

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6533932号  
(P6533932)

(45) 発行日 令和1年6月26日(2019.6.26)

(24) 登録日 令和1年6月7日(2019.6.7)

(51) Int.Cl.	F 1		
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	M
A 6 1 K 47/34	(2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/36	(2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 47/42	(2017.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 9/19	(2006.01)	A 6 1 K 9/19	

請求項の数 23 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-550818 (P2015-550818)
(86) (22) 出願日	平成25年12月27日(2013.12.27)
(65) 公表番号	特表2016-504369 (P2016-504369A)
(43) 公表日	平成28年2月12日(2016.2.12)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/078102
(87) 國際公開番号	W02014/106116
(87) 國際公開日	平成26年7月3日(2014.7.3)
審査請求日	平成28年12月16日(2016.12.16)
(31) 優先権主張番号	61/747,176
(32) 優先日	平成24年12月28日(2012.12.28)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	507328645 アボット カーディオバスキュラー システムズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95054 サンタ クララ レイクサイド ドライブ 3200
(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口國際特許事務所
(72) 発明者	トロールサス, ミカエル アメリカ合衆国、カリフォルニア・95124、サン・ホセ、ホスター・レイン・5989

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗体を含む治療用組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 生物学的治療薬、及び

(b) ポリマー間架橋することができる官能基を含む複数の親水性ポリマー鎖を含む製剤であって、製剤は、架橋されると、直径約50nm～約10μmのサイズを有する沈殿物となる生物学的治療薬の可逆的沈殿を示すヒドロゲルを形成する、製剤であって、

生物学的治療薬が、トラスツズマブ(ハーセプチン(TM))、ベバシズマブ(アバストン(TM))、アダリムマブ(ヒュミラ(TM))、ラニビズマブ(ルセンティス(TM))、アフリバーセプト(アイリーア(TM))、エタネルセプト(エンブレル(TM))、リツキシマブ(リツキサン(TM))、ペグフィルグラスチム(ニューラスター(TM))、インターフェロン-1a(アボネックス(TM))、インターフェロン-1a(レビフ(TM))、インフリキシマブ(レミケード(TM))からなる群から選択され；および

複数の親水性ポリマー鎖は、ポリエチレングリコール(PEG)、デキストラン、ヒアルロン酸、ペクチン、コラーゲン、フィブリノーゲン、アルギニート、PLLA-PEG-PLLAコポリマー、PLDA-PEG-PLDAコポリマー、PLGA-PEG-PLGAコポリマー、PEG-PLLAコポリマー、PEG-PLDAコポリマー及びPEG-PLGAコポリマーからなる群から選択され；

複数の親水性ポリマー鎖は、チオール、アミノ、ヒドロキシ及びCO-NH-NH<sub>2</sub>基

から成る群から選択される求核性官能基で官能化された第1タイプの親水性ポリマー鎖、並びにアクリレート及びビニルスルホン基から成る群から選択される求電子性官能基で官能化された第2タイプの親水性ポリマー鎖を含み、親水性ポリマー鎖の構造は、分岐状、星形または櫛形であり、2～16本のアームを有しており；および

生物学的治療薬：全親水性ポリマーの重量比は、約1：1～約1：125である、製剤。

【請求項2】

生物学的治療薬は、アダリムマブである、請求項1に記載の製剤。

【請求項3】

複数の親水性ポリマー鎖は、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒアルロン酸、PLA-PEG-PLLAコポリマー、PLDA-PEG-PLDAコポリマー、PLGA-PEG-PLGAコポリマー、PEG-PLLAコポリマー、PEG-PLDAコポリマー及びPEG-PLGAコポリマーである、請求項1に記載の製剤。  
10

【請求項4】

複数の親水性ポリマー鎖は、アクリレート、チオール、およびビニルスルホンである官能基を含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項5】

親水性ポリマー鎖の各々の分子量は、約2～30kDaである、請求項1に記載の製剤。  
20

【請求項6】

第1タイプの親水性ポリマー鎖は、PEG-アクリレートであり、第2タイプの親水性ポリマー鎖は、PEG-チオールである、請求項1に記載の製剤。

【請求項7】

第1タイプの親水性ポリマー鎖は4、8または16本のアームを有し、第2タイプの親水性ポリマー鎖は4、8または16本のアームを有している、請求項1に記載の製剤。

【請求項8】

親水性ポリマー鎖の各アームは、官能基を含む、請求項7に記載の製剤。

【請求項9】

第1タイプの親水性ポリマー鎖：第2タイプの親水性ポリマー鎖の比は、9：10～約10：9である、請求項1に記載の製剤。  
30

【請求項10】

第1タイプの親水性ポリマー鎖は8本のアームを有し、第2タイプの親水性ポリマー鎖は8本のアームを有している、請求項1に記載の製剤。

【請求項11】

第1タイプの親水性ポリマー鎖は16本のアームを有し、第2タイプの親水性ポリマー鎖は16本のアームを有している、請求項1に記載の製剤。

【請求項12】

第1タイプの親水性ポリマー鎖は8本のアームを有し、第2タイプの親水性ポリマー鎖は8本のアームを有しており、複数の親水性ポリマーは、4本のアームを有するPEG-アクリレートである第3タイプの親水性ポリマー鎖及び4本のアームを有するPEG-チオールである第4タイプの親水性ポリマー鎖を更に含む、請求項1に記載の製剤。  
40

【請求項13】

第1及び第2親水性ポリマー鎖：第3及び第4親水性ポリマー鎖の比は、1：99～99：1である、請求項12に記載の製剤。

【請求項14】

第1及び第2タイプの親水性ポリマー鎖：第3及び第4タイプの親水性ポリマーの比は、75：25、50：50、または25：75である、請求項13に記載の製剤。

【請求項15】

製剤は、凍結乾燥形態で用意される、請求項1に記載の製剤。

【請求項16】

更に、バッファー溶液を含む、請求項1\_5に記載の製剤。

【請求項17】

バッファー溶液は、約3.5～約6のpHを有する、請求項1\_6に記載の製剤。

【請求項18】

PEG-アクリレート及びPEG-チオール：バッファーの重量/容量比は、約5%～約30%である、請求項1\_7に記載の製剤。

【請求項19】

生物学的治療薬：全親水性ポリマーの重量比は、約1:3.75～約1:2.5である、請求項1に記載の製剤。

【請求項20】

10

(a) 生物学的治療薬、及びポリマー間架橋することができる官能基を含む複数の親水性ポリマー鎖を含む製剤、及び

(b) 架橋を誘導するための活性化バッファーを含むキットであって、

生物学的治療薬が、トラスツズマブ(ハーセプチン(TM))、ベバシズマブ(アバスチン(TM))、アダリムマブ(ヒュミラ(TM))、ラニビズマブ(ルセンティス(TM))、アフリバーセプト(アイリーア(TM))、エタネルセプト(エンブレル(TM))、リツキシマブ(リツキサン(TM))、ペグフィルグラスチム(ニューラスター(TM))、インターフェロン-1a(アボネックス(TM))、インターフェロン-1a(レビフ(TM))、インフリキシマブ(レミケード(TM))からなる群から選択され；および

20

複数の親水性ポリマー鎖は、ポリエチレングリコール(PEG)、デキストラン、ヒアルロン酸、ペクチン、コラーゲン、フィブリノーゲン、アルギメント、PLLA-PEG-PLLAコポリマー、PLDA-PEG-PLDAコポリマー、PLGA-PEG-PLGAコポリマー、PEG-PLLAコポリマー、PEG-PLDAコポリマー及びPEG-PLGAコポリマーからなる群から選択され；

複数の親水性ポリマー鎖は、チオール、アミノ、ヒドロキシ及びCO-NH-NH<sub>2</sub>基から成る群から選択される求核性官能基で官能化された第1タイプの親水性ポリマー鎖、並びにアクリレート及びビニルスルホン基から成る群から選択される求電子性官能基で官能化された第2タイプの親水性ポリマー鎖を含み、親水性ポリマー鎖の構造は、分岐状、星形または樹形であり、2～16本のアームを有しており；および

30

生物学的治療薬：全親水性ポリマーの重量比は、約1:1～約1:12.5であり、

製剤は架橋されたとき

(i) 患者の体内のスペースへの投与から24時間で<5%の累積生物学的治療薬放出のバースト効果；

(ii) 患者の体内のスペースへの投与から7日で<10%の累積生物学的治療薬放出の初期放出；

(iii) 患者の体内のスペースへの投与後の放出率が約0～30日間の第1相、約0～30日間の第2相及び約0～30日間の第3相の間ほぼ一定である三相放出プロフィール；

40

(iv) 生物学的治療薬を完全放出するための患者の体内のスペースへの投与から1～3ヶ月の放出期間；  
を示すヒドロゲルを形成する、キット。

【請求項21】

更に、活性化バッファーと混合した製剤をデリバリーするためのデリバリーデバイスを含み、デリバリーデバイスはシングルボア注射器、デュアルボア注射器、または混合ヘッドを含む多チャネルデリバリーデバイスから選択される、請求項2\_0に記載のキット。

【請求項22】

(a) 生物学的治療薬、及びポリマー間架橋することができる官能基を含む複数の親水性ポリマー鎖を含む製剤、

50

## (b) 架橋を誘導するための活性化バッファー

を含むキットであって、製剤は、架橋されると、直径約50nm～約10μmのサイズを有する沈殿物となる生物学的治療薬の可逆的沈殿を示すヒドロゲルを形成し；

生物学的治療薬が、トラスツズマブ(ハーセプチン(TM))、ベバシズマブ(アバスチン(TM))、アダリムマブ(ヒュミラ(TM))、ラニビズマブ(ルセンティス(TM))、アフリバーセプト(アイリーア(TM))、エタネルセプト(エンブレル(TM))、リツキシマブ(リツキサン(TM))、ペグフィルグラスチム(ニューラスタ(TM))、インターフェロン-1a(アボネックス(TM))、インターフェロン-1a(レビフ(TM))、インフリキシマブ(レミケード(TM))からなる群から選択され；および

10

複数の親水性ポリマー鎖は、ポリエチレングリコール(PEG)、デキストラン、ヒアルロン酸、ペクチン、コラーゲン、フィブリノーゲン、アルギメント、PLLA-PEG-PLLAコポリマー、PLDA-PEG-PLDAコポリマー、PLGA-PEG-PLGAコポリマー、PEG-PLLAコポリマー、PEG-PLDAコポリマー及びPEG-PLGAコポリマーからなる群から選択され；

複数の親水性ポリマー鎖は、チオール、アミノ、ヒドロキシ及びCO-NH-NH<sub>2</sub>基から成る群から選択される求核性官能基で官能化された第1タイプの親水性ポリマー鎖、並びにアクリレート及びビニルスルホン基から成る群から選択される求電子性官能基で官能化された第2タイプの親水性ポリマー鎖を含み、親水性ポリマー鎖の構造は、分岐状、星形または櫛形であり、2～16本のアームを有しており；および

20

生物学的治療薬：全親水性ポリマーの重量比は、約1：1～約1：125である、キット。

## 【請求項23】

更に、活性化バッファーと混合した製剤をデリバリーするためのデリバリーデバイスを含み、デリバリーデバイスはシングルボア注射器、デュアルボア注射器、または混合ヘッドを含む多チャネルデリバリーデバイスから選択される、請求項22に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【背景技術】

## 【0001】

生物学的治療薬は公知であり、その無比のベネフィット及び効力のために広く処方されている。しかしながら、生物学的治療薬は高い全身濃度で望ましくない副作用を伴うことがある。加えて、有痛で高価な生物学的治療薬を反復投与しなければならず、患者や供給業者に対するあるベネフィット及びアピールが低下することがある。従って、全身暴露及び投与頻度を減らし、生物学的治療薬の安全性及び患者コンプライアンスを改善するために生物学的治療薬のデリバリーに対して制御的徐放性製剤を提供することが望ましい。

30

## 【0002】

変形性関節炎は、生物学的治療薬の制御的放出に対する高いまだ満たされていない必要性を有する病変の一例である。米国だけでも現在3800万人以上の人々が変形性関節炎を患っている。変形性関節炎は、関節痛、こわばり及び狭い可動域を特徴とする進行性の病気であり、典型的には手、脊椎、股及び膝の関節を冒す。現在、変形性関節炎の疾患修飾のためにFDAが認可している薬はない。現在、変形性関節炎の疼痛はNSAID及びオピオイドにより管理されている。また、視野を段階的に害し、失明に至る黄斑変性の治療は目への反復注射の必要性により妨げられている。本明細書中に開示されているような低い全身濃度、低い最大局所及び全身濃度、少ない投与頻度要件、より高い有効投与及び改善されたコンプライアンスを与える生物学的治療薬の制御放出製剤は変形性関節炎、黄斑変性及び他の病気の治療を大きく前進させる。

40

## 【発明の概要】

## 【0003】

開示されている主題の目的及び作用効果は、以下の明細書中に記載されており、この記載から明白であり、開示されている主題の実施により分かるであろう。開示されている主

50

題の別の作用効果は本明細書及び特許請求の範囲中に特に指摘されている方法及びシステムにより、添付されている図面から実現され、達成されるであろう。

【0004】

上記及び他の作用効果を達成するために、具体化されており、広く記載されているように開示されている主題の目的に従って、開示されている主題は生物学的治療薬を体内のスペースに制御的徐放するための製剤、キット及び方法を含む。開示されている主題に従って、生物学的治療薬及び複数の親水性ポリマー鎖を含み、前記ポリマー鎖の各々がポリマー間重合することができる、すなわち架橋することができる官能基を含んでいる製剤が提供される。開示されている主題の製剤の重合により、製剤の体内のスペースへの投与から24時間以内の生物学的治療薬の放出の「バースト効果」；製剤の体内のスペースへの投与から7日以内での生物学的治療薬の初期累積放出；三相放出プロフィール；及び生物学的治療薬を完全放出するための体内のスペースへの投与から1～3ヶ月の放出期間；を含めた多数の作用効果及び独自の特性が与えられる。

【0005】

開示されている主題の別の態様によれば、体内のスペースからの生物学的治療薬の可逆的沈殿を与えるための製剤が提供される。この製剤は生物学的治療薬及び複数の親水性ポリマー鎖を含み、前記ポリマー鎖の各々はポリマー間重合することができる官能基を含む。複数の親水性ポリマー鎖が重合されると、架橋組成物は生物学的治療薬の可逆的沈殿を示し、これらの沈殿物は直径約50nm～約10μmの沈殿物を含む。

【0006】

開示されている主題の別の態様では、可逆的に沈殿する生物学的治療薬を含む架橋組成物の投与方法が提供される。この方法は、生物学的治療薬及び複数の親水性ポリマー鎖を組み合わせて配合物を形成し、配合物を親水性ポリマー鎖のポリマー間重合を誘導するための活性化バッファーと混合して可逆的に沈殿する生物学的治療薬を含む架橋組成物を形成し、架橋組成物をその必要がある患者に対して投与することを含む。更なる実施形態では、非限定的に癌、眼の疾患、炎症、自己免疫疾患、創傷、骨折、感染性疾患または心血管疾患を含めた疾患の治療方法が提供される。

【0007】

開示されている主題の別の態様では、全身循環中の生物学的治療薬の濃度より約10～約10000倍高い生物学的治療薬の局所的濃度を約1日～約90日間生ずる製剤が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、開示されている主題の1つの態様の略図を表し、生物学的治療薬の制御的徐放製剤は架橋組成物を形成すべく複数の親水性ポリマー鎖を架橋することにより形成され、該組成物は体内のスペースに投与され得る。

【図2】図2は、開示されている主題の1つの態様に従うプレミックスした製剤の略図を表す。

【図3A】図3Aは、4アーム、8アーム及び混合4アーム/8アーム親水性ポリマー鎖を含む架橋組成物からの生物学的治療薬のインビトロ徐放カインティックスを表す。

【図3B】図3Bは、4アーム、8アーム及び混合4アーム/8アーム親水性ポリマー鎖を含む架橋組成物からの生物学的治療薬のインビトロ徐放カインティックスを表す。

【図4A】図4Aは、インビトロでのモノクローナル抗体の放出と平行して架橋組成物の膨潤を示す。

【図4B】図4Bは、インビトロでの各種架橋組成物製剤の目に見える溶解までの時間を表す。

【図5】図5は、開示されている主題に従う幾つかの製剤中のPEG固体濃度及び生物学的治療薬濃度を関数とする目に見える沈殿物形成及び沈殿物沈降を図示する。

【図6A】図6Aは、5、15及び30回注射器プランジングすることにより10%4アームPEG固体架橋組成物を生成した後の可逆的に沈殿した蛍光標識したモノクローナ

10

20

30

40

50

ル抗体沈殿物を表す。

【図 6 B】図 6 B は、5、15 及び 30 回注射器プランジングすることにより 10% 8 アーム PEG 固体架橋組成物を生成した後の可逆的に沈殿した蛍光標識したモノクローナル抗体沈殿物を表す。

【図 6 C】図 6 C は、5、15 及び 30 回注射器プランジングすることにより 20% 4 アーム PEG 固体架橋組成物を生成した後の可逆的に沈殿した蛍光標識したモノクローナル抗体沈殿物を表す。

【図 6 D】図 6 D は、5、15 及び 30 回注射器プランジングすることにより 20% 8 アーム PEG 固体架橋組成物を生成した後の可逆的に沈殿した蛍光標識したモノクローナル抗体沈殿物を表す。

【図 7】図 7 は、開示されている主題の幾つかの製剤中に形成される生物学的治療薬の沈殿物のサイズ分布の図である。

【図 8 A】図 8 A は、健康なラットの後肢の関節内スペースに投与してから 2、4、6、12 及び 24 時間後の非製剤化モノクローナル抗体の血清及び滑液濃度を表す。

【図 8 B】図 8 B はこの情報を棒グラフの形で示す。

【図 9 A】図 9 A は、8 アーム PEG - SH / PEG - Accr 架橋組成物からのモノクローナル抗体のインビトロ放出カイネティックスを表す。

【図 9 B】図 9 B は、開示されている主題の 1 つの態様に従う例示的三相放出プロファイルを図示する。

【図 10】図 10 は、健康なラットの後肢の関節内スペースへの投与から 14 日間に架橋ヒドロゲル組成物を介してデリバリーされたモノクローナル抗体の血清及び滑液濃度を表す。

【図 11 A】図 11 A は、サイズ排除クロマトグラフィーにより測定した形成から 18 及び 26 日目に示す 4 アーム親水性ポリマー鎖を含む各種架橋組成物からインビトロで放出されたモノクローナル抗体のモノマー、凝集物及び断片の割合を表す。

【図 11 B】図 11 B は、サイズ排除クロマトグラフィーにより測定した形成から 18 及び 26 日目に示す 4 アーム親水性ポリマー鎖を含む各種架橋組成物からインビトロで放出されたモノクローナル抗体のモノマー、凝集物及び断片の割合を表す。

【図 12】図 12 は、血清 mAb 濃度対開示されている主題に従う架橋組成物の投与からの時間のプロットを図示する。

【図 13 A】図 13 A は、注射から 4 時間後のラットの関節内スペース中の架橋組成物の写真である。

【図 13 B】図 13 B は、注射から 4 時間後のラットの関節内スペース中の架橋組成物の写真である。

【図 13 C】図 13 C は、ラット後肢の関節内スペースに注射及びスペースからの射出後の蛍光標識した mAb を含む架橋組成物の写真である。

【図 14 A】図 14 A は、それぞれ各種の架橋プレミックスした及びプレミックスしていない組成物からの平均インビトロ mAb 放出の経時的プロットである。

【図 14 B】図 14 B は、それぞれ各種の架橋プレミックスした及びプレミックスしていない組成物からの平均インビトロ mAb 放出の経時的プロットである。

【図 15 A】図 15 A は、図 14 A にプロットした平均値に対応する個々の架橋組成物からのインビトロ mAb 放出の経時的プロットである。

【図 15 B】図 15 B は、図 14 A にプロットした平均値に対応する個々の架橋組成物からのインビトロ mAb 放出の経時的プロットである。

【図 15 C】図 15 C は、図 14 A にプロットした平均値に対応する個々の架橋組成物からのインビトロ mAb 放出の経時的プロットである。

【図 15 D】図 15 D は、図 14 A にプロットした平均値に対応する個々の架橋組成物からのインビトロ mAb 放出の経時的プロットである。

【図 15 E】図 15 E は、図 14 A にプロットした平均値に対応する個々の架橋組成物からのインビトロ mAb 放出の経時的プロットである。

10

20

30

40

50

【図16A】図16Aは、図12Bにプロットした平均値に対応する個々の架橋組成物からのインピトロmAb放出の経時的プロットである。

【図16B】図16Bは、図12Bにプロットした平均値に対応する個々の架橋組成物からのインピトロmAb放出の経時的プロットである。

【図16C】図16Cは、図12Bにプロットした平均値に対応する個々の架橋組成物からのインピトロmAb放出の経時的プロットである。

【図16D】図16Dは、図12Bにプロットした平均値に対応する個々の架橋組成物からのインピトロmAb放出の経時的プロットである。

【図16E】図16Eは、図12Bにプロットした平均値に対応する個々の架橋組成物からのインピトロmAb放出の経時的プロットである。

【図17A】図17Aは、開示されている主題に従う各種架橋組成物からの追加のインピトロ経時的mAb放出を表す。

【図17B】図17Bは、開示されている主題に従う各種架橋組成物からの追加のインピトロ経時的mAb放出を表す。

【図17C】図17Cは、開示されている主題に従う各種架橋組成物からの追加のインピトロ経時的mAb放出を表す。

【図18A】図18Aは、開示されている主題に従う各種架橋組成物についての膨潤比の経時的プロットを表す。

【図18B】図18Bは、開示されている主題に従う各種架橋組成物についての膨潤比の経時的プロットを表す。

【図19】図19は、開示されている主題に従う各種架橋組成物の経時的に見える膨潤のデジタル写真である。

【図20】図20は、開示されている主題に従う各種架橋組成物の架橋までの時間のグラフである。

【図21】図21は、開示されている主題に従う各種架橋組成物からのインピトロmAb放出の経時的プロットである。

【図22】図22は、開示されている主題に従う架橋組成物の投与後または非製剤化抗体の投与後のmAbの血清濃度のプロットである。

【図23A】図23Aは、それぞれ図22に表した治療群B、C、D及びEについての平均血清濃度の経時的プロットである。

【図23B】図23Bは、それぞれ図22に表した治療群B、C、D及びEについての平均血清濃度の経時的プロットである。

【図23C】図23Cは、それぞれ図22に表した治療群B、C、D及びEについての平均血清濃度の経時的プロットである。

【図23D】図23Dは、それぞれ図22に表した治療群B、C、D及びEについての平均血清濃度の経時的プロットである。

【図23E】図23Eは、それぞれ図22に表した治療群B、C、D及びEについての平均血清濃度の経時的プロットである。

【図24A】図24Aは、それぞれ図22に表した治療群A～Eについての個別の動物についての血清濃度の経時的プロットである。

【図24B】図24Bは、それぞれ図22に表した治療群A～Eについての個別の動物についての血清濃度の経時的プロットである。

【図24C】図24Cは、それぞれ図22に表した治療群A～Eについての個別の動物についての血清濃度の経時的プロットである。

【図24D】図24Dは、それぞれ図22に表した治療群A～Eについての個別の動物についての血清濃度の経時的プロットである。

【図24E】図24Eは、それぞれ図22に表した治療群A～Eについての個別の動物についての血清濃度の経時的プロットである。

【図25】図25は、開示されている主題に従う架橋組成物の投与後または非製剤化抗体の投与後のmAbの血清濃度のプロットである。

10

20

30

40

50

【図26A】図26Aは、それぞれ図24に表した治療群D及びEについての血清濃度の経時的プロットである。

【図26B】図26Bは、それぞれ図24に表した治療群D及びEについての血清濃度の経時的プロットである。

【図27A】図27Aは、それぞれ図25に表した治療群A、D及びEの個別の動物についての血清濃度の経時的プロットである。

【図27B】図27Bは、それぞれ図25に表した治療群A、D及びEの個別の動物についての血清濃度の経時的プロットである。

【図27C】図27Cは、それぞれ図25に表した治療群A、D及びEの個別の動物についての血清濃度の経時的プロットである。

【図28】図28は、別々の実験からの選択治療群についての血清及び滑液暴露の経時的プロットである。

【図29】図29は、開示されている主題に従う架橋組成物からインピトロで放出されたmAbについてのサイズ排除クロマトグラフィーデータである。

【図30】図30は、開示されている主題に従う架橋組成物からのmAb放出の経時的プロットである。

【図31】図31は、投与したmAbの初期濃度に正規化した開示されている主題に従う架橋組成物からのmAb放出のプロットである。

【図32】図32は、開示されている主題に従う架橋組成物からのmAb放出の経時的プロットである。

【図33】図33は、開示されている主題に従う架橋組成物から放出された抗MMP-mAbに対するサイズ排除クロマトグラフィー結果を図示する。

【発明を実施するための形態】

【0009】

開示されている主題の実施形態を詳細に説明する。方法及びキットは開示されている主題の製剤の具体的実施形態の詳細説明に関連して記載する。

【0010】

非限定的に説明し、例示する目的で、開示されている主題の製剤及び対応する方法の例示的実施形態を図1に模式的に図示する。図示されているように、本明細書中に具体化されている製剤は架橋性ポリマー（すなわち、ポリマー間重合することができる親水性ポリマー鎖）及び生物学的治療薬を含む。架橋されると、親水性ポリマー鎖は三次元ネットワークを形成し、この中に生物学的治療薬は可逆的に沈殿している。生物学的治療薬は、架橋されたポリマーネットワークが膨潤し、分解して、生物学的治療薬が放出されるまでこのネットワーク中に効果的に捕捉されている。予期せぬことに、生物学的治療薬が架橋組成物中にデリバリーされている開示されている主題の製剤では、ポリマーネットワークから放出後生物学的治療薬は復元され、復元された生物学的治療薬はその治療有効性を保持していることが知見された。更に、開示されている主題の製剤が生物学的治療薬の非常に望ましい放出プロフィールを与えることができ、制御的三相放出を30～90日間与えることができる事が驚くことに知見された。

