーとしてのアルギニンの使用も検査した。表 26 に示す通り、クラウドーとしてアルギニンを用いて遠心ろ過により、R o c k l a n d c h e m i c a l 製ヒツジ I g G のナノクラスターを生成した。D L S における計数率は、およそ 1000 カウント/秒 (counts per second) (それに対し、トレハロースを含有する分散系は数万カウント/秒) であり、よって、正確な自己相関関数を得るには小さすぎる。最終タンパク質濃度 296 mg/ml に対し、僅か 7 の固有粘度により粘度は僅か 73 cP であった。mg/ml 単位の所定のアミノ酸又はペプチド質量濃度において、緊張度はペプチドの分子量と共に減少するため、クラウドーとしてのアルギニン及び他のアミノ酸の使用には利点がある。

10

【0400】

pH 6.4 の 20 mM リン酸ナトリウムバッファーにおける 100 mg/mL アルギニンクラウドーからなる 296 mg/mL I g G 分散系 (表 26 における列 3) を走査型電子顕微鏡 (S E M) により解析した。S E M (30 KV における H i t a c h i S - 5500 走査型電子顕微鏡を使用) 用のアルギニン試料を調製するため、クラウドーとして N M P を用いて、一定のクラウドー体積分率 0.077 (296 mg/ml の本来の分散系におけるクラウドー分率の体積に相当) において約 75 mg/ml (本来のタンパク質濃度の 4 分の 1) となるよう分散系を希釈し、レイシー炭素膜を備える銅 T E M グリッド上に滴下し、過剰な液体を拭き取って除去し、液体窒素中に浸漬することにより急速に凍結し、続いて凍結乾燥した。図 52 において個々のナノクラスターの画像を見ることができる。各画像は、レイシー炭素グリッド上における単一のナノ粒子を含有する。ナノクラスターは、直径 50 ~ 100 nm の間である。

20

【0401】

【表 28】

表 26: クラウドーとして 100mg/ml 濃度のアルギニン有する、遠心ろ過濃縮方法により形成されたヒツジ IgG のナノクラスターの分散系

No.	用いたクラウドー	クラウドーの濃度 (mg/ml)	重量オスモル濃度/等張性濃度における重量オスモル濃度	タンパク質の初期濃度 (mg/ml)	タンパク質溶液の初期容量 (μl)	遠心分離の時間(分)	タンパク質の最終濃度 (mg/ml)	溶媒粘度	粘度 (cP)	固有粘度
1	アルギニン	100	1.89	69	550	25	298	1.36	166	8
2	アルギニン	100	1.89	69	550	25	323	1.36	207	8
3	アルギニン	100	1.89	58	595	21	296	1.36	73	7
4	アルギニン	100	1.89	47	555	17	218	1.36	24	9

貯蔵安定性。外因性クラウダーとしてトレハロースを用いて調製した分散系の貯蔵安定性を解析し、これを表 27 及び図 50 に報告する。図 53 に示す通り、遠心ろ過濃縮方法により形成された、50 mM リン酸バッファー（0.92 の重量オスモル濃度／等張性濃度における重量オスモル濃度）における 217 mg/mL IgG、70 mg/mL トレハロース分散系を約 1 カ月間凍結した。−40 °C における凍結状態で 1 カ月間貯蔵した後、試料を 4 °C の冷蔵庫で解凍し、続いて解析した。粘度及び水力学的直径は、貯蔵後に殆ど変化しなかった。

【0403】

【表 29】

表 27: 凍結前後の分散系特徴。注記:解凍後に全サイズを得た。さらに、大量の初期容量は、表 28 に記載する滅菌ろ過実験に必要とされる大容量を得るための Millipore Centricon フィルターの使用によるものである。

10

分散系の状態	タンパク質の初期濃度 (mg/ml)	タンパク質溶液の初期容量 (ml)	遠心分離の時間 (分)	粘度 (cP)	固有粘度	水力学的直径 (nm)
凍結前	5	25.84	35	36±9	9	30*
凍結後	5	25.84	35	35	9	26*

20

【0404】

無菌分散系の生成は全製造コストを低下させるため、産業上の利用に有益となり得る。したがって、滅菌ろ過の使用を解析した。表 27 にも示す試料の滅菌ろ過の結果を表 28 に示す。分散系を形成した後、滅菌ろ過実験を行った。50 mM リン酸バッファー（0.92 の重量オスモル濃度／等張性濃度における重量オスモル濃度）における 217 mg/mL IgG、70 mg/mL トレハロース分散系を最初に調製し、0.22 µm フィルターに通した。次に、表 27 に示す条件に従って分散系を凍結し、貯蔵し、解凍した。その後、水力学的直径を測定した。ろ過前後で同様のサイズは、フィルターを通り抜けたナノクラスターを示す。

30

【0405】

Cary 3E UV/VIS 分光光度計において分散系の濁度を測定し、これを表 296 に報告する。図 51 は、変動波長においてろ過前の濁度が非常に低いことを立証し、よって、分散系の光学的透明度を強化する。

【0406】

【表 3 0】

表 28. 滅菌ろ過。凍結前後の分散系特徴。注記:試料を凍結し、解凍した後に全サイズを得た。さらに、大量の初期容量は、滅菌ろ過実験に必要とされる大容量を得るための Millipore Centricon フィルターの使用によるものである。

分散系の 状態	タンパク質の 初期濃度 (mg/ml)	タンパク質溶液の 初期容量(ml)	遠心分離の時間 (分)	タンパク質 の最終濃度 (mg/ml)	粘度 (cP)	固有粘度	水力学的直径 (nm)
ろ過前	5	25.84	35	217	36±9	9	30
ろ過後	5	25.84	35	200	26	10	26

【 0 4 0 7】

10

20

30

40

【表 3 1】

表 29: 図 2 におけるナノクラスターの分散系の光学的特性

分散系	600nm における吸光度	600nm における濁度 (l/cm)	吸光度、平均 400 ~ 700nm	濁度、平均 400 ~ 700nm(l/cm)
217mg/ml IgG+70mg/ml トレ ハコース	0.113	0.261	0.145	0.335

10

【0408】

本明細書に記されているいずれかの実施形態は、本発明のいずれかの方法、キット、試薬又は組成物に関して実行することができ、逆もまた同じであると考えられる。さらに、本発明の組成物を用いて、本発明の方法を達成することができる。

【0409】

本明細書に記載されている特定の実施形態は、例証として示されており、本発明を限定するものではないことが理解されよう。本発明の主要な特色は、本発明の範囲から逸脱することなく、様々な実施形態において利用することができる。当業者であれば、本明細書に記載されている特定の手順の数多くの均等物を認識できる、或いは単なるルーチン実験により確認することができる。このような均等物は、本発明の範囲内に収まるものと考えられ、特許請求の範囲により網羅される。

20

【0410】

本明細書において言及されているあらゆる刊行物及び特許出願は、本発明が属する技術分野の当業者の技能水準を示す。あらゆる刊行物及び特許出願は、あたかも個々の刊行物又は特許出願それぞれが、参照により援用されていると明確且つ個々に示されているのと同じ程度まで、参照によりここに援用する。

【0411】

本明細書における用語「又はこれらの組み合わせ」は、この用語に先行して列挙されている項目のあらゆる並べ替え及び組み合わせを意味する。例えば、「A、B、C 又はこれらの組み合わせ」は、A、B、C、AB、AC、BC 又は ABC のうち少なくとも 1 つを包含するよう企図されており、特定の文脈において順序が重要であるならば、BA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC 又は CAB も包含するよう企図されている。この例を続けると、BB、AAA、MB、BBC、AAAABCC、CBBAAA、CABABAB 等々、1 つ又は複数の項目又は用語の反復を含有する組み合わせが明らかに包含されている。当業者であれば、他の事柄が文脈から明らかでない限り、通常、任意の組み合わせにおける項目又は用語の数に限界が存在しないことを理解されよう。

30

【0412】

本明細書において開示及び請求されている組成物及び／又は方法は全て、本開示を踏まえることにより、必要以上に実験することなく作製及び実行することができる。本発明の組成物及び方法を好ましい実施形態の観点から説明してきたが、本発明の概念、精神及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載されている組成物及び／又は方法並びに方法のステップ又は一連のステップに変化を加えてよいことは、当業者にとって明らかであろう。当業者にとって明らかなこのような類似の代替及び修正は全て、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲及び概念の内に収まるものと考えられる。

40

【0413】

本明細書に記載されている実施例及び実施形態は、単に例証目的のためのものであり、これを踏まえた様々な修正又は変化が当業者に示唆され、本願の精神及び権限並びに添付の特許請求の範囲の内に包含されるべきものであることが理解される。本明細書に引用されているあらゆる刊行物、特許及び特許出願は、これによりあらゆる点においてその全内

50

容を参照により援用される。

【0414】

V I I . 実施形態

実施形態 1

透明な、低粘性、高タンパク質濃度の分散系であって、前記分散系が複数のナノクラスターを含み、前記複数のナノクラスターのそれぞれが複数のタンパク質を含み、前記複数のタンパク質のそれぞれがアミノ酸配列同一性を共有する、分散系。

【0415】

実施形態 2

前記複数のナノクラスターのそれぞれの平均直径が約 20 から約 1,000 ナノメートルの間である、実施形態 1 に記載の分散系。 10

【0416】

実施形態 3

前記平均直径が水力学的直径の平均値である、実施形態 2 に記載の分散系。

【0417】

実施形態 4

前記平均直径が、前記複数のナノクラスターの最長寸法の平均値である、実施形態 2 に記載の分散系。

【0418】

実施形態 5 20

前記複数のナノクラスター中の前記複数のタンパク質の 5 % 未満が不可逆的に凝集している、実施形態 1 に記載の分散系。

【0419】

実施形態 6

前記複数のナノクラスター中の前記複数のタンパク質の 2 % 未満が不可逆的に凝集している、実施形態 1 に記載の分散系。

【0420】

実施形態 7

前記複数のナノクラスター中の前記複数のタンパク質の 1 % 未満が不可逆的に凝集している、実施形態 1 に記載の分散系。 30

【0421】

実施形態 8

粘度が約 1 センチポアズから約 1000 センチポアズの間である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0422】

実施形態 9

粘度が約 1 センチポアズから約 500 センチポアズの間である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0423】

実施形態 10 40

粘度が約 1 センチポアズから約 250 センチポアズの間である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0424】

実施形態 11

粘度が約 1 センチポアズから約 100 センチポアズの間である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0425】

実施形態 12

粘度が約 1 センチポアズから約 90 センチポアズの間である、実施形態 1 に記載の分散系。 50

【0426】

実施形態13

粘度が約1センチポアズから約80センチポアズの間である、実施形態1に記載の分散系。

【0427】

実施形態14

粘度が約1センチポアズから約70センチポアズの間である、実施形態1に記載の分散系。

【0428】

実施形態15

粘度が約1センチポアズから約60センチポアズの間である、実施形態1に記載の分散系。

【0429】

実施形態16

粘度が約1センチポアズから約50センチポアズの間である、実施形態1に記載の分散系。

【0430】

実施形態17

粘度が約1センチポアズから約40センチポアズの間である、実施形態1に記載の分散系。

【0431】

実施形態18

粘度が約50センチポアズであり、せん断速度が約1000秒⁻¹である、実施形態1に記載の分散系。

【0432】

実施形態19

粘度が約25センチポアズから約75センチポアズの間であり、せん断速度が約1000秒⁻¹である、実施形態1に記載の分散系。

【0433】

実施形態20

粘度が約10センチポアズから約90センチポアズの間であり、せん断速度が約1000秒⁻¹である、実施形態1に記載の分散系。

【0434】

実施形態21

粘度が約50センチポアズであり、せん断速度が約100秒⁻¹から約50000秒⁻¹の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0435】

実施形態22

粘度が約25センチポアズから75センチポアズの間であり、せん断速度が約100秒⁻¹から約50000秒⁻¹の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0436】

実施形態23

粘度が約25センチポアズから75センチポアズの間であり、せん断速度が約1000秒⁻¹から約100000秒⁻¹の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0437】

実施形態24

前記粘度が、注射器装填法により測定される、実施形態8から23のいずれか一項に記載の分散系。

【0438】

実施形態25

10

20

30

40

50

前記分散系は注射可能であるが、同一濃度の前記複数のタンパク質の水溶液は注射可能ではない、実施形態 1 に記載の分散系。

【0439】

実施形態 26

粘度が、同一濃度の前記複数のタンパク質の水溶液の粘度の約 2 分の 1 である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0440】

実施形態 27

粘度が、同一濃度の前記複数のタンパク質の水溶液の粘度の約 5 分の 1 である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0441】

実施形態 28

粘度が、同一濃度の前記複数のタンパク質の水溶液の粘度の約 10 分の 1 である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0442】

実施形態 29

約 200 mg / mL から約 600 mg / mL の間の前記タンパク質を含む、実施形態 1 に記載の分散系。

【0443】

実施形態 30

約 200 mg / mL から約 400 mg / mL の間の前記タンパク質を含む、実施形態 1 に記載の分散系。

【0444】

実施形態 31

約 200 mg / mL から約 300 mg / mL の間の前記タンパク質を含む、実施形態 1 に記載の分散系。

【0445】

実施形態 32

約 200 mg / mL から約 250 mg / mL の間の前記タンパク質を含む、実施形態 1 に記載の分散系。

【0446】

実施形態 33

約 200 mg / mL 超の前記タンパク質を含む、実施形態 1 に記載の分散系。

【0447】

実施形態 34

約 300 mg / mL 超の前記タンパク質を含む、実施形態 1 に記載の分散系。

【0448】

実施形態 35

約 400 mg / mL 超の前記タンパク質を含む、実施形態 1 に記載の分散系。

【0449】

実施形態 36

約 500 mg / mL 超の前記タンパク質を含む、実施形態 1 に記載の分散系。

【0450】

実施形態 37

約 600 mg / mL 超の前記タンパク質を含む、実施形態 1 に記載の分散系。

【0451】

実施形態 38

光減衰量測定値が約 0.05 cm⁻¹未満、0.1 cm⁻¹未満、0.25 cm⁻¹未満、又は 0.5 cm⁻¹未満であり、前記光減衰量測定値が、波長 400 nm から 700 nm の間の平均の光減衰量を含む、実施形態 1 に記載の分散系。

10

20

30

40

50

【0452】

実施形態39

光減衰量測定値が約 0.05 cm^{-1} 未満、 0.1 cm^{-1} 未満、 0.25 cm^{-1} 未満、又は 0.5 cm^{-1} 未満であり、前記光減衰量測定値が、波長 600 nm で得られるものである実施形態1に記載の分散系。

【0453】

実施形態40

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 nm から約 800 nm の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0454】

実施形態41

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 nm から約 600 nm の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0455】

実施形態42

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 nm から約 400 nm の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0456】

実施形態43

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 nm から約 200 nm の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0457】

実施形態44

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 nm から約 100 nm の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0458】

実施形態45

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 nm から約 75 nm の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0459】

実施形態46

前記複数のナノクラスターの平均直径が、約 20 nm から約 50 nm の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0460】

実施形態47

前記複数のナノクラスターの充填率の平均値が、約 30% から約 80% の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0461】

実施形態48

前記複数のナノクラスターの充填率の平均値が、約 30% から約 70% の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0462】

実施形態49

前記複数のナノクラスターの充填率の平均値が、約 30% から約 60% の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0463】

実施形態50

前記複数のナノクラスターの充填率の平均値が、約 30% から約 50% の間である、実施形態1に記載の分散系。

【0464】

10

20

30

40

50

実施形態 5 1

前記複数のナノクラスターの充填率の平均値が、約 5 0 % から約 6 0 % の間である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 6 5】

実施形態 5 2

前記複数のナノクラスターの充填率の平均値が、約 6 0 % から約 7 4 % の間である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 6 6】

実施形態 5 3

クラウドを含む、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 6 7】

実施形態 5 4

クラウドを含み、前記クラウドが単糖である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 6 8】

実施形態 5 5

クラウドを含み、前記クラウドが、グルコース、マンノース、フルクトース、アラビノース、キシロース、リボース、及びガラクトースから選択される単糖である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 6 9】

実施形態 5 6

クラウドを含み、前記クラウドが二糖である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 7 0】

実施形態 5 7

クラウドを含み、前記クラウドが、トレハロース、ラクツロース、ラクトース、セロビオース、マルトース、又はスクロースから選択される二糖である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 7 1】

実施形態 5 8

クラウドを含み、前記クラウドが多糖である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 7 2】

実施形態 5 9

クラウドを含み、前記クラウドが多価電解質である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 7 3】

実施形態 6 0

クラウドを含み、前記クラウドがポリ酸である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 7 4】

実施形態 6 1

クラウドを含み、前記クラウドがポリ（エチレングリコール）である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 7 5】

実施形態 6 2

クラウドを含み、前記クラウドが、P E G 2 0 0 から P E G 5 0 0 0 の間の分子量を有するポリ（エチレングリコール）である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 7 6】

実施形態 6 3

クラウドを含み、前記クラウドが塩である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 4 7 7】

実施形態 6 4

クラウドを含み、前記クラウドがデキストランである、実施形態 1 に記載の分散系。

。

10

20

30

40

50

【0478】

実施形態65

クラウドを含む、前記クラウドがボラキサマーである、実施形態1に記載の分散系。

【0479】

実施形態66

クラウドを含む、前記クラウドがアルコールである、実施形態1に記載の分散系。

【0480】

実施形態67

クラウドを含む、前記クラウドがアミノ酸又はペプチド又はタンパク質である、実施形態1に記載の分散系。 10

【0481】

実施形態68

前記タンパク質のクラウドが、ジペプチド、トリペプチド、4個のアミノ酸から成るペプチド、又は5個のアミノ酸から成るペプチドである、実施形態67に記載の分散系。

【0482】

実施形態69

クラウドを含む、前記クラウドが界面活性剤である、実施形態1に記載の分散系。

【0483】

実施形態70

トレハロース、ポリ（エチレングリコール）、エタノール、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、バッファー、又はそれらの組合せから成る群から選択されるクラウドを含む、実施形態1に記載の分散系。 20

【0484】

実施形態71

タンパク質対クラウドを約1：1の重量比で含む、実施形態1に記載の分散系。

【0485】

実施形態72

タンパク質対クラウドを約2：1の重量比で含む、実施形態1に記載の分散系。

【0486】

実施形態73

タンパク質対クラウドを約3：1の重量比で含む、実施形態1に記載の分散系。 30

【0487】

実施形態74

タンパク質対クラウドを約4：1の重量比で含む、実施形態1に記載の分散系。

【0488】

実施形態75

タンパク質対クラウドを約1：2の重量比で含む、実施形態1に記載の分散系。

【0489】

実施形態76

タンパク質対クラウドを約1：3、1：4、又は1：10の重量比で含む、実施形態1に記載の分散系。 40

【0490】

実施形態77

タンパク質対クラウドを約10：1の重量比で含む、実施形態1に記載の分散系。

【0491】

実施形態78

前記複数のナノクラスターが、多数の異なるタンパク質種を含む、実施形態1に記載の分散系。

【0492】

実施形態 79

前記複数のナノクラスターが第1の複数のナノクラスターであり、前記複数のタンパク質が第1の複数のタンパク質であり、前記分散系が第2の複数のナノクラスターをさらに含み、前記第2の複数のナノクラスターのそれぞれが第2の複数のタンパク質を含み、前記第2の複数のタンパク質のそれぞれがアミノ酸配列同一性を共有し、前記第2の複数のタンパク質が前記第1の複数のタンパク質とは異なる、実施形態1に記載の分散系。

【0493】

実施形態 80

前記複数のナノクラスターが、制御放出成分又は制御放出ポリマーをさらに含む、実施形態1に記載の分散系。

【0494】

実施形態 81

前記複数のナノクラスターのそれぞれが低分子量化合物をさらに含み、前記低分子量化合物が、診断剤、医薬剤、造影剤、発蛍光団、放射性同位体、毒素、常磁性剤、金属、金属酸化物、又はアプタマーである、実施形態1に記載の分散系。

【0495】

実施形態 82

複数のナノ粒子をさらに含む、実施形態1に記載の分散系。

【0496】

実施形態 83

前記複数のナノ粒子が、Au、磁性剤、光学剤、診断剤、医薬剤、造影剤、発蛍光団、放射性同位体、毒素、常磁性剤、金属、金属酸化物、又はアプタマーから選択される複数の化合物を含む、実施形態82に記載の分散系。

【0497】

実施形態 84

pHが、前記複数のタンパク質のほぼ等電点の値である、実施形態1に記載の分散系。

【0498】

実施形態 85

pHが、前記複数のタンパク質の等電点とは異なる、約2.5未満、約2.0未満、約1.5未満、約1.0未満、約0.8未満、約0.75未満、約0.5未満、約0.3未満、約0.2未満、約0.1未満、又は約0.05未満のpH単位である、実施形態1に記載の分散系。

【0499】

実施形態 86

pHが、約4、約4.5、約5、約5.5、約6、約6.5、約7、約7.5、約8、約8.5、約9、又は約9.5である、実施形態1に記載の分散系。

【0500】

実施形態 87

ヒト血液に対して等張である、実施形態1に記載の分散系。

【0501】

実施形態 88

ヒト血液に対して低張である、実施形態1に記載の分散系。

【0502】

実施形態 89

容量オスモル濃度が約300 mOsmol/Lである、実施形態1に記載の分散系。

【0503】

実施形態 90

容量オスモル濃度が、約250 mOsmol/Lから350 mOsmol/Lの間である、実施形態1に記載の分散系。

【0504】

10

20

30

40

50

実施形態 9 1

容量オスモル濃度が約 1 5 0 m O s m o / L から 4 5 0 m O s m o l / L の間である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 5 0 5】

実施形態 9 2

容量オスモル濃度が約 1 5 0 m O s m o / L から 6 0 0 m O s m o l / L の間である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 5 0 6】

実施形態 9 3

前記複数のタンパク質のそれぞれが、抗体、抗体断片、ペグ化タンパク質、脂質付加タンパク質、成長因子若しくは成長因子拮抗薬、サイトカイン若しくはサイトカイン拮抗薬、受容体若しくは受容体拮抗薬、抗原、ワクチン、又は抗炎症剤である、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 5 0 7】

実施形態 9 4

前記複数のタンパク質が複数のコンジュゲートであり、前記コンジュゲートのそれぞれが、低分子量化合物と結合しているタンパク質であり、前記低分子量化合物が、診断剤、医薬剤、造影剤、発蛍光団、放射性同位体、毒素、常磁性剤、又はアプタマーである、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 5 0 8】

実施形態 9 5

前記複数のタンパク質が、自己群集している、実施形態 1 に記載の分散系。

【0 5 0 9】

実施形態 9 6

前記複数のタンパク質が複数のコンジュゲートではなく、前記タンパク質のそれぞれがアミノ酸から成る、実施形態 1 から 9 5 のいずれか一項に記載の分散系。

【0 5 1 0】

実施形態 9 7

実施形態 1 から 9 6 のいずれか一項に記載の分散系を含む医薬組成物であって、前記複数のタンパク質が、複数の薬学的に活性なタンパク質である、医薬組成物。

【0 5 1 1】

実施形態 9 8

2 1 から 2 7 ゲージの針に取り付けられている注射器内に入っている、実施形態 9 7 に記載の医薬組成物。

【0 5 1 2】

実施形態 9 9

透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法であって、タンパク質ークラウダー配合液を濃縮し、それにより前記分散系を形成するステップを含み、前記分散系が複数のナノクラスターを含み、前記複数のナノクラスターのそれぞれが複数のタンパク質を含み、前記複数のタンパク質のそれぞれがアミノ酸配列同一性を共有し、前記分散系が、透明な、低粘性の分散系であり、前記分散系が、約 2 0 0 m g / m L 超の濃度の前記タンパク質を含み、前記分散系が、複数のクラウダーを含む、方法。

【0 5 1 3】

実施形態 1 0 0

前記濃縮するステップに先立ち、前記タンパク質の溶液を、容器中でクラウダーと配合してタンパク質ークラウダー配合液を形成するステップを含む、実施形態 9 9 に記載の方法。

【0 5 1 4】

実施形態 1 0 1

10

20

30

40

50

前記タンパク質ークラウダー配合液が、タンパク質ナノクラスターの平均直径が、前記濃縮するステップにより形成される前記複数のタンパク質ナノクラスターの平均直径とは異なる、タンパク質ナノクラスター分散系を含む、実施形態 99 に記載の方法。

【0515】

実施形態 102

透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法であって、粉末形態のタンパク質をクラウダー及び分散液と配合し、それにより、複数の前記タンパク質を含む複数のナノクラスターを含む分散系を形成するステップを含み、前記複数のタンパク質のそれぞれがアミノ酸配列同一性を共有し、前記分散系が、透明な、低粘性の分散系であり、前記分散系が、約 200 mg/mL 超の濃度の前記タンパク質を含む、方法。

10

【0516】

実施形態 103

前記配合するステップに先立ち、タンパク質混合物から溶媒を除去し、それにより前記粉末形態のタンパク質を形成するステップを含む、実施形態 102 に記載の方法。

【0517】

実施形態 104

前記タンパク質混合物が、タンパク質分散系又はタンパク質溶液である、実施形態 103 に記載の方法。

【0518】

実施形態 105

前記除去するステップが、前記タンパク質混合物を粉碎、沈殿、透析、篩過、噴霧乾燥、凍結乾燥、若しくは噴霧フリーズドライ、噴霧凍結するステップを含む、又は、前記除去するステップが、前記タンパク質混合物に、渦巻き式その場凍結技術 (SWIFT) を適用するステップを含む、実施形態 103 に記載の方法。

