

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-249085

(P2006-249085A)

(43) 公開日 平成18年9月21日(2006.9.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	4 C O 7 6
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	4 C O 8 5
A 6 1 K 47/16 (2006.01)	A 6 1 K 47/16	4 H O 4 5
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	

審査請求 未請求 請求項の数 25 O L 外国語出願 (全 161 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-56870 (P2006-56870)	(71) 出願人	504396379
(22) 出願日	平成18年3月2日 (2006.3.2)		ファルマシア・アンド・アップジョン・カンパニー・エルエルシー
(31) 優先権主張番号	60/659, 766		アメリカ合衆国ミシガン州49001-0199, カラマズー, ポーティジロード7000
(32) 優先日	平成17年3月8日 (2005.3.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	60/728, 165		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成17年10月19日 (2005.10.19)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	60/752, 712	(74) 代理人	100087871
(32) 優先日	平成17年12月20日 (2005.12.20)		弁理士 福本 積
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087413
(31) 優先権主張番号	60/762, 456		弁理士 古賀 哲次
(32) 優先日	平成18年1月26日 (2006.1.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プラットホーム抗体組成物

(57) 【要約】

【課題】新規プラットホーム抗体組成物の提供。

【解決手段】本発明は、キレート剤を含んでなるヒト I g G₂ 抗体の新規な組成物を提供する。本発明はまた、改良された化学的および／または物理的安定性を示す、新規な抗体組成物も提供する。また、ヒト I g G₂ 抗体の組成物による、炎症性疾患および新生物障害を含めた疾病および症状の治療法も提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 種のヒト IgG₂ 抗体およびキレート化剤を含む組成物。

【請求項 2】

該組成物が液状医薬組成物であり、該抗体がシグナル配列を含まない、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

該組成物が EDTA である少なくとも 1 種のキレート化剤を含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 4】

該組成物がさらにバッファーを含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 5】

該組成物が EDTA である少なくとも 1 種のキレート化剤を含み、さらにヒスチジンである少なくとも 1 種のバッファーを含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 6】

該組成物がさらにバッファーおよび界面活性剤を含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 7】

該組成物がさらにバッファー、界面活性剤、および等調化剤を含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 8】

該組成物が EDTA である少なくとも 1 種のキレート化剤を含み、さらにバッファー、界面活性剤、および等調化剤を含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 9】

該組成物が EDTA である少なくとも 1 種のキレート化剤を含み、さらにヒスチジン、界面活性剤、および等調化剤を含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 10】

該組成物が EDTA である少なくとも 1 種のキレート化剤を含み、さらにヒスチジン、ポリソルベート 80、および等調化剤を含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 11】

該組成物が、

約 0.1 mg/ml ないし約 200 mg/ml の抗体；

約 0.001 ミリモルないし約 5.0 ミリモルのキレート化剤；および

約 1 mM ないし約 100 mM のヒスチジンを含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 12】

該組成物が、

約 1 mg/ml ないし約 200 mg/ml の抗体；

約 0.01 ミリモルないし約 5.0 ミリモルの EDTA；および

約 1 mM ないし約 100 mM のヒスチジンを含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 13】

該組成物が、

約 1 mg/ml ないし約 200 mg/ml の抗体；

約 0.01 ミリモルないし約 1.0 ミリモルのキレート化剤；

約 1 mM ないし約 100 mM のバッファー；

約 0.01 mg/ml ないし約 10 mg/ml の界面活性剤；および

約 100 ミリモルないし約 400 ミリモルの等調化剤を含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 14】

該組成物が、

約 1 mg/ml ないし約 200 mg/ml の抗体；

約 0.01 ミリモルないし約 1.0 ミリモルの EDTA；

約 1 mM ないし約 100 mM のバッファー；

10

20

30

40

50

約 0.01 mg/ml ないし約 10 mg/ml の界面活性剤；および
約 100 ミリモルないし約 400 ミリモルの等調化剤を含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 15】