【0011】

開示されている主題の1つの態様によれば、体内のスペースからの生物学的治療薬の制御的放出を与える製剤が提供される。この製剤は生物学的治療薬及びポリマー間架橋することができる複数の親水性ポリマー鎖を含む。前記製剤及び関連するキットは更に活性化バッファー、懸濁バッファー及びデリバリーデバイスを含み得る。以下、これらについて順次記載する。

【0012】

I. 製剤

### 1. 生物学的治療薬

本明細書中に開示されている主題によれば、広範囲の生物学的治療薬が使用され得る。非限定的に例示する目的で、生物学的治療薬には核酸及びタンパク質が含まれる。適当な

10

20

30

40

50

核酸の例には s i R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び D N A プラスミドが含まれ、例示的な適当なタンパク質には成長因子、酵素、サイトカイン、ペプチドホルモン、サイトカイントラップ及び抗体が含まれる。

【 0 0 1 3 】

本明細書に記載されている主題で使用するための適当な成長因子には、非限定的にインスリン様成長因子（例えば、 I G F - 1 及び I G F - 2 ）、神経成長因子、血管内皮細胞成長因子（例えば、 V E G F A 、 V E G F B 、 V E G F C 、 V E G F D 、 P I G F 及びそのアイソマー）、血小板由来成長因子、顆粒球コロニー刺激因子、脳由来神経栄養成長因子、トランスフォーミング成長因子（例えば、 T G F - 1 及び T G F - 2 ）、エリスロポエチン及びアンジオポエチンが含まれる。適当なペプチドホルモンには、非限定的にインスリン、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド 1 、グルカゴン様ペプチド 2 、副腎皮質刺激ホルモン、ヒト総毛性ゴナドトロピン、キスペプチン、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、レブチン、コレシストキニン、グレリン、抗利尿ホルモン、オキシトシン、アンギオテンシン及びアンギオテンシン I I が含まれる。

【 0 0 1 4 】

非限定的に例示する目的で、以後主に抗体について言及する。例えば哺乳動物、ヒト化、キメラ及び完全ヒト抗体を含めた全ての抗体が開示されている製剤、並びに対応する方法及びキットにおいて使用するのに適している。適当な抗体の非限定例には、抗腫瘍壞死因子（ T N F ）抗体、抗インターロイキン - 1 3 抗体、抗血管内皮細胞成長（ V E G F ）抗体、抗マトリックスマタロプロテアーゼ 1 3 抗体及び抗 I L - 1 抗体が含まれる。二重可変ドメイン抗体も開示されている主題で使用するのに適している。適当な抗 T N F 抗体にはアダリムマブが含まれるが、これに限定されない。適当な抗 I L - 1 3 抗体には A B T - 3 0 8 が含まれるが、これに限定されない。本明細書に開示されている主題で使用するのに適している具体的な抗体にはトラスツズマブ（ハーセプチン（ T M ））、ベバシズマブ（アバスチン（ T M ））、アダリムマブ（ヒュミラ（ T M ））、ラニビズマブ（ルセンティス（ T M ））、アフリバーセプト（アイリーア（ T M ））、エタネルセプト（エンブレル（ T M ））、リツキシマブ（リツキサン（ T M ））、ペグフィルグラスチム（ニューラスター（ T M ））、インターフェロン - 1 a （アボネックス（ T M ））、インターフェロン - 1 a （レビフ（ T M ））及びインフリキシマブ（レミケード（ T M ））が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 1 5 】

開示されている主題の 1 つの態様によれば、驚くことに、本明細書中に開示されている製剤、並びに対応するキット及び方法での使用と併せてペプチド生物学的治療薬（例えば、抗体及び他のタンパク質）が可逆的沈殿を受けることが知見された。高濃度の 1 つの親水性ポリマーのポリエチレングリコール（以後、“ P E G ”）がタンパク質を沈殿させることは立証されているが、開示されている製剤のペプチド生物学的治療薬は予期せぬことに再可溶化後その構造及び機能を保持することが本発明において立証された。こうした構造及び機能の保存により、第 3 級及び第 4 級タンパク質構造は分解することなく非常に望ましい長期間放出が可能となる。抗体を開示されている主題の生物学的治療薬として使用する場合、生物学的治療薬の抗原結合は保存され、生物学的治療薬の放出が 1 ~ 9 0 日間持続される。

【 0 0 1 6 】

開示されている主題の別の態様によれば、開示されている主題のある実施形態では生物学的治療薬は直径約 1 0 0 n m ~ 約 1 μ m の沈殿物を形成することが判明した。直径が 2 5 n m ~ 約 1 0 μ m の範囲の沈殿物は下記に示すように望ましい薬物動態性能に関連している。

【 0 0 1 7 】

2 . 親水性ポリマー

開示されている主題の別の態様によれば、その各々がポリマー鎖間重合することができる、すなわち他の親水性ポリマー鎖と架橋することができる複数の親水性ポリマー鎖を用

10

20

30

40

50

意する。ある実施形態では、親水性ポリマー鎖は他の親水性ポリマー鎖上にある官能基と架橋することができる官能基を含む。

【0018】

ポリマー間重合することができる親水性ポリマー鎖には、非限定的にポリエチレングリコール(PEG)、ヒアルロン酸、デキストラン、ペクチン、コラーゲン、フィブリノーゲン、アルギメント、PLLA-PEG-PLLAコポリマー、PLDA-PEG-PLDAコポリマー、PLGA-PEG-PLGAコポリマー、PEG-PLLAコポリマー、PEG-PLDAコポリマー及びPEG-PLGAコポリマーが含まれる。適当な官能基には、非限定的にチオール、ビニル、アミノ、アルデヒド、ビニルスルホン、スクシンイミジル、ヒドロキシスクシンイミジル、ニトロフェノラート及びカルボヒドラジド部分が含まれる。

10

【0019】

非限定的に例示する目的で、以後複数のPEGポリマー鎖を含む製剤、並びに関連する方法及びキットについて言及する。PEGは( $OCH_2CH_2$ )サブユニットの反復構造を有する合成ポリマーである。加えて、開示されている主題で使用するのに適しているPEGポリマー鎖はポリマー鎖間重合することができる少なくとも1つの官能基を含み得る。従って、開示されている主題の適当なPEGポリマー鎖には、非限定的にPEG-チオール、PEG-ビニル、PEG-アミノ、PEG-アルデヒド、PEG-ビニルスルホン、PEG-スクシンイミジル、PEG-ヒドロキシスクシンイミジル、PEG-ニトロフェノラート及びPEG-カルボヒドラジドポリマーが含まれる。例示のみの目的で、親水性ポリマー鎖は2~30キロダルトンの分子量を有するポリエチレングリコール分子であり得る。

20

【0020】

加えて、開示されている製剤で使用するのに適しているPEGポリマー鎖はポリマー間重合前に1ポリマー鎖分子あたり2個以上の官能基を含み得る。本明細書では、前記PEGポリマー鎖を「多官能性」と称する。開示されている製剤で使用するのに適しているPEGポリマーには、非限定的に線状PEG、2アームPEG、3アームPEG、4アームPEG、6アームPEG、8アームPEG及び16アームPEGが含まれる。多官能性PEGポリマー鎖は各種の異なる構造配置で入手可能である。開示されている製剤のポリマーのために適している構造の例には線状、分岐状、星形及び輪形配置が含まれるが、これらに限定されない。開示されている主題の幾つかの実施形態では、親水性ポリマー鎖の各アームは図1に描かれている官能基を含む。開示されている主題に従う幾つかの実施形態では、多官能性PEGポリマー鎖上にある官能基のすべてが同一の官能基から構成されている。

30

【0021】

本明細書中に開示されている主題の幾つかの実施形態によれば、複数の親水性ポリマー鎖は2つ以上のタイプのPEGポリマーからなる。本明細書中に開示されているように、PEGポリマーのタイプは同一数のアーム(例えば、4本のアーム、8本のアームまたは16本のアーム)及び同一の官能基(例えば、チオールまたはアクリレート)を有する複数のPEGポリマー鎖を指す。開示されている主題によれば、複数の親水性ポリマー鎖は少なくとも2つのタイプのPEGポリマーからなり得、2つのタイプの官能基の合計(すなわち、 $m + n$ の合計であり、 $m$ は第1タイプのPEGポリマー上に存在する官能基の数を表し、 $n$ は第2タイプのPEGポリマー上に存在する官能基の数を表す)は2~32(すなわち、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、または32)である。

40

【0022】

幾つかの実施形態では、複数の親水性ポリマー鎖は2タイプのPEGポリマーからなる。幾つかの実施形態では、第1タイプのPEGポリマーは4本のアームを有するPEGアクリレートであり、第2タイプのPEGポリマーは4本のアームを有するPEGチオール

50

である。更なる実施形態では、第1タイプのPEGポリマーは8本のアームを有するPEGアクリレートであり、第2タイプのPEGポリマーは8本のアームを有するPEGチオールである。更なる実施形態では、第1タイプのPEGポリマーは16本のアームを有するPEGアクリレートであり、第2タイプのPEGポリマーは16本のアームを有するPEGチオールである。これらのタイプは1:1の比で用意され得る。しかしながら、開示されている主題に従う追加の実施形態では、第1タイプのPEGポリマー:第2タイプのPEGポリマーの比は約1:10~約10:1である。

#### 【0023】

更なる実施形態では、複数のPEGポリマー鎖は4タイプのPEGポリマーからなり得る。幾つかの実施形態では、第1及び第2タイプのPEGポリマーは同一数の官能基を有し、第3及び第4タイプのPEGポリマーも同一数の官能基を有しているが、その数は第1及び第2タイプのPEGポリマー上の官能基の数が第3及び第4タイプのPEGポリマー上の官能基の数と異なる更なる実施形態では、第1及び第2タイプのPEGポリマー:第3及び第4タイプのPEGポリマーの比は調節され得る。非限定的に例示する目的で、第1及び第2タイプのポリマー:第3及び第4タイプのポリマーの比は50:50、25:75、または75:25であり得る。以下に記載されているように、存在するポリマー鎖のタイプの比を調節することにより製剤の制御的放出特性を変更することができる。

#### 【0024】

開示されている主題の1つの態様によれば、予期せぬことに、親水性ポリマー鎖上のある官能基が可逆的沈殿後の再可溶化時の生物学的治療薬の構造及び機能の改善された保存に関連していることが分かった。官能基は生物学的治療薬の溶媒暴露残基及び生物学的治療薬に対する翻訳後修飾に基づいて選択され得る。非限定的に例示する目的で、以下に記載する所望の制御的放出特性及び特定の生物学的治療薬との最低相互作用に関連するチオール官能基及びアクリレート官能基について言及する。

#### 【0025】

開示されている主題の幾つかの実施形態では、生物学的治療薬:親水性ポリマーの重量比は約1:1~1:125である。ある好ましい実施形態では、生物学的治療薬:親水性ポリマーの重量比は1:3.75~1:25である。下記するように、予期せぬことにこの重量比が所望の制御的放出プロフィールに従って調節され得ることが立証された。

#### 【0026】

##### 3. 懸濁バッファー

開示されている主題の幾つかの実施形態では、生物学的治療薬及び複数の親水性ポリマー鎖を懸濁バッファー溶液中に用意し得る。懸濁バッファー溶液は約3.5~約6のpHを有し得、非限定的にヒスチジン、クエン酸及び/またはリン酸からなり得る。追加の候補バッファーにはコハク酸、酢酸、トリス及び炭酸が含まれる。幾つかの例示的実施形態では、懸濁バッファーはpH5.2の1.5mMヒスチジン、またはpH3.5の0.05Mクエン酸-リン酸バッファーからなり得る。0.05M~3Mのバッファーモル濃度が開示されている主題の各種実施形態で使用するに適している。懸濁バッファーは、ポリマー間重合までポリマー及び生物学的治療薬を懸濁させ、保存する。或いは、幾つかの実施形態では、親水性ポリマー鎖、生物学的治療薬、または親水性ポリマー鎖と生物学的治療薬の両方を凍結乾燥形態で用意してもよい。

#### 【0027】

##### 4. 懸濁バッファー添加剤

開示されている主題に従うある実施形態では、1つ以上の添加剤を含み得る懸濁バッファーを用意する。非限定的例として、添加剤には塩、糖、ポリオール、アミノ酸、保存剤及び/または追加の化合物が含まれ得る。懸濁バッファーと共に使用するための塩には、非限定的に塩化ナトリウム、塩化カルシウム及び塩化マグネシウムが含まれる。懸濁バッファーと共に使用するための糖には、非限定的にスクロース、トレハロース、マンノース及びデキストロースが含まれる。懸濁バッファーと共に使用するためのポリオールには、

10

20

30

40

50

非限定的にソルビトール、マンニトール及びグリセロールが含まれる。懸濁バッファーと共に使用するための候補アミノ酸には、ヒスチジン、アルギニン、グリシン、メチオニン、プロリン、リシン、グルタミン酸、アラニン及びアルギニン混合物が含まれる。ある実施形態では、アルブミン及び組換えアルブミンも懸濁バッファーと共に使用され得る。開示されている主題の懸濁バッファー中に使用するための適当な保存剤には、非限定的にm-クレゾール、ベンジルアルコール及びフェノールが含まれる。トウイーン80及びトウイーン20のような保存剤、及びSDS、Brrij-35及びトリトンX-10のような界面活性剤も使用し得る。デキストランのような多糖、EDTAのようなキレート剤、ブルロニックF-68及びF-127のようなポロキサマー、ポリビニルピロリドン、アルキルサッカライド及びセルロース系も開示されている主題の懸濁バッファー中に使用され得る。加えて、低分子量PEG、すなわち4000未満の分子量を有するPEGも懸濁バッファー添加剤として使用され得る。

【0028】

### 5. 活性化バッファー

開示されている主題の幾つかの実施形態では、活性化バッファーも用意する。本明細書中で言及されているように、活性化バッファーは複数の親水性ポリマー鎖のポリマー間重合を触媒する溶液である。非限定的に例示する目的で、活性化バッファーは炭酸バッファーまたはリン酸バッファーであり得る。幾つかの実施形態では、活性化バッファーは7~10.5のpHを有している。

【0029】

開示されている主題の1つの態様によれば、親水性ポリマー鎖のポリマー間重合、すなわち架橋は1つの親水性ポリマー鎖上にある官能基と別の親水性ポリマー鎖上にある官能基の間で起こる。異なる官能基を有する2つ以上のタイプの親水性ポリマー鎖を用意し、1つの官能基が求電子性であり、別の官能基が求核性である幾つかの実施形態では、架橋は当業者に公知のマイケル付加反応を介して起こり得る。例えば、基本活性化溶液中でチオールで官能化されているポリマー鎖及びアクリレートで官能化されているポリマーを混合すると、求核性チオール基の脱プロトン化、次いで求電子性アクリレート部分への電子の供給が生じて、ポリマー間チオエーテルエステル結合が形成される。別の適当なPEG架橋反応は、全文を参照により本明細書に組み入れる米国特許No.7,732,190及び米国特許出願公開No.2009/0226519に開示されている。

【0030】

開示されている主題の別の態様によれば、以下に記載されているように、活性化バッファーは製剤の制御放出特性を最適化し、再可溶化したとき生物学的治療薬の機能の保存を最適化するように選択され得る。驚くことに、活性化バッファーのpHは生物学的治療薬の溶媒露出残基及び親水性ポリマー鎖上に存在する官能基の架橋を最小限とするように選択され得ることが立証された。特に、生物学的治療薬の等電点(以下、“pI”)よりも僅かに高いpHを有するバッファーを選択することにより、生物学的治療薬の構造及び機能は親水性ポリマー鎖及び生物学的治療薬をポリマー間重合を触媒するための活性化バッファーと混合している間保存される。

【0031】

幾つかの実施形態では、求核性官能基で官能化したPEGポリマー鎖の部分集合は当業者に公知のマイケルタイプ反応により求電子性官能基で官能化したPEGポリマー鎖の別の部分集合と共有結合を形成する。適当な求核性官能基には、非限定的にチオール、アミノ、ヒドロキシ及びCO-NH-NH<sub>2</sub>基が含まれる。適当な求電子性官能基には、非限定的にアクリレート、ビニルスルホン及びN-ヒドロキシスルホン酸基が含まれる。基本活性化バッファーは求核性官能基を脱プロトン化してマイケルタイプ付加反応を促進させることによりポリマー間重合を触媒し得る。

【0032】

開示されている主題の幾つかの実施形態では、PEGポリマー鎖：活性化バッファーの%重量/容量比は活性化バッファー溶液の5容量%~30容量%である。下記するように

10

20

30

40

50

、予期せぬことに、この重量 / 容量比は所望する制御的放出プロフィールに従って調節され得ることが立証された。

【 0 0 3 3 】

I I . 架橋組成物

開示されている主題の別の態様によれば、生物学的治療薬及び親水性ポリマー鎖を組合せ、親水性ポリマー鎖を架橋して上で検討した所望の放出特性を有する架橋組成物を形成する。開示されている主題の 1 つの態様によれば、製剤を親水性ポリマー鎖のポリマー間重合（すなわち、架橋）を触媒するための活性化バッファーの存在下で混合し、これにより間質空間中に生物学的治療薬を含有している架橋組成物が形成される。

【 0 0 3 4 】

開示されている主題の 1 つの非限定的態様によれば、開示されている主題の架橋組成物をデリバリーするために 3 つの基本ステップを実施する。生物学的治療薬を親水性ポリマー鎖と組合せ、親水性ポリマー鎖を（例えば、活性化バッファーと混合することにより）架橋し、架橋組成物を体内のスペースにデリバリーする。幾つかの実施形態では、生物学的治療薬及び親水性ポリマー鎖を溶液中に用意することができる。或いは、体内のスペースにデリバリーする前に再懸濁するためにこれらを凍結乾燥形態で用意してもよい。幾つかの実施形態では、体内のスペースに投与する少し前に生物学的治療薬及び親水性ポリマー鎖を活性化バッファーと混合して、親水性ポリマー鎖を架橋してもよい。或いは、デリバリー前に混合を実施し得、デリバリー前に再懸濁するために生じた生物学的治療薬を含む架橋組成物を粉碎し、凍結乾燥し得る。この後者の実施形態の架橋組成物を「プレミックスした」と称する。プレミックスした製剤の非限定的略図を図 2 に示す。

【 0 0 3 5 】

開示されている主題の幾つかの実施形態では、生物学的治療薬及び親水性ポリマー鎖を含む製剤を溶液中に用意する。製剤溶液をポリマー間重合を触媒するための基本活性化バッファーと混合する。幾つかの実施形態では、求核性官能基で官能化した P E G ポリマー鎖の部分集合を当業者に公知のマイケルタイプ反応により求電子性官能基で官能化した P E G ポリマー鎖の別の部分集合と共有結合を形成する。適当な求核性官能基には、非限定的にチオール、アミノ、ヒドロキシ及び C O - N H - N H <sub>2</sub> 基が含まれる。適当な求電子性官能基には、非限定的にアクリレート、ビニルスルホン及び N - ヒドロキシスクシンイミド基が含まれる。基本活性化バッファーは、求核性官能基を脱プロトン化してマイケルタイプ付加反応を促進させることによりポリマー鎖架橋を触媒し得る。

【 0 0 3 6 】

開示されている主題の幾つかの実施形態によれば、ポリマー鎖架橋をエキソビボで開始し、インビボで、すなわち製剤をデリバリーした体内のスペース中で完了するまで進行させる。ポリマー間重合（架橋）を開始後、混合物を体内のスペースに投与し、ここで架橋反応が完了して架橋組成物を形成する。追加の実施形態では、なお注射器で押し出し可能な少しばかり架橋した P E G を形成し、その後生物学的治療薬と混合し得る。次いで、第 2 の活性化バッファーと混合することにより更なる架橋を達成し得る。このような混合により、生物学的治療薬と P E G ポリマー鎖上の官能基と基本活性化バッファー間の接触時間を最小限として、より多くの生物学的治療薬を充填することができ、また生物学的治療薬の活性の保存を強化することができる。