20

【0519】

実施形態 106

前記溶媒が水である、実施形態 103 に記載の方法。

【0520】

実施形態 107

透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系を作製する方法であって、粉末形態のタンパク質を分散液と配合し、それにより、複数の前記タンパク質を含む複数のナノクラスターを含む分散系を形成するステップを含み、前記複数のタンパク質のそれぞれがアミノ酸配列同一性を共有し、前記分散系が、透明な、低粘性の分散系であり、前記分散系が、約 200 mg/mL 超の濃度の前記タンパク質を含む、方法。

30

【0521】

実施形態 108

前記配合するステップに先立ち、タンパク質ークラウダー混合物から溶媒を除去し、それにより前記粉末形態のタンパク質を形成するステップを含む、実施形態 107 に記載の方法。

40

【0522】

実施形態 109

前記タンパク質ークラウダー混合物が、タンパク質分散系又はタンパク質溶液である、実施形態 108 に記載の方法。

【0523】

実施形態 110

前記除去するステップが、前記タンパク質ークラウダー混合物を粉碎、沈殿、透析、篩過、噴霧乾燥、凍結乾燥、若しくは噴霧フリーズドライ、噴霧凍結するステップを含む、又は、前記除去するステップが、前記タンパク質ークラウダー混合物に渦巻き式その場凍結技術 (SWIFT) を適用するステップを含む、実施形態 108 に記載の方法。

50

【0524】

実施形態111

前記溶媒が水である、実施形態108に記載の方法。

【0525】

実施形態112

前記分散液が、水、水性液、又は非水性液である、実施形態102又は107に記載の方法。

【0526】

実施形態113

前記分散液が、安息香酸ベンジル、又は、安息香酸ベンジルと、ベニバナ油、ゴマ油、ヒマシ油、綿実油、キャノーラ油、サフラン油、オリーブ油、ピーナッツ油、ヒマワリ種子油、 α -トコフェロール、Miglyol 812、及びオレイン酸エチルから選択される1つ若しくは複数の油とを合わせたものである、実施形態102又は107に記載の方法。

10

【0527】

実施形態114

前記除去するステップが、前記混合物に渦巻き式その場凍結技術（SWIFT）を適用するステップを含む、実施形態103又は108に記載の方法。

【0528】

実施形態115

SWIFTを適用するステップが、

1. 前記混合物を含有するバイアルを、極低温剤と接触させながら回転させるステップと、
 2. 前記混合物をすべて凍結するステップであり、前記バイアルの内側表面上の前記凍結された混合物の薄いフィルム、及び、前記バイアルの中心部に向かってらせん方向に1つ又は複数の後続のフィルムが得られるステップと、
 3. 前記凍結された混合物を凍結乾燥するステップと
- を含む、実施形態114に記載の方法。

20

【0529】

実施形態116

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約300mg/mL超である、実施形態99から115のいずれか一項に記載の方法。

30

【0530】

実施形態117

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約400mg/mL超である、実施形態99から115のいずれか一項に記載の方法。

【0531】

実施形態118

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約500mg/mL超である、実施形態99から115のいずれか一項に記載の方法。

40

【0532】

実施形態119

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約600mg/mL超である、実施形態99から115のいずれか一項に記載の方法。

【0533】

実施形態120

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約200mg/mLから約300mg/mLの間である、実施形態99から115のいずれか一項に記載の方法。

【0534】

実施形態121

50

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約 300 mg/mL から約 400 mg/mL の間である、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0535】

実施形態 122

前記分散系中の前記タンパク質の濃度が約 400 mg/mL から約 500 mg/mL の間である、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0536】

実施形態 123

前記クラウダーが、グリセロール、エリトリール、アラビノース、キシロース、リボース、イノシトール、フルクトース、ガラクトース、マルトース、グルコース、マンノース、トレハロース、スクロース、ポリ（エチレングリコール）、アミノ酸、ペプチド、カルボマー 1342、グルコースポリマー、シリコーンポリマー、ポリジメチルシロキサン、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-c o -グリコール酸）、ポリ乳酸、デキストラン、ポロキサマー、有機共溶媒であり、エタノール、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、PEG 300、PEG 400、PEG 200、PEG 3350、プロピレングリコール、N,Nジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ソルケター、テタヒドロフルフリルアルコール、ジグリム、乳酸エチルから選択される有機共溶媒、それらの塩、バッファー、又は組合せである、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0537】

実施形態 124

前記クラウダーが多糖である、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0538】

実施形態 125

前記クラウダーがポリ（エチレングリコール）である、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0539】

実施形態 126

前記クラウダーが NMP 又はアルコールである、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0540】

実施形態 127

前記クラウダーがアミノ酸である、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0541】

実施形態 128

前記濃縮するステップが、ろ過を用いて実施される、実施形態 99 に記載の方法。

【0542】

実施形態 129

前記濃縮するステップが、遠心ろ過を用いて実施される、実施形態 99 に記載の方法。

【0543】

実施形態 130

前記濃縮するステップが、正の気体圧力又は機械的圧力を用いて実施される、実施形態 99 に記載の方法。

【0544】

実施形態 131

前記濃縮するステップが、接線ろ過、透析、又はバッファーの吸収を用いて実施される、実施形態 99 に記載の方法。

【0545】

実施形態 132

10

20

30

40

50

クラウドー又は前記タンパク質が、前記濃縮するステップの間に前記タンパク質－クラウドー配合液に加えられる、実施形態 99 に記載の方法。

【0546】

実施形態 133

ろ過により前記分散系を滅菌するステップをさらに含む、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0547】

実施形態 134

直径約 200 nm の細孔を備えるフィルターを通したろ過により前記分散系を滅菌するステップをさらに含む、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

10

【0548】

実施形態 135

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの平均直径が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0549】

実施形態 136

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの解凍後の平均直径が、前記複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約 1 % 以内である、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

20

【0550】

実施形態 137

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの解凍後の平均直径が、前記複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約 5 % 以内である、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0551】

実施形態 138

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの解凍後の平均直径が、前記複数のナノクラスターの凍結前の平均直径の約 10 % 以内である、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

30

【0552】

実施形態 139

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含み、前記分散系の粘度が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0553】

実施形態 140

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含み、前記分散系の解凍後の粘度が、前記分散系の凍結前の粘度の約 1 % 以内である、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

40

【0554】

実施形態 141

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含み、前記分散系の解凍後の粘度が、前記分散系の凍結前の粘度の約 5 % 以内である、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0555】

実施形態 142

50

前記分散系を凍結するステップ、貯蔵するステップ、及び解凍するステップをさらに含み、前記分散系の解凍後の粘度が、前記分散系の凍結前の粘度の約 10 % 以内である、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0556】

実施形態 143

前記分散系を凍結するステップ、前記凍結された分散系を約 1 日間貯蔵するステップ、及び前記分散系を解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの平均直径が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0557】

実施形態 144

前記分散系を凍結するステップ、前記凍結された分散系を約 3 日間貯蔵するステップ、及び前記分散系を解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの平均直径が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0558】

実施形態 145

前記分散系を凍結するステップ、前記凍結された分散系を約 1 週間貯蔵するステップ、及び前記分散系を解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの平均直径が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0559】

実施形態 146

前記分散系を凍結するステップ、前記凍結された分散系を約 1 カ月間貯蔵するステップ、及び前記分散系を解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの平均直径が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0560】

実施形態 147

前記分散系を凍結するステップ、前記凍結された分散系を約 1 年間貯蔵するステップ、及び前記分散系を解凍するステップをさらに含み、前記複数のナノクラスターの平均直径が、解凍後と凍結前とでほぼ同じである、実施形態 99 から 115 のいずれか一項に記載の方法。

【0561】

実施形態 148

当該治療を必要とする患者における疾患を治療する方法であって、有効量の実施形態 1 から 96 のいずれか一項に記載の分散系を前記患者に投与するステップを含む、方法。

【0562】

実施形態 149

前記投与される分散系が、前記患者の体重 1 kg 当たり約 0.5 mg、約 1 mg、約 2 mg、約 4 mg、約 6 mg、約 8 mg、約 10 mg のタンパク質を含む、実施形態 148 に記載の方法。

【0563】

実施形態 150

透明な、低粘性、高タンパク質のタンパク質ナノクラスター分散系のタンパク質ナノクラスターの平均直径を修正する方法であって、前記分散系中のクラウダー又は前記タンパク質の濃度を増加又は減少させるステップを含み、前記分散系が複数のナノクラスターを含み、前記複数のナノクラスターのそれぞれが複数のタンパク質を含み、前記複数のタンパク質のそれぞれがアミノ酸配列同一性を共有し、前記分散系が、透明な、低粘性の分散系であり、前記分散系が、約 200 mg/mL 超の濃度の前記タンパク質を含む、方法。

10

20

30

40

50

【 0 5 6 4 】

実施形態 1 5 1

実施形態 1 から 9 6 のいずれか一項に記載の分散系又は実施形態 9 7 若しくは 9 8 に記載の医薬組成物を備えるキット。

【 0 5 6 5 】

実施形態 1 5 2

粉末形態のタンパク質又は粉末形態のタンパク質－クラウダー混合物と分散液とを備えるキット。

【 0 5 6 6 】

参考文献

- U.S. Patent 7,374,782: Production of Microspheres.
- U.S. Patent Application 20100158899: Protein Formulation.
- U.S. Patent Application No.20060024379: Protein Microspheres having Injectable Properties at High Concentrations.
- Chari, R., K. Jerath, et al. (2009). "Long- and Short-Range Electrostatic Interactions Affect the Rheology of Highly Concentrated Antibody Solutions." *Pharm. Res.* 26(12): 2607-2618.
- Groenewold, J. and W. K. Kegel (2001). "Anomalously large equilibrium clusters of colloids." *Journal of Physical Chemistry B* 105(47): 11702-11709.
- Horn, F. (2000). "Hydrodynamic and Colloidal Interactions in Concentrated Charge-Stabilized Polymer Dispersions." *Journal of Colloid and Interface Science* 225(1): 166-178.
- Kulkarni, A. M., N. M. Dixit, et al. (2003). "Ergodic and non-ergodic phase transitions in globular protein suspensions." *Faraday Discuss.* 123: 37-50.
- Maynard, J. A., C. B. M. Maassen, et al. (2002). "Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity." *Nature Biotechnology* 20: 597-601.
- Miller, M. A. (2011). Ph. D. Thesis. Department of Chemical Engineering. Austin, University of Texas at Austin. Ph. D.
- Porcar, L., P. Falus, et al. (2010). "Formation of the Dynamic Clusters in Concentrated Lyoszyme Protein Solutions." *J. Phys. Chem. Lett.* 1: 126-129.
- Saluja, A. and D. S. Kalonia (2008). "Nature and consequences of protein-protein interactions in high protein concentration solutions." *Int. J. Pharm.* 358:1-15.
- Shen, V. K., J. K. Cheung, et al. (2006). "Coarse-Grained Strategy for Modeling Protein Stability in Concentrated Solutions. II: Phase Behavior." *Biophysical Journal* 90(6): 1949-1960.
- Shen, V. K., J. K. Cheung, et al. (2009). "Insights into Crowding Effects on Protein Stability from Coarse-Grained Model." *Journal of Biomechanical Engineering* 131: 071002 (071007pg).
- Sinko, Patrick J., and Alfred N. Martin. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- Sutherland, J. N. and J. A. Maynard (2009). "Characterization of a Key Neutralizing Epitope on Pertussis Toxin Recognized by Monoclonal Antibody 1B7." *Biochemistry* 48: 11982-11993.
- Zhou, H.-X., G. Rivas, et al. (2008). "Macromolecular Crowding and Confinement: Biochemical, Biophysical, and Potential Physiological Consequences*." *Annual Review of Biophysics* 37(1): 375-397.
- Arfken, G. B. and H. J. Weber (1995). *Mathematical Methods for Physicists*. San

Diego, Academic Press.

Asakura, S. and F. Oosawa (1958). "Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules." *Journal of Polymer Science* 33(126): 183-192.

Chari, R., K. Jerath, et al. (2009). "Long- and short-range electrostatic interactions affect the rheology of highly concentrated antibody solutions." *Pharmaceutical Research* 26(12): 2607-2618.

Cheung, J. K. and T. M. Truskett (2005). "Coarse-grained strategy for modeling protein stability in concentrated solutions." *Biophysical Journal* 89(4): 2372-2384.

Cheung, M. S., D. Klimov, et al. (2005). "Molecular crowding enhances native state stability and refolding rates of globular proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(13): 4753-4758.

Chi, E. Y., S. Krishnan, et al. (2003). "Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor." *Protein Science* 12(5): 903-913.

Crowther, J. R. and Editor (1995). *ELISA: Theory and Practice*. [In: *Methods Mol. Biol.* (Totowa, N. J.), 1995; 42], Humana.

Davis-Searles, P. R., A. J. Saunders, et al. (2001). "Interpreting the effects of small uncharged solutes on protein-folding equilibria." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30: 271-306.

del Alamo, M., G. Rivas, et al. (2005). "Effect of Macromolecular Crowding Agents on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Protein Assembly In Vitro." *Journal of Virology* 79(22): 14271-14281.

Dhar, A., A. Samiotakis, et al. (2010). "Structure, function, and folding of phosphoglycerate kinase are strongly perturbed by macromolecular crowding." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(41): 17586-17591.

Fields, G. B., D. O. V. Alonso, et al. (1992). "Theory for the aggregation of proteins and copolymers." *Journal of Physical Chemistry* 96(10): 3974-3981.

Garber, E. and S. J. Demarest (2007). "A broad range of Fab stabilities within a host of therapeutic IgGs." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355(3): 751-757.

Gast, A. P., C. K. Hall, et al. (1983). "Polymer-induced phase separations in nonaqueous colloidal suspensions." *J Colloid Interface Sci* 96(1): 251-267.

Groenewold, J. and W. K. Kegel (2001). "Anomalous large equilibrium clusters of colloids." *Journal of Physical Chemistry B* 105(47): 11702-11709.

Groenewold, J. and W. K. Kegel (2004). "Colloidal cluster phases, gelation and nuclear matter." *Journal of Physics-Condensed Matter* 16(42): S4877-S4886.

Hall, D. and A. P. Minton (2003). "Macromolecular crowding: qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1649(2): 127-139.

Harn, N., T. Spitznagel, et al. (2010). *Biophysical Signatures of Monoclonal Antibodies. Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*. S. J. Shire. New York, Springer: 229-246.

Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2002). "Protein folding - Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." *Science* 295(5561): 1852-1858.

Hiemenz, P. C. and R. Rajagopalan (1997). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. New York, Marcel Dekker, Inc.

Horn, F. (2000). "Hydrodynamic and colloidal interactions in concentrated char

10

20

30

40

50

ge-stabilized polymer dispersions." *Journal of Colloid and Interface Science* 225 (1): 166-178.

Kendrick, B. S., J. F. Carpenter, et al. (1998). "A transient expansion of the native state precedes aggregation of recombinant human interferon- γ ." *PNAS* 95: 14142-14146.

Krishnan, S., E. Y. Chi, et al. (2002). "Aggregation of Granulocyte Colony Stimulating Factor under Physiological Conditions: Characterization and Thermodynamic Inhibition." *Biochemistry* 41: 6422-6431.

Kumar, V., V. K. Sharma, et al. (2009). "In Situ Precipitation and Vacuum Drying of Interferon Alpha-2a: Development of a Single-Step Process for Obtaining Dry, Stable Protein Formulation." *International Journal of Pharmaceutics* 366(1-2): 88-98.

Lavinder, J. J., S. B. Hari, et al. (2009). "High-throughput thermal scanning: a general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering." *Journal of the American Chemical Society* 131(11): 3794-3795.

Lee, J. C. and S. N. Timasheff (1981). "The stabilization of proteins by sucrose." *Journal of Biological Chemistry* 256(14): 7193-7201.

Liu, J., M. D. H. Nguyen, et al. (2005). "Reversible Self-Association Increases the Viscosity of a Concentrated Monoclonal Antibody in Aqueous Solution." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94(9): 1928-1940.

Lu, P. J., J. C. Conrad, et al. (2006). "Fluids of Clusters in Attractive Colloids." *Physical Review Letters* 96(2).

Lu, P. J., E. Zaccarelli, et al. (2008). "Gelation of particles with short-range attraction." *Nature* 453(7194): 499-503.

Miller, D. P., J. J. dePablo, et al. (1997). "Thermophysical Properties of Trehalose and its Concentrated Aqueous Solutions." *Pharmaceutical Research* 14(5): 578-590.

Miller, M. A., J. D. Engstrom, et al. (2010). "Low Viscosity Highly Concentrated Injectable Nonaqueous Suspensions of Lysozyme Microparticles." *Langmuir* 26(2): 1067-1074.

Minton, A. P. (1999). "Adsorption of globular proteins on locally planar surfaces. II. Models for the effect of multiple adsorbate conformations on adsorption equilibria and kinetics." *Biophysical Journal* 76(1): 176-187.

Mutch, K. J., J. S. van Duijneveldt, et al. (2007). "Colloid-Polymer Mixtures in the Protein Limit." *Soft Matter* 3(2): 155.

Oconnor, T., P. Debenedetti, et al. (2007). "Stability of proteins in the presence of carbohydrates; experiments and modeling using scaled particle theory." *Biophysical Chemistry* 127(1-2): 51-63.

Pan, W. C., P. G. Vekilov, et al. (2010). "Origin of anomalous mesoscopic phases in protein solutions." *Journal of Physical Chemistry B* 114(22): 7620-7630.

Pielak, G. J. and A. C. Miklos (2010). "Crowding and function reunite." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(41): 17457-17458.

Pilz, I., G. Puchwein, et al. (1970). "Small Angle X-Ray Scattering of a Homogeneous GammaG1 Immunoglobulin." *Biochemistry* 9(2): 211-219.

Ping, G., G. Yang, et al. (2006). "Depletion force from macromolecular crowding enhances mechanical stability of protein molecules." *Polymer* 47(7): 2564-2570.

Porcar, L., P. Falus, et al. (2010). "Formation of the dynamic clusters in concentrated lysozyme protein solutions." *J. Phys. Chem. Lett.* 1: 126-129.

Roosen-Runge, F., M. Hennig, et al. (2011). "Protein self-diffusion in crowded solutions." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(29): 11815-1182

10

20

30

40

50

0.

Rosenbaum, D. F., P. C. Zamora, et al. (1996). "Phase behavior of small attractive colloidal particles." *Phys Rev Let* 76(1): 150-153.

Scherer, T. M., J. Liu, et al. (2010). "Intermolecular interactions of IgG1 monoclonal antibodies at high concentrations characterized by light scattering." *J Phys Chem B* 114: 12948-12957.

Sedgwick, H., S. U. Egelhaaf, et al. (2004). "Clusters and gels in systems of sticky particles." *Journal of Physics: Condensed Matter* 16(42): S4913-S4922.

Sharma, A. and J. Y. Walz (1996). "Direct Measurement of the Depletion Interaction in a Charged Colloidal Dispersion." *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 92(24): 4997. 10

Shen, V. K., J. K. Cheung, et al. (2006). "Coarse-grained strategy for modeling protein stability in concentrated solutions II: Phase behavior." *Biophysical Journal* 90: 1949-1960.

Shire, S. J., Z. Shahrokh, et al. (2004). "Challenges in the development of high protein concentration formulations." *J. Pharm. Sci.* 93(6): 1390-1402.

Stradner, A., H. Sedgwick, et al. (2004). "Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids." *Nature* 432(7016): 492-495.

Sutherland, J. N., C. Chang, et al. (2011). "Antibodies recognizing protective Pertussis toxin epitopes are preferentially elicited by natural infection versus acellular immunization." *Clinical and Vaccine Immunology* 18(6): 954-962. 20

Sutherland, J. N. and J. A. Maynard (2009). "Characterization of a key neutralizing epitope on Pertussis toxin recognized by monoclonal antibody 1B7." *Biochemistry* 48: 11982-11993.

Tabrizi, M. A., C. M. L. Tseng, et al. (2006). "Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies." *Drug Discovery Today* 11(1-2): 81-88.

Tam, J. M., A. K. Murthy, et al. (2010). "Kinetic Assembly of Near-IR-Active Gold Nanoclusters Using Weakly Adsorbing Polymers to Control the Size." *Langmuir* 26(11): 8988-8999.

Tam, J. M., J. O. Tam, et al. (2010). "Controlled Assembly of Biodegradable Plasmonic Nanoclusters for Near-Infrared Imaging and Therapeutic Applications." *ACS Nano* 4(4): 2178-2184. 30

ten Wolde, P. R. and D. Frenkel (1997). "Enhancement of protein crystal nucleation by critical density fluctuations." *Science* 277: 1975-1978.

Torquato, S., T. M. Truskett, et al. (2000). "Is Random Close Packing of Spheres Well Defined?" *Physical Review Letters* 84(10): 2064-2067.

Tuinier, R., G. A. Vliegenthart, et al. (2000). "Depletion interaction between spheres immersed in a solution of ideal polymer chains." *Journal of Chemical Physics* 113(23): 10768-10775.

Uchida, T., M. Nagayama, et al. (2009). "Trehalose Solution Viscosity at Low Temperatures Measured by Dynamic Light Scattering Method: Trehalose Depresses Molecular Transportation for Ice Crystal Growth." *Journal of Crystal Growth* 311(23-24): 4747-4752. 40

Vrij, A. (1976). "Polymer at interfaces and interactions in colloidal dispersions." *Pure and Applied Chemistry* 48(4): 471-483.

Wallace, B. A., R. W. Janes, et al. (2009). *Modern Techniques for Circular Dichroism and Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy*. [In: *Adv. Biomed. Spectrosc.*, 2009; 1], IOS Press.

Xia, Y. S., T. D. Nguyen, et al. (2011). "Self-Assembly of Self-Limiting Monodisperse Supraparticles from Polydisperse Nanoparticles." *Nature Nanotechnology* 6 50

(9): 580-587.

Yadav, S., J. Liu, et al. (2010). "Specific interactions in high concentration antibody solutions resulting in high viscosity." *J Pharm Sci* 99(3): 1152-1168.

Young, T. M. and C. J. Roberts (2009). "Structure and Thermodynamics of Colloidal Protein Cluster Formation: Comparison of Square-Well and Simple Dipolar Models." *The Journal of Chemical Physics* 131(12): 125104.

Zaccarelli, E. (2007). "Colloidal gels: equilibrium and non-equilibrium routes." *J Phys: Condens. Matter* 19: 323101.

Zhou, H. X., G. Rivas, et al. (2008). "Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences." *Annual Review of Biophysics* 37(1): 375-397. 10

Ahmad, M., W. Gu, et al. (2011). "Adhesive water networks facilitate binding of protein interfaces." *Nature Communications* 2: 261.

Asakura, S. and F. Oosawa (1958). "Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules." *Journal of Polymer Science* 33(126): 183-192.

Bajaj, H., V. K. Sharma, et al. (2007). "A high-throughput method for detection of protein self-association and second virial coefficient using size-exclusion chromatography through simultaneous measurement of concentration and scattered light intensity." *Pharm. Res.* 24(11): 2071-2083.

Biswas, R., N. Rohman, et al. (2008). "Intramolecular charge transfer reaction, polarity, and dielectric relaxation in AOT/water/heptane reverse micelles: pool size dependence." *The Journal of Physical Chemistry B* 112(31): 9379-9388. 20

Bottcher, C. J. F. (1945). "The dielectric constant of crystalline powders." *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas Belg.* 64(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 47-51.

Curtis, R. A., J. M. Prausnitz, et al. (1998). "Protein-protein and protein-salt interactions in aqueous protein solutions containing concentrated electrolytes." *Biotechnology and Bioengineering* 57(1): 11-21.

Groenewold, J. and W. K. Kegel (2001). "Anomalous large equilibrium clusters of colloids." *Journal of Physical Chemistry B* 105(47): 11702-11709. 30

Hiemenz, P. C. and R. Rajagopalan (1997). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. New York, Marcel Dekker, Inc.

Kanai, S., J. Liu, et al. (2008). "Reversible self-association of a concentrated monoclonal antibody solution mediated by Fab-Fab interaction that impacts solution viscosity." *J Pharm Sci* 97(10): 4219-4227.

Kralchevsky, P. A., K. D. Danov, et al. (2011). "Hydration force due to the reduced screening of the electrostatic repulsion in few-nanometer-thick films." *Current Opinion in Colloid & Interface Science*.

Kulkarni, A. M., N. M. Dixit, et al. (2003). "Ergodic and non-ergodic phase transitions in globular protein suspensions." *Faraday Discuss.* 123: 37-50. 40

McCabe, W. J., J. C. Smith, et al. (1985). *Unit Operations of Chemical Engineering*. 4th Ed, Macgraw Hill.

Minton, A. P. (2007). "The effective hard particle model provides a simple, robust, and broadly applicable description of nonideal behavior in concentrated solutions of bovine serum albumin and other nonassociating proteins." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96(12): 3466-3469.

Paddison, S. J. (2003). "Proton conduction mechanisms at low degrees of hydration in sulfonic acid-based polymer electrolyte membrane." *Annu. Rev. Mater. Res.* 33: 289-319.

Reynolds, J. A. and J. M. Hough (1957). "Formulas for dielectric constant of m 50

ixtures." *Proc. Phys. Soc., London* 70B(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 769-775.