【 0 0 3 7 】

開示されている主題の幾つかの態様によれば、溶液中の製剤を注射器混合により活性化バッファーと混合する。この点で、驚くことに、ある非限定的実施形態では特定程度の注射器混合が所望の沈殿物サイズ及び放出プロフィールに関連していることが立証された。例えば、図 6 に図示されているように、幾つかの実施形態では、約 3 秒間～約 10 秒間に通常不变のプランジャーストローク（例えば、約 5 ～ 15 回プランジャーストローク）を用いる注射器混合により、所望の沈殿物サイズ及び均一性が生じ、例えば 30 回以上のプランジャーストロークによりより長時間混合すると大きな粘着性の沈殿物及び生物学的治療薬の損失を伴う。雌・雌ルアフィッティングを接続した 1 m 1 ベクトン・ディッキン

10

20

30

40

50

ソン注射器を含めた各種の適當な注射器を混合のために使用し得る。ほぼ等しい全剪断力及び製剤に対する剪断力の暴露期間を与える混合方法により同様の結果が得られる。幾つかの実施形態では、50 nm ~ 10 μm の範囲の直径を有する生物学的治療薬の沈殿物が上記した所望の再可溶化及び放出プロフィールに関連している。幾つかの実施形態では、最高 250 μm の生物学的治療薬の沈殿物が提供される。幾つかの実施形態では、混合は製剤及び活性化バッファーの混合物を渦流混合または反復反転により実施する。

【0038】

開示されている主題の別の態様によれば、多数の親水性ポリマー鎖を生物学的治療薬の存在下でポリマー間重合すると架橋組成物が形成する。開示されている主題によれば、架橋後架橋組成物の特性を最適化するように複数の親水性ポリマーを選択し得る。架橋組成物の架橋密度は、例えばポリマー鎖の分子量、ゲル化反応の時間（すなわち「ゲル化時間」）、PEG アームの数、PEG ポリマー鎖上に存在する官能基及びポリマー間架橋前の溶液中のPEG 固体の濃度により影響される。懸濁バッファーのpH、懸濁バッファー添加剤、及びポリマー間架橋を触媒するために使用される活性化バッファーもゲル化時間、架橋密度、及び生じる生物学的治療薬の沈殿物サイズに影響を与える。通常、架橋密度は、ポリマーのより低い分子量、親水性ポリマー鎖あたりのPEG アームの高い割合、溶液中のPEG 固体のより高い濃度、及び活性化バッファーのより高いpH に応じて増加する。架橋組成物の架橋密度は生物学的治療薬に関するその放出プロフィールの決定因子である。

【0039】

例えば、図3A 及び図3B に図示されているように、4アームPEG : 8アームPEG の比を変更し、製剤のPEG 固体の重量 / 容量比を変えると、架橋組成物の制御的放出プロフィールが変化する。示されているように、各架橋組成物は所望の制御的放出及び期間を与えるが、その放出は生物学的治療薬、適応、デリバリーの場所及び他の考慮すべき要件に従って最適化され得る。加えて、実施例13で検討し、図5に図示されているように、親水性ポリマーの重量%、生物学的治療薬 : 親水性ポリマーの重量比、生物学的治療薬の沈殿物のサイズは架橋製剤の放出プロフィールに対する付随する影響で調節される。

【0040】

驚くことに、PEG の存在下でタンパク質が沈殿している間またはその後にPEG ポリマー鎖を架橋組成物ネットワークに架橋することにより、タンパク質はPEG ポリマー鎖の官能基との共有相互作用から保護され、その生物学的活性は再可溶化後維持されることが知見された。更に、架橋触媒作用のために活性化バッファーを用意することにより、PEG ポリマー鎖間で比較的迅速な架橋が達成され、それにより例えばアミン基のようなタンパク質の反応性溶媒暴露残基が例えばアクリレート基のようなPEG ポリマーの架橋官能基と反応する機会が最小限となる。加えて、PEG ポリマー鎖の架橋官能基はタンパク質の溶媒暴露残基の共有修飾を最小限とするように選択され得る。例えば、タンパク質がジスルフィド結合に関与しないシステイン残基の量が高いことにより特徴づけられている場合、生物学的治療薬とPEG ポリマー鎖間のジスルフィド結合の形成を最小限とするためにはアミン基のような架橋官能基を有するPEG ポリマー鎖がチオール基のような架橋官能基を有するPEG ポリマー鎖より好ましいことがある。

【0041】

親水性ポリマー鎖を架橋した後、生じた架橋組成物は水を吸収する。架橋組成物が水を吸収するので、架橋組成物はその容量が増加するにつれて膨潤する。架橋組成物の容量が増加すると、沈殿した生物学的治療薬は再可溶化し、ポリマーマトリックスから拡散する。加えて、水は架橋組成物の成分ポリマー間のチオエーテルエステル結合を加水分解して、生物学的治療薬を更に放出させる。更に、生物学的治療薬は平衡水摂取量を減少させ、それにより架橋組成物は大きな膨潤から妨げられる。形成された架橋組成物は相互貫入または半相互貫入ネットワーク構造を有し得る。

【0042】

架橋組成物の放出プロフィールに加えて、組成物の追加パラメーターは関節内スペース

10

20

30

40

50

のような体内のスペースへのデリバリーの適合性に対して最適化され得る。例えば、架橋組成物の粘弾性及び弾性係数が患者の快適さを最大限とするように考慮され得る。インビボでの膨潤比に依存する架橋組成物の最終的最大容量は体内のスペースにデリバリーされ得る製剤の全量を制限する。加えて、形成されるポリマー組成物が親水性ポリマー鎖から構成されているので、インビボで再吸収され得、架橋組成物を体内の同ースペースに反復投与することができる。

【0043】

図4Aは、架橋組成物の膨潤と生物学的治療薬放出の関係を図示している。平行プロットから、生物学的治療薬の膨潤及び放出が平行して起こることが明らかである。加えて、図4Bは各種架橋組成物のインビトロでの目に見える溶解までの時間を示している。検討しているように、複数の変数が架橋組成物の所望の溶解速度を達成するように調節され得る。

10

【0044】

2. 生物学的治療薬沈殿物のサイズ及び均質性

本明細書中に開示されている主題によれば、生物学的治療薬と親水性ポリマーの製剤は架橋された親水性ポリマーマトリックス内に生物学的治療薬の沈殿物を生じる。驚くことに、これらの沈殿物はポリマーマトリックスから拡散され、再可溶化された後その構造及び機能を保持している。使用する具体的な製剤に基づいて、混合の力及び期間、選択する生物学的治療薬、懸濁バッファー及び活性化バッファーのpH及び他の変数に基づいて、沈殿物のサイズは変わる。例えば、図5に図示するように、PEG固体の量及び生物学的治療薬の濃度が高くなると沈殿物サイズは大きくなる。25%以上のPEG固体では、生物学的治療薬の沈降も観察される。

20

【0045】

更に、図6A～Dに示すように、混合の程度は生ずる生物学的治療薬の沈殿物のサイズにも影響を与える。図示されているように、5～15回のプランジャーストロークによる混合はより小さい沈殿物が生じ、30回のプランジャーストロークでの混合はより大きく、より粘着性の沈殿物を生ずる。幾つかの実施形態では50nm～10μmの沈殿物サイズが好ましく、最高250μmの沈殿物サイズが形成され得る。沈殿物サイズの選択は主にその適応、その効力及びその薬物動態を含めた生物学的治療薬に依存している。より大きな沈殿物は通常、より小さく且つより均一な沈殿物に比して局所及びそれほどではないが全身濃度での山及び谷に関連している。

30

【0046】

更に図6A～Dに図示されているように、沈殿物の均質性は混合の程度及び親水性ポリマー鎖の組成によっても影響され得る。図6B(10%PEG固体)及び図6D(20%PEG固体)に示すように4アームPEGよりも架橋された親水性ポリマー鎖のより密なネットワークを形成する8アームPEGは、通常図6A(10%PEG固体)及び図6C(20%PEG固体)に示す4アームPEGよりも高度の沈殿物サイズの均質性及び分布に関連している。

【0047】

例示する目的で、図7は製剤を用いて、以下の実施例4に記載するプロトコルに従って達成され得る沈殿物サイズを示す。沈殿物サイズは、ナノサイトのナノ粒子トラッキング解析バージョン2.2Build 0366を用いて測定した。約50nm～約400nmの直径を有する生物学的治療薬の沈殿物が生ずる。図示されているように、沈殿物のサイズは通常ガウス分布を示す。更なる実施形態では、約50nm～約10μmの直径を有する生物学的治療薬の沈殿物が生ずる。更に別の実施形態では、約10μm～約250μmの直径を有する生物学的治療薬の沈殿物が生ずる。

40

【0048】

I II I . 架橋組成物の使用

1. 制御的放出

開示されている主題の架橋組成物は、頭部及び臓器の洞腔、長骨の骨髓、胸腔内及び腹

50

腔内スペース、血管の管腔、外分泌管、眼内（例えば、硝子体内）スペース及び関節内スペースを含めた体内の各種スペースにデリバリーするのに適している。非限定的に例示する目的で、以後本明細書中に開示されている主題に従う架橋組成物の体内の関節内スペースまたは眼内スペースへのデリバリーについて言及する。滑液の関節内スペースから血漿へのターンオーバーは比較的速い。その結果、可溶性生物学的治療薬の関節内スペースへのデリバリーは、特に比較的長い半減期を有する治療薬の場合関節内濃度を最大限にし且つ全身濃度を最小限とするためには有効でない。この現象を図8A及び図8Bに図示する。示されているように、非製剤化（すなわち、ポリマーマトリックスに被包されていない）モノクローナル抗体を $t_0$ に関節内スペースに注射し、関節内及び全身濃度をモニターする。12時間以内に、抗体の局所（関節内）濃度は血漿内で見られるのとほぼ同一濃度まで2桁ずつ低下したが、全身暴露はコントロールされない。硝子体内流体ターンオーバーも非常に高く、更に薬物の眼への全身デリバリーを阻止する血液眼関門により眼は全身循環から分離されている。

#### 【0049】

対照的に、開示されている主題の1つの態様によれば、本明細書中に開示されている製剤は生物学的治療薬の局所デリバリーの点で非常に有利である放出プロフィールを示す。非限定的に例示する目的で、前記放出プロフィールは、「バースト」、すなわち架橋組成物の体内のスペースへの投与により24時間以内にデリバリーされた全生物学的治療薬の一部分が比較的即時に放出されることにより特徴づけられ得る。「バースト効果」は図9Aに図示されており、この図は生物学的治療薬の短期間放出がコントロールされていることを図示している。この減少したバースト効果は全身暴露を低下させる。特定実施形態の放出プロフィールは更に、投与された全生物学的治療薬の大部分が投与の最初の7日間以内に放出される初期放出により特徴づけられ得る。更なる実施形態では、放出プロフィールは生物学的治療薬の架橋組成物マトリックスから体内のスペースへの長期間放出により特徴づけられ得る。

#### 【0050】

開示されている主題の追加実施形態では、放出プロフィールは約0～30日間の第1期間の間の第1放出率、0～30日間の第2期間の間の第2放出率及び約0～30日間の第3期間の間の第3放出率の三相である。幾つかの好ましい実施形態では、三相放出プロフィールの少なくとも1つの相はほぼ直線、すなわちゼロ次放出カイネティックスを示す。すなわち、生物学的治療薬の放出率は相の期間にわたってほぼ同一である。開示されている主題の態様に従う三相放出プロフィールを図9Bに図示する。示されているように、三相放出プロフィールは30～90日間にわたって生物学的治療薬の安定した長期間放出を与える。以下に検討するように、前記放出プロフィールにより、非製剤化生物学的治療薬の投与に比して生物学的治療薬のより高い局所濃度及び低い全身濃度が生ずる。記載されている放出プロフィールを与える例示的製剤の非限定的リストを表1に示し、この表には本明細書中に開示されている架橋されている成分の各種成分についての仕様が記載されている。幾つかの非限定実施形態では、表2に従う薬物動態結果が達成される。

#### 【0051】

本明細書中に開示されている「バースト効果」は架橋組成物を投与してから最初の24時間以内に一部分の生物学的治療薬が架橋組成物から体内のスペースに放出されることを指す。非限定的に例示する目的で、バースト効果はデリバリーされた全生物学的治療薬の約0.1%～デリバリーされた全生物学的治療薬の約30%の放出に相当し得る。幾つかの実施形態では、バースト効果はデリバリーされた全生物学的治療薬の約1%～約10%である。更なる実施形態では、バースト効果は約10%～約20%である。もっと更なる実施形態では、バースト効果は20%～30%である。本明細書中に開示されている用語「初期累積放出」は、最初の24時間にわたり放出された部分を含めて、投与から最初の7日以内に一部分の生物学的治療薬が架橋組成物から体内のスペースに放出されることを指す。幾つかの実施形態では、初期放出はデリバリーされた全生物学的治療薬の10%に相当し得る。追加の実施形態では、初期放出はデリバリーされた全生物学的治療薬の10

10

20

30

40

50

～20%に相当する。幾つかの実施形態では、初期放出は20～30%である。もっと異なる実施形態では、初期放出は約30～40%である。本明細書中に開示されている「三相放出プロフィール」は生物学的治療薬の放出プロフィール、すなわち一定期間の3つの識別できる放出率で一部分の生物学的治療薬が架橋組成物から経時的に放出されたプロットを指す。図9Bは本明細書中に開示されている主題に従う三相放出プロフィールを例示的非限定例を示す。

【0052】

開示されている主題の製剤により与えられる制御的放出により、生物学的治療薬のデリバリーのための著しく改善された薬物動態エンドポイントが生ずる。全放出期間にわたり全及び最大全身暴露が少なくなるのに対して、局所濃度は最大限となり、これにより治療の有効性が最大となり、望ましくない副作用は最小限となる。これらの改善された薬物動態を図10に図示する。示されているように、開示されている主題に従うABT-308を含む製剤をデリバリーした後、生物学的治療薬（モノクローナル抗体）の全身濃度は最小限となるのに対して、関節内濃度は14日間維持される。更に、表3に示すように、滑液中の生物学的治療薬の濃度：生物学的治療薬の濃度の平均比は100以上である。これらの薬物動態エンドポイントは図8Aに図示されている非製剤化抗体に比して非常に有意な改善を表す。

10

【0053】

2. 生物学的治療薬の全身濃度：局所濃度の比

20

本明細書中に開示されている主題の目的は、架橋組成物を関節内スペースにデリバリーしてから約1日～約90日間関節内スペース中の生物学的治療薬の全身濃度：生物学的治療薬の局所濃度の比を1未満とすることである。開示されている主題のある好ましい実施形態では、生物学的治療薬の全身濃度：生物学的治療薬の局所濃度の比は0.1以下である。本発明で言及されている生物学的治療薬の「局所濃度」は生物学的治療薬をデリバリーした体内的スペース内の生物学的治療薬の濃度であり、生物学的治療薬の「全身濃度」はデリバリーした生体中の生物学的治療薬の平衡血清濃度である。

【0054】

生物学的治療薬の局所濃度：生物学的治療薬の全身濃度の比は多くの要因により影響される。開示されている主題の製剤を投与する体内的スペースに従って、その比は血管新生の程度、細静脈または毛細血管の周囲の密度、リンパ管クリアランスの速度及び/または体内的スペースの流体ターンオーバーの速度に依存する。製剤をデリバリーする被験者の相対的大きさ、被験者の活動の相対レベル及び製剤をデリバリーするスペースの容積を含めた追加の要因もこの比に影響を与える。この比は更に生物学的治療薬の半減期により影響される。

30

【0055】

非限定的に例示する目的で、開示されている主題に従う製剤をデリバリーするための体内的適当なスペースには硝子体内スペース、関節内スペース、腹腔内スペース、動脈内スペース、骨内スペース、洞腔または外分泌管が含まれる。非限定的に説明する目的で、開示されている主題に従う製剤を関節内スペースにデリバリーした後の生物学的治療薬の局所濃度：生物学的治療薬の全身濃度の比について言及する。

40

【0056】

組成物を関節内スペースにデリバリーする実施形態に関して、1未満の生物学的治療薬の全身濃度：局所濃度の比は記載されている架橋組成物から生物学的治療薬を比較的ゆっくり、制御して溶離させることにより達成される。架橋組成物から溶離させた後、生物学的治療薬は関節内スペース中に一時的に保持され、ここで標的の抗原、受容体またはリガンドに結合し、または他の方法で相互作用し、または他の方法で所望の局所治療効果を達成し得る。幾つかの好ましい実施形態では、体循環に入る前に大部分の生物学的治療薬は排泄または不活化される。排泄は免疫媒介クリアランス、腎臓濾過、酵素分解または他の手段により起こり得る。

【0057】

50

本明細書中に開示されている主題によれば、製剤を関節内スペースにデリバリーした後に生ずる生物学的治療薬の全身濃度：生物学的治療薬の局所濃度の比は約1～0である。幾つかの好ましい実施形態では、前記比は0.1未満である。幾つかの好ましい実施形態では、前記比は約0.1～約0.001である。他の好ましい実施形態では、この比は約0.2～約0.002である。追加の好ましい実施形態では、この比は約0.5～約0.005である。表3、表4A及び表4Bに示すように、約0.2～約0.01の比は開示されている主題に従うある架橋組成物製剤を関節内にデリバリーすることにより達成される。意義深いことに、この比は、非製剤化生物学的治療薬の投与から生ずる約5～約7の比より約25～500倍低い。類似の結果が表5及び表6に示されている。図10を参照すると、滑液中の生物学的治療薬の濃度は以下の実施例7に記載されているようにモニタリング期間中血清中の生物学的治療薬の濃度より約2桁高い。以下の実施例8で検討するように、局所：血清濃度のこの比は開示されている主題に従う製剤をデリバリーしてから30～90日間維持される。  
10

#### 【0058】

開示されている主題に従う幾つかの実施形態では、1未満の生物学的治療薬の全身濃度：生物学的治療薬の局所濃度の比は架橋組成物を体内のスペースにデリバリーした後約1～約90日間与えられる。幾つかの好ましい実施形態では、1未満の比はデリバリーしてから約1～約7日間与えられる。追加の実施形態では、1未満の比はデリバリーしてから約1～約14日間与えられる。開示されている主題に従う追加の好ましい実施形態では、1未満の比はデリバリーしてから約14～約30日間与えられる。更に別の実施形態では、1未満の比はデリバリーしてから約30～約60日間与えられる。更なる実施形態では、1未満の生物学的治療薬の全身濃度：生物学的治療薬の局所濃度の比は開示されている主題に従う架橋組成物を体内のスペースにデリバリーしてから約60日～約90日間与えられる。追加の好ましい実施形態では、前記比は0.1未満である。  
20

#### 【0059】

##### 3. 治療方法

上記した所望の制御的放出特性及び生じた1未満の生物学的治療薬の全身濃度：局所濃度の比の結果として、開示されている主題の重合（架橋）組成物は疾患の治療において特に有益である。広範囲の疾患が本明細書中に開示されている架橋組成物のデリバリーを含む方法により適切に治療され、疾患の中には非限定的に癌、眼の疾患、炎症、自己免疫疾患、創傷、骨折、感染性疾患または心血管疾患が含まれる。その方法は、生物学的治療薬及び複数の親水性ポリマー鎖を組み合わせて配合物を形成し、配合物を親水性ポリマー鎖のポリマー間重合を誘導するための活性化バッファーと混合して、可逆的に沈殿する生物学的治療薬を含む架橋組成物を形成し、架橋組成物をその必要がある患者に対して投与し、それにより疾患を治療することを含む。  
30

#### 【0060】

開示されている主題に従う幾つかの実施形態では、腫瘍のような限局性癌を治療するための方法が提供される。その方法は、製剤を混合するステップ、製剤を架橋して開示されている架橋組成物を形成するステップ、及び架橋組成物を例えば腫瘍、腫瘍に供給する血管、または腫瘍近くの体内のスペースにデリバリーするステップを含む。更なる実施形態では、生物学的治療薬は血管新生阻害薬、例えば抗VEGF抗体である。  
40

#### 【0061】

幾つかの実施形態では、黄斑変性のような眼の疾患の治療方法が提供される。その方法は、製剤を混合し、製剤を架橋して開示されている架橋組成物を形成し、架橋組成物を例えば眼の硝子体内スペースにデリバリーするステップを含む。更なる実施形態では、生物学的治療薬は血管新生阻害薬、例えば抗VEGF抗体である。追加の非限定的実施形態では、炎症の治療方法が提供される。その方法は、製剤を混合するステップ、製剤を架橋して開示されている架橋組成物を形成するステップ、及び架橋組成物を例えば炎症部位または炎症部位近くの体内のスペースにデリバリーするステップを含む。更なる実施形態では、生物学的治療薬は抗炎症性化合物、例えば炎症性サイトカインに結合し、中和する抗体  
50

である。幾つかの実施形態では、薬物は抗TNF抗体、抗IL-13抗体または抗IL-1抗体である。

#### 【0062】

幾つかの実施形態では、関節リウマチのような自己免疫疾患の治療方法が提供される。その方法は、製剤を混合するステップ、製剤を架橋して開示されている架橋組成物を形成するステップ、及び架橋組成物を例えば冒されている関節の関節内スペースにデリバリーするステップを含む。更なる実施形態では、生物学的治療薬は抗炎症性サイトカインを中和する抗体、例えば抗TNF抗体である。

#### 【0063】

幾つかの実施形態では、変形性関節炎のような関節疾患の治療方法が提供される。その方法は、製剤を混合するステップ、製剤を架橋して開示されている架橋組成物を形成するステップ、及び架橋組成物を例えば冒されている関節の関節内スペースにデリバリーするステップを含む。更なる実施形態では、生物学的治療薬は抗炎症性サイトカインを中和する抗体（例えば、抗TNF抗体）、冒されている関節中の軟膏を分解するプロテアーゼを中和する抗体（例えば、抗マトリックスメタロプロテアーゼ13抗体）である。

10

#### 【0064】

幾つかの実施形態では、創傷の治療方法が提供される。その方法は、製剤を混合するステップ、製剤を架橋して開示されている架橋組成物を形成するステップ、及び架橋組成物を例えば創傷または創傷近くの体内的スペースにデリバリーするステップを含む。更なる実施形態では、生物学的治療薬は創傷治癒を促進し、瘢痕化を阻止し、または感染を予防するタンパク質である。

20

#### 【0065】

幾つかの実施形態では、骨折の治療方法が提供される。その方法は、製剤を混合するステップ、製剤を架橋して開示されている架橋組成物を形成するステップ、及び架橋組成物を例えば骨折した骨、または骨折した骨の近くの体内的スペースにデリバリーするステップを含む。更なる実施形態では、生物学的治療薬は骨折治癒を促進するタンパク質である。

#### 【0066】

幾つかの実施形態では、感染の治療方法が提供される。その方法は、製剤を混合するステップ、製剤を架橋して開示されている架橋組成物を形成するステップ、及び架橋組成物を例えば体の感染部位にデリバリーするステップを含む。感染はウイルス病原体、細菌病原体または真菌病原体により引き起こされ得る。更なる実施形態では、生物学的治療薬はウイルス、細菌または真菌病原体に対する抗体である。

30

#### 【0067】

幾つかの実施形態では、冠動脈疾患のような心血管疾患の治療方法が提供される。その方法は、製剤を混合するステップ、製剤を架橋して開示されている架橋組成物を形成するステップ、及び架橋組成物を例えば体内的スペースにデリバリーするステップを含む。更なる実施形態では、生物学的治療薬は抗凝固剤、抗炎症剤または抗高脂血性タンパク質である。

#### 【0068】

40

更なる実施形態では、術後創傷癒着のような手術による瘢痕化の治療方法が提供される。手術は、例えば腸切除のような侵襲性、または例えば関節鏡下靭帯修復のような非侵襲性であり得る。その方法は、製剤を混合するステップ、製剤を架橋して開示されている架橋組成物を形成するステップ、及び架橋組成物を例えば手術部位にデリバリーするステップを含む。デリバリーは手術創を縫合する前または後に実施し得る。更なる実施形態では、生物学的治療薬は抗線維性タンパク質である。

#### 【0069】

更なる実施形態では、乾癬のような皮膚疾患の治療方法が提供される。その方法は、製剤を混合するステップ、製剤を架橋して開示されている架橋組成物を形成するステップ、及び架橋組成物を例えば乾癬病変の近くの皮下スペースにデリバリーするステップを含む

50

。更なる実施形態では、生物学的治療薬は抗炎症性または免疫調節性タンパク質である。

【0070】

更なる実施形態では、子宮内膜症の治療方法が提供される。その方法は、製剤を混合するステップ、製剤を架橋して開示されている架橋組成物を形成するステップ、及び架橋組成物を例えば腹腔内スペースにデリバリーするステップを含む。更なる実施形態では、生物学的治療薬は抗エストロゲンタンパク質である。

【0071】

I V . キット

開示されている主題の別の態様によれば、各種組合せで複数の親水性ポリマー鎖、生物学的治療薬、及び場合により活性化バッファー及び懸濁バッファー、並びに架橋組成物を体内のスペースにデリバリーするためのデリバリーデバイスを別々に含むキットが提供される。各種デリバリーデバイスが開示されている主題の製剤及び架橋組成物のために適している。非限定的に例示する目的で、シングルボア注射器、デュアルボア注射器、または混合ヘッドを有する多チャネルデリバリーデバイスを使用し得る。幾つかの実施形態では、製剤及び活性化バッファーを混合ヘッドを含む多チャネルデリバリーデバイスの別々のチャネルに用意する。追加の実施形態では、生物学的治療薬及び複数の親水性ポリマー鎖を投与の少し前に再構成するための架橋組成物として用意する。

10

【0072】

幾つかの実施形態では、キットは（上記した）懸濁バッファー及び複数の親水性ポリマー鎖を含む第1溶液、及び（上記した）生物学的治療薬及び活性化バッファーを含む第2溶液を含み得る。他の非限定的実施形態では、生物学的治療薬、複数の親水性ポリマー鎖及び活性化バッファーを含む第1溶液を別々に含むキットが提供される。都合上、これらの成分をデュアルボア注射器または多チャネルデリバリーデバイスの別々のチャネル中に用意してもよい。

20

【0073】

各種刊行物が本明細書中で引用されており、その内容は参照によりその全文を本明細書に組み入れる。

【0074】

以下の特許請求の範囲に記載されている具体的実施形態に加えて、開示されている主題は以下の特許請求の範囲に記載されている及び上に開示した独立の要件の他の考えられる組合せを有する他の実施形態にも向けられる。従って、独立の特許請求の範囲及び上に開示されている具体的要件は、開示されている主題が他の考えられる組合せを有する他の実施形態に具体的に向けられているとも認識されるべきであるように開示されている主題の範囲内の他の方法で相互に組み合わされ得る。よって、開示されている主題の具体的実施形態の記載は例示及び説明の目的で提示されている。網羅的であるとも、開示されている主題をこれらの開示されている実施形態に限定するとも意図されない。

30

【0075】

開示されている主題の趣旨または範囲を逸脱することなく開示されている主題の方法及びシステムに各種修飾及び変更を加え得ることは当業者に自明であろう。よって、開示されている主題は添付の特許請求の範囲及びその均等物の範囲内の修飾及び変更を含むと意図される。

40

【実施例】

【0076】

5 . 1 実施例 1

5 %、6 . 3 %、7 . 5 %、11 . 5 %または20 %重量 / 容量比のPEG固体で1 : 1比でチオールまたはアクリレートで官能化した8アームPEG及びアダリムマブを含む製剤を示されているpH 8 . 0のリン酸活性化バッファーまたはpH 9 . 5の炭酸活性化バッファーと混合して、架橋組成物を形成した。PEG固体に対する抗体充填量は、示されているように20 %、27 %、32 %または50 %であった。インピトロで18日間及び26日間インキュベートした後、サイズ排除クロマトグラフィーを架橋組成物から放出

50

された生物学的治療薬に対して実施して、凝集物及び断片の量に対する放出されたモノマーの量を調べた。高量（例えば、> 90%）のモノマーは生物学的治療薬の良好な可逆的沈殿及び再可溶化を示している。図11A及び図11Bに図示されているように、高量のモノマーが製剤の重合から18日及び26日後に架橋組成物から放出される。図11Aに示すように、NHSで官能化したPEGが使用されている場合にはより高量の凝集物及び断片が生成される。

#### 【0077】

5重量%のPEG固体及び20重量%のPEG固体を有する4アームPEG-アクリレート及び4アームPEG-チオールをpH8のリン酸ナトリウムバッファーの溶液中で8mgまたは0.8mgの用量で凍結乾燥したアダリムマブ抗体を用いて製剤化した。50μLの製剤を健康なラット後肢の関節内スペースに注射した。群A及びCには20%PEG固体から形成した架橋組成物を与え、群B及びDには5%PEG固体で製剤化した架橋組成物を与え、群E及びGには非製剤化mAbを投与した。群A及びBには8mgmAbを投与し、残りの群は0.8mgmAbを投与した。表7はTNF-結合定量アッセイにより測定した抗体の血清暴露を示し、図12はmAbの濃度をデリバリー後最長14日まで経時的に示す。架橋組成物を介するデリバリーはアダリムマブ血清濃度を大きく低下させた。図13A、図13B及び図13Cはラット後肢に注射後及びラット後肢から除去後の架橋組成物の写真である。

#### 【0078】

##### 5.2 実施例2

50μlのリン酸緩衝食塩液中の4.25mgの非製剤化アダリムマブ抗体を健康なラットの後肢の関節内スペースに投与した。アダリムマブの血清濃度及び滑液濃度を投与から24時間にわたり定期的にモニターした。図8A及び8Bに図示されているように、非製剤化抗体は滑液から迅速に取り除かれ、血清に入って、12時間後低い滑液濃度及び高い全身暴露が生じた。投与から2時間後関節中に比較的高濃度の抗体が見られる。投与から約10時間以内に滑液中の生物学的治療薬の局所濃度が約2桁低下し、生物学的治療薬の血清暴露は比較的高い。

#### 【0079】

##### 5.3 実施例3

10%、15%及び20%重量/容量比の1:1比でチオールまたはアクリレートで官能化した8アームPEG、及び1:2.5比の生物学的治療薬:PEG固体のABT-308を含む溶液を作成した。ポリマー鎖の分子量は10kDaであった。これらの溶液の半分を活性化バッファーと混合して、架橋組成物を形成した。溶液の半分はプレミックスした。プレミックスした溶液は懸濁バッファー中に溶解したPEG固体からなり、これを活性化バッファー中に溶解した生物学的治療薬と混合して、架橋組成物を形成した。架橋組成物をインビトロで観察し、インキュベーションの最初の4時間の間の生物学的治療薬の初期放出を調べた。図9Aに示すように、プレミックスした架橋組成物からは平均6.8%の生物学的治療薬が放出され、プレミックスしていない20%PEG架橋組成物からは平均7.9%が放出された。プレミックスした架橋組成物の場合3%くらいの生物学的治療薬の初期放出が観察された。図9Bは開示されている主題の1つの態様に従う例示的三相放出プロフィールを示す。図14A及び14Bは実験からの全てのインビトロ放出を図示している。PEG固体を10%から15%に増加させるとmAb放出率は低下するようである。

#### 【0080】

プレミックスした8アーム、4アーム及びブレンドした8アーム/4アームPEGゲルの制御的放出プロフィールを評価した追加の長期間放出インビトロアッセイを行った。架橋組成物は、1:1比でチオールまたはアクリレートで官能化した8アームPEGを1:2.5比の生物学的治療薬:PEG固体でABT-308と混合することにより、1:1比でチオールまたはアクリレートで官能化した4アームPEGを1:2.5比の生物学的治療薬:PEG固体でABT-308と混合することにより、25:75、50:50または

10

20

30

40

50

75:25の8アームPEG:4アームPEG比の8アームと4アームPEG製剤の混合物を混合することにより形成した。溶液中のPEGの全重量/溶液比は10%または15%であった。図3A及び図3Bに示すように、10%PEG固体または15%PEG固体で製剤化されても全ての架橋組成物が生物学的治療薬の0~30日間の初期放出率、0~30日間の第2放出率及び0~30日間の第3放出率の三相放出プロフィールを示したことが観察された。第2放出率は第1放出率及び第3放出率よりも速かった。制御的放出の全期間は約40日間~約80日間で異なった。表1は、5%以下のバースト効果、10%未満の初期放出、30日間以上の放出期間及び三相放出プロフィールをインピトロで確認した追加の実施形態を示す。図15A~E及び図16A~Eはそれぞれ図3A及び図3Bに曲線を作成すべく平均化した個々の実験を示している。

10

#### 【0081】

上記実験を20%PEG固体で繰り返した。プレミックスした8アーム、4アーム、及びブレンドした8アーム/4アームPEGゲルの制御的放出プロフィールを評価する延長放出インピトロアッセイを行った。1:1比でチオールまたはアクリレートで官能化した8アームPEGと1:25の生物学的治療薬:PEG固体比でABT-308を混合することにより、1:1比でチオールまたはアクリレートで官能化した4アームPEGを1:12.5の生物学的治療薬:PEG固体比でABT-308と混合することにより、または25:75、50:50または75:25比の8アームPEG:4アームPEGの8アームと4アームPEG製剤の混合物を混合することにより形成した。溶液中のPEGの全重量/容量比は20%であった。プレミックスした製剤及びプレミックスしていない製剤を研究した。図17A及び図17Bに示すように、全ての架橋組成物が生物学的治療薬の0~30日間の初期放出、0~30日間の第2放出及び0~30日間の第3放出の三相放出プロフィールを示すことが観察された。第2放出率は第1放出率及び第3放出率よりも大きかった。制御的放出の全期間は約40日間~約80日間で異なった。加えて、8アームPEGの量が多くなると、完全mAb放出と完全ゲル分解の間の遅れが増した。更に、プレミックスしていない架橋組成物がより大きなバースト効果を生じ得ることが観察された。

20

#### 【0082】

加えて、図17Cに示すように、溶液中のPEGの全重量/容量比が12または20%であり、8または32μg/μlの抗体を含有している8アームプレミックスしたまたはプレミックスしていないPEG製剤を用いて上記した実験を繰り返した。生物学的治療薬の三相放出が最長85日まで観察された。架橋製剤の完全分解が100日目までに起こった。上記したより大きいバースト放出が溶液中の全PEG固体が多くなると観察された。

30

#### 【0083】

上記した製剤の架橋組成物の初期質量に対する質量の経時的増加により測定される膨潤比をプロットした。これらのグラフを図18A及び図18Bに示す。表8に示すように、プレミックスしていない架橋組成物はプレミックスした架橋組成物よりも有意により多くの水を吸収する。

#### 【0084】

40

##### 5.4 実施例4

pH3.5の0.05Mリン酸懸濁バッファー中に溶解した1:1比でチオールまたはアクリレートで官能化した8アームPEGを蛍光体で標記した0.16mgのABT-308(モノクローナル抗体)と合わせ、pH9.0の0.2M炭酸水素懸濁バッファー中に溶解した。合わせた溶液を注射器中に吸引し、注射器から射出させる(プランジングすることにより混合した。10%全PEG固体及び20%全PEG固体の両方の溶液を混合した。5、15または30回注射器プランジングし、この間に架橋反応が開始し、その後混合物を吸引し、架橋を完了近くまで進行させ、部分的に形成された架橋組成物を射出させた。架橋が完了したら、架橋組成物を位相差イメージング及び20倍の倍率で蛍光イメージング下で観察した。実験を10%全PEG固体及び20%全PEG固体の4アームPEG溶液に対して繰り返した。驚くことに、4アームPEG固体混合物に

50

より製剤の全体にわたって非均一の沈殿物サイズ及び沈殿物の非均質分布が生ずることが観察された。更に、混合プランジングの回数と共に沈殿物サイズが大きくなり、30回プランジングすることにより形成された混合物は大きくて粘った沈殿物及び不完全な沈殿物を示す。対照的に、8アームPEG固体混合物は5、15または30回プランジングすることにより混合したとき比較的均一な沈殿物サイズを呈した。プランジングの回数が増えると沈殿物サイズの増加が観察された。20%PEG固体溶液は直径約100nm~1μmのサイズの生物学的治療薬沈殿物を示した。これらの結果を図6A、図6B、図6C及び図6Dに図示する。図6Aは10%4アームPEG製剤を図示し、図6Bは10%8アームPEG製剤を図示し、図6Cは20%4アームPEG製剤を図示し、図6Dは20%8アームPEG製剤を図示する。

10

#### 【0085】

##### 5.5 実施例5

1:1比でチオールまたはアクリレートで官能化した4アームPEGの製剤を27重量%モノクローナル抗体(アダリムマブ)の充填量で7.91容量%の濃度、または32重量%モノクローナル抗体(アダリムマブ)の充填量で6.29容量%の濃度で用意した。製剤をpH9.5の炭酸活性化バッファーと混合して、架橋組成物を形成した。プラスチック管中での高さの変化の%により観察される膨潤が放出された抗体の%と平行して観察された。図4Aに図示されているように、架橋組成物の膨潤は放出された抗体の量に密接に対応している。ゲルの経時的膨潤を図19に示す。

#### 【0086】

20

加えて、PEG固体濃度、モノクローナル抗体充填量、溶液バッファー組成及び官能基の各種割合を有する4アームPEGの製剤を架橋して、架橋組成物を形成した。架橋組成物をインピトロでインキュベートし、各種組成物について目視検査により調べた溶解までの時間を記録した。架橋組成物の成分及び対応する溶解時間を図4Bに図示する。

#### 【0087】

##### 5.6 実施例6

pH5.2の15mMヒスチジンバッファー中、またはバッファー中に再溶解される凍結乾燥形態の4アームPEG-Acr/PEG-SH及びアダリムマブの製剤をpH8またはpH10の0.2Mリン酸バッファーまたはpH9.5及びpH10.5の0.2M炭酸-炭酸水素バッファーと混合した。ゲルを滅菌遠心管中で形成し、ゲル化時間を自然流下に対する抵抗として目視検査することにより調べた。ゲル形成から1時間後に放出媒体(PBS+0.1wt%トウイーン80及び0.05wt%のナトリウムアジド、pH7.4)を添加し、600uLサンプルを特定の時間間隔で採取することにより抗体放出も経時的に調べた。サンプル容量を直ちに交換した。図20及び図21はそれぞれ示した架橋組成物のゲル化時間及び抗体放出を経時的に示す。結果は、幾つかの変数がゲル化時間及びmAb放出に影響を与えることを示している。

30

#### 【0088】

##### 5.7 実施例7

5群(群A~E)の9匹のルイスラット(3匹×3群に小分けする)に対してABT-308モノクローナル抗体を後肢の関節内スペースに投与した。群Aには、0.16mgの非製剤化凍結乾燥したmAbを与えた。群Bには、pH3.5の0.05Mリン酸バッファー中に懸濁した8アームPEG-Acr/SH中で製剤化し、pH9.0の0.2Mリン酸バッファーと混合した0.16mgのmAbを与えた。PEGは用意したバッファーに対して20%重量/容量比で用意した。PEGの分子量は10kDaであり、PEG-Acr及びPEG-SHは1:1比で組み合わせた。懸濁バッファー及び活性化バッファーは1:1比で用意した。群Cには、20%8アームPEG-Acr/SH中で製剤化した0.16mgのmAbを与えた。PEGは使用したバッファーに対して20%重量/容量比で使用した。PEG及びmAbをpH7.5の0.2Mリン酸バッファー中に混合した。PEGの分子量は10kDaであり、PEG-Acr及びPEG-SHを1:1比で組み合わせた。群Dには、50:50比の4アーム及び8アームPEG中に用

40

50

意したPEG-Acr/SH中の0.16mgのmAbを与えた。PEGは用意したバッファーに対して20%重量/容量比で用意した。PEGの分子量は10kDaであり、PEG-Acr及びPEG-SHは1:1比で組み合わせた。群Eには、20%8アームPEG-Acr/SH中で製剤化した0.32mgのmAbを与えた。PEGは用意したバッファーに対して20%重量/容量比で用意した。群Aには14日目に滑液洗浄を行い、群B~Eには1、7及び14日目に滑液洗浄を行った。図10は群Cの14日間にわたる抗体の血清及び滑液濃度を図示する。暴露期間にわたって比較的高い滑液濃度が維持され、血清暴露は最小限となった。各治療群についての滑液濃度、血清濃度及び滑液:血清濃度の比を表5に示す。各群についてのAUC暴露データを表7に示す。群及び時間ポイントによる平均滑液及び血清mAb濃度を図22に図示する。図23A、図23B、図23C及び図23Dはそれぞれ治療群B、C、D及びEについての血清及び滑液濃度を示し、図24A、図24B、図24C、図24D及び図24Eはそれぞれの研究群の個別の動物についての全身暴露及びAUC暴露データを示す。

#### 【0089】

##### 5.8 実施例8

5群(群A~E)の9匹のルイスラット(3匹×3群に小分けする)に対してABT-308モノクローナル抗体を後肢の関節内スペースに投与した。群Aには、0.16mgの非製剤化凍結乾燥したmAbを与えた。群Bには、4アームPEG-Acr/SH中で製剤化した0.16mgのmAbを与えた。PEGは用意したバッファーに対して20%重量/容量比で用意した。PEGの分子量は10kDaであり、PEG-Acr及びPEG-SHは1:1比で組み合わせた。懸濁バッファー及び活性化バッファーは1:1比で用意した。群Cには、4アームPEG-Acr/SH中で製剤化した0.16mgのmAbを与えた。PEGは用意したバッファーに対して20%重量/容量比で用意した。PEG及びmAbをpH7.5の0.2Mリン酸バッファー中に混合した。PEGの分子量は2kDaであり、PEG-Acr及びPEG-SHを1:1比で組み合わせた。群Dには、4アームPEG-Acr/SH中で用意した0.16mgのmAbを与えた。PEGは用意したバッファーに対して10%重量/容量比で用意した。PEGの分子量は10kDaであり、PEG-Acr及びPEG-SHは1:1比で組み合わせた。群Eには、8アームPEG-Acr/SH中で製剤化した0.16mgのmAbを与えた。PEGは用意したバッファーに対して20%重量/容量比で用意した。群Aには14日目に滑液洗浄を行い、群B~Eには1、7及び14日目に滑液洗浄を行った。群毎の平均滑液及び血清mAb濃度を図25に図示し、表9は全群についての血清AUC全量を示す。

#### 【0090】

本研究を3群で繰り返した。群Aには0.16mgの非製剤化凍結乾燥したmAbを与え、群Dには10%8アームPEG-Ac/SH(pH3.5の0.05Mクエン酸-リン酸バッファー中に懸濁し、pH9の0.2M炭酸水素バッファーで架橋した)中の0.16mgのmAbを与え、群Eには20%8アームPEG-Ac/SH(pH3.5の0.05Mクエン酸-リン酸バッファー中に懸濁し、pH9の0.2M炭酸水素バッファーで架橋した)中の0.16mgのmAbを与えた。群Aは14日目に抽出した滑液洗浄液サンプルを有しており、群D及びEは1日目、7日目及び14日目に抽出した滑液洗浄液サンプルを有していた。血清暴露及びAUC計算値を図23に図示する。滑液暴露は表6に示す。各治療群についての結果を図26A及び図26Bに図示する。各群の個々の動物についての結果を図27A~Cに図示する。約0.1以下の全身:局所濃度の比が少なくとも6週間にわたり維持されていることを示す更なる実験データを図28に示す。対応するAUCデータを表10に示す。

#### 【0091】

##### 5.9 実施例9

100μlの8、16、24及び32μgのABT-308/μL組成物の充填量を有する20%8アーム架橋組成物についてゲル時間及び沈殿物の均一性を評価した。プレミックスした製剤を0.2MpH7.5のリン酸バッファー中に混合し、プレミックス

していない製剤を0.05M pH3.5のクエン酸-リン酸バッファー中で懸濁し、0.2M pH9.0の炭酸水素バッファーと混合した。平均ゲル化時間及び沈殿物の均一性を表11に示す。

【0092】

5.10 実施例10

100μlの8μg/μL組成物の凍結乾燥したABT-308または凍結した抗MM P13の充填量を有する20%8アーム架橋組成物についてゲル化時間を評価した。プレミックスした製剤を0.2M pH7.5のリン酸バッファー中で混合し、プレミックスしていない製剤を0.05M pH3.5のクエン酸-リン酸バッファー中で懸濁し、0.2M pH9.0の炭酸水素バッファーと混合した。プレミックスした溶液の場合、mAbをバッファー中でプレミックスし、架橋時にPEG固体と組み合わせるか、または架橋前にPEG固体中でプレミックスした。平均ゲル化時間を表12に示す。

10

【0093】

5.11 実施例11

表4A及び表4Bは、ラットにおいてMMT手術後に製剤化mAbを関節内投与した後、または非製剤化mAbを静脈内投与した後の全身及び滑液濃度の実験データを示す。MMT手術は変形性関節炎の病態モデルとしてのルイスラットの3群(A~C)に対して0日目に実施した。5日目に、ラットに対して手術を実施した後肢の関節内スペースに製剤化抗MMP13またはABT-308 mAbを注射し、または700mg/kg体重の抗MMP13を静脈内注射した。製剤はプレミックスしたかまたはプレミックスしていないかった。7日目に、血清及び滑膜洗浄液サンプルを集めた。ABT-308濃度を測定するために抗IL-13 MSDアッセイを用いて、または抗MMP13濃度を測定するために抗MMP13 MSDアッセイを用いて抗体濃度を分析した。実験結果を表12A(プレミックスしていない製剤に関する)及び表12B(プレミックスした製剤に関する)に示す。