Rintoul, M. D. and S. Torquato (1998). "Hard-sphere statistics along the metastable amorphous branch." *Physical Review* E58(1): 532.

Rosenbaum, D. F., A. M. Kulkarni, et al. (1999). "Protein interactions and phase behavior: Sensitivity to the form of the pair potential." *J Chem Phys* 111(21): 9882-9890.

S. Asakura, F. O. (1954). *J. Chem. Phys.* 22.

Senapati, S. and A. Chandra (2001). "Dielectric constant of water confined in a nanocavity." *The Journal of Physical Chemistry* B105(22): 5106-5109.

Stradner, A., H. Sedgwick, et al. (2004). "Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids." *Nature* 432(7016): 492-495.

ten Wolde, P. R. and D. Frenkel (1997). "Enhancement of protein crystal nucleation by critical density fluctuations." *Science* 277: 1975-1978.

Tuinier, R., J. Rieger, et al. (2003). "Depletion-induced phase separation in colloid-polymer mixtures." *Advances in Colloid and Interface Science* 103: 1-31.

Wang, M. and N. Pan (2007). "Numerical analyses of effective dielectric constant of multiphase microporous media." *Journal of Applied Physics* 101(11): 114102.

Yadav, S., J. Liu, et al. (2010). "Specific interactions in high concentration antibody solutions resulting in high viscosity." *J Pharm Sci* 99(3): 1152-1168.

Zhou, H. X. (2008). "Effect of mixed macromolecular crowding agents on protein folding." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 72(4): 1109-1113.

Zhou, H. X., G. Rivas, et al. (2008). "Macromolecular crowding and confinement : biochemical, biophysical, and potential physiological consequences." *Annual Review of Biophysics* 37(1): 375-397.

Chu, T. C. "Aptamer:Toxin Conjugates That Specifically Target Prostate Tumor Cells." *Cancer Research* 66.12 (2006): 5989-992.

Hamblett, K. J. "Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate." *Clinical Cancer Research* 10.20 (2004): 7063-070.

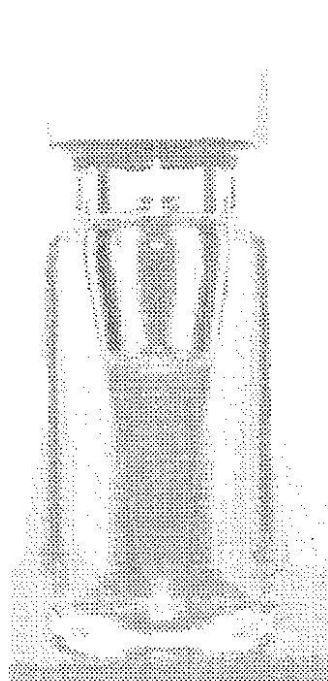
Krop, I. E., M. Beeram, S. Modi, S. F. Jones, S. N. Holden, W. Yu, S. Girish, J. Tibbitts, J.-H. Yi, M. X. Sliwkowski, F. Jacobson, S. G. Lutzker, and H. A. Burris. "Phase I Study of Trastuzumab-DM1, an HER2 Antibody-Drug Conjugate, Given Every 3 Weeks to Patients With HER2-Positive Metastatic Breast Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 28.16 (2010): 2698-704.

10

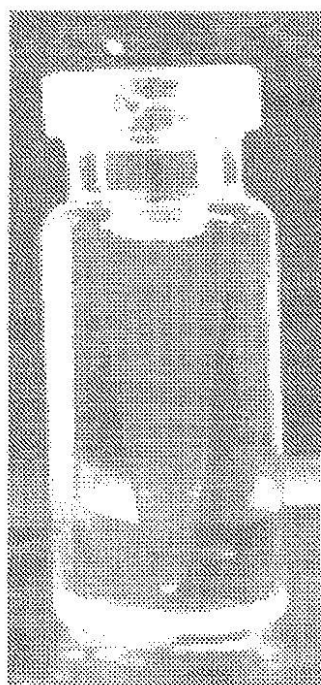
20

30

【図 1】

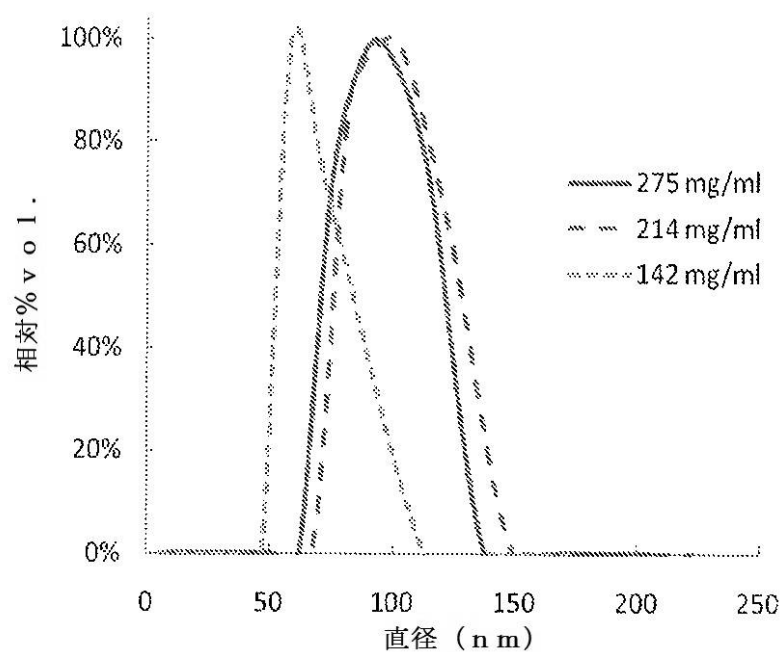


A

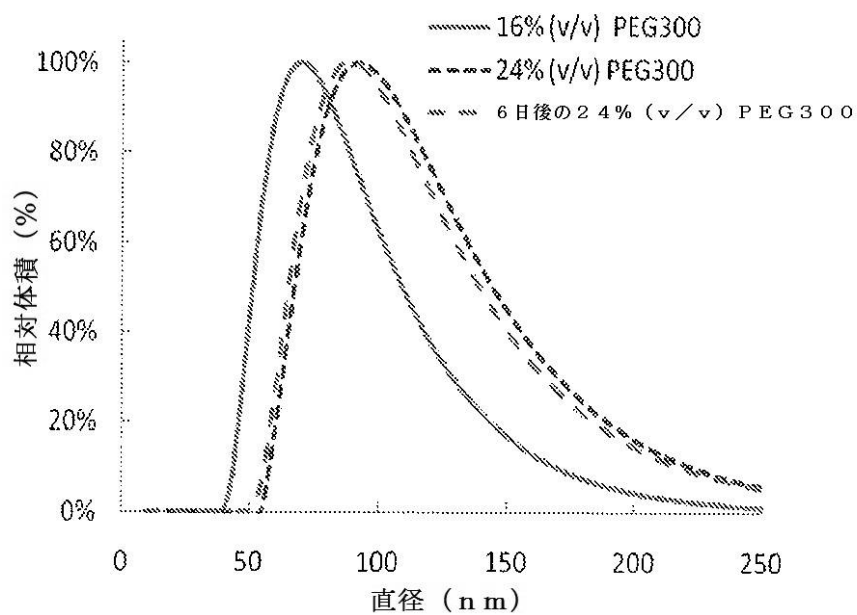


B

【図 2】

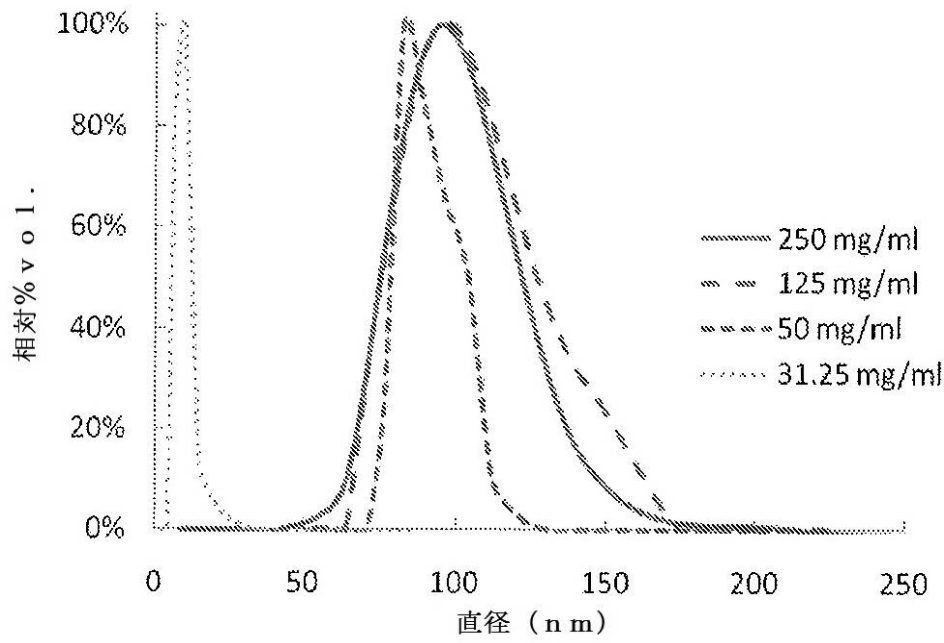


A

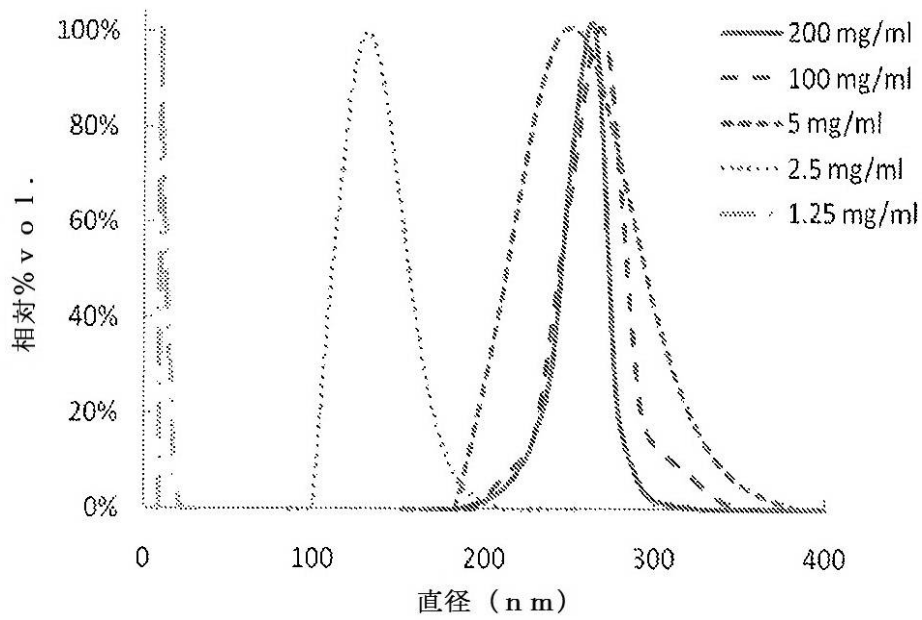


B

【図 3】

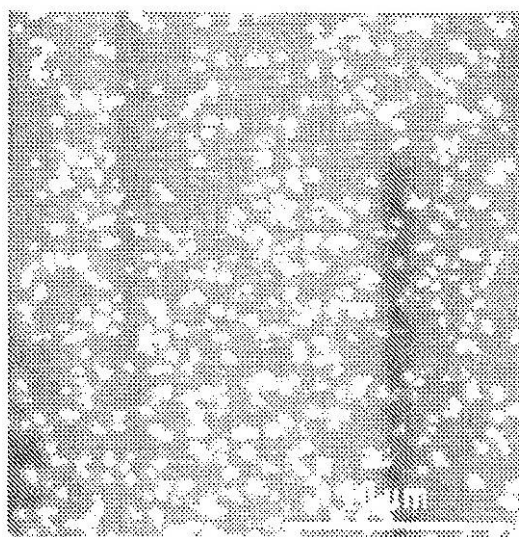
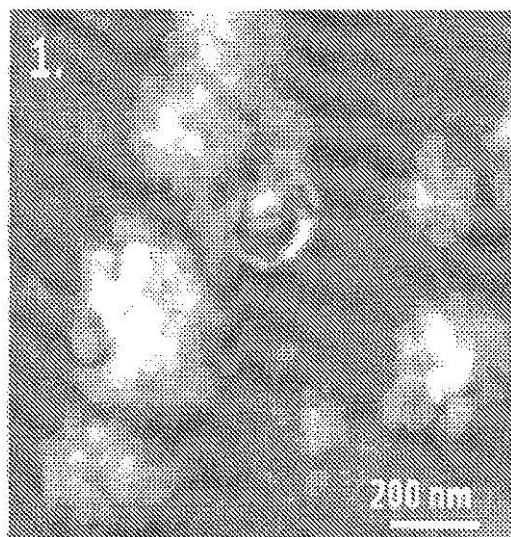