20

【0094】

5.12 実施例12

インピトロmAb(アダリムマブ)放出を調べるために、1:1比のPEG-Acr:PEG-SHを有する10000MW 4アームPEG、4.84%全PEG固体及び50% mAb充填量の製剤を滅菌遠心管中で形成した。放出後の抗体の完全性を、ゲル形成から1時間後に放出媒体(0.1wt%トウイーン80及び0.05wt%ナトリウムアジドを有するPBS, pH7.4)を添加し、特定の時間間隔で600uLのサンプルを採取することにより調べた。ゲルは、目視検査で37で10秒未満に形成された。図29及び表13は放出されたモノクローナル抗体に対して実施したサイズ排除クロマトグラフィーの結果を図示している。架橋組成物から放出された抗体は断片及び凝集物に比して高量のモノマーを示し、再可溶化時の構造保存を示している。放出されたmAbの濃度を96ウェル石英プレートを用いてSpectraMax 96ウェルプレートリーダーを使用して280nmでの吸光度により測定した。各サンプルの吸光度を各時点で標準mAb曲線と比較し、プランク放出媒体吸光度に対して調節した。図30は経時に放出されたmAbの平均濃度を図示し、図31は経時に放出された投与された初期mAbの平均パーセントを示す。

30

40

【0095】

1:25の抗MMP13抗体:ポリマー充填量比を有する20%8アームPEG-SH/Acrの製剤を架橋し、インピトロでの累積mAb放出の%をモニターした。放出されたモノクローナル抗体を集め、その完全性をサイズ排除クロマトグラフィーにより調べた。図32はmAbの累積放出を経時に図示する。図33は凝集物及び断片に比して高量のモノマーを示すサイズ排除クロマトグラフィー結果を表している。

【0096】

5.13 実施例13

0、5、10、15、20、25または30重量%のPEG固体及び0mg、0.16

50

m g または 0 . 3 2 m g の m A b ( A B T - 3 0 8 ) から構成される 8 アーム P E G - S H / A c r の製剤。製剤の全容量は 2 0  $\mu$  l である。架橋製剤は目視検査のために透明なバイアル中で形成する。m A b なしの製剤はすべて透明であった。0 . 1 6 m g の全 m A b を含有している製剤では、2 0 % 以下の P E G の製剤は透明であり、2 5 % 及び 3 0 % 製剤は目視検査により沈降している沈殿物を示した。0 . 3 2 m g の m A b を含有している製剤では、2 0 % の P E G 製剤は懸濁した沈殿物を示し、2 0 % 未満の P E G を含有している製剤は透明であり、2 5 重量 % の P E G または 3 0 重量 % の P E G を含有している製剤は浮遊したり、沈降している沈殿物を示す。これらの実験を図 5 に図示する。

【 0 0 9 7 】

5 . 1 4 実施例 1 4

10

1 : 1 比の P E G - A c r : P E G - S H を有する 1 0 0 0 0 M W 8 アームの製剤を眼内注射用に作成した。表 1 4 に示す組成を有する 1 2 % 重量 / 容量の P E G 及び 2 0 % 重量 / 容量の P E G の製剤を作成した。いずれの製剤にも生物学的治療薬を配合しなかった。

【 0 0 9 8 】

1 つの注射器には 8 アーム P E G - S H の溶液を充填し、もう一方の注射器には 8 アーム P E G - A c の溶液を充填した 2 つの充填済み 1 m l 注射器に雌型 - 雌型ルアーロックアダプターを取り付け、前後に手動でプランジングすることにより各製剤を 5 ~ 1 0 秒間プレミックスした後、3 0 ゲージの眼科用針及び深さ 5 m m に即席に作った針ストップを有する 1 m l ベクトン・ディッキンソン注射器に吸引して、5 0  $\mu$  l の均一注射容量を得た。プレミックスし、吸引した後、6 匹のニュージーランドホワイト家兔の眼の各々の硝子体内スペースに 5 0  $\mu$  l の 1 2 % 重量 / 容量 P E G 製剤または 2 0 % 重量 / 容量 P E G 製剤を注射した。各注射は約 5 秒間かけた。ゲル化の前後に眼を観察し、その後水晶体及び網膜を観察し、形成されたヒドロゲルを抽出するために切開した。

20

【 0 0 9 9 】

各製剤は 3 0 ゲージの眼科用針を用いて注射可能であった。注射後眼の大きな出っ張りが観察されず、各製剤をその場で硝子体内スペース内で架橋して、ゲルを形成した。ゲルは光学的に透明のままであり、ピンセットで掴んだり、操作するのに十分に堅かった。2 0 重量 % P E G の製剤ゲルは 1 2 重量 % P E G の製剤ゲルよりも堅いことが観察された。ゲルの抽出時に眼組織の付着は観察されず、切開した眼の検査時に水晶体の破裂または網膜損傷は観察されなかった。ヒドロゲル製剤のゲル化時間を目視観察し、上記のように混合した製剤がもはや試験マイクロチューブ内を流れなくなるまでの期間を調整することによりインビトロで実験的に評価した。1 2 % 製剤は約 4 5 秒間でゲル化し、2 0 % 製剤は約 2 3 秒間でゲル化した。

30

【 0 1 0 0 】

## 【表1】

表1

	% PEG	P/NP	アーム の数(%)	[ug API/ u1 ゲル]	API	D:P 比	バッフ ア-	インビ トロ研 究番号	インビトロ PK 確認
1)	20	P	8(100)	16	ABT-308	01:12.5	A+B	7, 12	NA
2)	20	NP	8(100)	16	ABT-308	01:12.5	C	7	NA
3)	10	P	8(100)	8	ABT-308	01:12.5	A+B	8	NA
4)	10	P	8(75):4(25)	8	ABT-308	01:12.5	A+B	8	NA
5)	15	P	8(100)	8	ABT-308	01:18.7	A+B	8, 13	NA
6)	15	P	8(75):4(25)	8	ABT-308	01:18.7	A+B	8	NA
7)	15	P	8(50):4(50)	8	ABT-308	01:18.7	A+B	8	NA
8)	20	NP	8(50):4(50)	16	ABT-308	01:12.5	C	12	NA
9)	20	NP	8(25):4(75)	16	ABT-308	01:12.5	C	12	NA
10)	20	P	8(100)	8	ABT-308, 抗 MMP13	1:25	A+B	13, 14, 15	✓
11)	15	NP	8(100)	8	ABT-308	01:18.7	C	13	NA
12)	20	NP	8(100)	8	ABT-308	1:25	C	15	✓

10

20

## 【0101】

表2

前臨床 P O C	ヒト
生物適合性	非炎症性／生分解性
作用期間	7～30日間
用量	0.1 mg
放出率	2%/日
初期バースト	充填用量の<15%
容量	0.02 ml
針サイズ	25G
ルート	大きな関節に関節内注射
所望の滑液レベル	>7～30日間で>E C 9 0
所望の血漿レベル	滑液レベルの<1%
製品安定性	2～80°Cで>18ヶ月

30

40

## 【0102】

【表3】

表3

	動物	時間 (時)	滑液濃度 (ug/mL)	血清濃度 (ug/mL)	血清：滑液比
非製剤化抗体	A1	336	0.6	4.38	7.356
	A2	336	0.42	2.61	6.275
	A3	336	0.43	1.36	3.136
	平均		0.48	2.78	5.589
20% 8 ア 一 ム PEG-AC/SW(10kDa , 0.16mg mAb)	B1		48.73	0.22	0.005
	B2		192.09	3.19	0.017
	B3		102.29	0.92	0.009
	平均		114.37	1.44	0.01
	B4		133.57	0.85	0.006
	B5		123.4	0.28	0.002
	B6		31.9	2.87	0.09
	平均		96.29	1.33	0.033
	B7		80.48	1.5	0.019
	B8		23.04	0.69	0.03
	B9		53.17	2.4	0.045
	平均		52.22	1.53	0.031

10

20

【0103】

【表4】

表4A

群／用量	動物	注射後の時間(時)	滑液濃度(ug/mL)*	血清濃度(ug/mL)	血清:滑液比
群A 20ul IA プレミックスしていない20% 8アームPEG-AC-SH (10kDa, 1:1) 0.16mg 抗-MMP13 mAb	A1	48	11.55	0.91	0.08
	A2	48	12.15	0.46	0.04
	A3	48	1.42	1.07	0.75
	A4	48	11.48	0.62	0.05
	A5	48	38.74	0.63	0.02
	A6	48	6.32	0.46	0.07
	A7	48	サンプルなし	1.06	n/a
	A8	48	19.53	0.54	0.03
	A9	48	3.42	0.84	0.25
	平均		13.08	0.73	0.16
群B 20ul IA プレミックスしていない20% 8アームPEG-AC-SH (10kDa, 1:1) 0.16mg ABT-308 mAb	標準偏差		11.84	0.24	0.25
	B1	48	サンプルなし	4.81	n/a
	B2	48	42.31	0.85	0.02
	B3	48	152.65	3.77	0.02
	B4	48	167.39	3.14	0.02
	B5	48	サンプルなし	3.14	n/a
	B6	48	サンプルなし	2.57	n/a
	B7	48	サンプルなし	2.37	n/a
	B8	48	サンプルなし	1.89	n/a
	B9	48	37.71	6.29	0.17
群C 100ul IV 70mg/kg 抗-MMP13 mAb	平均		100.02	3.20	0.06
	標準偏差		69.57	1.61	0.07
	C1	48	119.08	668.94	5.62
	C2	48	153.27	751.57	4.90
	C3	48	113.12	553.06	4.89
	C4	48	104.41	498.45	4.77
	C5	48	121.52	435.85	3.59
	C6	48	111.75	500.47	4.48
	C7	48	71.09	525.29	7.39
	C8	48	100.87	391.25	3.88
抗MMP13血清LLOQ:定量下限(0.15ug/mL)以下 抗MMP13滑液LLOQ:定量下限(0.05ug/mL)以下	C9	48	104.70	607.36	5.80
	平均		111.09	548.03	5.04
	標準偏差		21.64	112.91	1.14

\*おおよその洗浄液希釈を説明するために5倍を掛けた滑液洗浄液濃

ABT-308血清LLOQ:定量下限(0.075ug/mL)以下

ABT-308滑液LLOQ:定量下限(0.375ug/mL)以下

抗MMP13血清LLOQ:定量下限(0.15ug/mL)以下

抗MMP13滑液LLOQ:定量下限(0.05ug/mL)以下

【0104】

10

20

30

40

【表5】

表4 B

群／用量	動物	注射後の時間(時)	滑液濃度(ug/mL)*	血清濃度(ug/mL)	血清:滑液比
群A 20ul IA プレミックスした20% 8アーム PEG-AC-SH (10kDa, 1:1) 0.16mg 抗-MMP13 mAb	A1	48	サンプルなし	0.86	n/a
	A2	48	サンプルなし	0.61	n/a
	A3	48	100.03	0.94	0.01
	A4	48	12.37	0.91	0.07
	A5	48	サンプルなし	0.97	n/a
	A6	48	3.08	1.33	0.43
	A7	48	サンプルなし	0.86	n/a
	A8	48	サンプルなし	1.15	n/a
	A9	48	15.71	1.03	0.07
	平均		32.80	0.96	0.14
群B 20ul IA プレミックスした20% 8アーム PEG-AC-SH (10kDa, 1:1) 0.16mg ABT-308 mAb	標準偏差		45.14	0.20	0.19
	B1	48	14.46	5.68	0.39
	B2	48	サンプルなし	8.04	n/a
	B3	48	22.12	7.67	0.35
	B4	48	サンプルなし	5.00	n/a
	B5	48	サンプルなし	2.15	n/a
	B6	48	サンプルなし	3.77	n/a
	B7	48	サンプルなし	2.13	n/a
	B8	48	59.22	1.64	0.03
	B9	48	8.19	4.57	0.56
群C 100ul IV 70mg/kg 抗-MMP13 mAb	平均		26.00	4.52	0.33
	標準偏差		22.87	2.35	0.22
	C1	48	234.47	633.14	2.70
	C2	48	77.01	606.87	7.88
	C3	48	58.79	476.14	8.10
	C4	48	61.68	512.51	8.31
	C5	48	62.89	480.08	7.63
	C6	48	85.87	511.80	5.96
	C7	48	75.64	527.05	6.97
	C8	48	75.38	587.56	7.79
*おおよその洗浄液希釈を説明するために5倍を掛けた滑液洗浄液濃度 ABT-308血清LLOQ:定量下限(0.075ug/mL)以下 ABT-308滑液LLOQ:定量下限(0.375ug/mL)以下 抗MMP13血清LLOQ:定量下限(0.15ug/mL)以下 抗MMP13滑液LLOQ:定量下限(0.05ug/mL)以下	平均		89.48	556.67	7.17
	標準偏差		55.06	71.14	1.90

【0 1 0 5】

【表6】

表5

群／用量	動物	時間 (時)	滑液濃度 (ug/mL)*	血清濃度 (ug/mL)	血清:滑液比
群A 非製剤化凍結乾燥したmAb 0.16mg mAb	A1	336	0.60	4.38	7.356
	A2	336	0.42	2.61	6.275
	A3	336	0.43	1.36	3.136
	平均		0.48	2.78	5.589
	B1	24	18.32	1.74	0.095
	B2	24	22.46	1.58	0.070
	B3	24	5.23	2.47	0.472
	平均		15.34	1.93	0.212
	B4	168	BQL	3.25	N/A
群B 20% 87- $\mu$ -PEG-AC-SH (10kDa 1:1) 0.16mg mAb	B5	168	1.78	2.23	1.251
	B6	168	11.20	1.09	0.097
	平均		6.49	2.19	0.674
	B7	336	6.94	0.14	0.020
	B8	336	0.57	1.32	2.327
	B9	336	4.13	0.69	0.168
	平均		3.88	0.72	0.838
	C1	24	48.73	0.22	0.005
	C2	24	192.09	3.19	0.017
群C 20% 87- $\mu$ -PEG-AC-SH (10kDa 1:1) 0.16mg mAb	C3	24	102.29	0.92	0.009
	平均		114.37	1.44	0.010
	C4	168	133.57	0.85	0.006
	C5	168	123.40	0.28	0.002
	C6	168	31.90	2.87	0.090
	平均		96.29	1.33	0.033
	C7	336	80.46	1.50	0.019
	C8	336	23.04	0.69	0.030
	C9	336	53.17	2.40	0.045
平均		52.22	1.53	0.031	

10

20

30

表5続き

群／用量	動物	時間 (時)	滑液濃度 (ug/mL)*	血清濃度 (ug/mL)	血清:滑液比
群D 50% 4アームPEG-AC-SH (10kDa, 1:1) 0.16mg mAb	D1	24	23.69	2.36	0.10
	D2	24	9.43	1.89	0.20
	D3	24	20.68	2.25	0.11
	平均		17.93	2.17	0.14
	D4	168	9.54	0.78	0.08
	D5	168	0.54	2.45	4.51
	D6	168	2.93	BQL	N/A
	平均		4.34	1.62	2.29
	D7	336	0.55	0.28	0.50
	D8	336	1.21	BQL	N/A
	D9	336	BQL	BQL	N/A
	平均		0.88	0.28	0.50
群E 20% 4アームPEG-AC-SH (10kDa, 1:1) 0.32mg mAb	E1	24	209.40	8.85	0.04
	E2	24	305.94	14.53	0.05
	E3	24	56.53	7.92	0.14
	平均		190.62	10.43	0.08
	E4	168	29.97	9.74	0.32
	E5	168	0.52	7.35	14.26
	E6	168	4.13	13.89	3.37
	平均		11.54	10.33	5.98
	E7	336	1.21	7.32	6.05
	E8	336	2.39	6.59	2.75
	E9	336	0.35	1.13	3.24
	平均		1.32	5.01	4.01

\*おおよその洗浄液希釈を説明するために5倍を掛けた滑液洗浄液濃度

LLOQ: 定量下限(0.375ug/mL)以下

10

20

【 0 1 0 6 】

【表7】

表6

群／用量	動物	時間 (時)	滑液濃度 (ug/mL)*	血清濃度 (ug/mL)	血清:滑液比
群A 非製剤化凍結乾燥したmAb 0.16mg mAb	A1	336	BQL	2.79	n/a
	A2	336	0.44	3.30	7.42
	A3	336	BQL	3.38	n/a
	平均		<b>0.44</b>	<b>3.16</b>	<b>7.42</b>
	D1	24	16.60	3.19	0.19
	D2	24	0.99	5.55	5.61
	D3	24	10.14	3.54	0.35
	平均		<b>9.24</b>	<b>4.09</b>	<b>2.05</b>
	D4	168	17.01	2.66	0.16
	D5	168	8.37	1.71	0.20
群D 10% 8アーメ-PEG-AC/-SH (10kDa, 1:1) 0.16mg mAb	D6	168	9.22	3.22	0.35
	平均		<b>11.53</b>	<b>2.53</b>	<b>0.24</b>
	D7	336	4.01	1.96	0.49
	D8	336	0.48	2.20	4.61
	D9	336	BQL	1.20	n/a
	平均		<b>2.24</b>	<b>1.79</b>	<b>2.55</b>
	E1	24	22.20	2.89	0.13
	E2	24	13.19	2.57	0.19
	E3	24	208.20	0.82	0.00
	平均		<b>81.20</b>	<b>2.09</b>	<b>0.11</b>
群E 20% 8アーメ-PEG-AC/-SH (10kDa, 1:1) 0.16mg mAb	E4	168	26.82	1.69	0.06
	E5	168	6.88	1.85	0.27
	E6	168	5.92	1.97	0.33
	平均		<b>13.21</b>	<b>1.84</b>	<b>0.22</b>
	E7	336	1.00	BQL	n/a
	E8	336	25.86	1.68	0.07
	E9	336	23.85	1.61	0.07
	平均		<b>16.90</b>	<b>1.65</b>	<b>0.07</b>

\*およその洗浄液希釈を説明するために5倍を掛けた滑液洗浄液濃度

LLOQ:定量下限(0.375ug/mL)以下

10

20

30

【0107】

【表8】

表7

群	AUC <sub>0-336時間</sub> (mg?hr/mL)	AUC <sub>0-336時間/用量</sub> (mg?hr/mL/mg/kg)	C <sub>max</sub> (μg/mL)	C <sub>max</sub> /用量 (μg/mL/mg/kg)	平均滑液濃度 (μg/mL)
A (8mg)	29.5	1.0	148.7	5.1	1.01
B (8mg)	40.4	1.4	167.4	5.8	1.41
C (0.8mg)	1.7	0.6	7.7	2.6	0.32
D (0.8mg)	5.2	1.8	24.2	8.3	0.17
E (0.8mg)	2.9	1.0	11.9	4.1	0.10
G (0.8mg)	11.5	4.0	50.9	17.5	0.31

\*用量を計算するためにラット重量を275mgと仮定した

【0108】

表9】

表8

10

20

製剤ブレンド	より多い膨潤% [(NP-P)/P]	日
4(0):8(100)	73.8	59
4(25):8(75)	24.5	59
4(50):8(50)	9.7	59
4(75):8(25)	8.3	42
4(100):8(0)	19.4	35

30

【0109】

【表10】

表9

群	AUC <sub>0-336時間</sub> (mg?hr/mL)	AUC <sub>0-336時間/用量</sub> (mg?hr/mL/mg/kg)	C <sub>max</sub> (μg/mL)	C <sub>max</sub> /用量 (μg/mL/mg/kg)	T <sub>max</sub> (日)
A	1.5	2.6	7.3	12.5	1.0
B	0.6	1.1	3.1	5.4	1.6
C	0.6	1.1	1.9	3.2	10.3
D	0.7	1.2	2.6	4.4	1.0
E	3.2	2.7	11.5	9.9	3.0

40

【0110】

## 【表11】

表10

群	AUC 0-336 時間 (mg/hr/mL)	AUC 0-336 時間/ 用量 (mg/hr/mL/mg/kg)	C <sub>max</sub> (ug/mL)	C <sub>max</sub> /用量 (ug/mL./mg/kg)	T <sub>max</sub> (日)
A	1.3	2.2	5.3	9.1	1
B	1.3	2.2	4.4	7.6	0.2
C	0.1	0.3	0.7	1.3	2.7
D	0.7	1.1	3.3	5.7	2
E	0.3	0.5	1.7	2.9	8

10

## 【0111】

## 【表12】

表11

API	P/NP	API 充填量 (ug/uL ゲル)	D:P	平均ゲル時間 (分:秒)	均一/不均一 沈殿
ABT-308	NP	8	1:25	0:29	均一
ABT-308	NP	16	1:12.5	0:30	均一
ABT-308	NP	24	1:8.25	0:34	不均一
ABT-308	NP	32	1:6.33	0:32	不均一
ABT-308	P	8	1:25	1:14	均一
ABT-308	P	16	1:12.5	1:30	均一
ABT-308	P	24	1:8.25	1:55	均一
ABT-308	P	32	1:6.33	2:05	不均一

20

30

40

## 【0112】

【表13】

表12

API	混合	8アームPEGの%	平均ゲル時間
抗MMP13	PEG中で プレミックスした	20	0:42
ABT-308	PEG中で プレミックスした	20	1:17
抗MMP13	プレミックスせず	20	0:23
ABT-308	プレミックスせず	20	0:30
抗MMP13	バッファー中で プレミックスした	20	1:20
ABT-308	バッファー中で プレミックスした	20	1:02

10

【0113】

20

【表14】

表13

表1. PEG-PEGゲルからの最長14日間の放出mAbの安定性を実証するSFC結果

製剤	放出時間ポイント	% 凝集物	% モノマー	% 断片
50% mAb, 5% PEG固体, リン酸バッファーpH=10.5	2h	1.97	97.49	0.54
	2d	2.92	96.53	0.55
	10d	1.08	96.12	2.79
50% mAb, 5% PEG固体, 混合リン酸-炭酸バッファー pH=10.5, 2時間	2h	1.56	97.93	0.51
	2d	1.50	98.15	0.35
	10d	1.56	96.46	1.94
	14d	1.34	96.77	1.80
	IP202	5.50	85.18	9.30
	7d			

30

【0114】

【表15】

40

表14

ゲル %(w/v)	8アーム PEG-SH (g)	PEG-SH バッファー 容量(ml)	8アーム PEG-AC (g)	PEG-AC バッファー 容量(ml)	バッファー タイプ	ゲル時間 (s)
12	0.15	0.625	0.1	0.835	0.2M pH7.5 リン酸	48
20	0.3	0.75	0.1	0.5	0.2M pH7.5 リン酸	23

50

【図1】

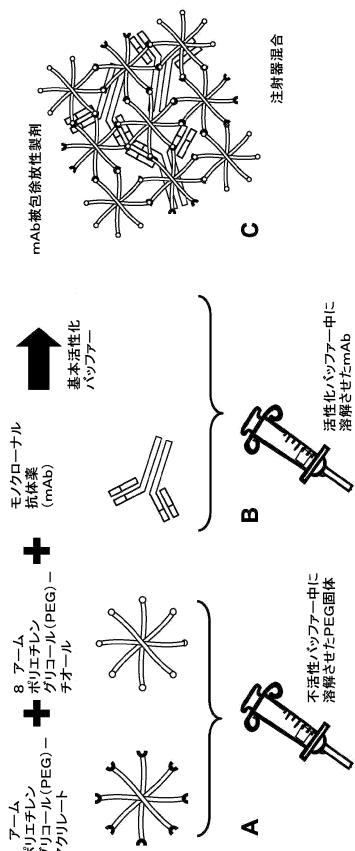


FIGURE 1

【図2】

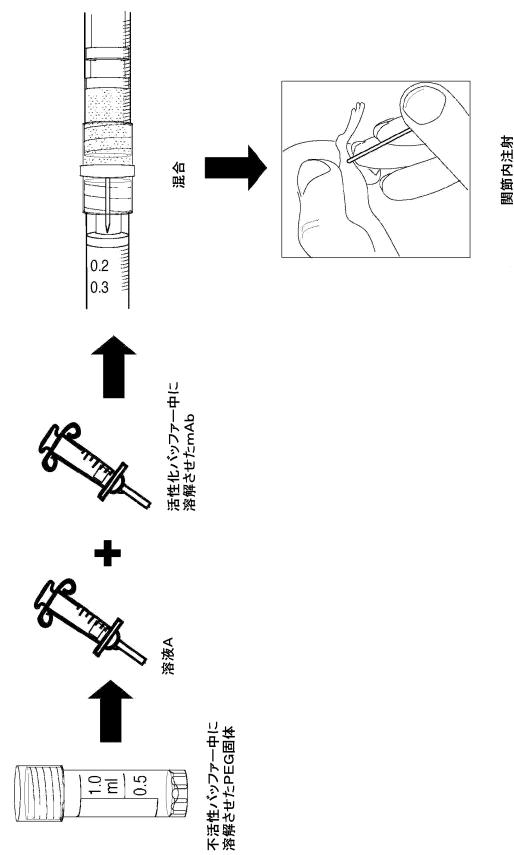


FIGURE 2

【図3 A】

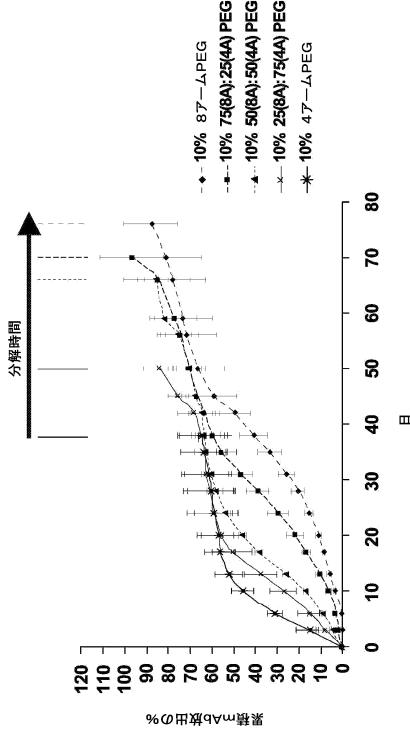


FIGURE 3A

【図3 B】

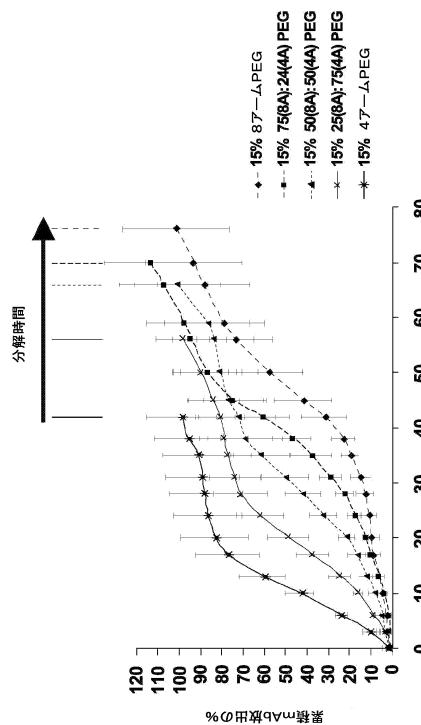


FIGURE 3B

【図4A】

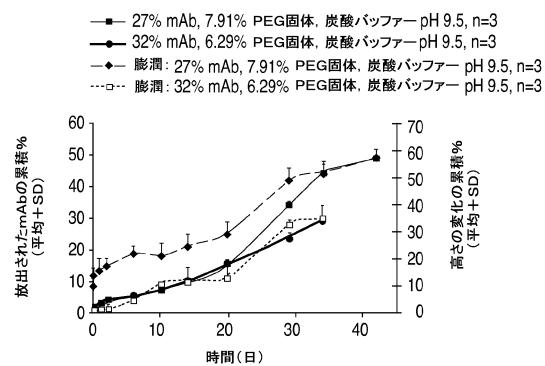


FIGURE 4A

【図4B】

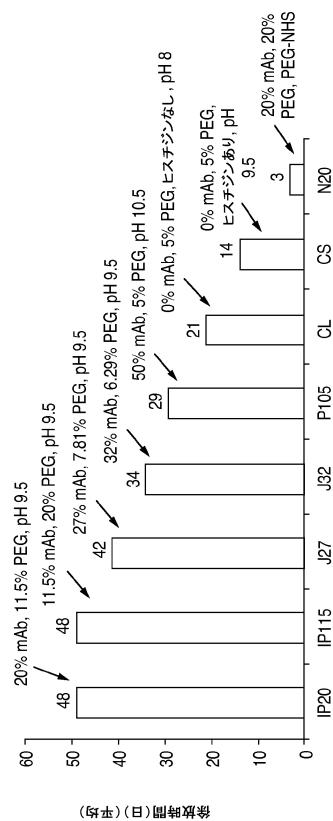
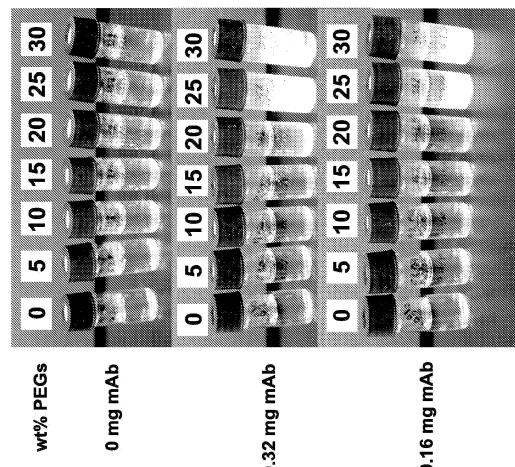


FIGURE 4B

【図5】



【図6A】

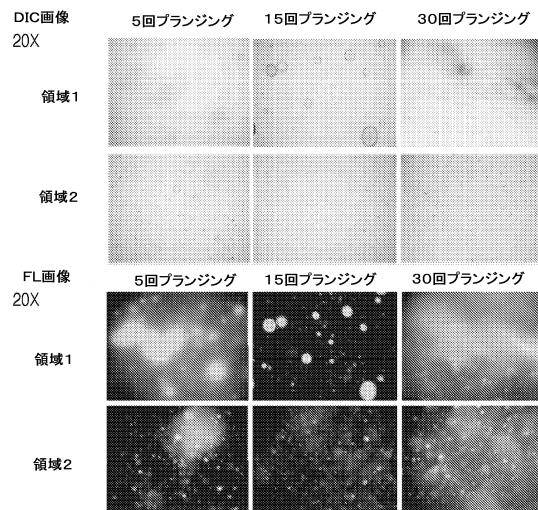


FIGURE 6A

【図 6 B】

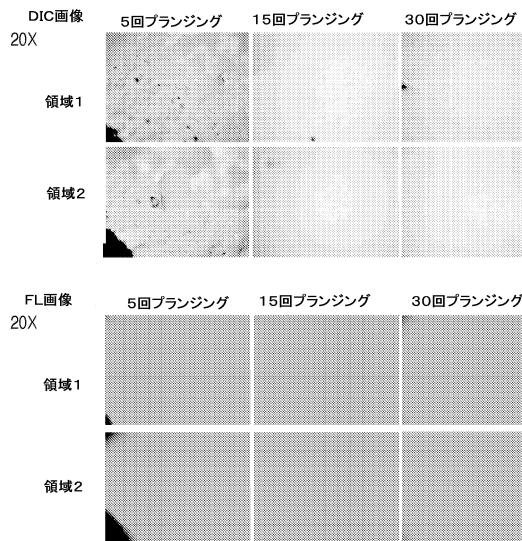


FIGURE 6B

【図 6 C】

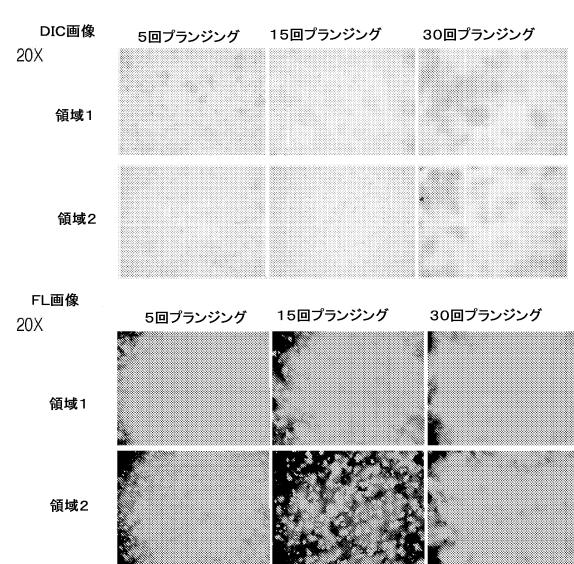


FIGURE 6C

【図 6 D】

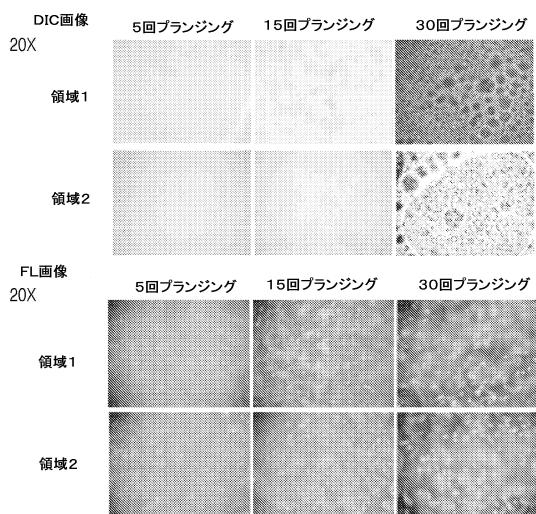


FIGURE 6D

【図 7】

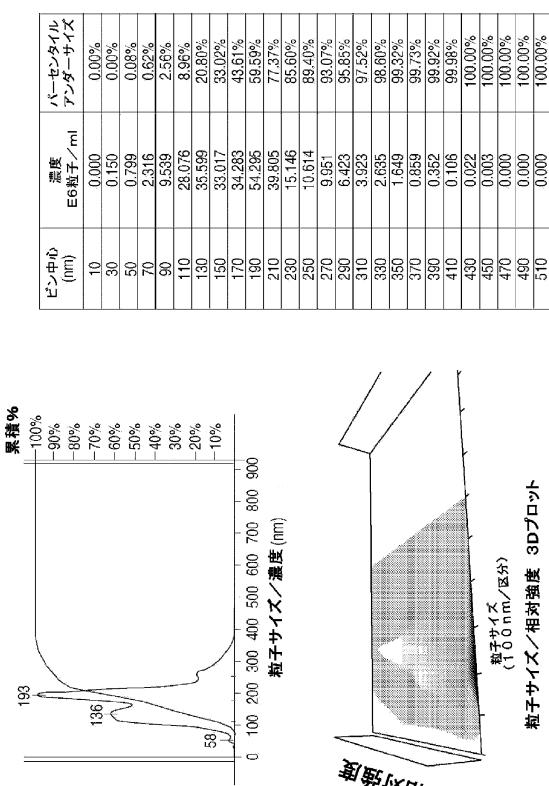


FIGURE 7

【図 8 A】

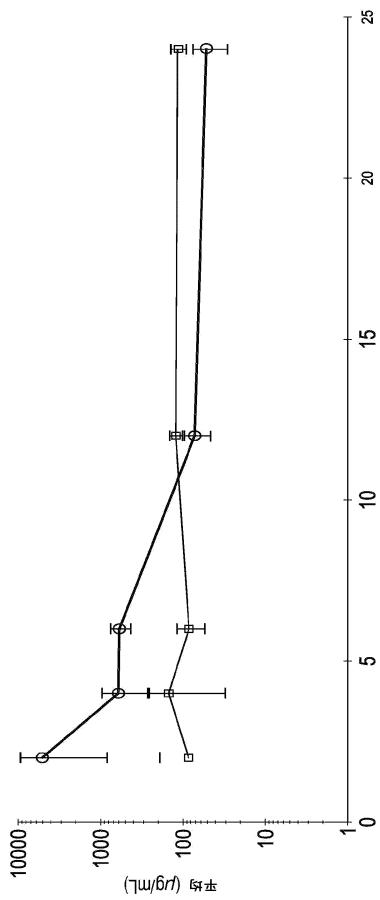


FIGURE 8A

【図 8 B】

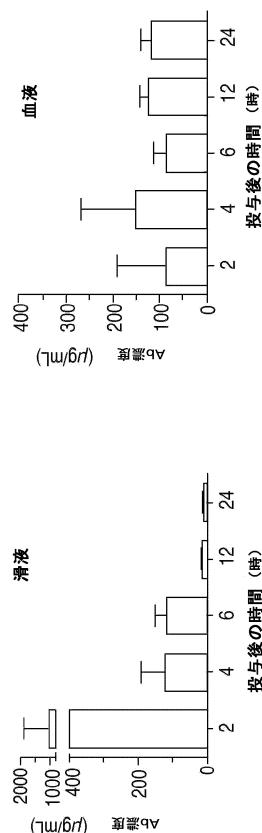


FIGURE 8B

【図 9 A】

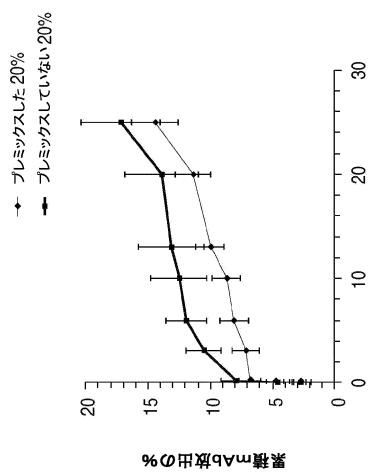


FIGURE 9A

【図 9 B】

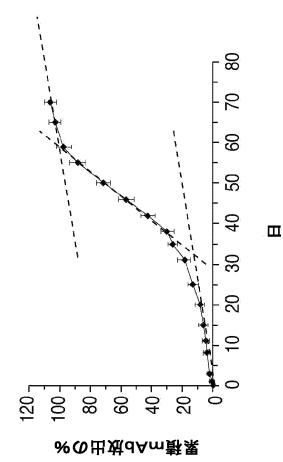


FIGURE 9B

【図 10】

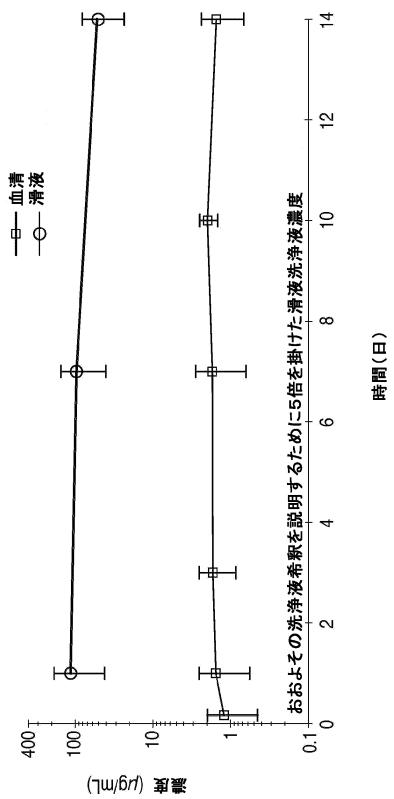


FIGURE 10

【図 11 A】

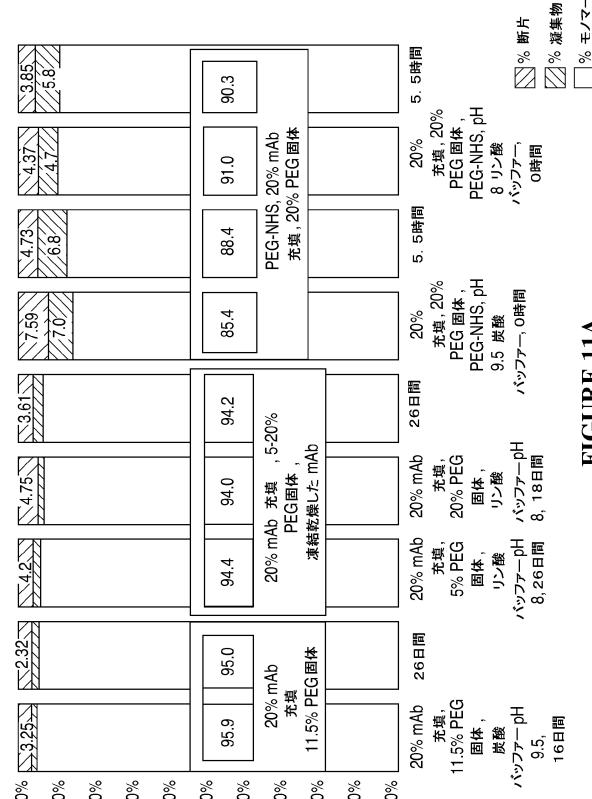


FIGURE 11A

【図 11 B】

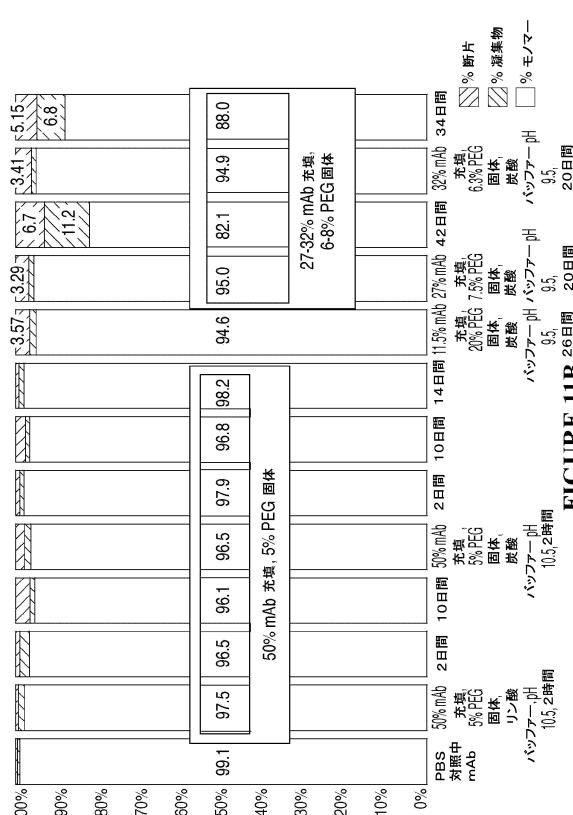


FIGURE 11B

【図 12】

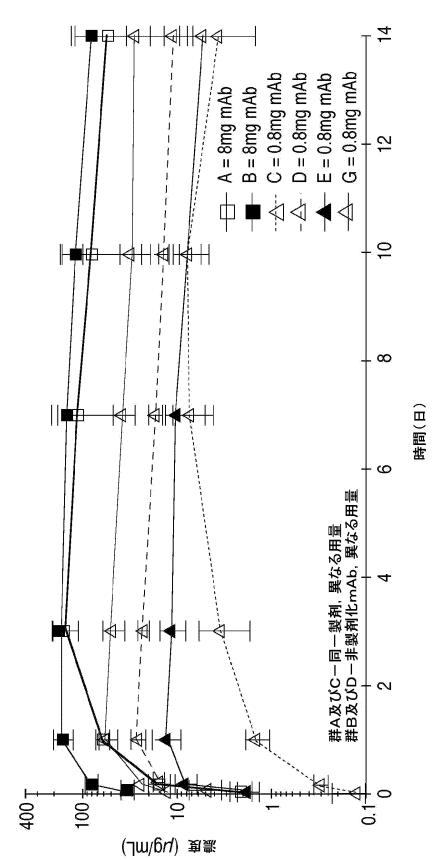


FIGURE 12

【図 13 A】

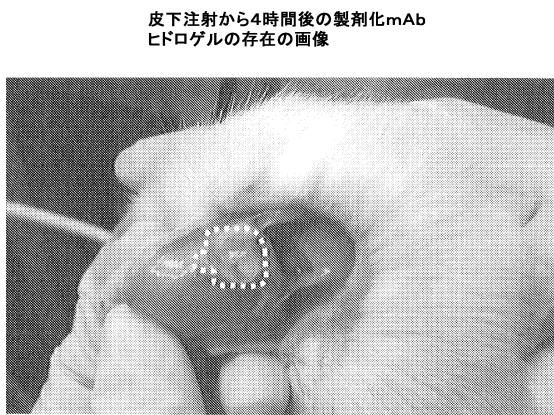


FIGURE 13A

【図 13 B】



FIGURE 13B

【図 13 C】

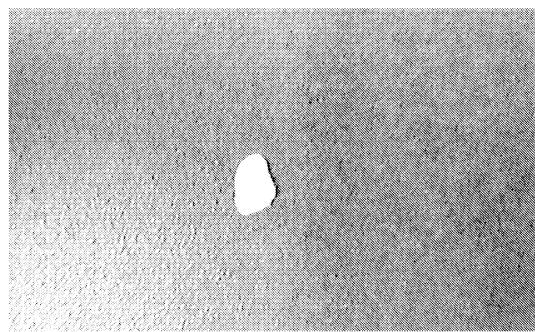


FIGURE 13C

【図 14 A】

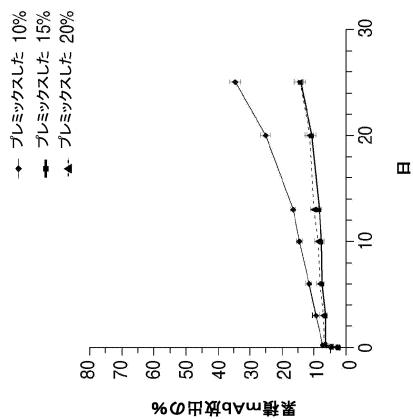
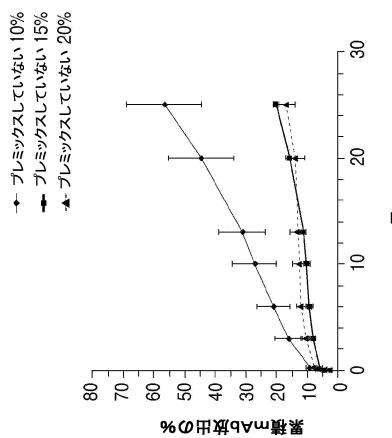