A

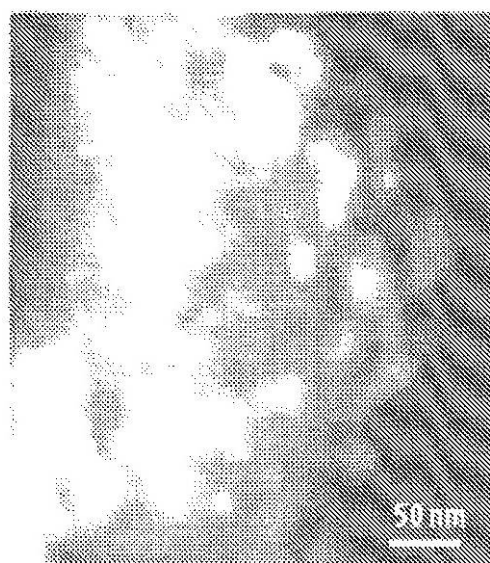


B

【図 4】

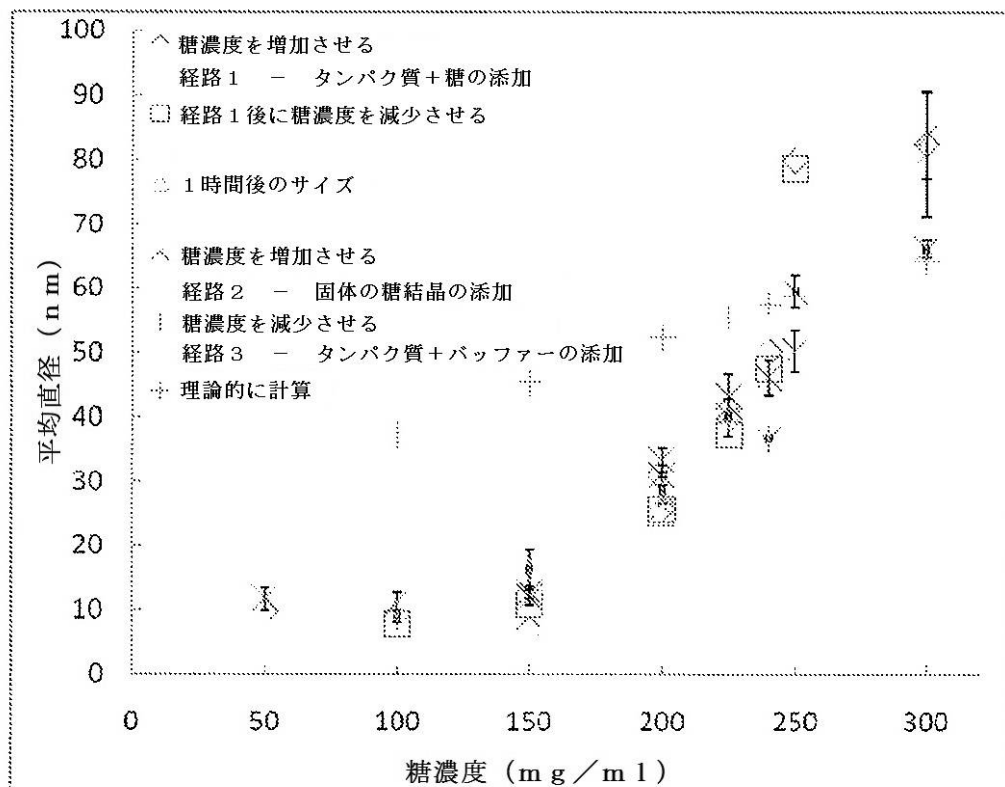


A

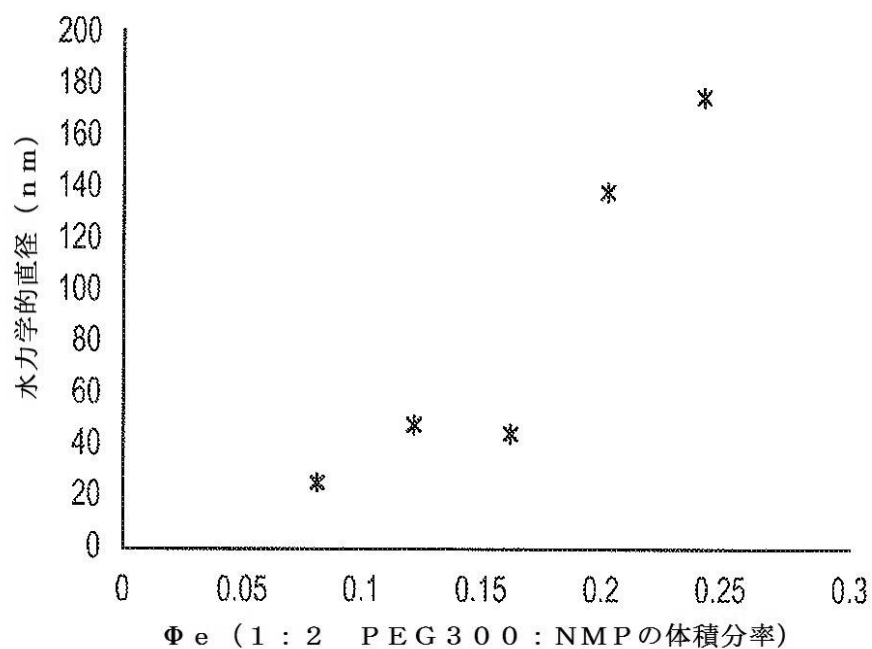


B

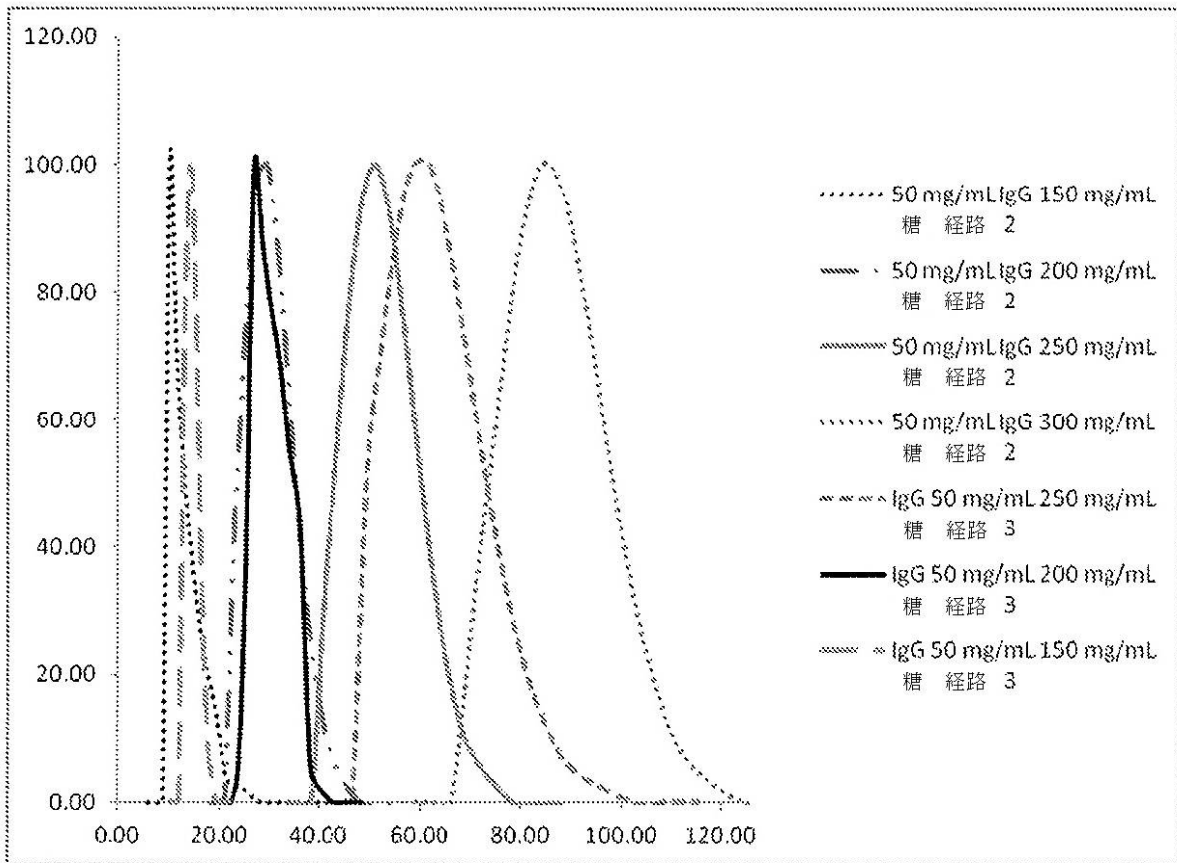
【図 5 A】



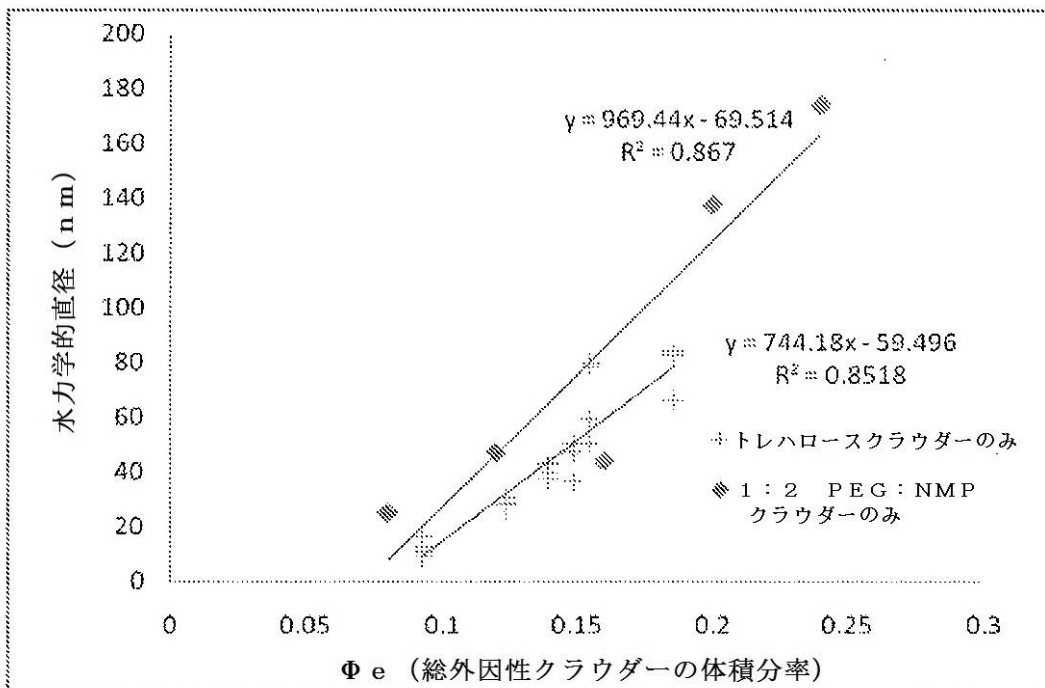
【図 5 B】



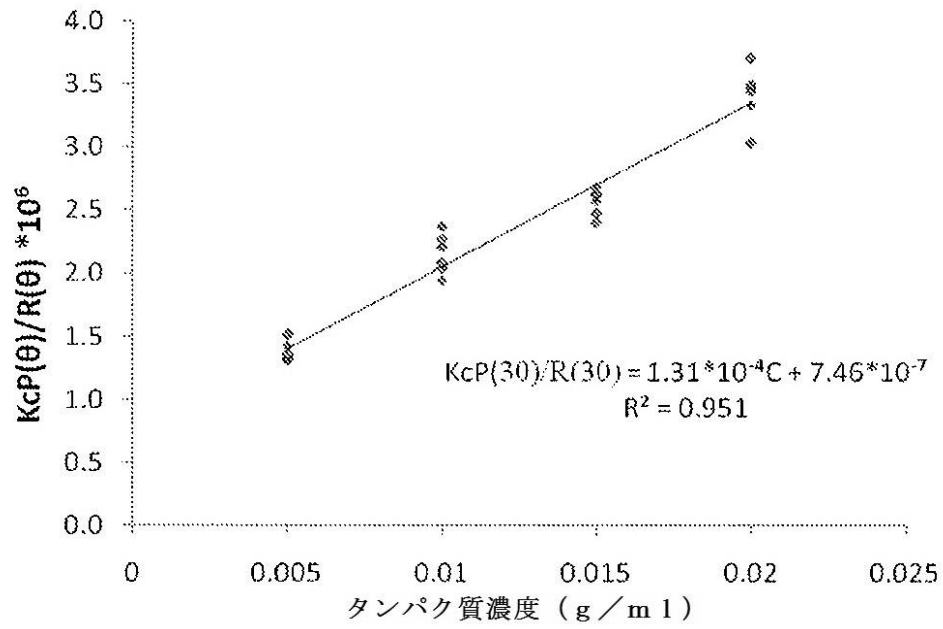
【図 6】



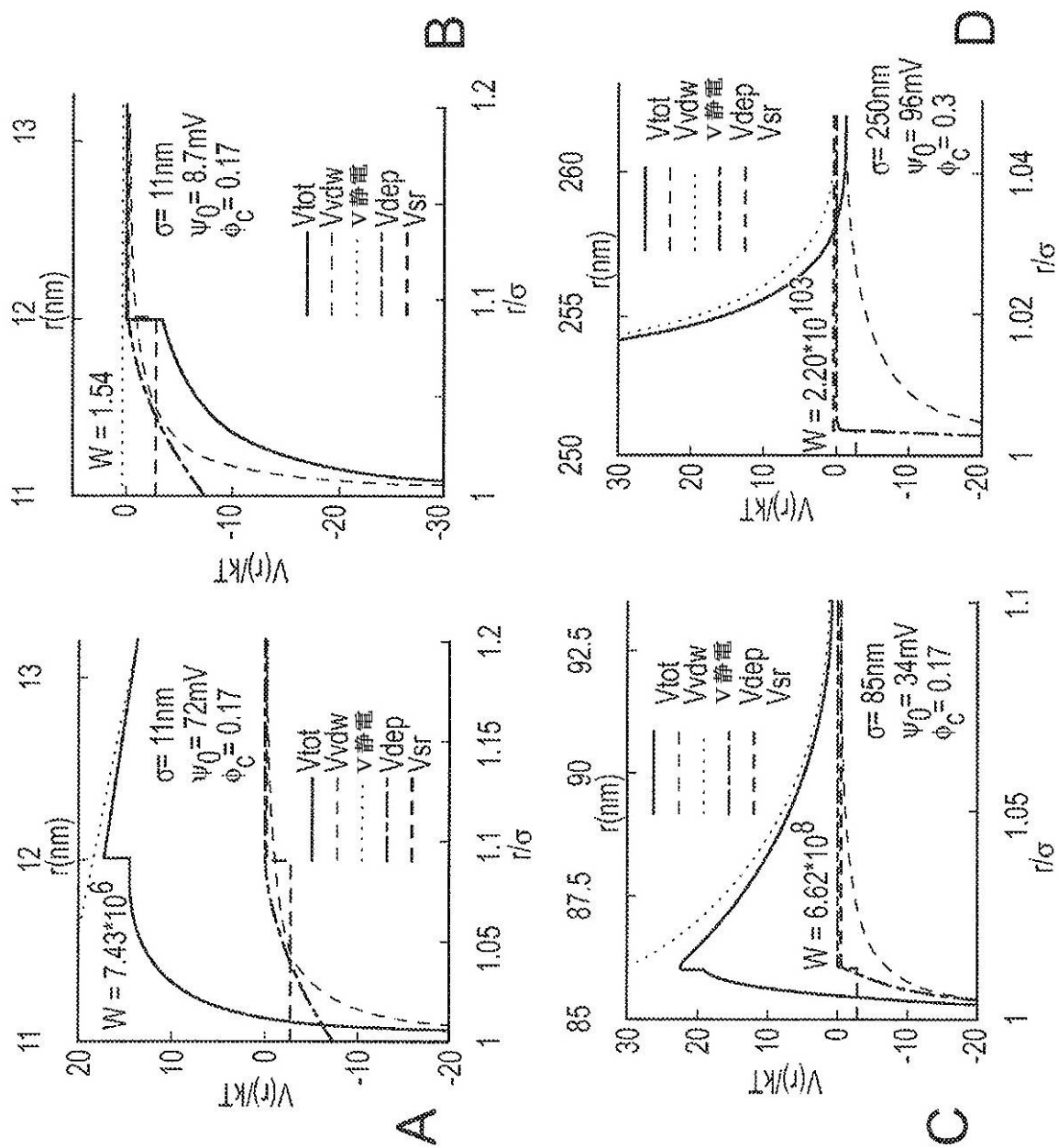
【図 7】



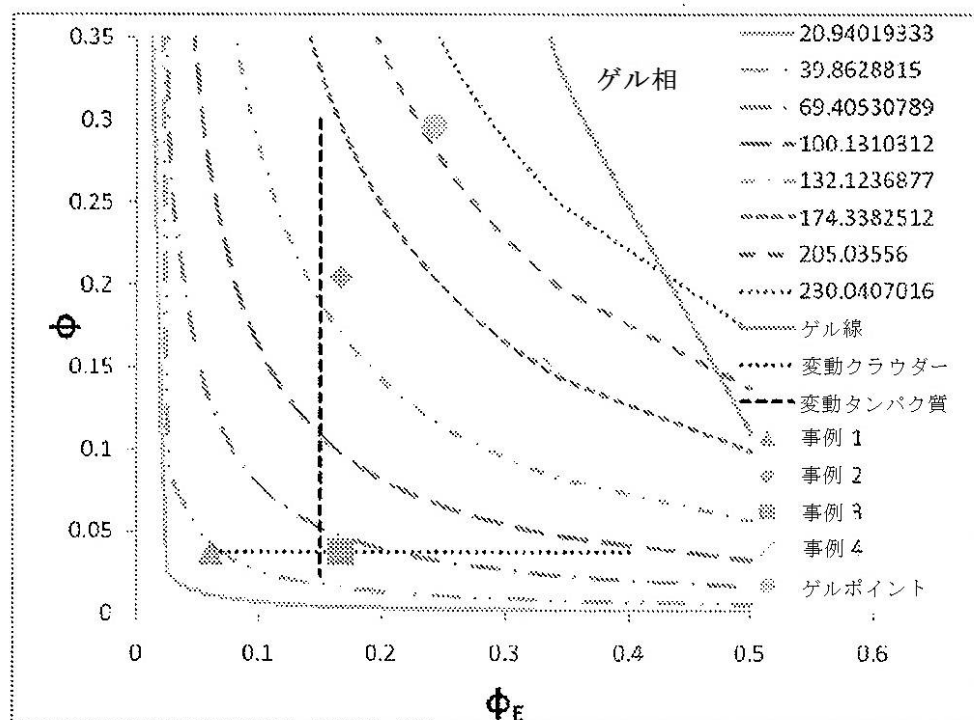
【図 8】



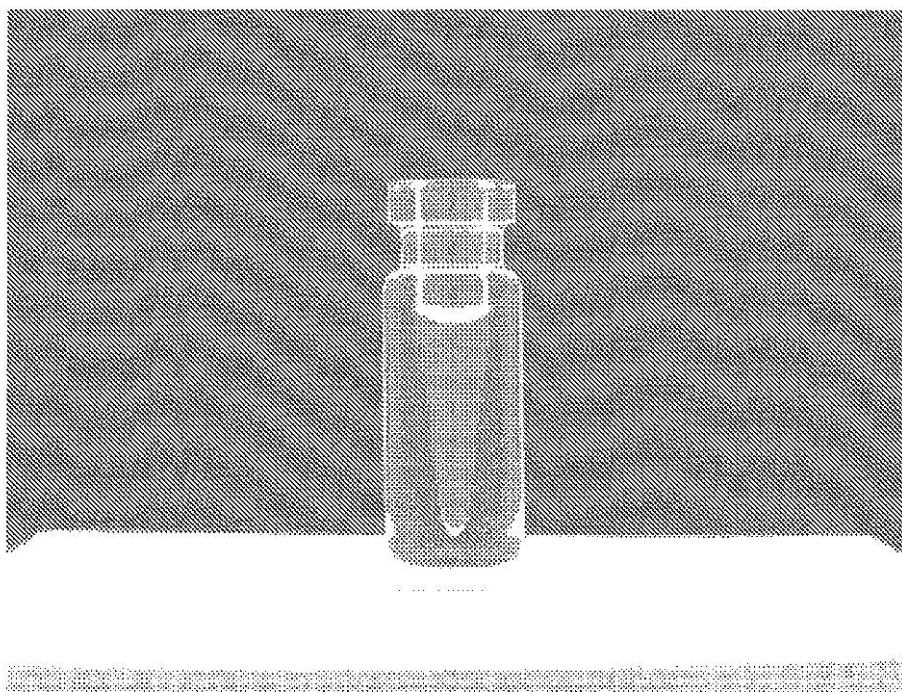
【図 9】



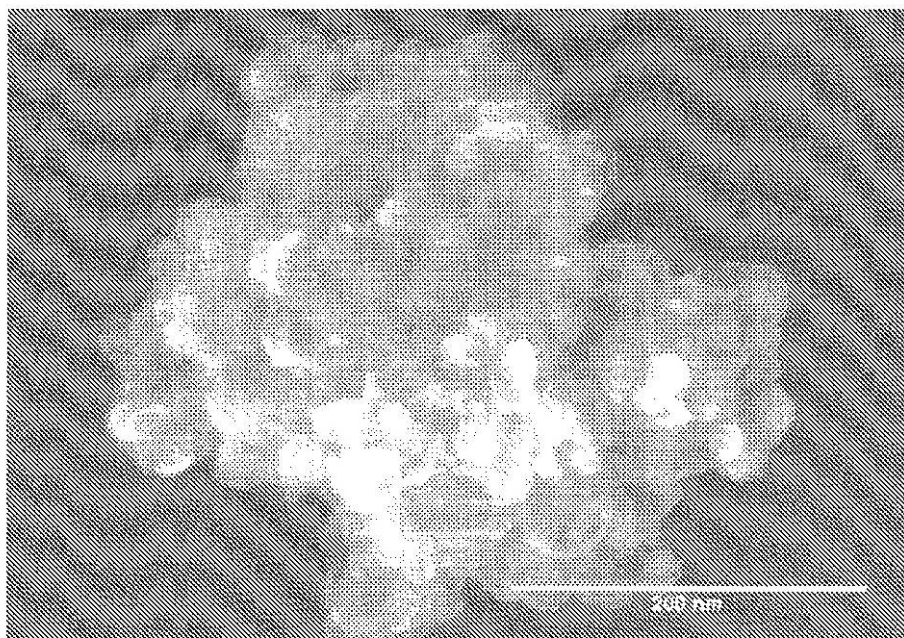
【図 10】



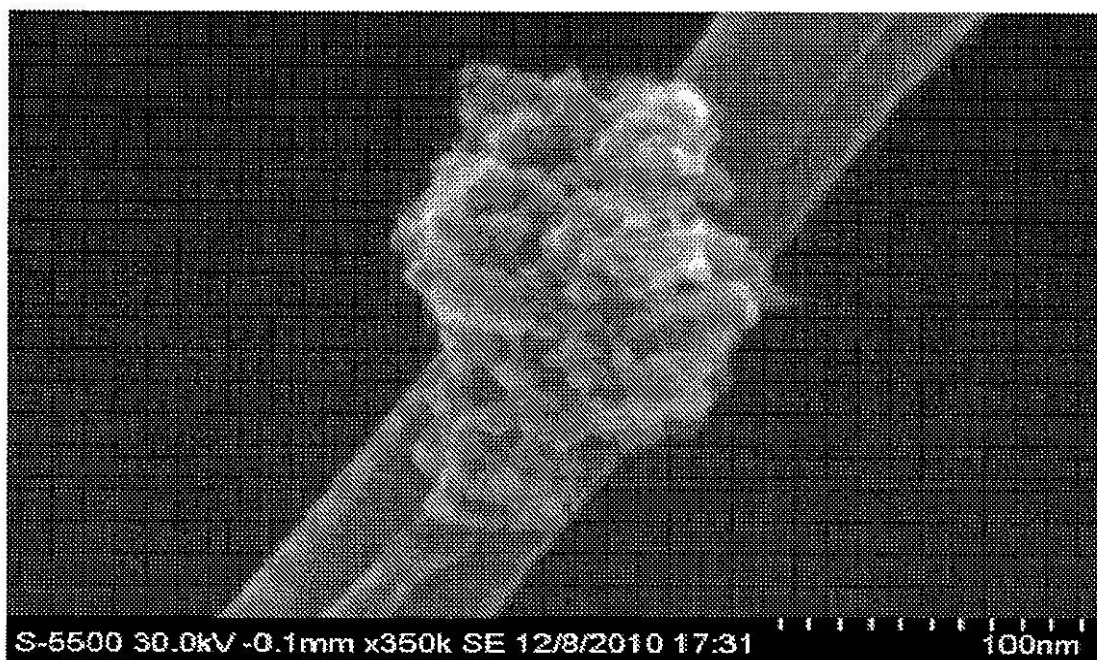
【図 11 A】



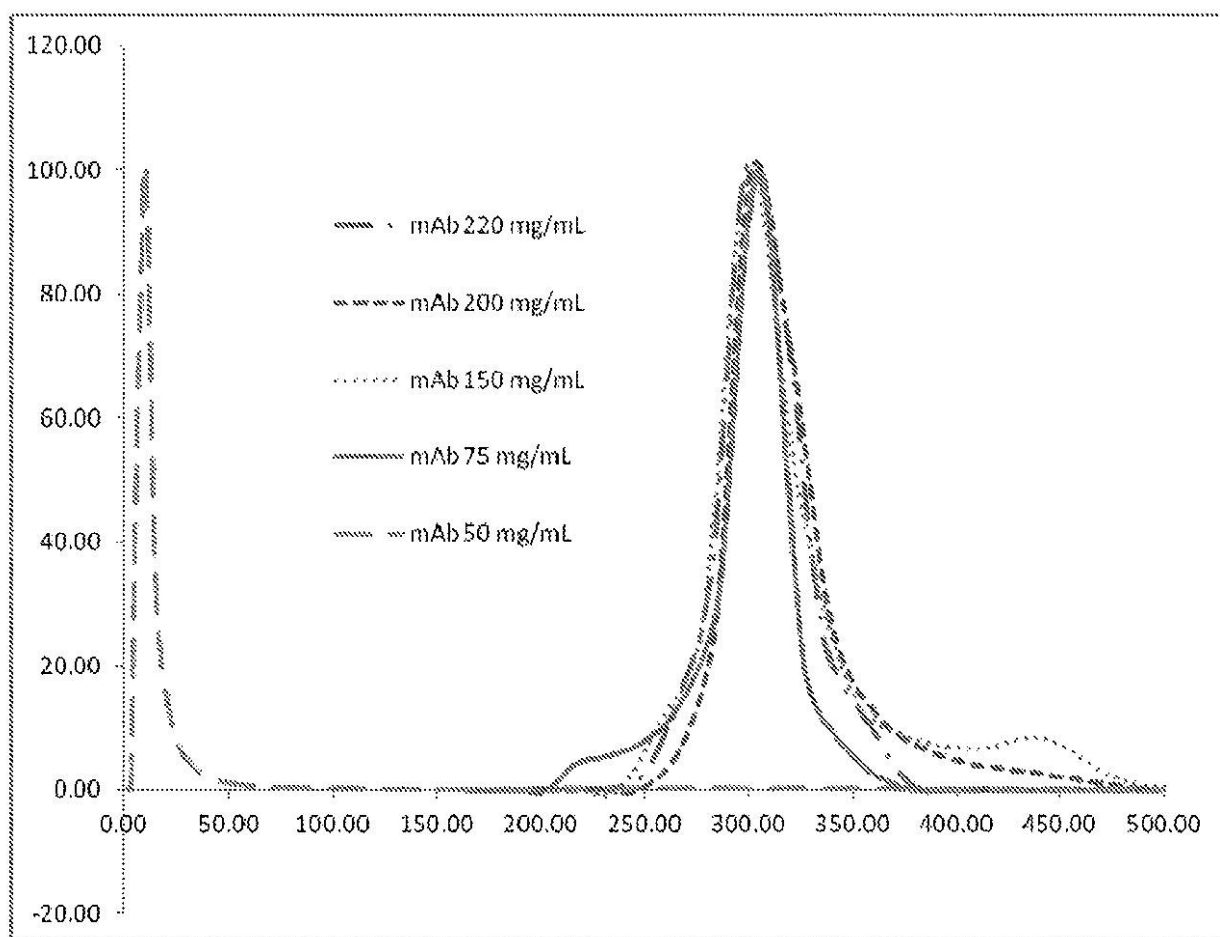
【図 1 1 B】



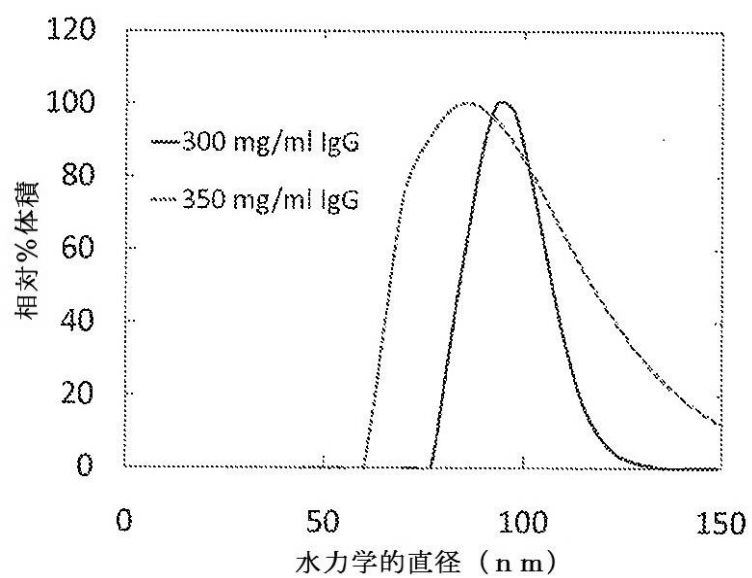
【図 1 1 C】