FIGURE 14A

【図 14B】



【図 15A】

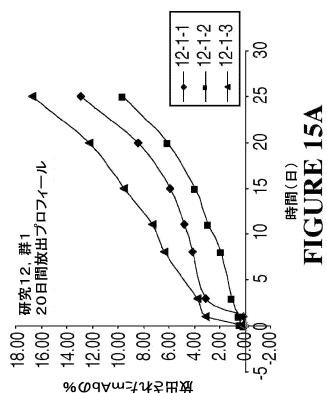


FIGURE 15A

FIGURE 14B

【図 15B】

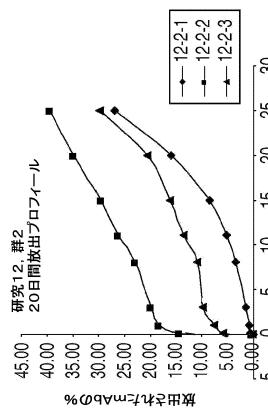


FIGURE 15B

【図 15C】

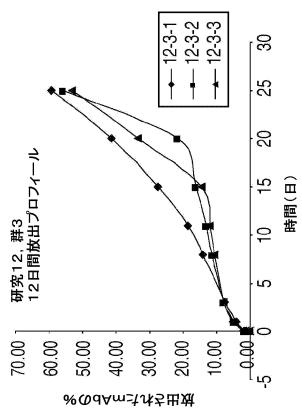


FIGURE 15C

【図 15D】

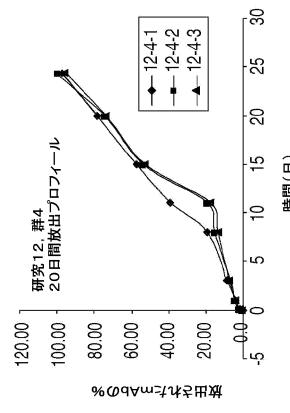


FIGURE 15D

【図 15E】

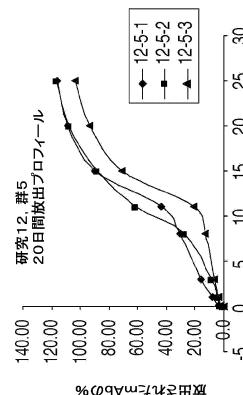
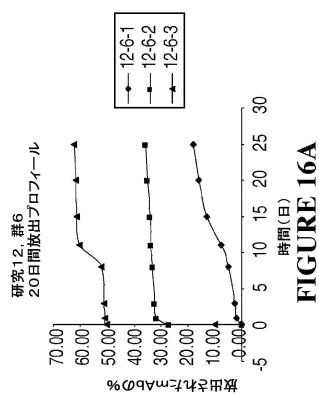
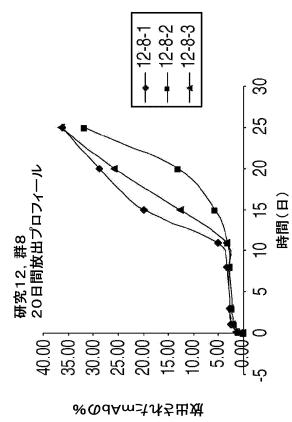


FIGURE 15E

【図 16 A】



【図 16 C】



【図 16 B】

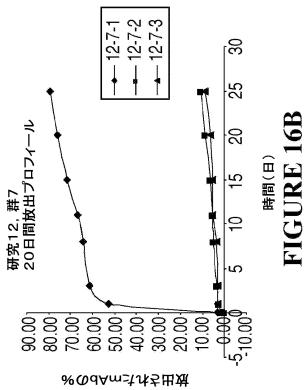


FIGURE 16B

FIGURE 16A

【図 16 D】

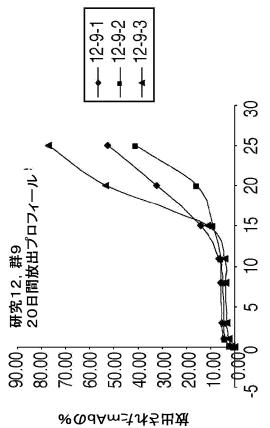


FIGURE 16D

【図 17 A】

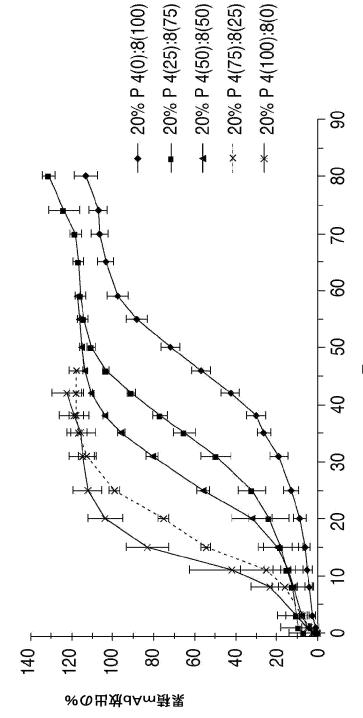


FIGURE 17A

【図 16 E】

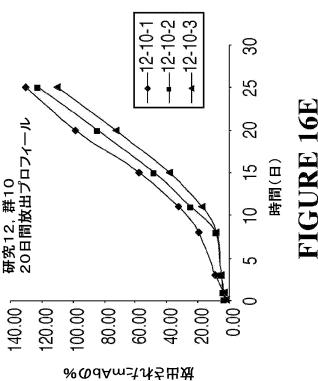


FIGURE 16E

【図 16 C】

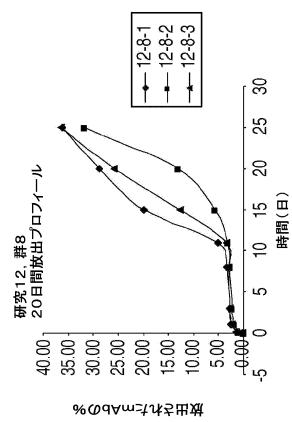


FIGURE 16C

【図 17B】

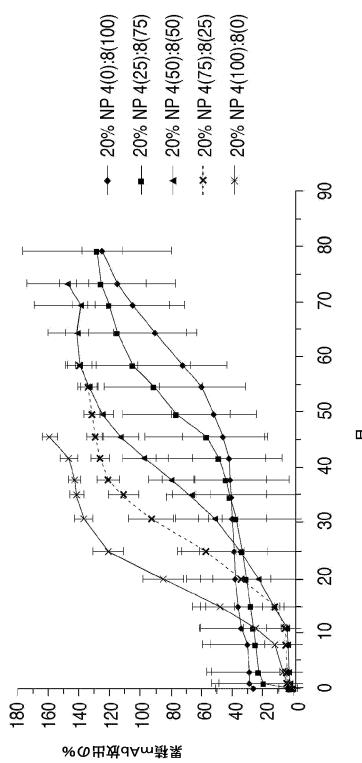


FIGURE 17B

【図 17C】

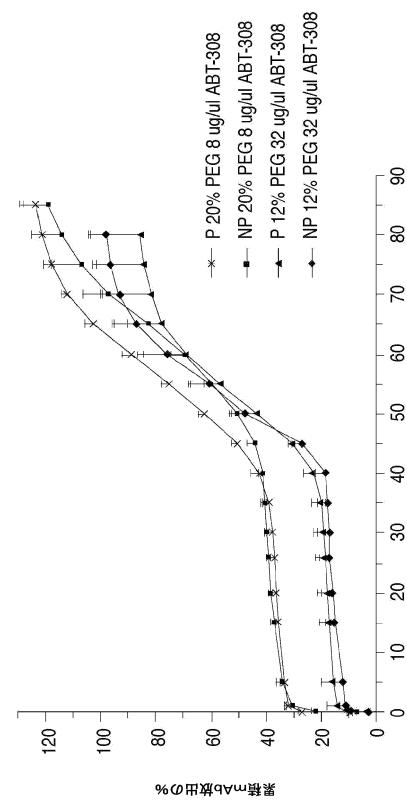


FIGURE 17C

【図 18A】

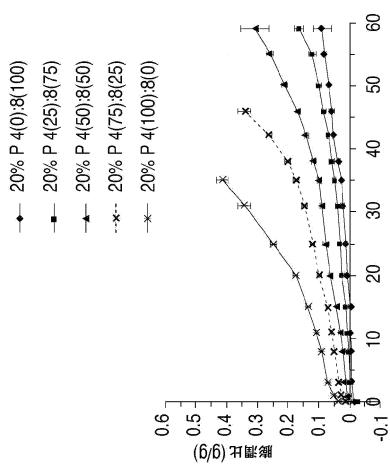


FIGURE 18A

【図 18B】

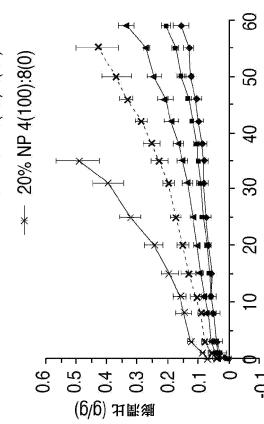
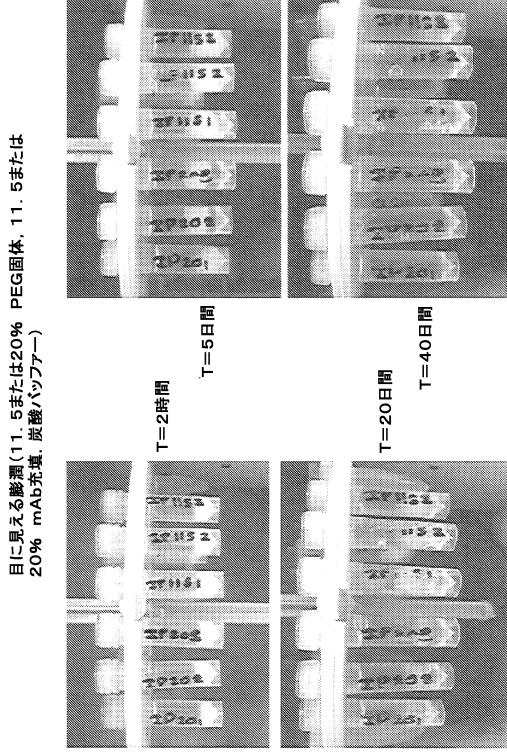


FIGURE 18B

【 図 1 9 】



【図21】

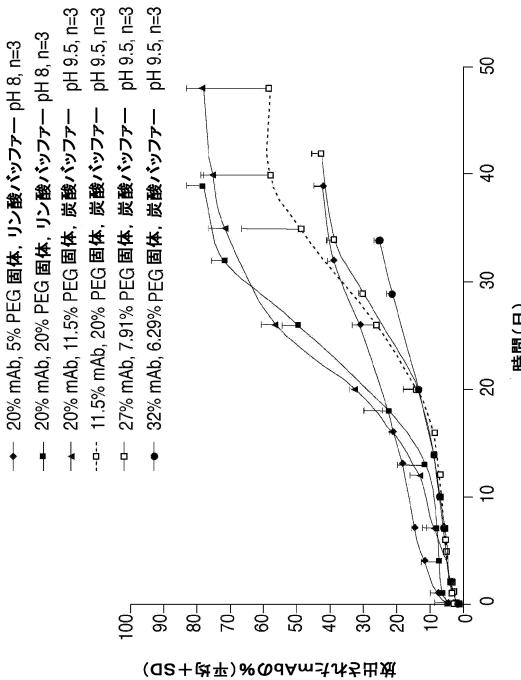


FIGURE 21

## 【図22】

群A: 非製剤化, 0.16mg mAb, n=3(3)  
 群B: 20% 8 $\gamma$ -L-PEG-AC/SH (10kDa, 1:1), 0.16mg mAb n=2(3)  
 群C: 20% 8 $\gamma$ -L-PEG-AC/SH (10kDa, 1:1), 0.16mg mAb n=3(3)  
 群D: 20% 50/40 4 $\gamma$ -L-8 $\gamma$ -L-PEG-AC/SH (10kDa, 1:1), 0.16mg mAb n=1(3)  
 群E: 20% 4 $\gamma$ -L-PEG-AC/SH (10kDa, 1:1), 0.32mg mAb n=1(3)

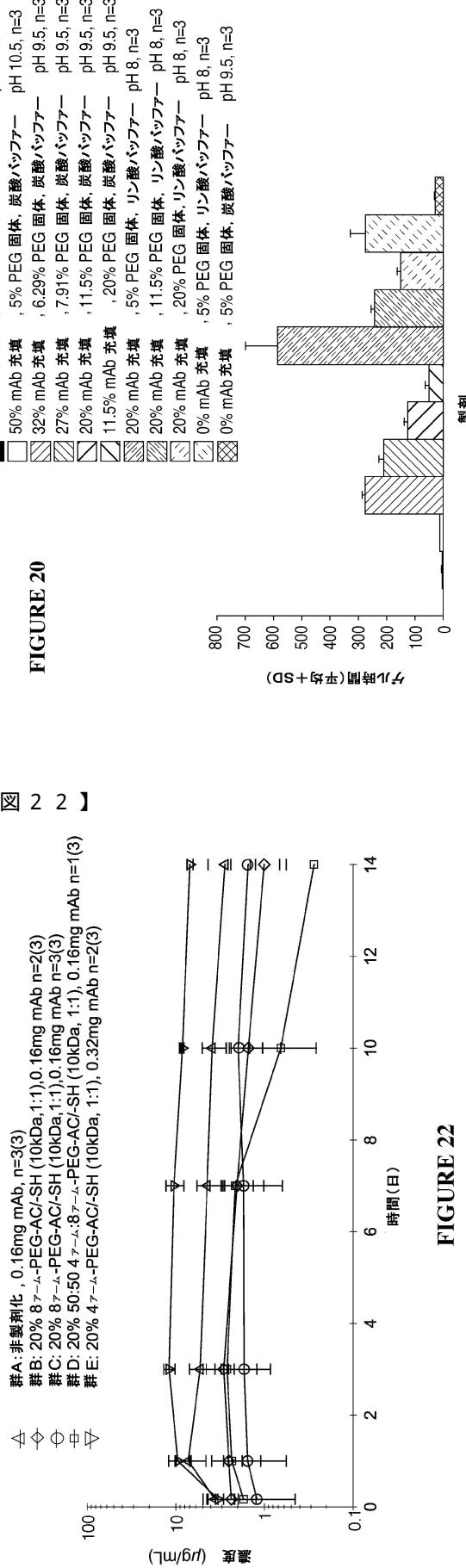


FIGURE 22

【図 23A】

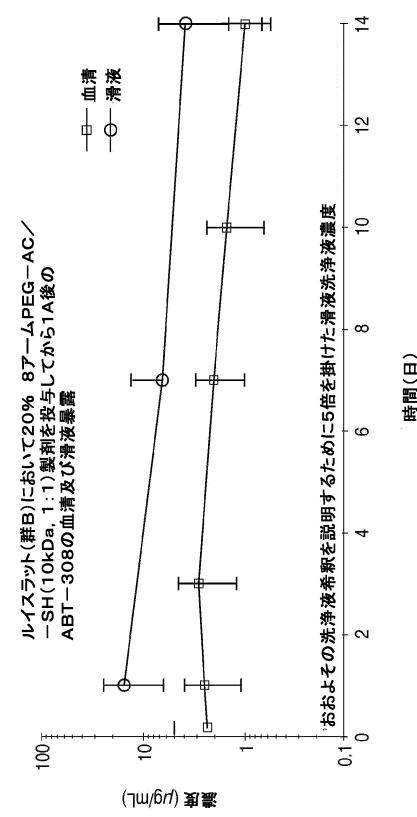


FIGURE 23A

【図 23B】

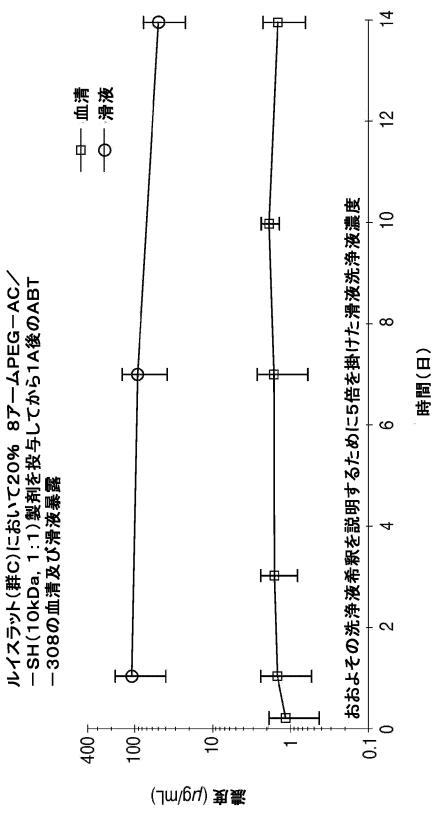


FIGURE 23B

【図 23C】

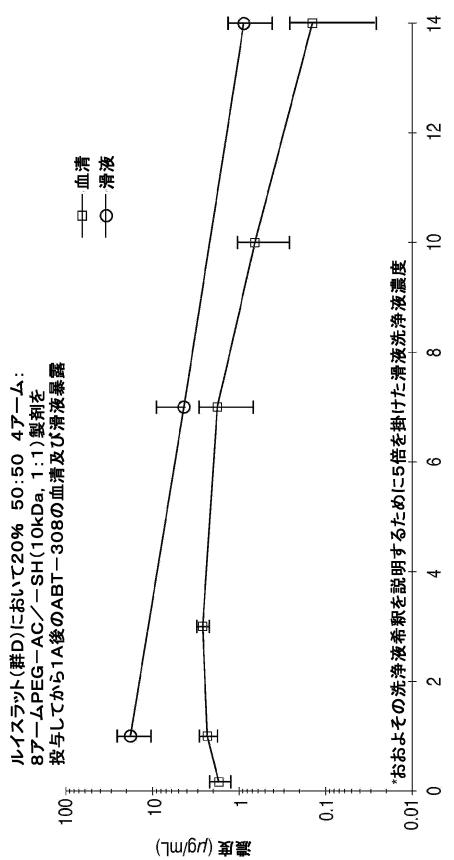


FIGURE 23C

【図 23D】

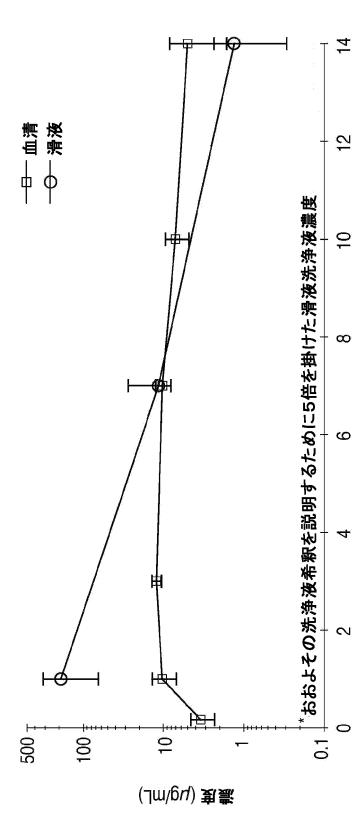


FIGURE 23D

【図 23E】

ルイスラット(群E)において20% 8アーモPEG-AC/-SH(10kDa, 1:1)製剤を投与してから1A後のABT-308の血清暴露—個々の動物

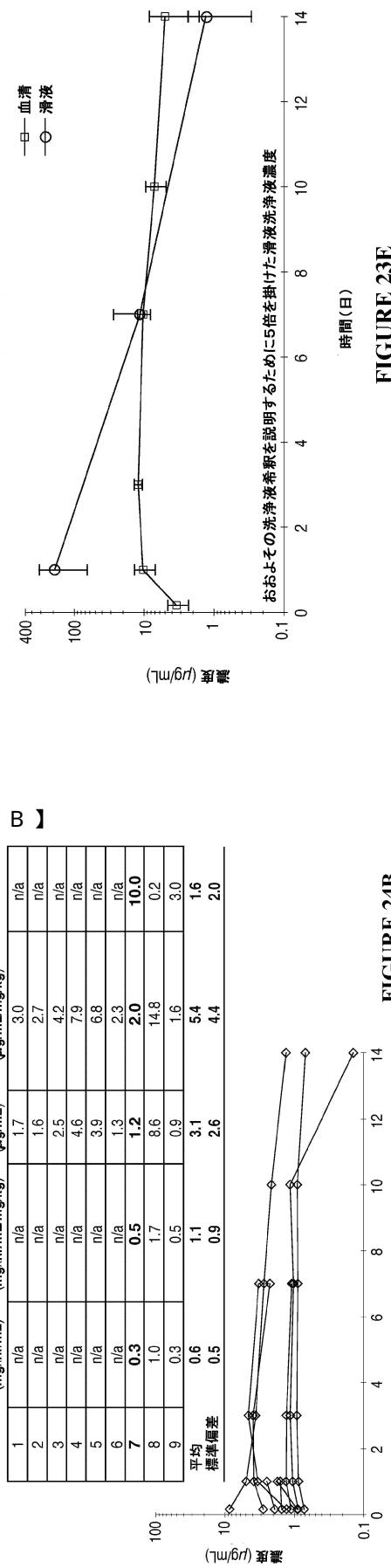


FIGURE 23E

【図 24A】

ルイスラット(群A)において20% 4アーモPEG-AC/-SH(10kDa, 1:1)製剤を投与してから1A後のABT-308の血清及び清液暴露

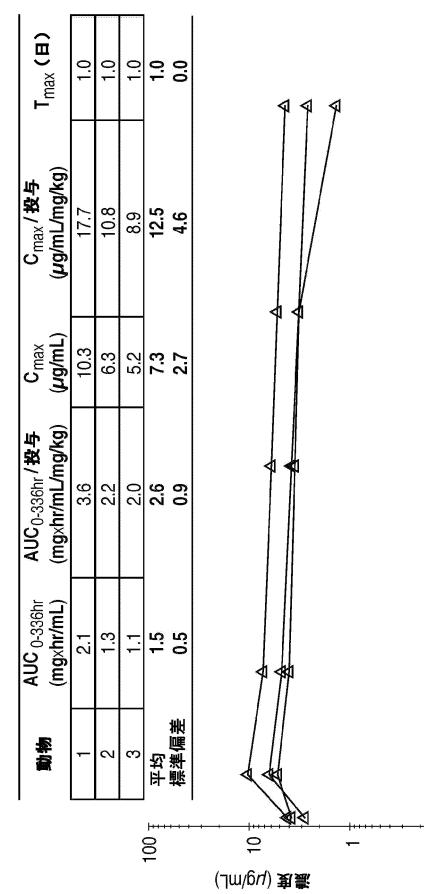


FIGURE 24A

【図 24B】

ルイスラット(群B)において20% 8アーモPEG-AC/-SH(10kDa, 1:1)製剤を投与してから1A後のABT-308の血清暴露—個々の動物

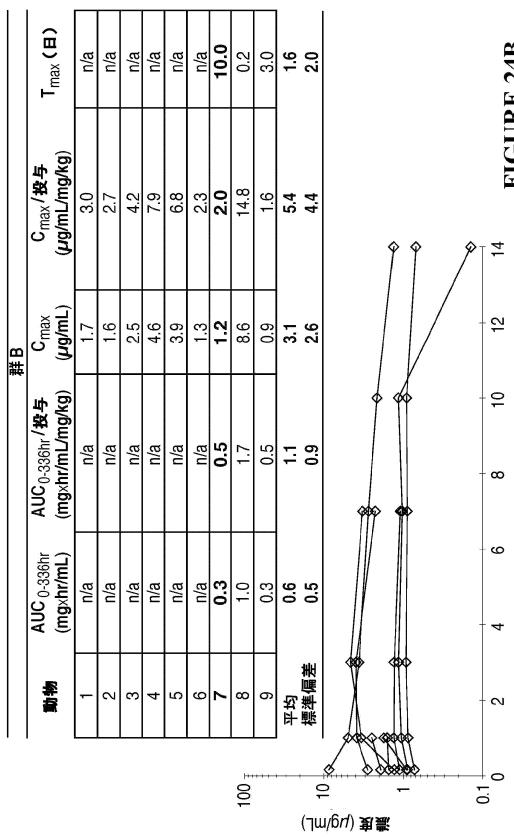


FIGURE 24B

【図 24C】

ルイスラット(群C)において20% 8アーモPEG-AC/-SH(10kDa, 1:1)製剤を投与してから1A後のABT-308の血清暴露—個々の動物

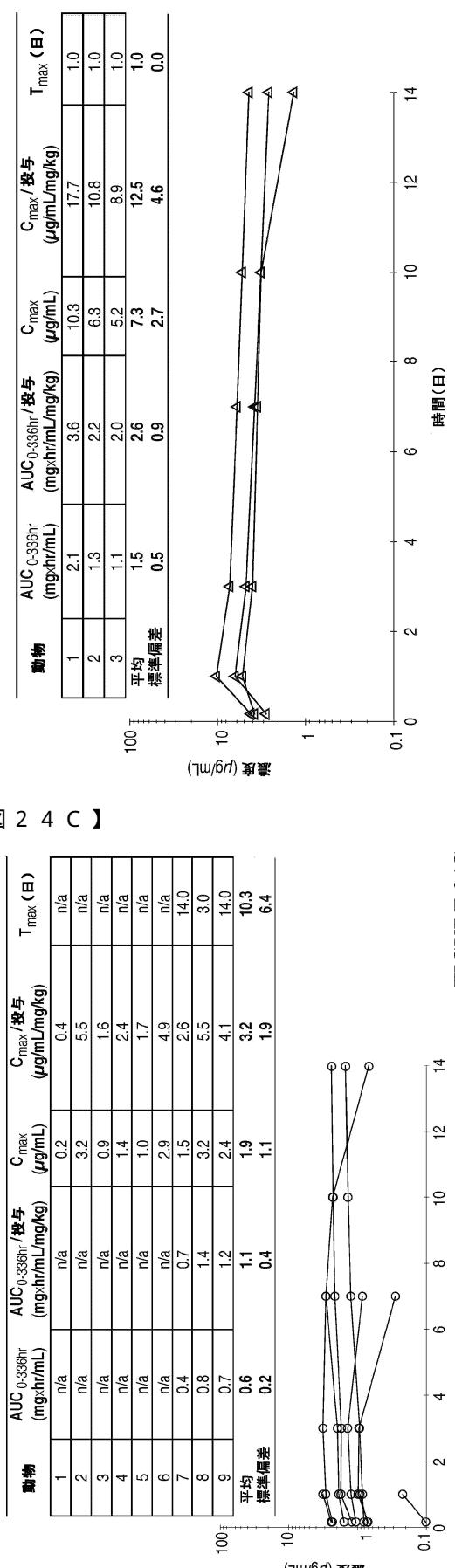


FIGURE 24C

【図 24D】

ルイスラットにおいて20% 8アーミュPEG-AC/-SH(10kDa, 1:1) 製剤を投与してから1A後のABT-308の血清暴露量-個々の動物

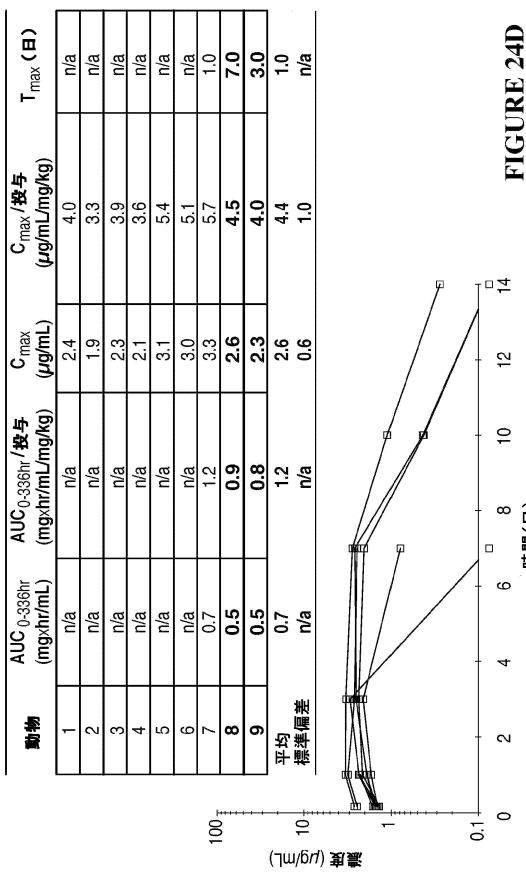


FIGURE 24D

【図 24E】

ルイスラットにおいて20% 8アーミュPEG-AC/-SH(10kDa, 1:1) 製剤を投与してから1A後のABT-308の血清暴露量-個々の動物

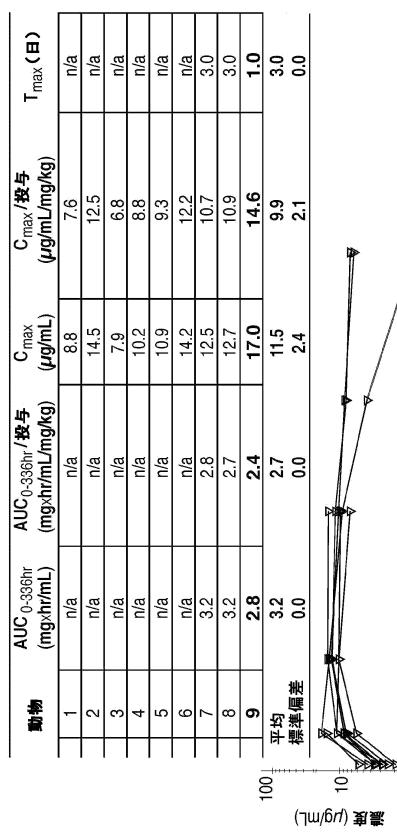


FIGURE 24E

【図 25】

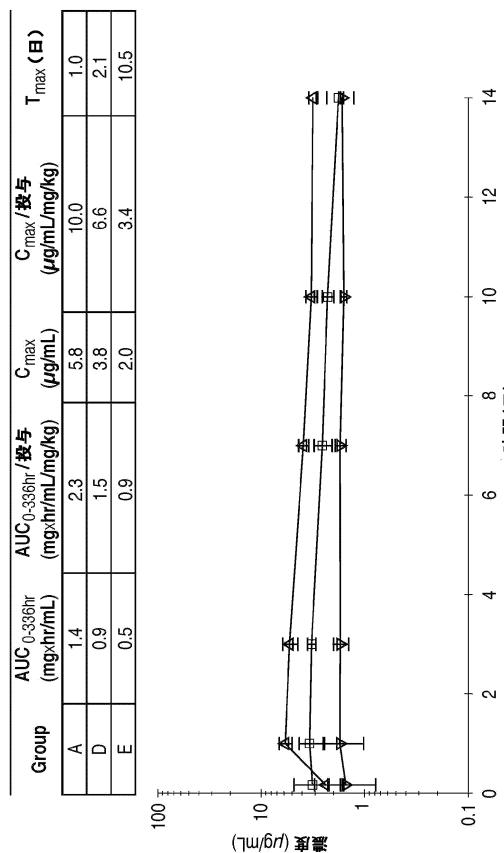


FIGURE 25

【図 26A】

ルイスラットにおいて10% 8アーミュPEG-AC/-SH(10kDa, 1:1) 製剤を投与してから1A後のABT-308の血清及び滑液暴露量-個々の動物

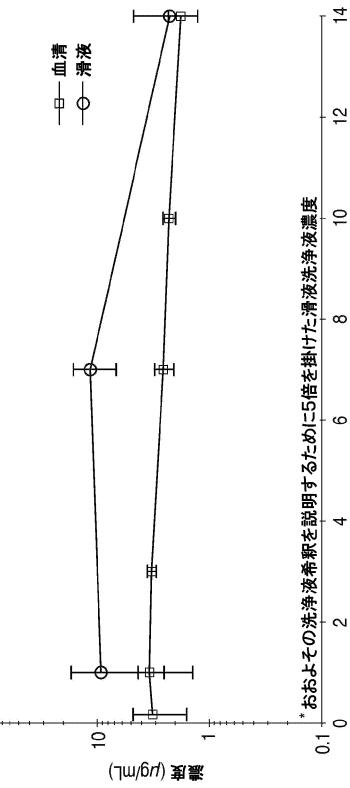


FIGURE 26A

\* おおよその洗浄液希釈を説明するために5倍を掛けた滑液洗浄液濃度

【図 26B】

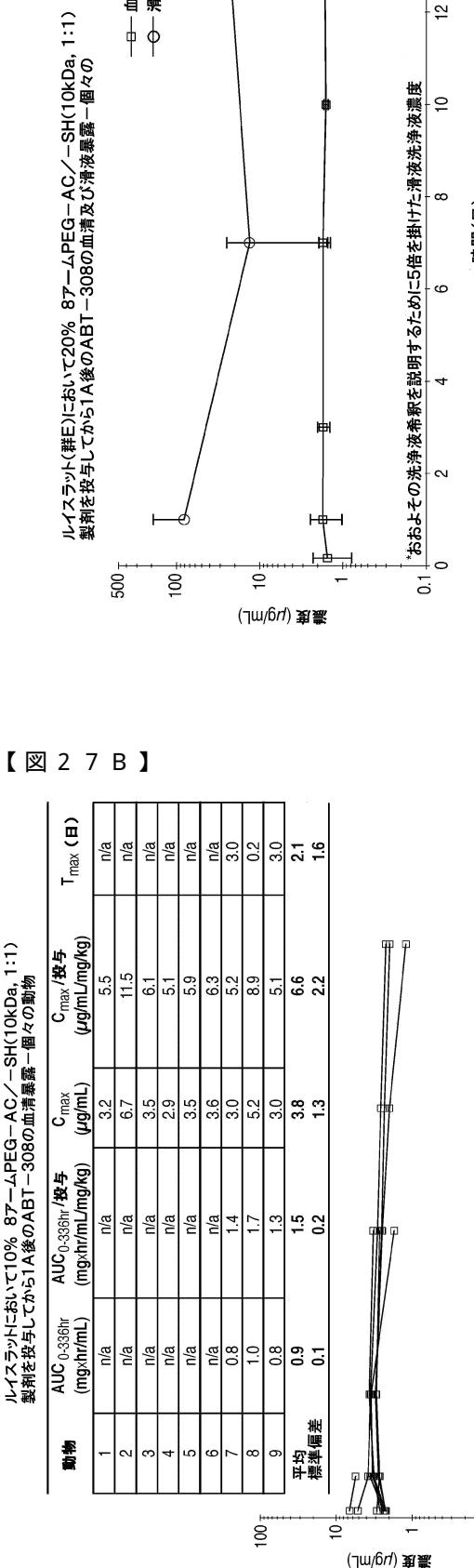


FIGURE 26B

【図 27A】

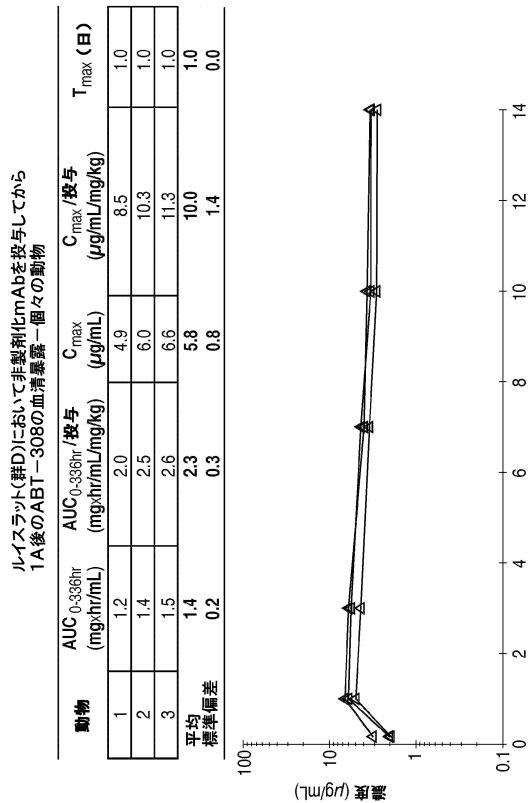
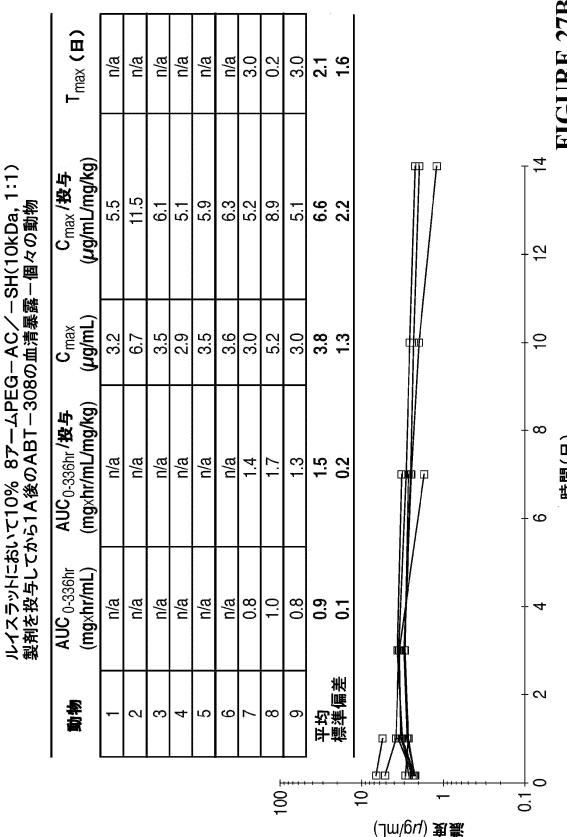


FIGURE 27A

【図 27B】



【図 27C】

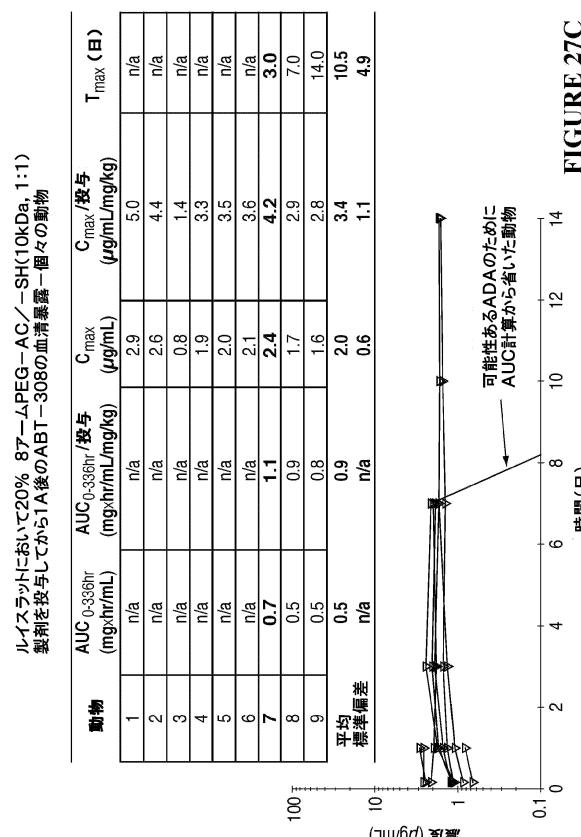
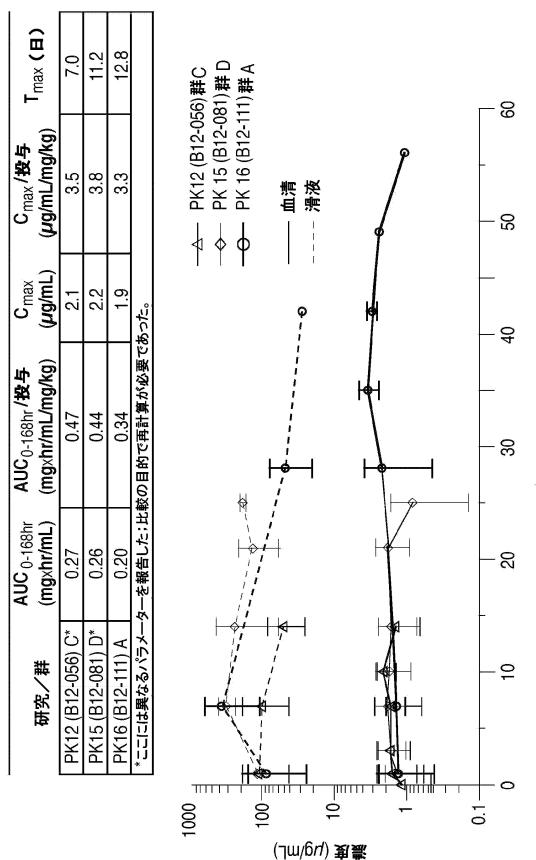


FIGURE 27C

【図 28】



【図 29】

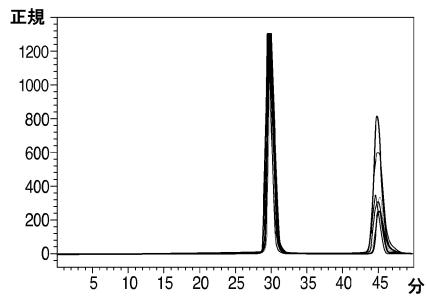


FIGURE 29

FIGURE 28

【図 30】

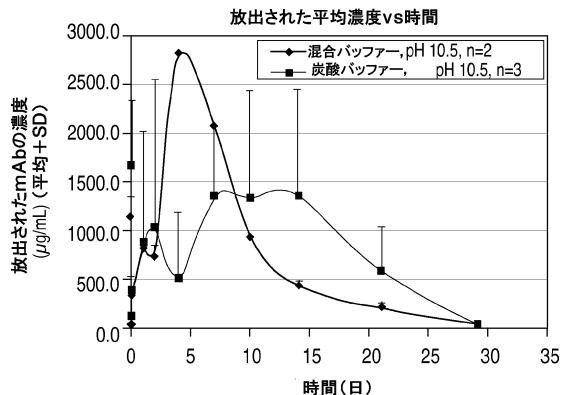


FIGURE 30

【図 31】

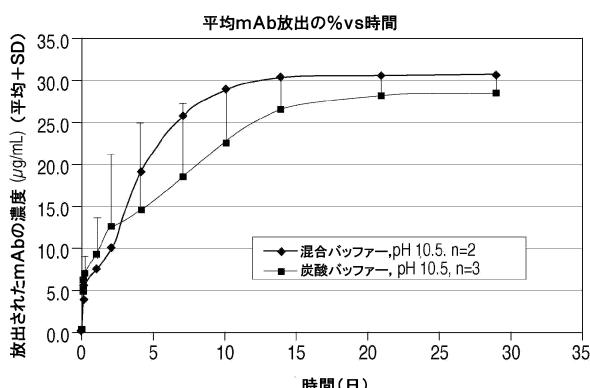


FIGURE 31

【図 33】

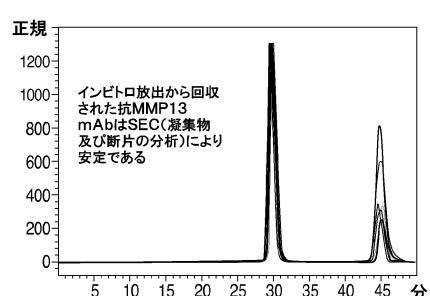


FIGURE 33

【図 32】

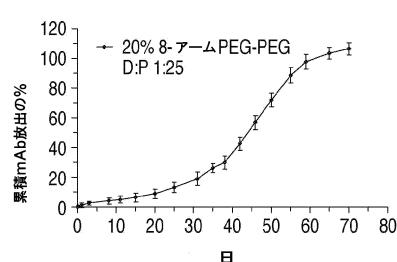


FIGURE 32

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 K 9/08 (2006.01) A 6 1 K 9/08  
A 6 1 P 19/02 (2006.01) A 6 1 P 19/02

(72)発明者 スタンクス, ジョン  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・95008、キャンベル、ラモント・コート・635  
(72)発明者 スー, ジェイムス  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94066、サン・ブルーノ、ウィットマン・ウェイ・216  
1、アパートメント・8  
(72)発明者 ホッサイニー, シード  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94544、ヘイワード、ベロウ・ビュー・プレイス・298  
85  
(72)発明者 スミス, ジョシュア, タケシ  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・95008、キャンベル、シャムロック・ドライブ・1082  
(72)発明者 アスカー, シャディド  
アメリカ合衆国、テキサス・78681、ラウンド・ロック、ファーン・ブラフ・アベニュー・8  
227

審査官 横田 優子

(56)参考文献 特表2008-530204 (JP, A)  
米国特許出願公開第2001/0053548 (US, A1)  
Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 2012, Vol.99, p.38-44  
Biomaterials, 2003, Vol.24, p.11-18  
Biomacromolecules, 2006, Vol.7, p.2790-2795  
第61回高分子学会年次大会予稿集, 2012, p.1618(3G15)  
Chem Commun, 2012, Vol.48, p.10289-10291

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 39/00  
A 6 1 K 9/00  
A 6 1 K 47/00  
A 6 1 P  
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDream III)  
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)