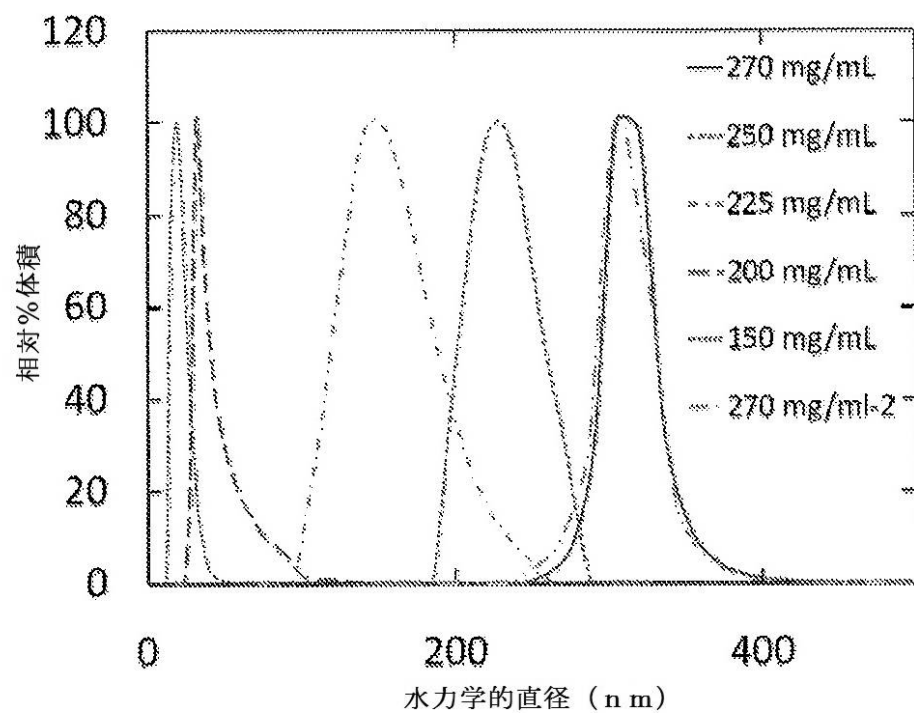
【図 1 1 D】



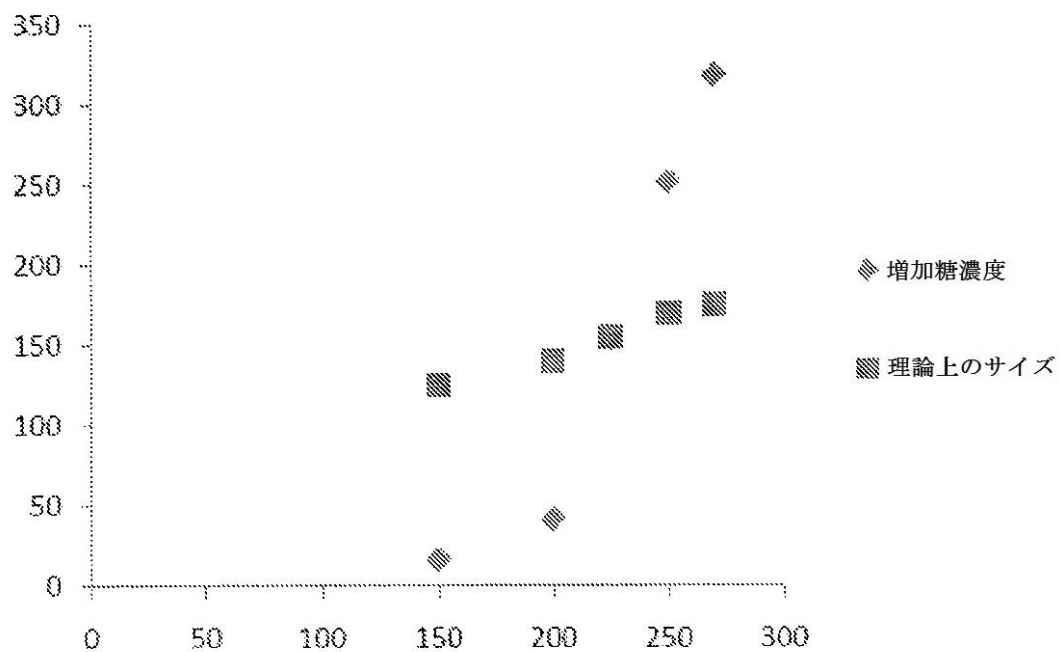
【図 1 1 E】



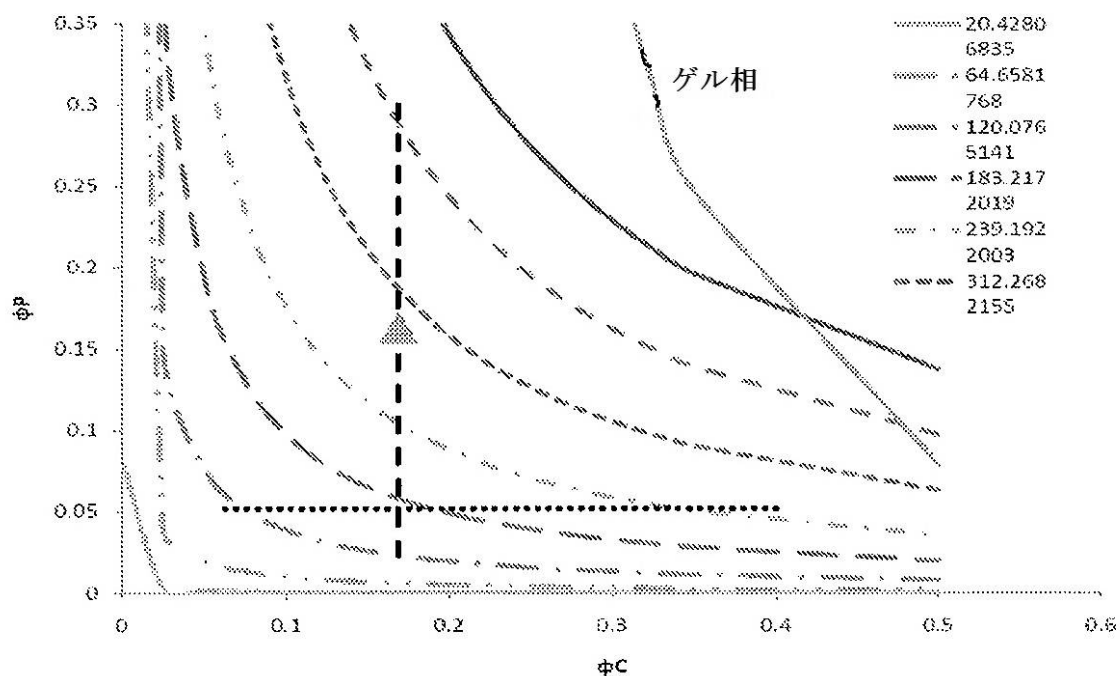
【図 1 2 A】



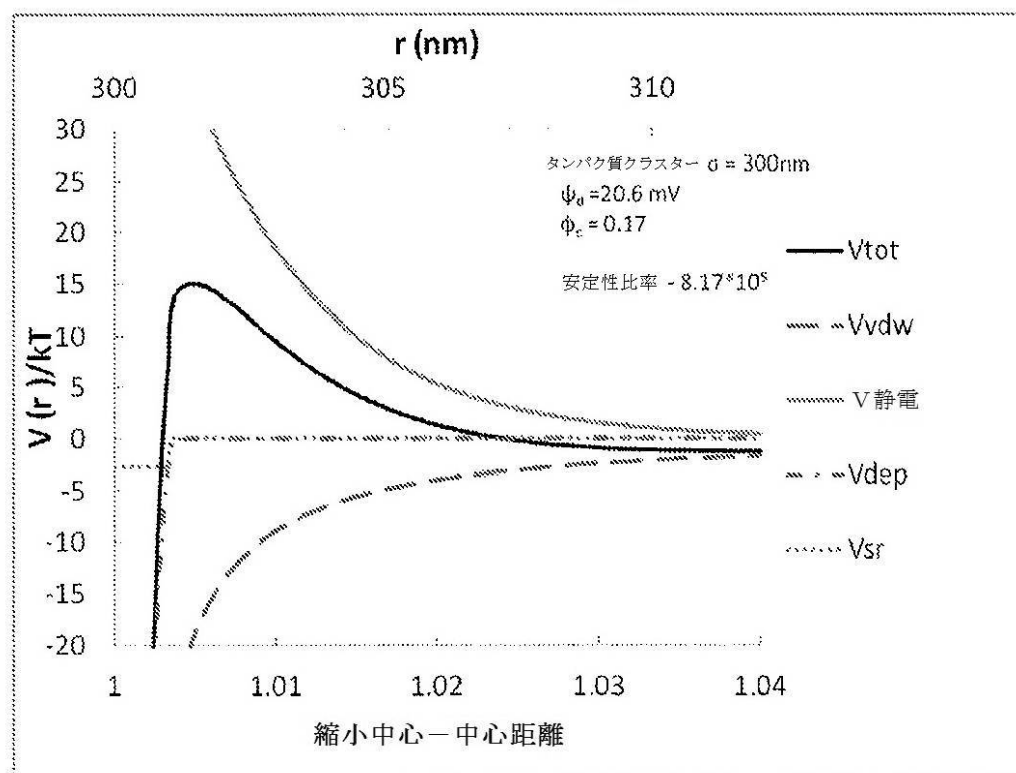
【図 1 2 B】



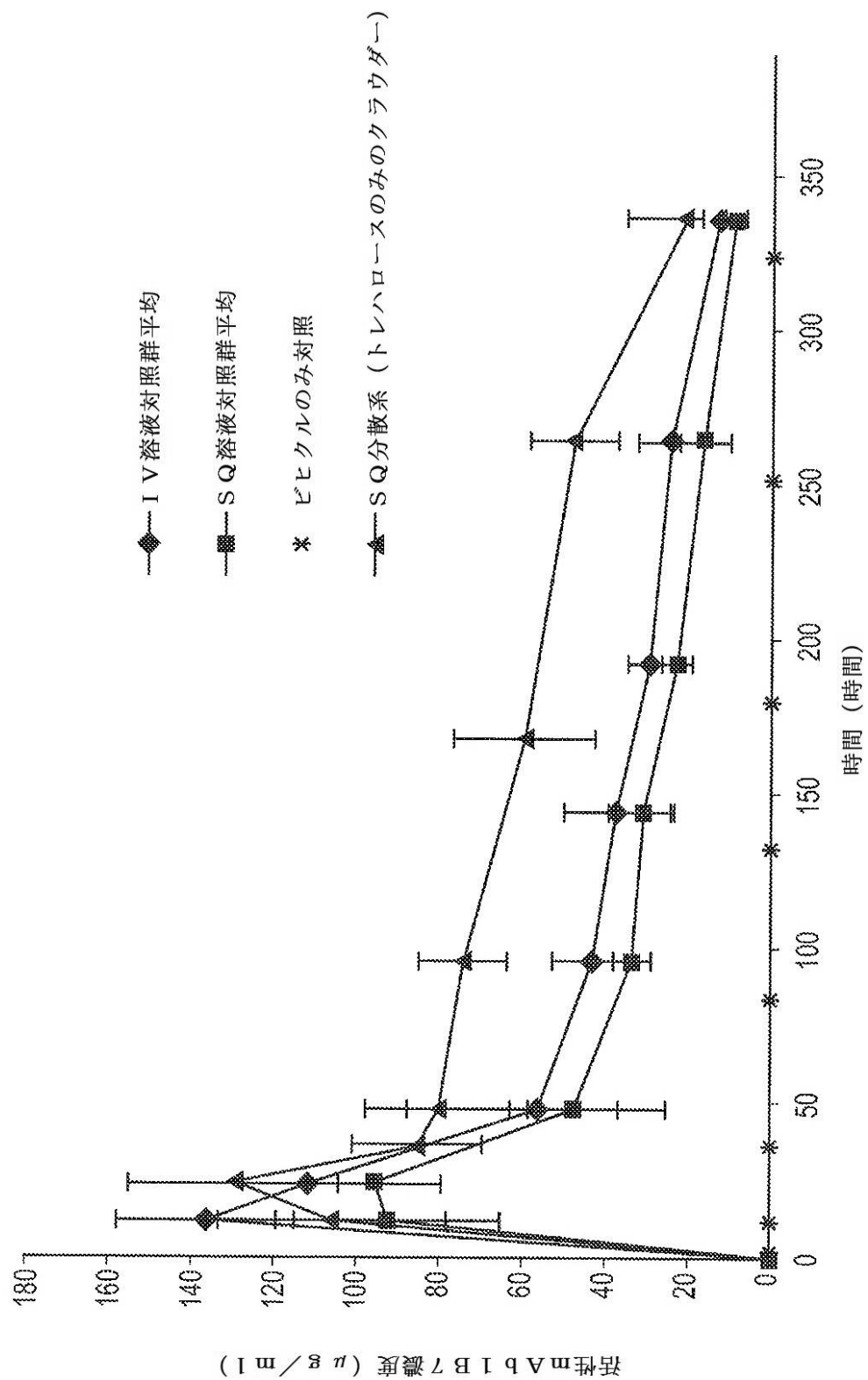
【図 1 2 C】



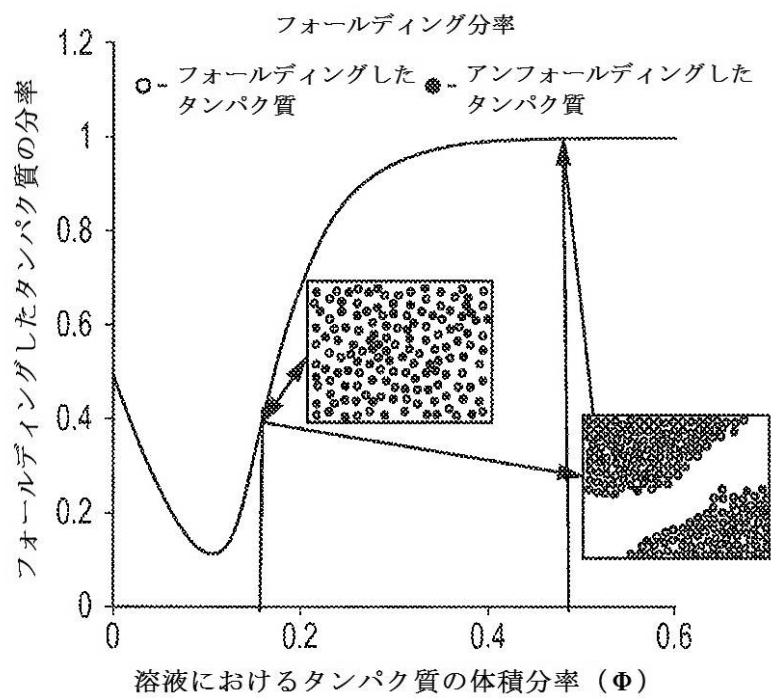
【図 1 2 D】



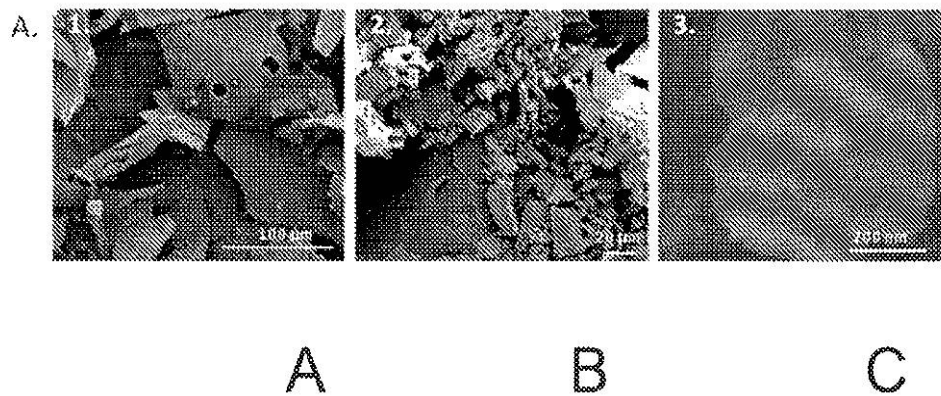
【図 13】



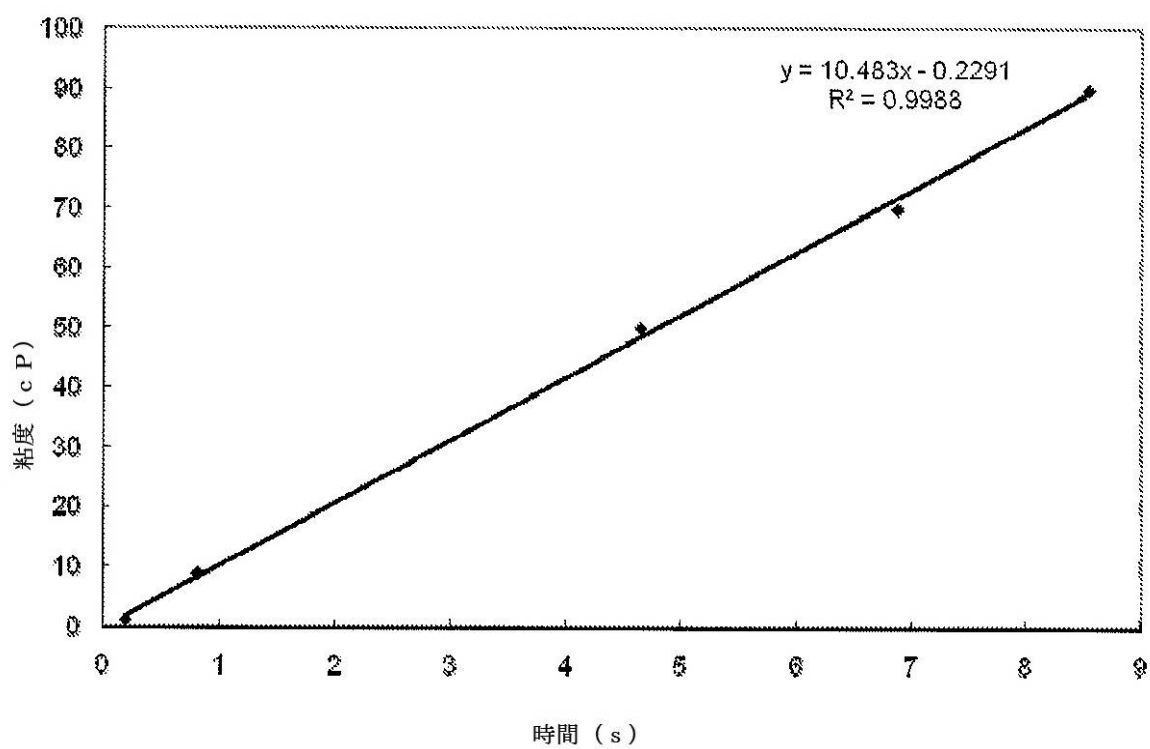
【図 1 4】



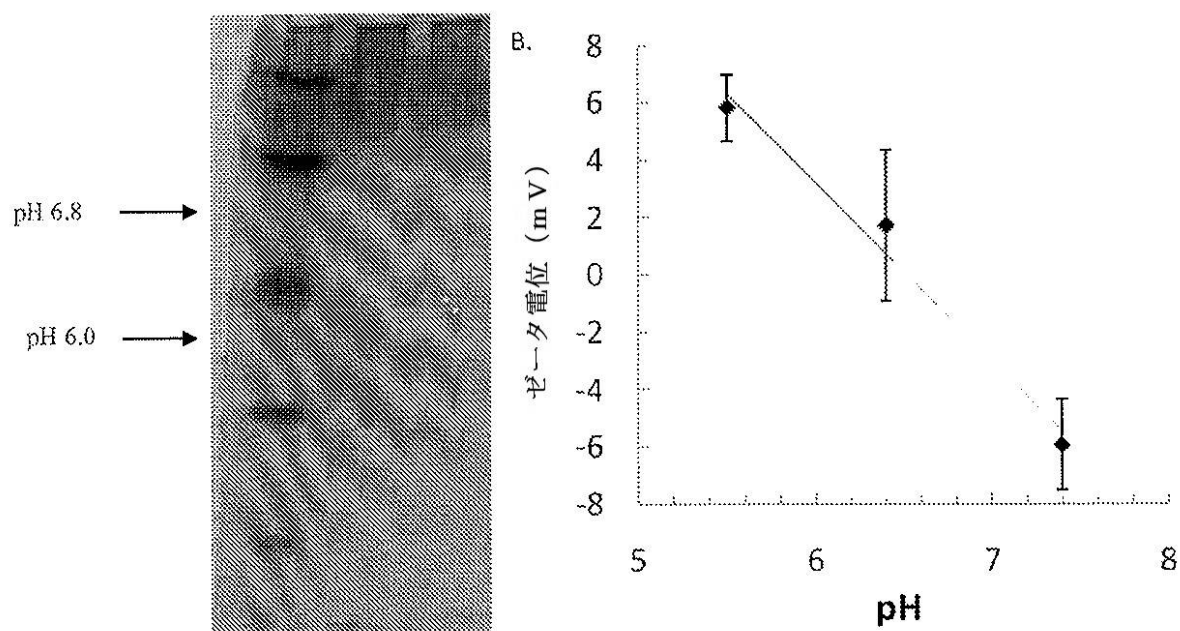
【図 1 5】



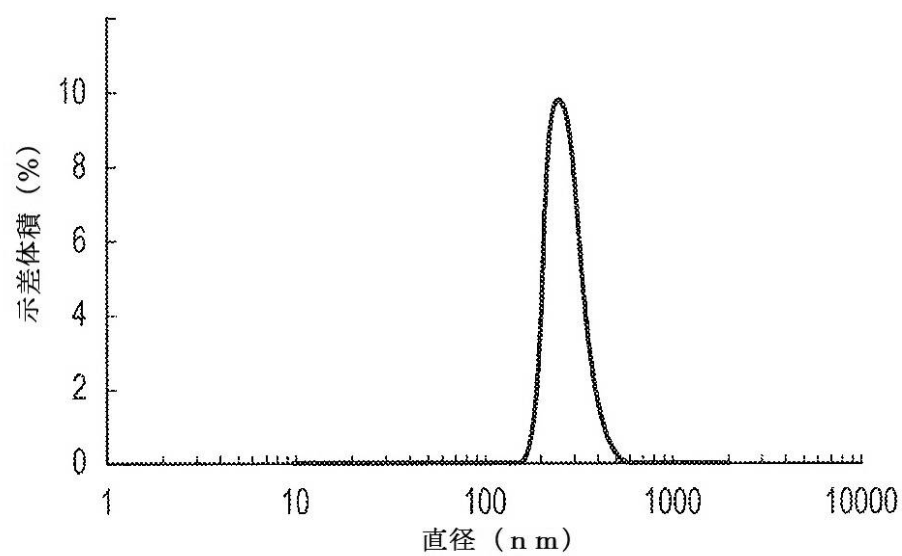
【図 16】



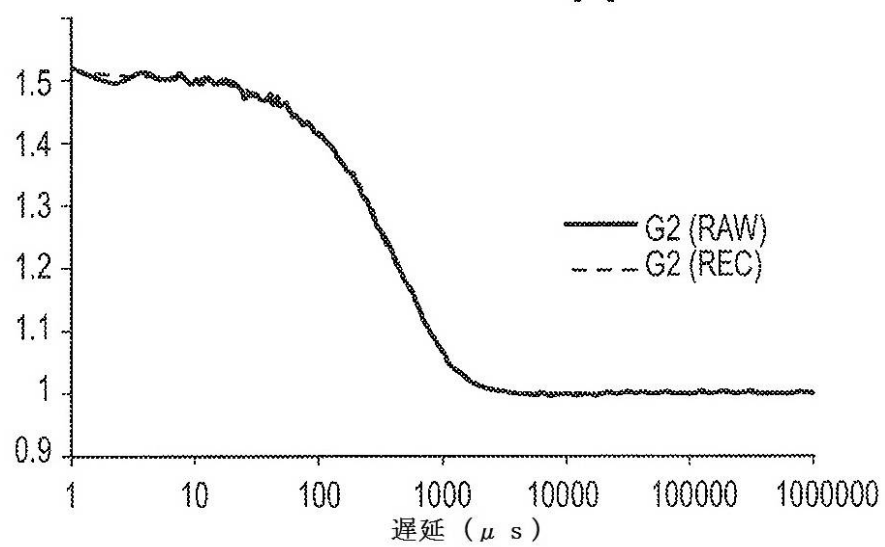
【図 17】



【図 18】

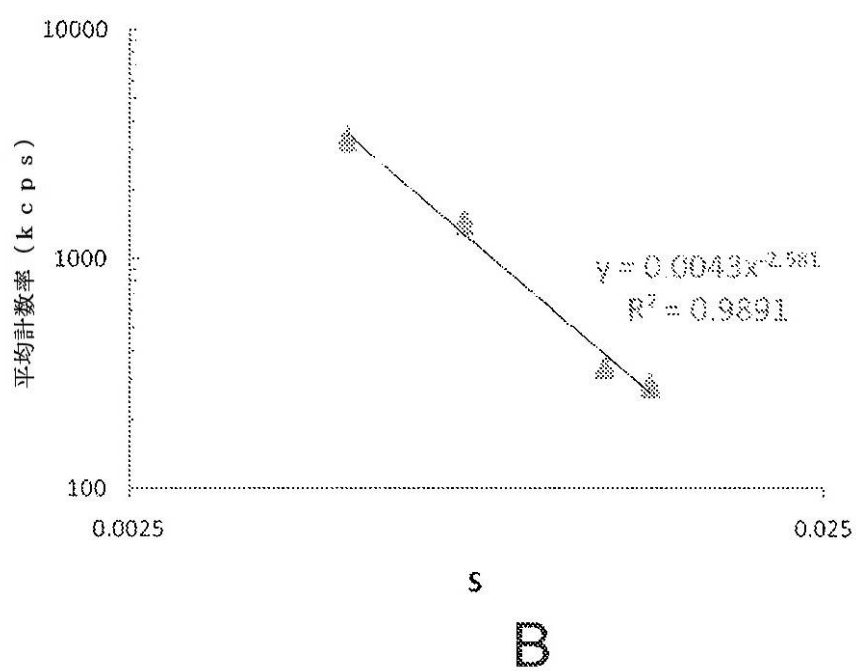
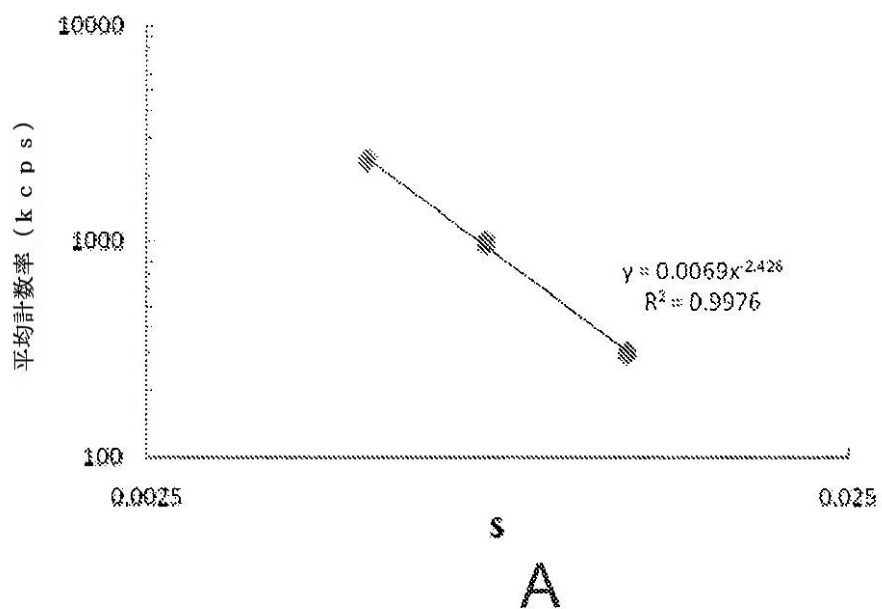


A

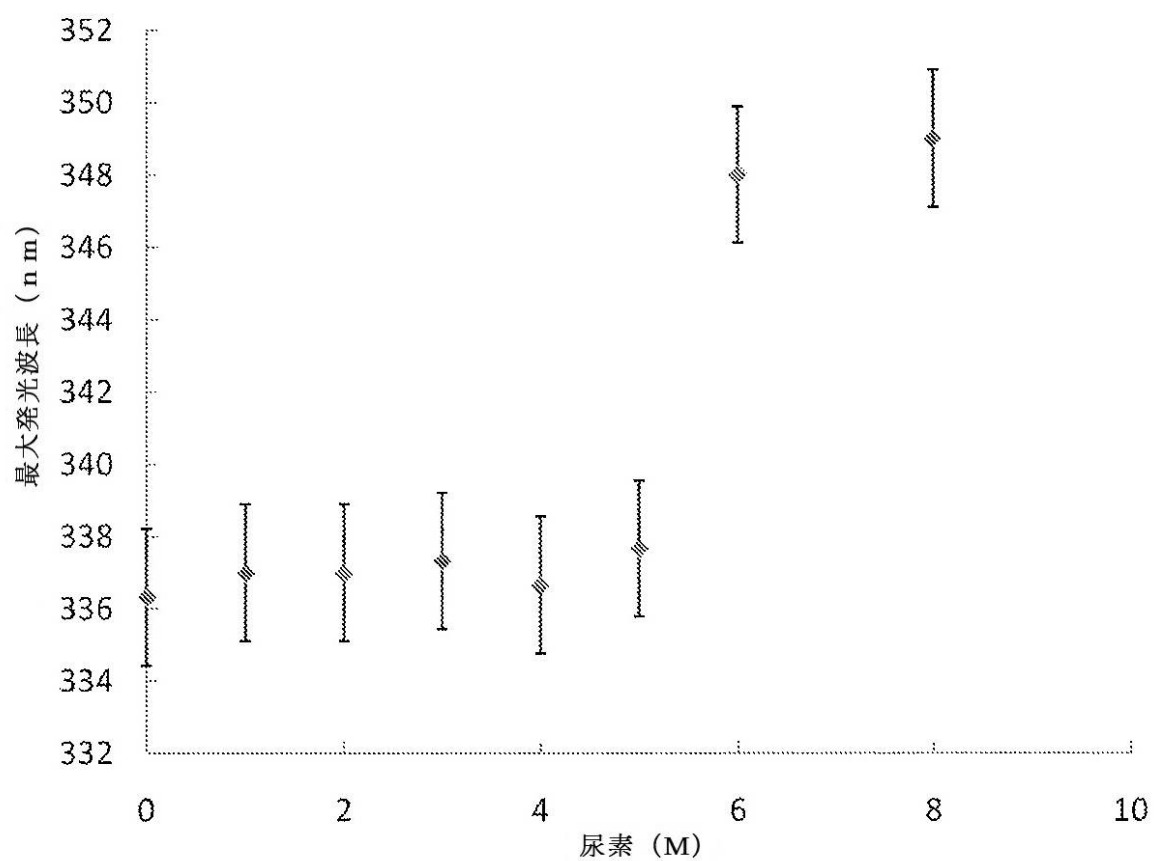


B

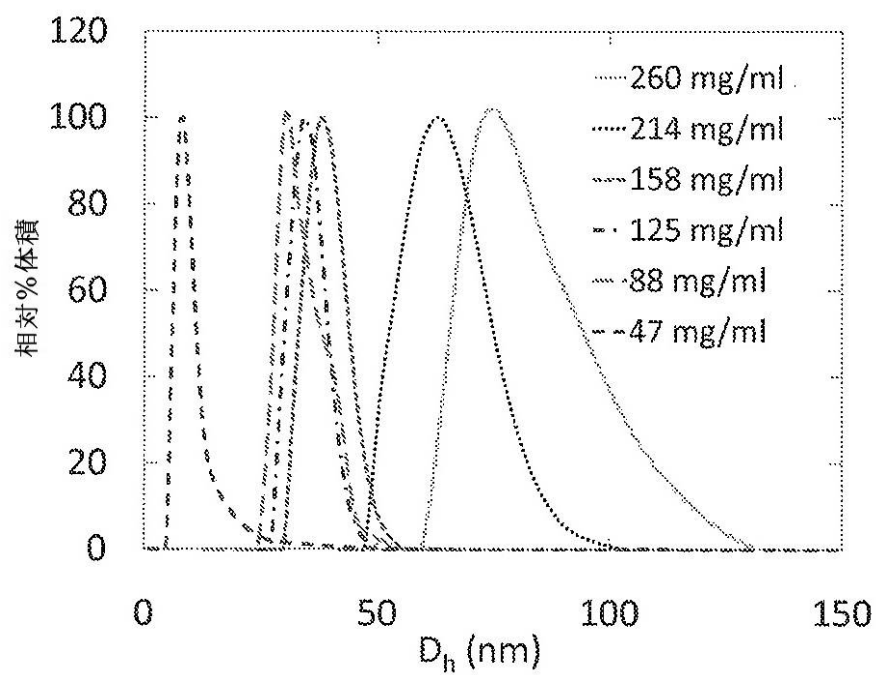
【図 19】



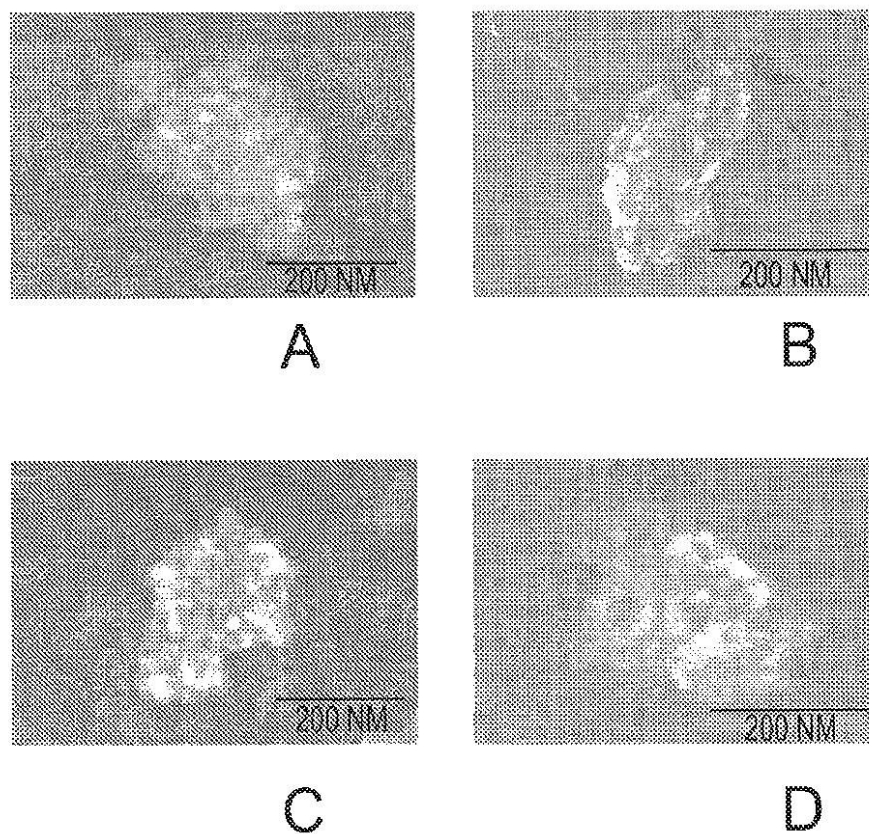
【図 2 0】



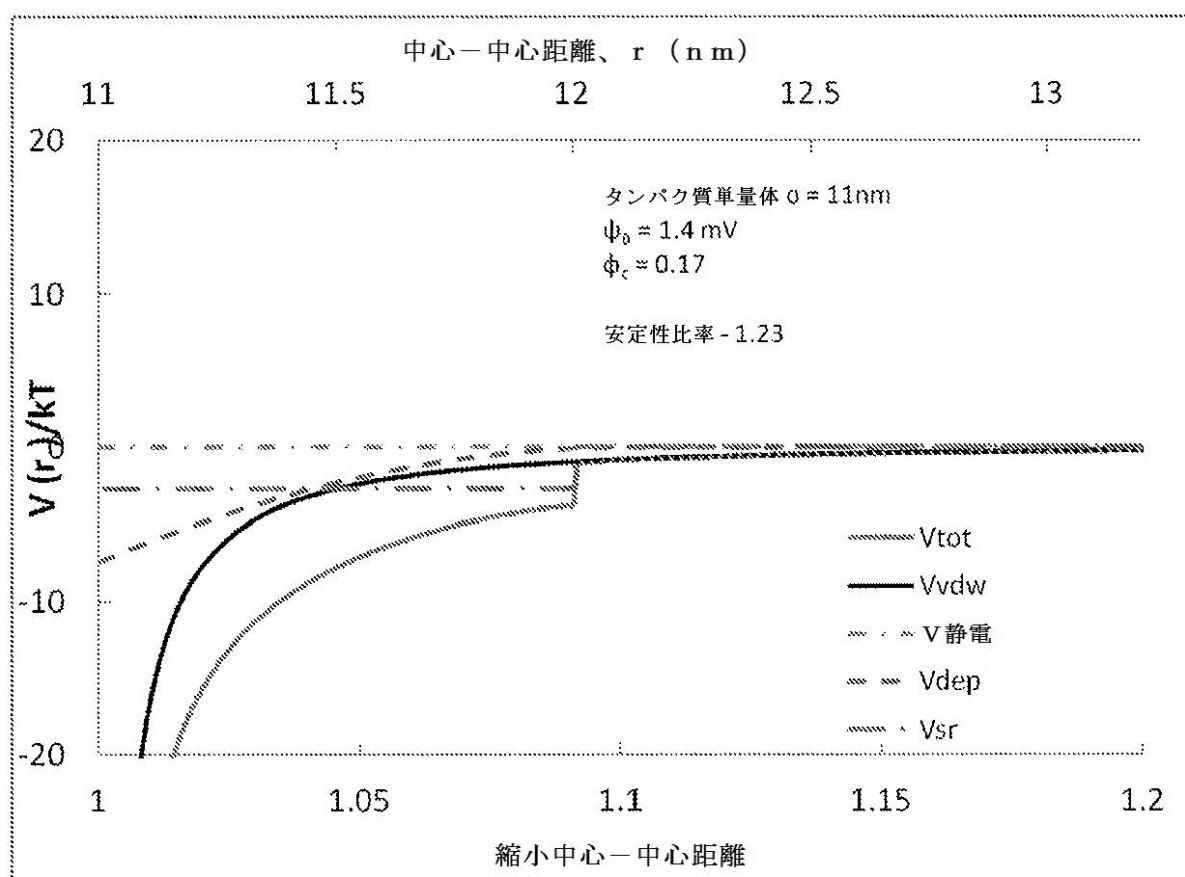
【図 2 1】



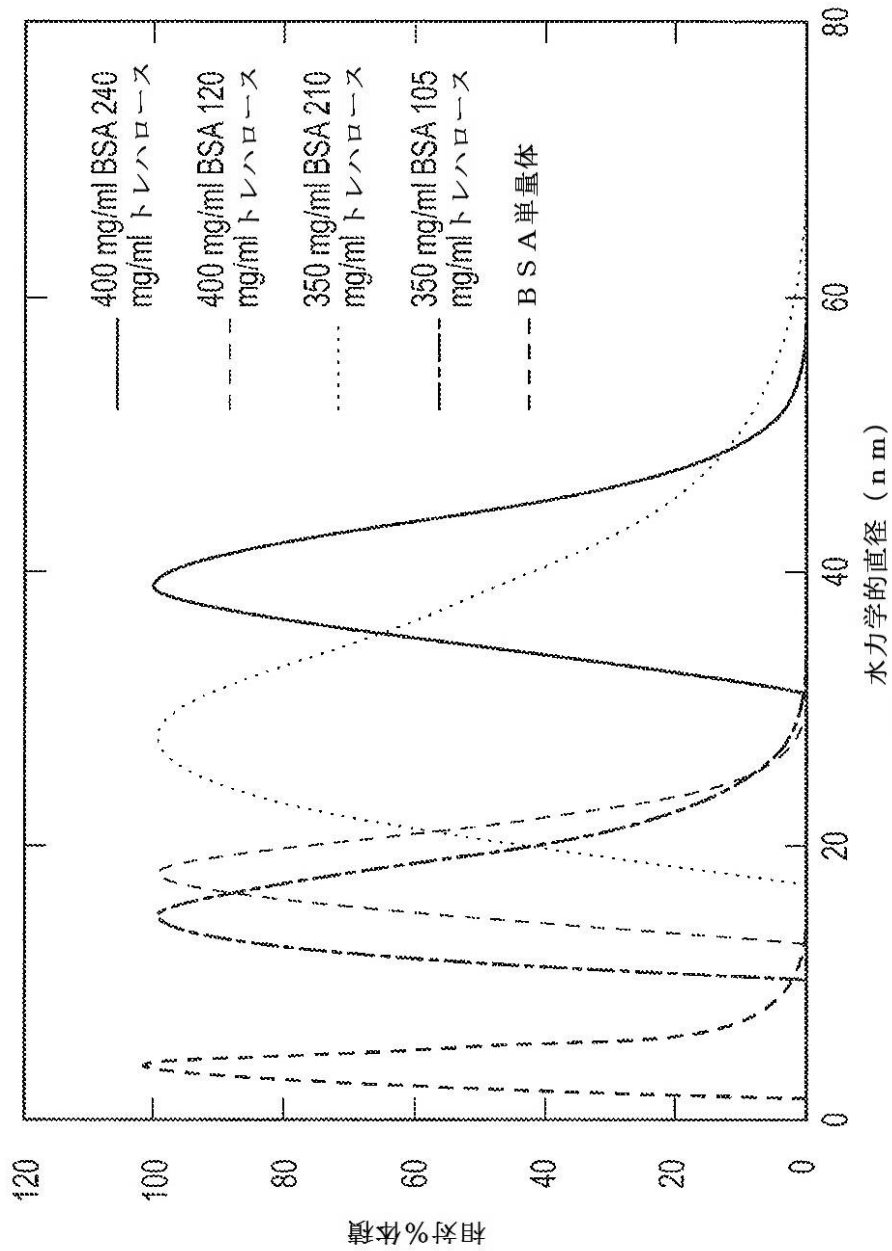
【図 2 2】



【図 2 3】

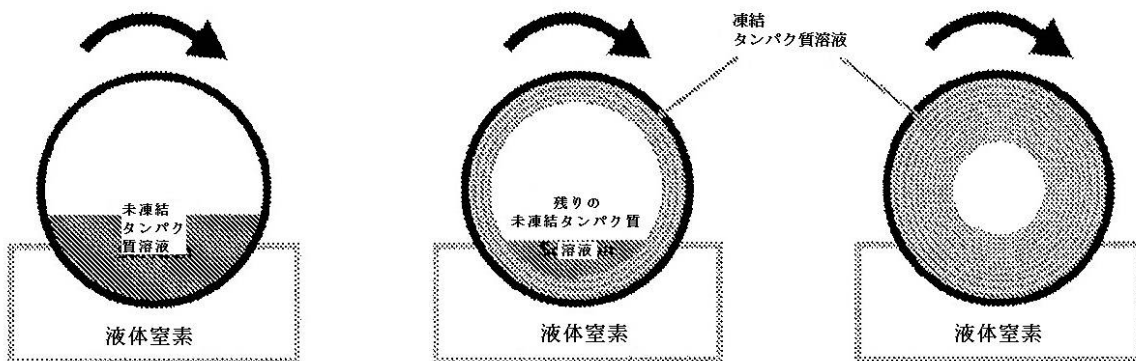


【図 2 4】

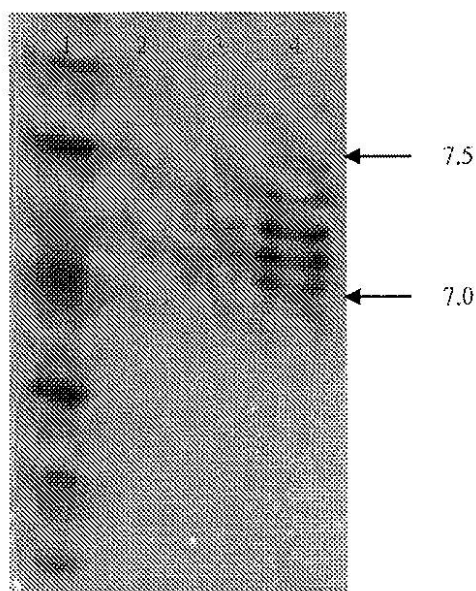


【図 2 5】

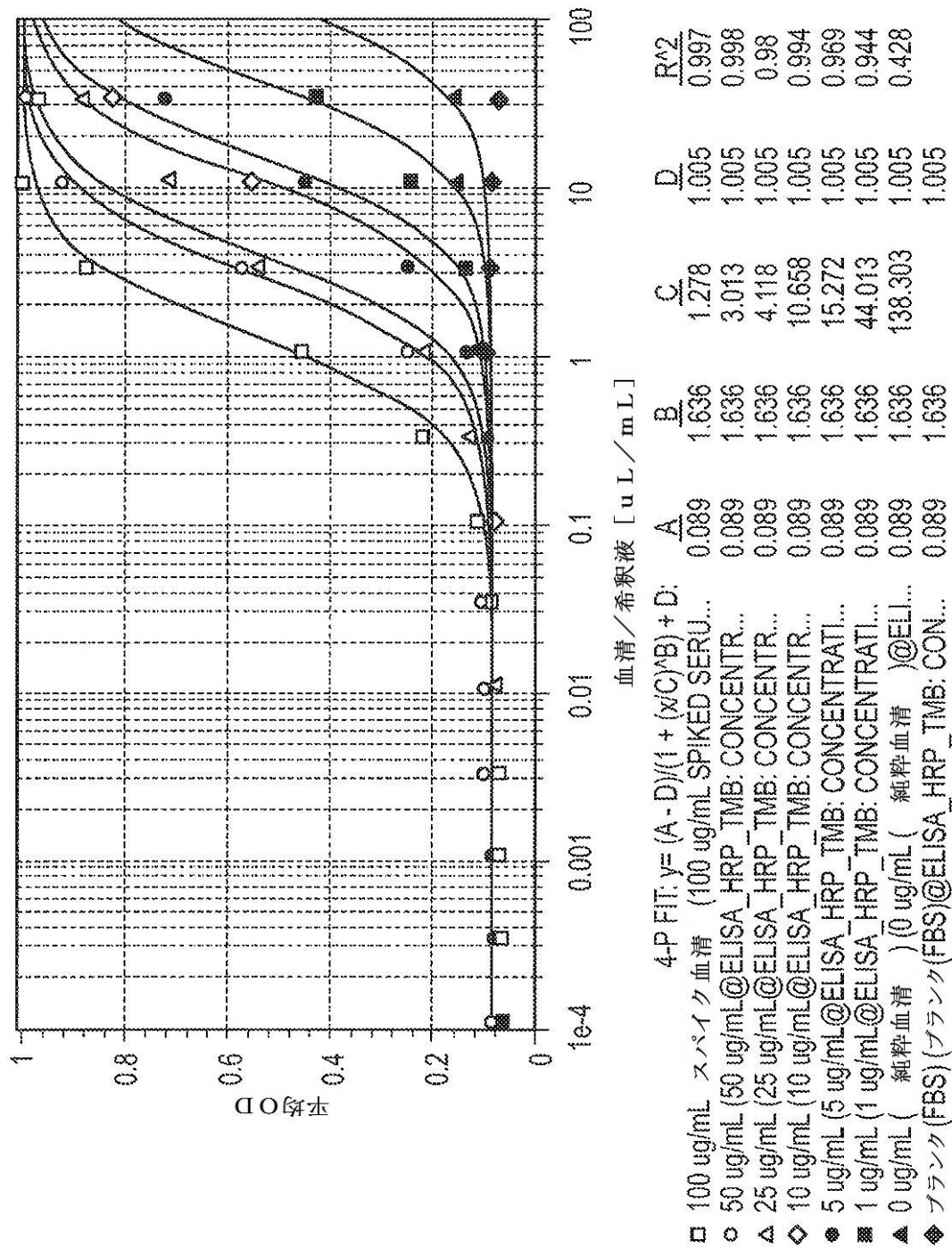
渦巻き式その場凍結技法 (SWIFT)



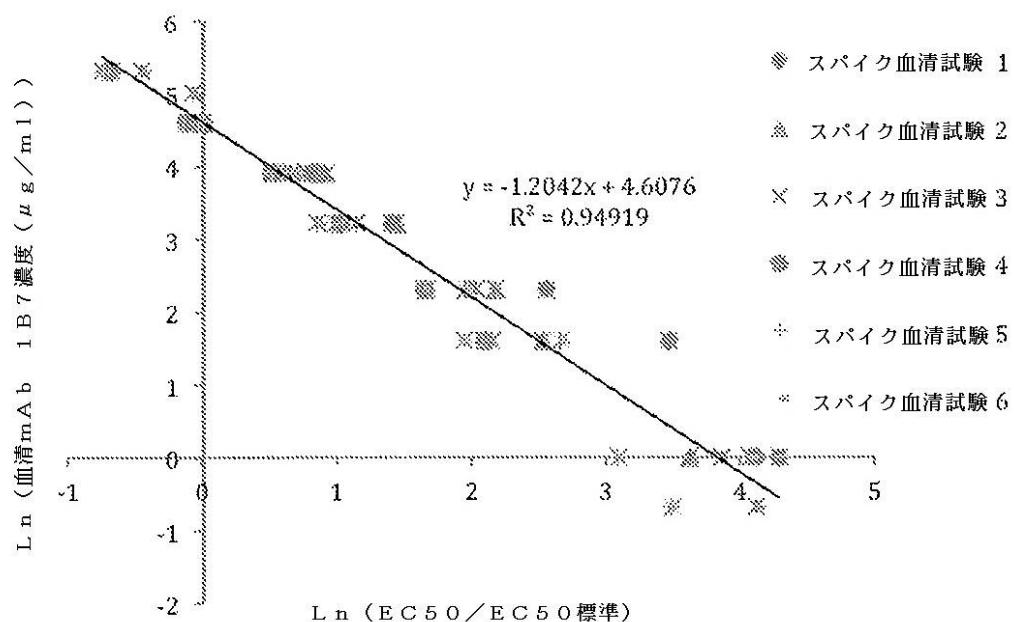
【図 26】



【図 27 A】

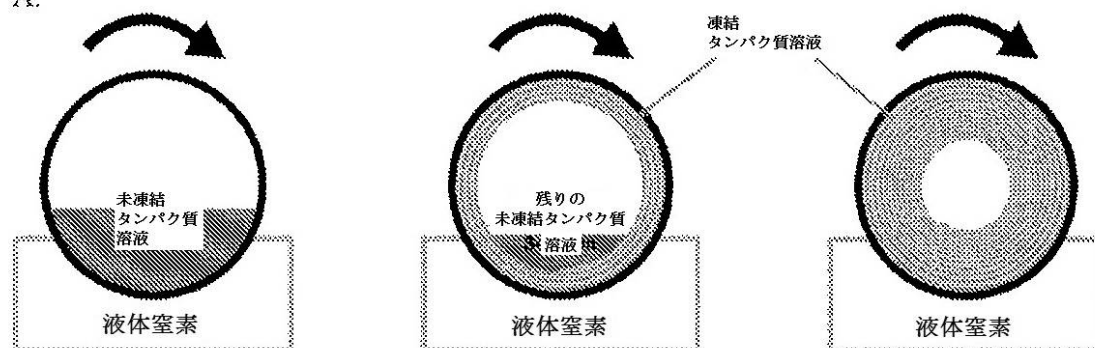


【図 27 B】

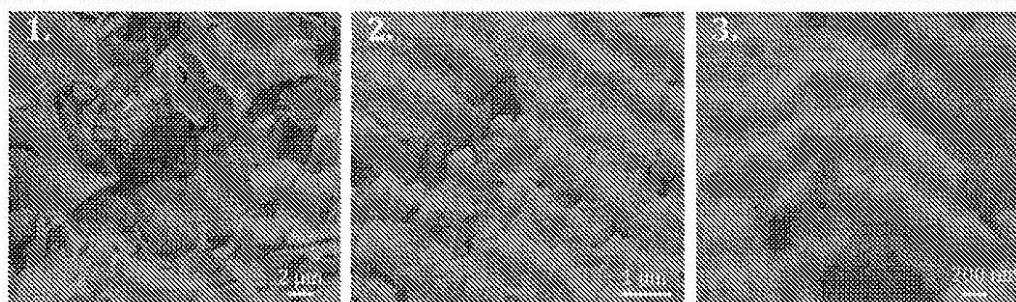


【図 28】

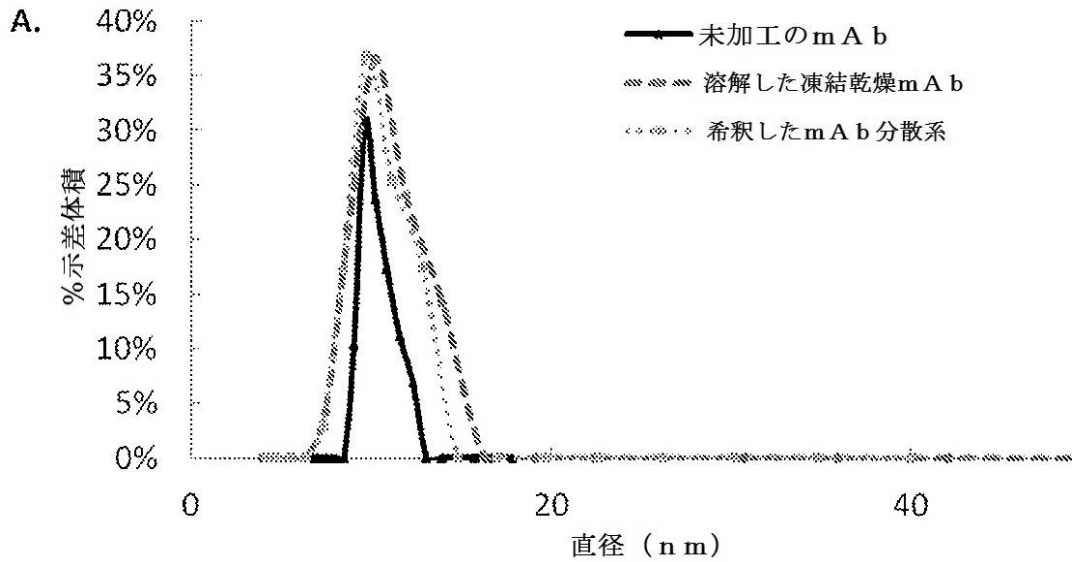
A.



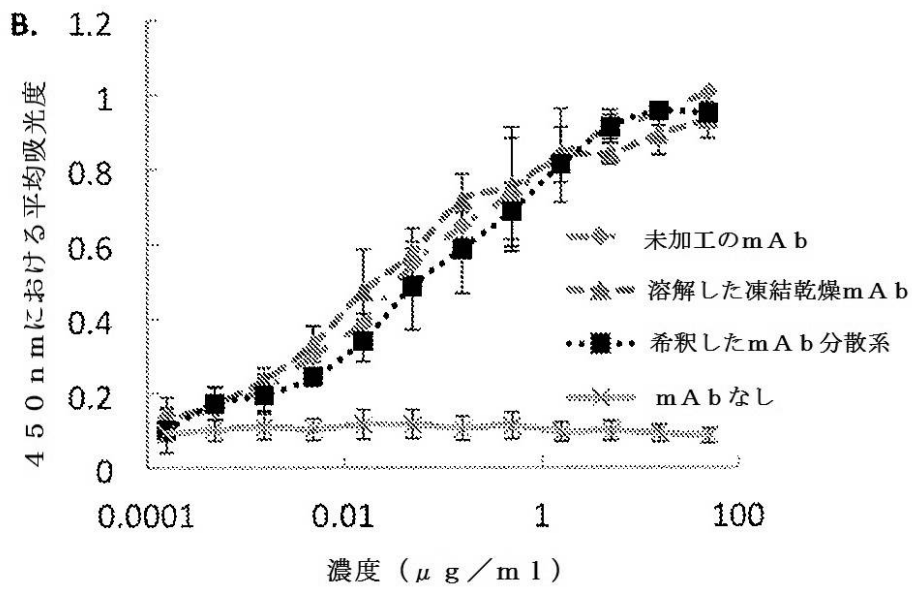
B.



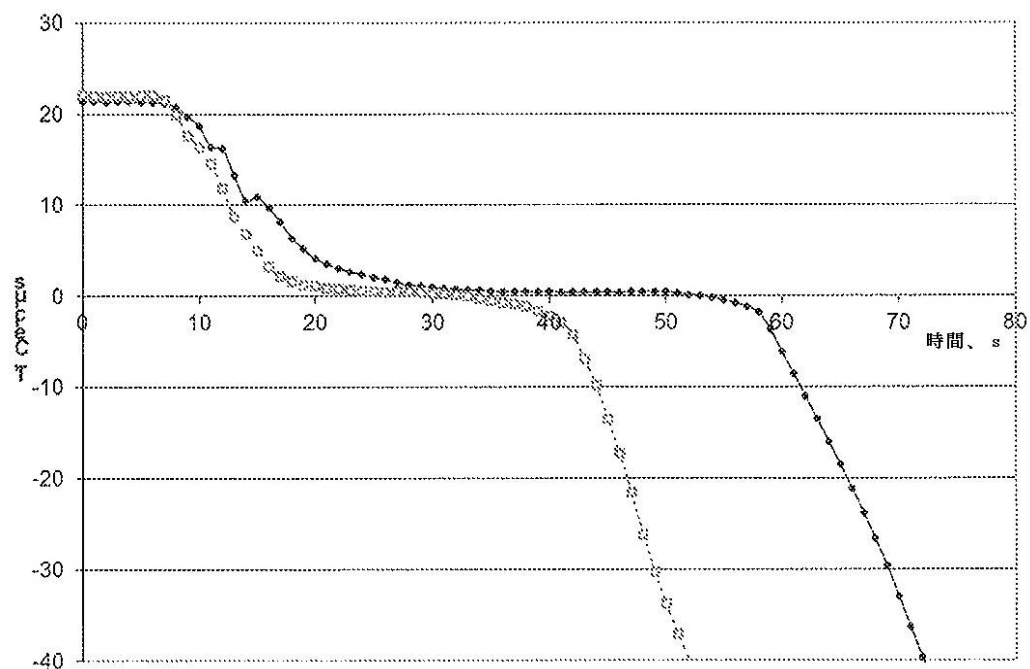
【図 29】



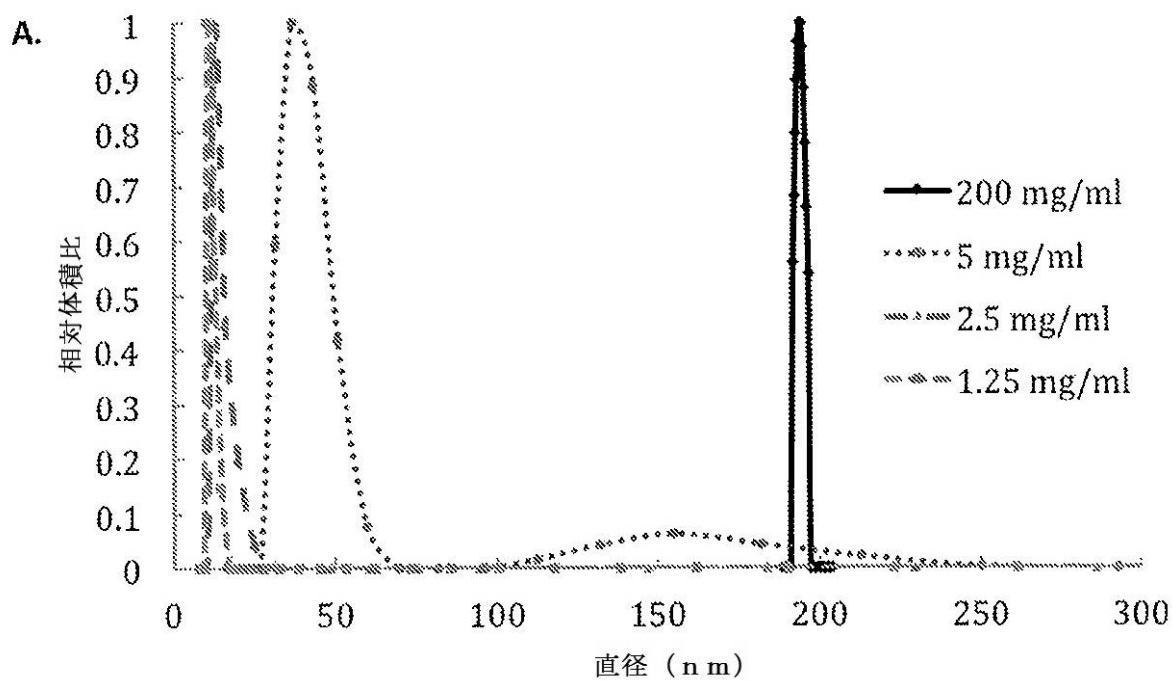
【図 30】



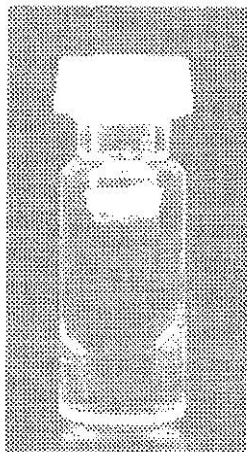
【図 3 1】



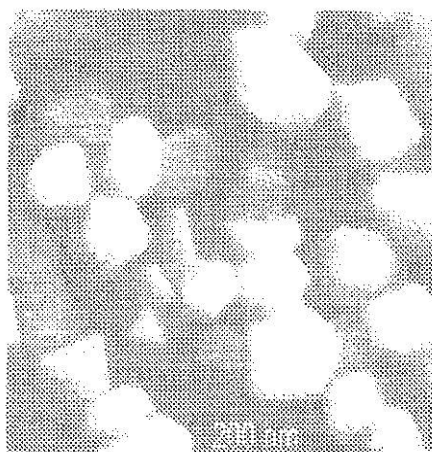
【図 3 2】



【図 3 3】

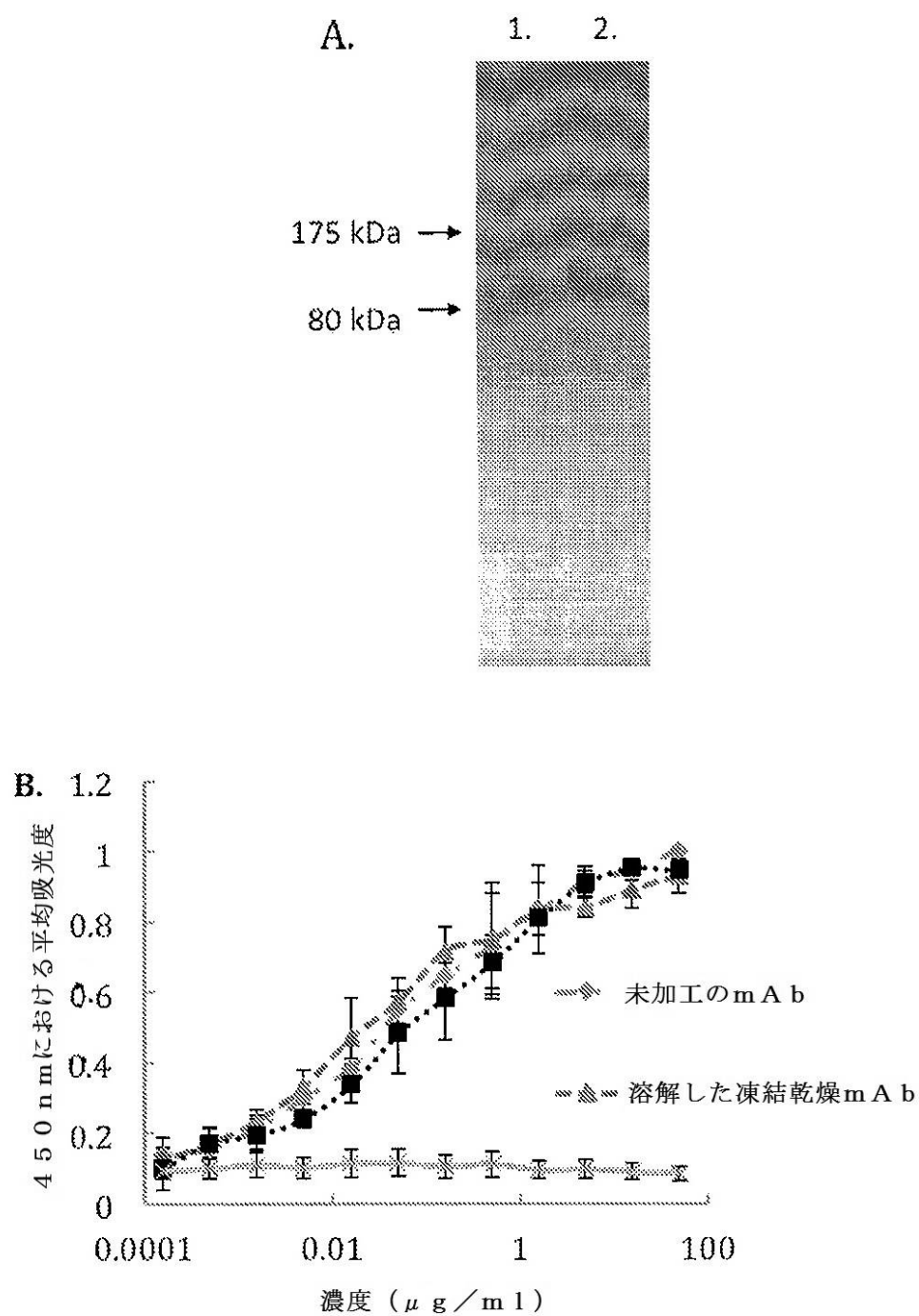


A

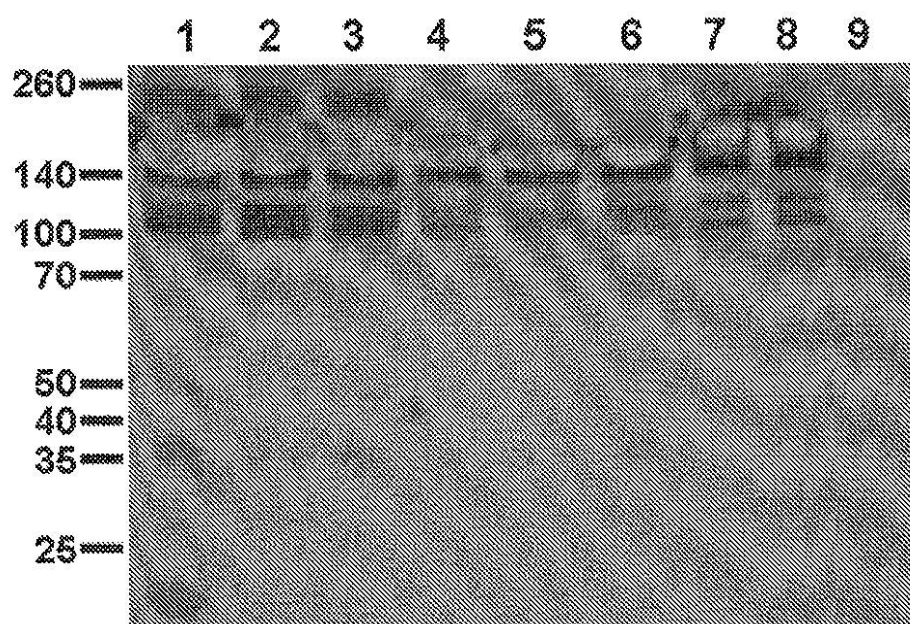


B

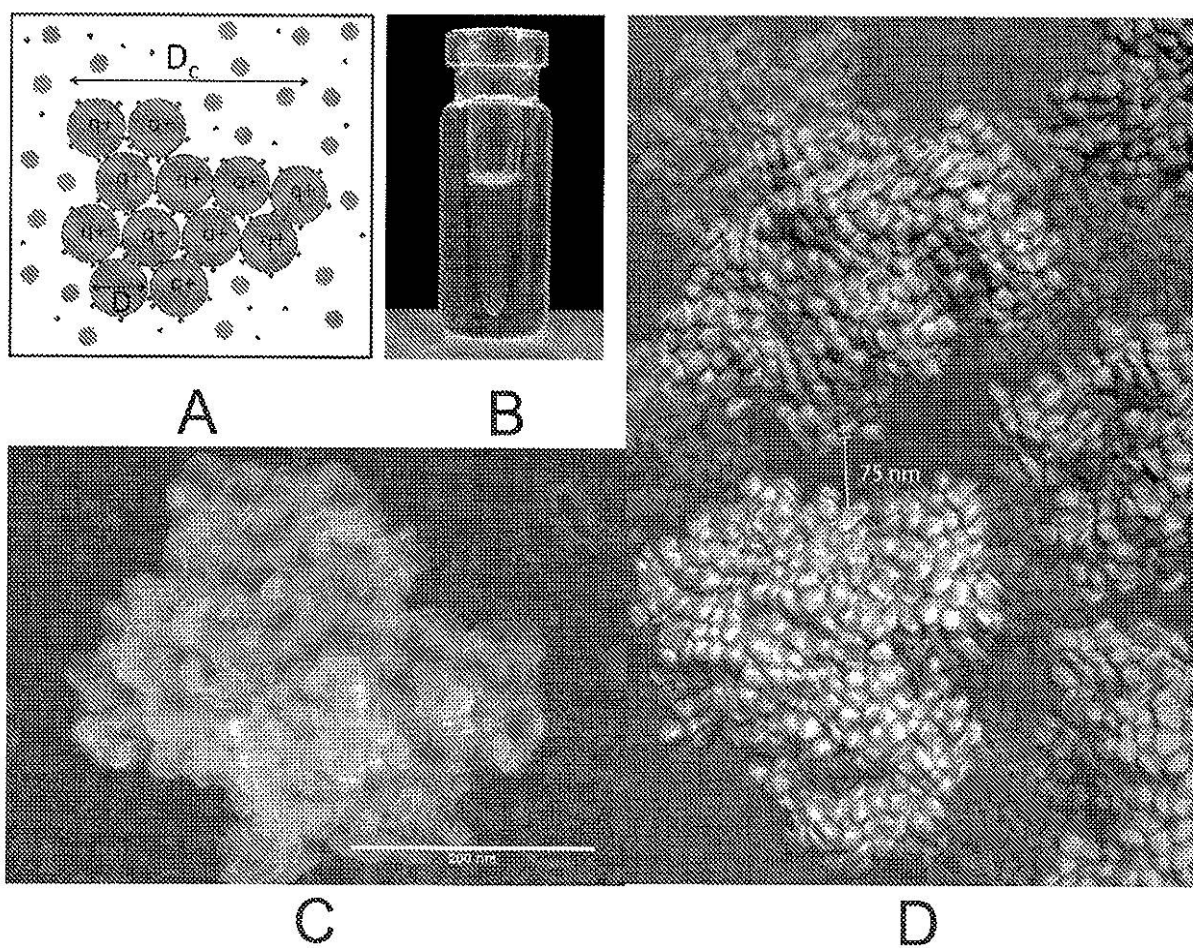
【図 3 4】



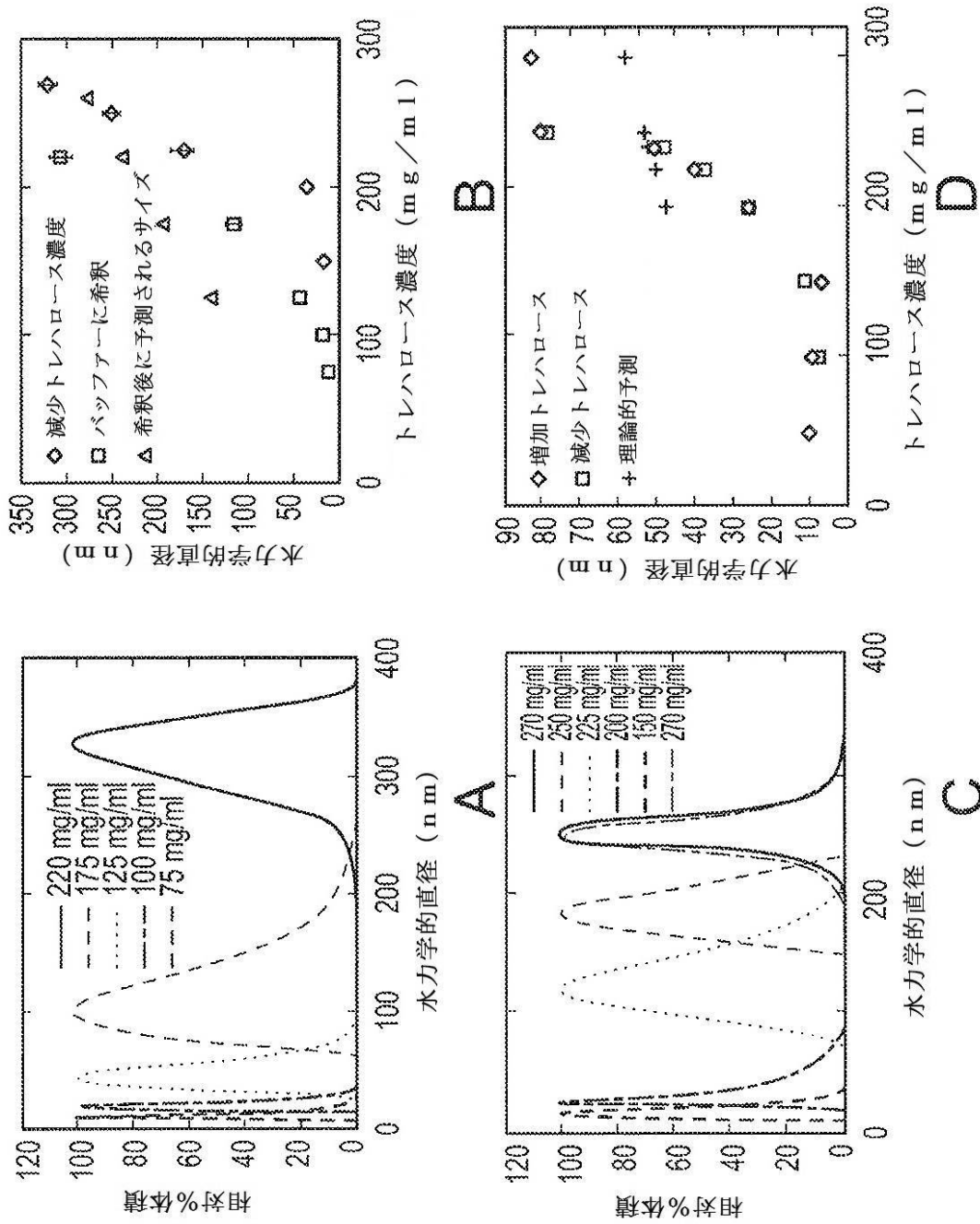
【図 3 5】



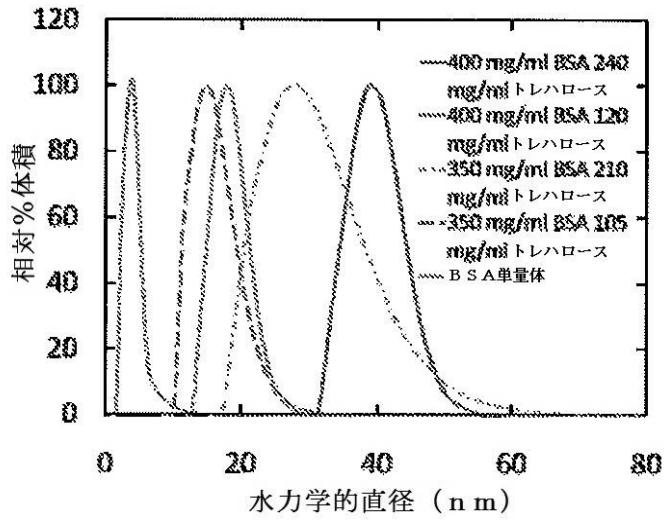
【図 3 6】



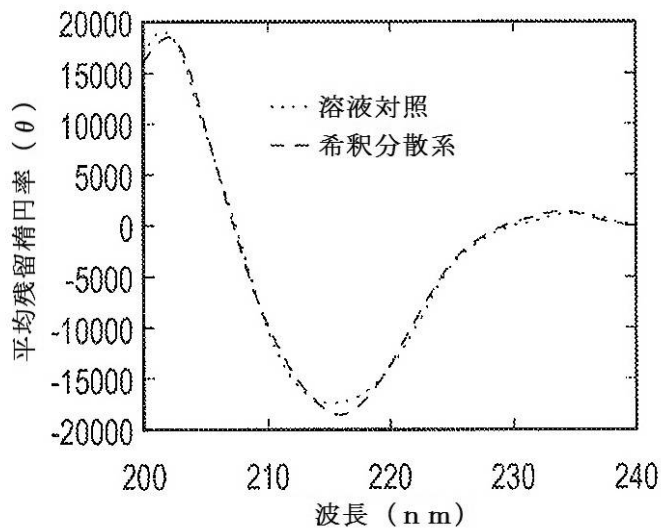
【図 37】



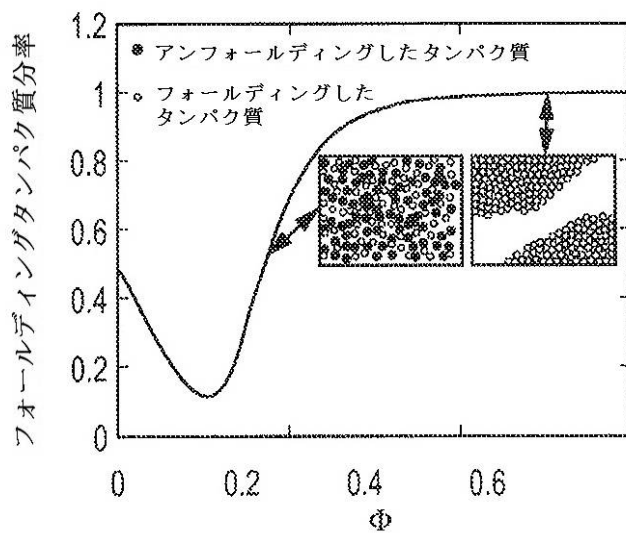
【図 3 8】



【図 3 9】

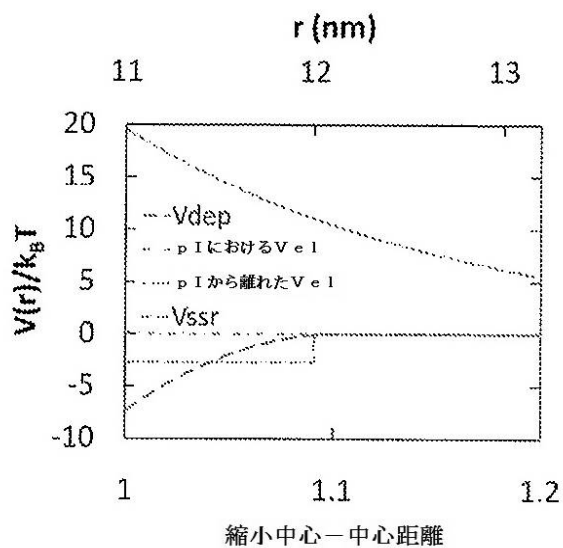


A

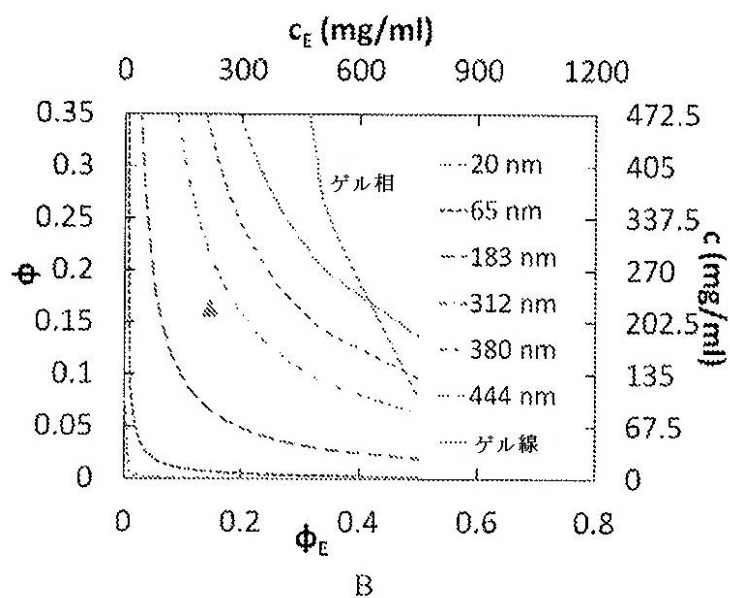


B

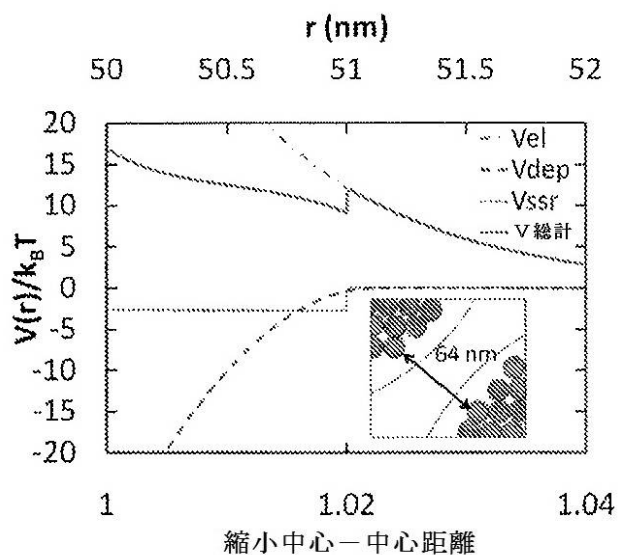
【図 40 A】



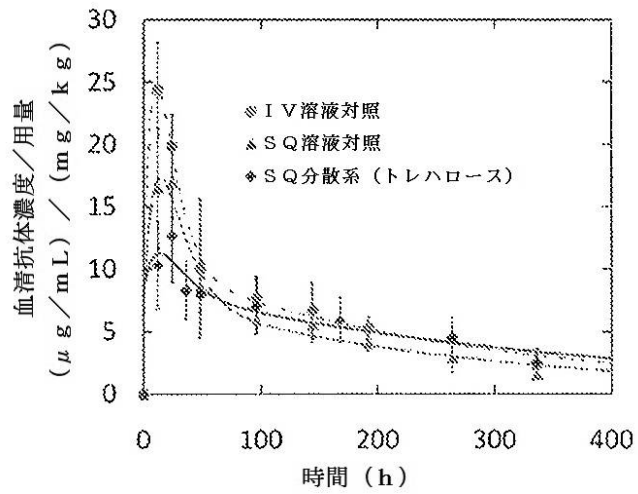
【図 40 B】



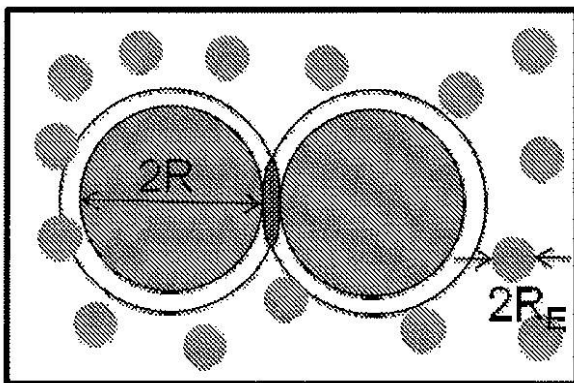
【図 40 C】



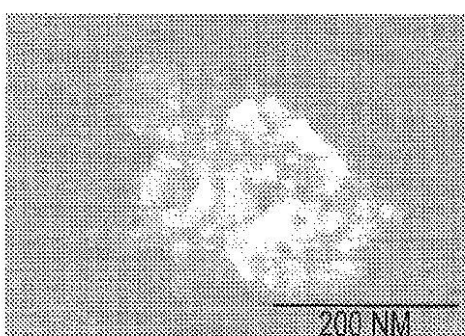
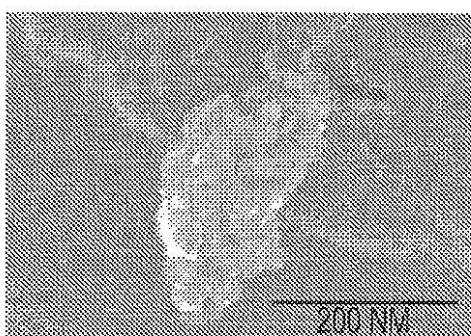
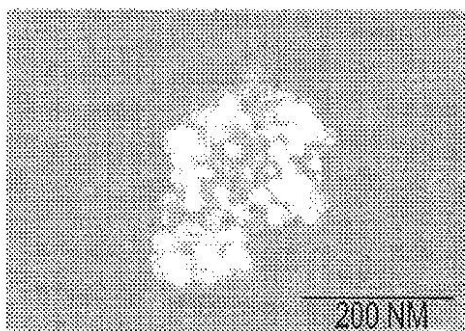
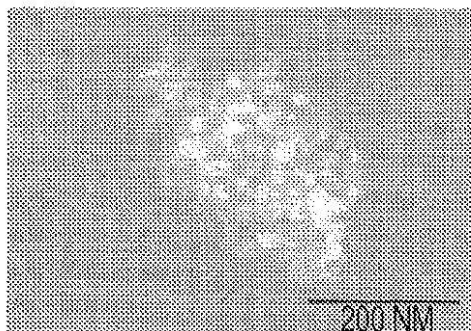
【図 4 1】



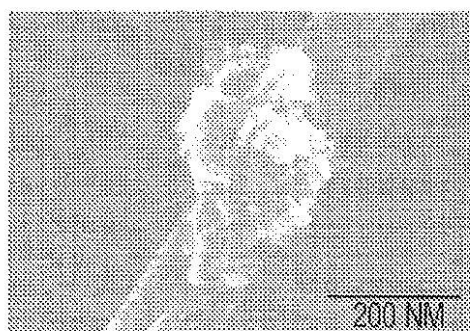
【図 4 2】



【図 4 3】

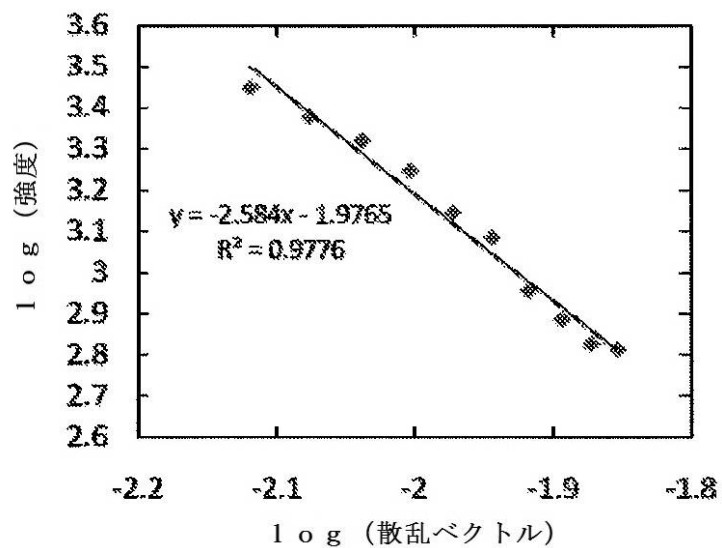


A

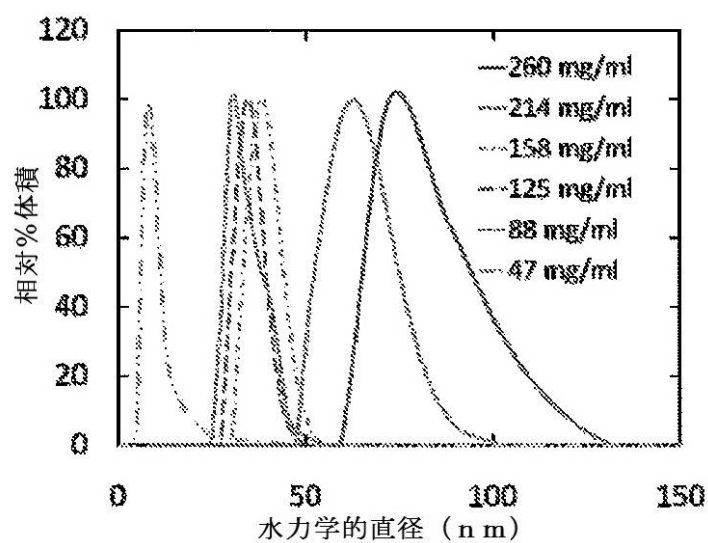


B

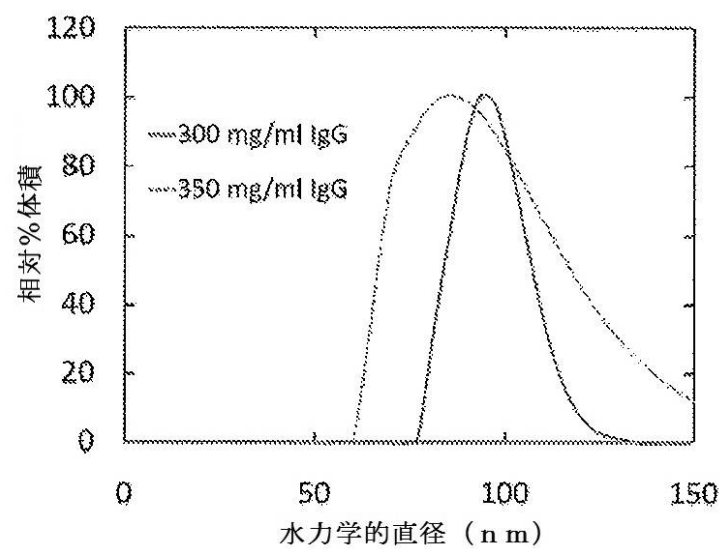
【図 4 4】



【図 4 5】

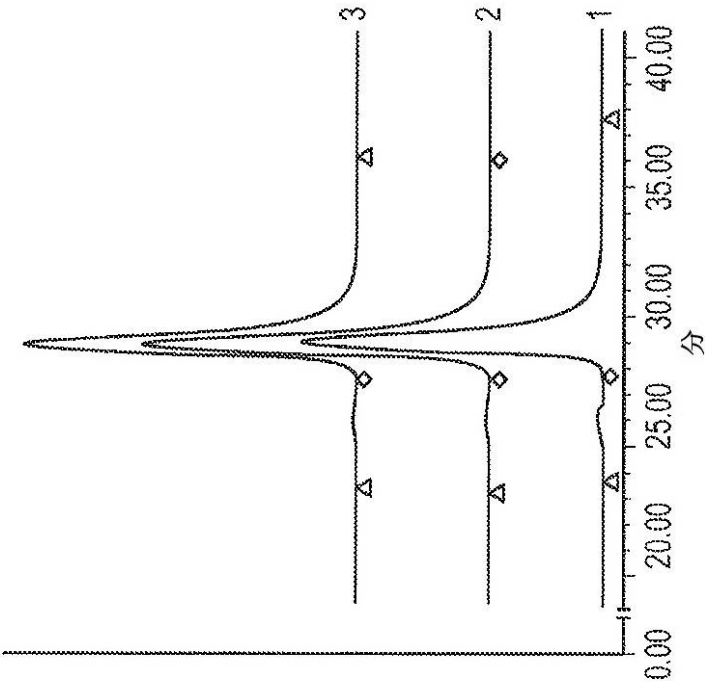


【図 4 6】



【図 4 7】

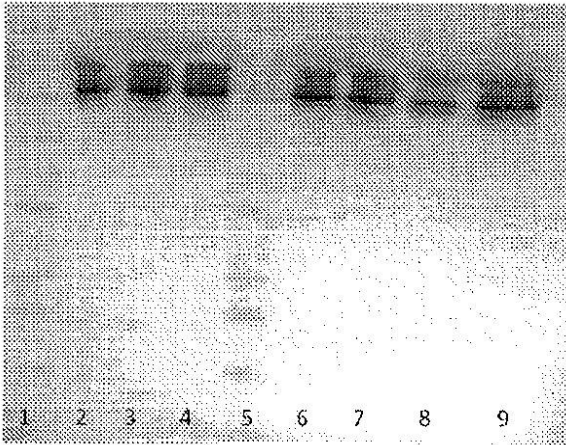
試料の種類	%単量体 (S E C)
対照溶液	98.88 ± 0.04
凍結乾燥後	98.52 ± 0.06
2 6 7 m g / m l 分散系	98.59 ± 0.04
2 6 7 から 1 7 5 m g / m l へと希釈した分散系	98.50 ± 0.19
2 6 7 から 1 2 5 m g / m l へと希釈した分散系	98.59 ± 0.01
2 6 7 から 7 5 m g / m l へと希釈した分散系	97.93 ± 0.30



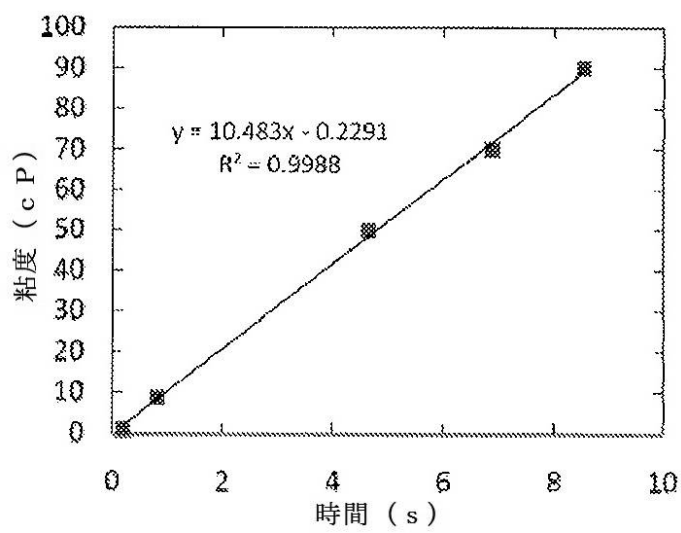
A

B

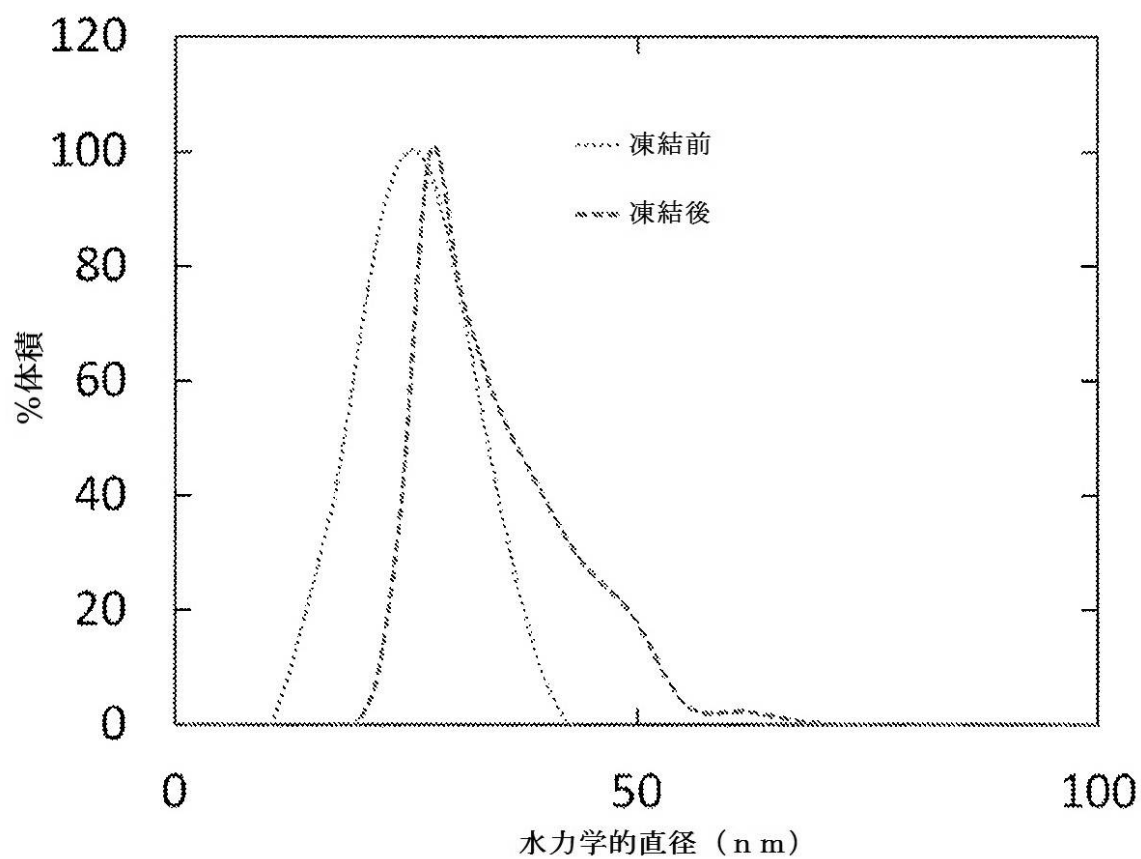
【図 4 8】



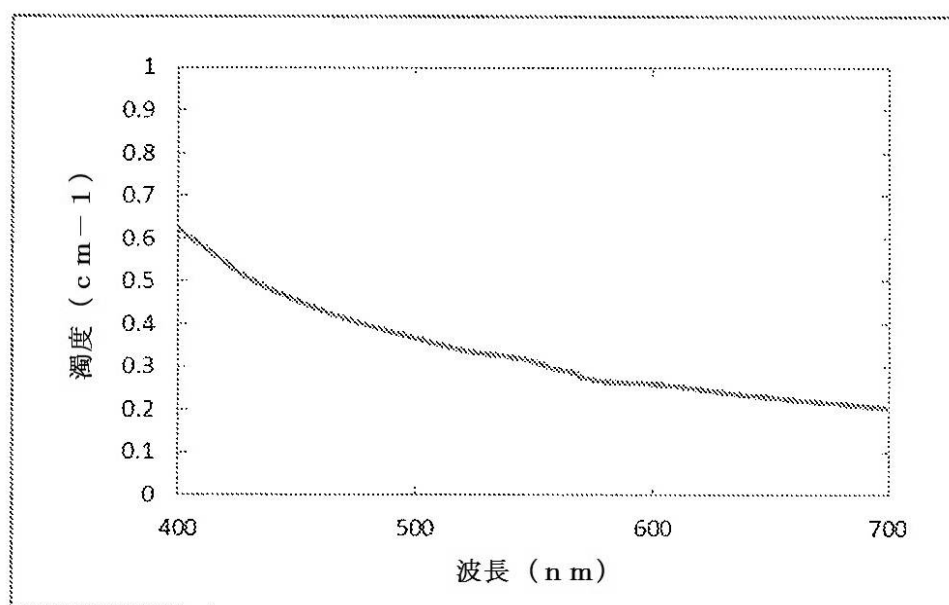
【図 4 9】



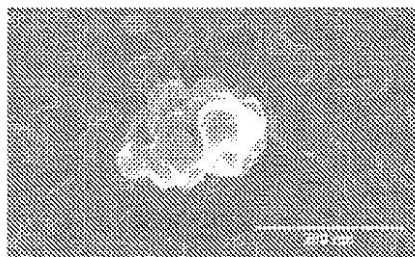
【図 5 0】



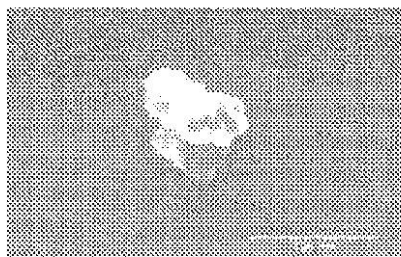
【図 5 1】



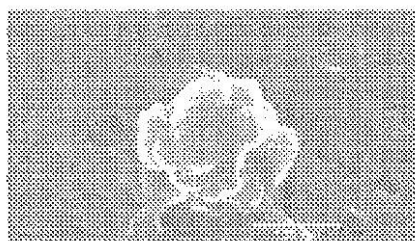
【図 5 2】



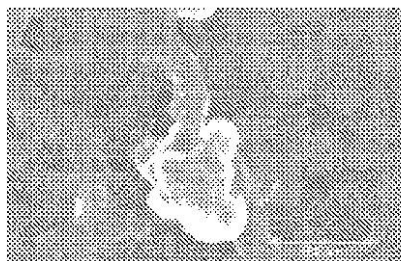
A



B

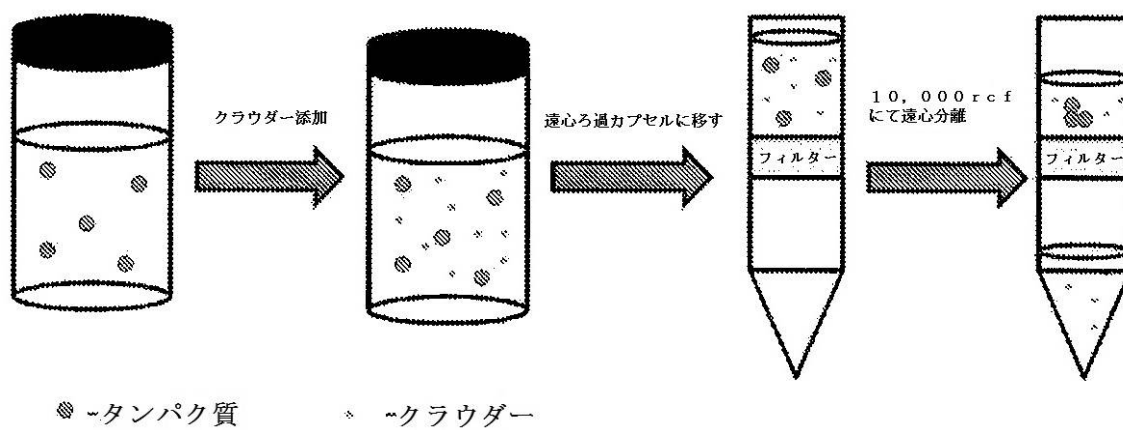


C



D

【図 5 3】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/028640
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 9/12(2006.01)i, A61K 9/10(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 9/14(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i</i>		
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 9/12; A61K 9/14; A61K 49/18; A61K 38/43; C07K 1/14; C07K 1/02; A61K 31/495; B32B 5/16		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: protein nanoparticle, protein nanocluster, dispersion, viscosity, drug delivery		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009-137112 A1 (SOUTH DAKOTA STATE UNIVERSITY) 12 November 2009 See abstract, Fig. 1, lines 4-8 in p. 10, lines 11-30 in p. 12, line 11 in p. 12-line 21 in p. 13, lines 3-10 in p. 14, examples 1-10, and all claims.	1-95,99-115 , 128-133, 150, 152
X	US 2009-0304599 A1 (M. AIMI et al.) 10 December 2009 See abstract, paragraphs [0013], [0014], [0024]-[0028], [0047], [0048], [0069]-[0073], [0076], examples 1-8, and all claims.	1-95,99-115 , 128-133, 150, 152
X	US 2009-0191277 A1 (M. AIMI) 30 July 2009 See abstract, paragraphs [0012]-[0027], [0030], [0038], [0049]-[0054], [0084], examples 1-6, test example 1, and all claims.	1-95,99-115 , 128-133, 150, 152
A	US 7651770 B2 (C. J. BERKLAND et al.) 26 January 2010 See the whole document.	1-95,99-115 , 128-133, 150, 152
A	J. P. BAGARIA, "Protein-nanoparticle constructs for intracellular delivery", Master Thesis in NINU Norwegian University of Science Technology, 18 February 2011 See the whole document.	1-95,99-115 , 128-133, 150, 152
☒ 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 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 10 SEPTEMBER 2012 (10.09.2012)		Date of mailing of the international search report 10 SEPTEMBER 2012 (10.09.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer LEE, SUN HWA Telephone No. 82-42-481-5606 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/028640

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	K. P. JOHNSTON et al, "Concentrated dispersions of equilibrium protein nanoclusters that reversibly dissociate into active monomers", ACS NANO, 19 January 2012, Vol. 6. No. 2, pp. 1357-1369 See abstract, line 48 in left-handed column-line 7 in right-handed column in p. 1358, lines 37-40, 51-55 in right-handed column in p. 1358, Figs. 1-3, lines 20-25 in left-handed column in p. 1360, section of viscosity of nanocluster dispersion in p. 1365, conclusion and methods in p. 1366.	1-95, 99-115 , 128-133, 150, 152

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/028640

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.: 148, 149
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 148 and 149 are directed to a treatment method of the human body by therapy under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT.
2. ☒ Claims Nos.: 98, 149
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:
Claims 88 and 149 are unclear under PCT Article 6, because they refer to any one of multiple dependent claims which are not drafted in accordance with the third sentence of PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: 96, 97, 116-127, 133-148, 151
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/028640

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009-137112 A1	12.11.2009	AU 2009-244742 A1 CA 2723563 A1 CN 102066399 A EP 2285825 A1 IL 209155 D0 JP 2011-519932 A KR 10-2011-0036704 A US 2011-0091565 A1	12.11.2009 12.11.2009 18.05.2011 23.02.2011 31.01.2011 14.07.2011 08.04.2011 21.04.2011
US 2009-0304599 A1	10.12.2009	EP 1968649 A1 JP 2009-519894 A JP 2009-519894 T WO 2007-072982 A1	17.09.2008 21.05.2009 21.05.2009 28.06.2007
US 2009-0191277 A1	30.07.2009	JP 2009-173610 A	06.08.2009
US 7651770 B2	26.01.2010	AU 2006-330627 A1 BR P10619938 A2 CA 2633380 A1 CN 101370479 A EP 1968550 A2 IL 192159 D0 JP 2009-519975 A JP 2009-519975 T MX 2008007697 A US 2007-0172653 A1 US 2008-0075667 A1 US 2009-053316 A1 US 2009-081295 A1 US 7993749 B2 WO 2007-076295 A2 WO 2007-076295 A3 ZA 200805918 A	05.07.2007 25.10.2011 05.07.2007 18.02.2009 17.09.2008 29.12.2008 21.05.2009 21.05.2009 26.09.2008 26.07.2007 27.03.2008 26.02.2009 26.03.2009 09.08.2011 05.07.2007 29.11.2007 27.05.2009

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/10 (2006.01)		A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)		A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)		A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 47/14 (2006.01)		A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/44 (2006.01)		A 6 1 K 47/44	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)		A 6 1 K 47/22	
B 8 2 Y 5/00 (2011.01)		B 8 2 Y 5/00	
B 8 2 Y 30/00 (2011.01)		B 8 2 Y 30/00	
B 8 2 Y 40/00 (2011.01)		B 8 2 Y 40/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	

(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,MD,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,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,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,VN

(74)代理人 100114465

弁理士 北野 健

(74)代理人 100156915

弁理士 伊藤 奈月

(74)代理人 100149076

弁理士 梅田 慎介

(72)発明者 ジョンストン, キース, ピー.

アメリカ合衆国 7 8 7 0 4 テキサス州, オースティン, ディアフット トレイル 2 6 2 8

(72)発明者 メイナード, ジェニファー, エー.

アメリカ合衆国 7 8 7 0 5 テキサス州, オースティン, ランドン レーン 7 0 0

(72)発明者 ミラー, アンドレア

アメリカ合衆国 2 2 3 1 5 ヴァージニア州, アレクサンドリア, キャスルフィン ウェイ 6 4 0 5

(72)発明者 ウィルソン, ブライアン

アメリカ合衆国 7 8 7 3 8 テキサス州, オースティン, クローヴァーブルック コート 6

(72)発明者 トラスケット, トーマス, エム.

アメリカ合衆国 7 8 7 2 3 テキサス州, オースティン, スケールズ ストリート 4 2 1 2

(72)発明者 ダイニン, アイリーン

アメリカ合衆国 7 8 7 0 5 テキサス州, オースティン, イースト 3 5 ストリート 3 1 1, アpartment エー

(72)発明者 ボーワンカー, アメヤ

アメリカ合衆国 7 8 7 5 1 テキサス州, オースティン, イースト 4 5 ストリート 1 0 2 0, アpartment 2 6 4

Fターム(参考) 4C076 AA16 BB01 BB11 BB16 BB25 BB31 DD01F DD37F DD51F DD60F

DD67F EE23F EE30F EE38F EE41F FF16 FF68 GG03 GG06 GG09

4C084 AA01 AA02 AA03 MA21 MA52 MA59 MA63 MA66 NA05 ZB261