該組成物が、
約 1 mg/ml ないし約 200 mg/ml の抗体；
約 0.01 ミリモルないし約 1.0 ミリモルの EDTA；
約 1 mM ないし約 100 mM のヒスチジン；
約 0.01 mg/ml ないし約 10 mg/ml の界面活性剤；および
約 100 ミリモルないし約 400 ミリモルの等調化剤を含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 16】

該組成物が、
約 1 mg/ml ないし約 200 mg/ml の抗体；
約 0.01 ミリモルないし約 1.0 ミリモルの EDTA；
約 1 mM ないし約 100 mM のヒスチジン；
約 0.01 mg/ml ないし約 10 mg/ml のポリソルベート 80；および
約 100 ミリモルないし約 400 ミリモルの等調化剤を含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 17】

該組成物が、
約 1 mg/ml ないし約 200 mg/ml の抗体；
約 0.01 ミリモルないし約 1.0 ミリモルの EDTA；
約 1 mM ないし約 100 mM のヒスチジン；
約 0.01 mg/ml ないし約 10 mg/ml のポリソルベート 80；および
約 100 ミリモルないし約 400 ミリモルのトレハロースを含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 18】

少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体およびキレート化剤を含有してなる組成物であって、該組成物が約 40℃ の温度で、少なくとも約 26 週間、該組成物を安定化するための十分な量のキレート化剤を含む、組成物。

【請求項 19】

少なくとも 1 種のヒト IgG2 モノクローナル抗体および医薬的に許容し得るキレート化剤を含有してなる液状医薬組成物であって、該組成物中の抗体のモル濃度が約 0.0006 ミリモルないし約 1.35 ミリモルの範囲であり、キレート化剤のモル濃度が約 0.003 ミリモルないし約 50 ミリモルの範囲であり、この場合の抗体とキレート化剤のモル比が約 0.00001 ないし約 2000 の範囲である前記組成物。

【請求項 20】

抗体とキレート化剤のモル比が約 0.01 ないし約 500 の範囲である、請求項 19 記載の組成物。

【請求項 21】

抗体とキレート化剤のモル比が約 0.05 ないし約 100 の範囲である、請求項 19 記載の組成物。

【請求項 22】

抗体とキレート化剤のモル比が約 0.1 ないし約 10 の範囲である、請求項 19 記載の組成物。

【請求項 23】

抗体とキレート化剤のモル比が約 0.5 ないし約 4 の範囲である、請求項 19 記載の組成物。

【請求項 24】

該組成物がさらに約 1 ミリモルないし約 100 ミリモルの範囲のモル濃度のヒスチジンを含む、請求項 19 記載の組成物。

【請求項 25】

少なくとも1種のヒトIgG2抗体溶液と、少なくとも1種のキレート化剤とを混合することを特徴とする液状ヒトIgG2医薬組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連特許および特許出願のクロス・リファレンス

本出願は米国仮特許出願番号60/659,766号(2005年3月8日出願)、米国仮特許出願番号60/728,165号(2005年10月19日出願)、米国仮特許出願番号60/752,712号(2005年12月20日出願)、および米国仮特許出願番号60/762,456号(2006年1月26日出願)の利益を請求する；これらのすべてはその全体を参照により本明細書の一部とする。 10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

近年、バイオテクノロジーの進歩は治療に適用し得る様々な抗体薬物の生産を可能としている。数種の抗体薬物が多く異なる疾患と障害の診断、予防、および処置に使用するために開発されている。しかし、抗体は伝統的な無生物薬物よりも大きく、またより複雑(すなわち、複雑な三次元構造に加えて、複数の官能基を保持する)なため、かかる抗体の組成物は特別の問題をもたらす。例えば、抗体を成功裏に市場に出すためには、その製品は長期間適切な安定性をもたねばならない。安定な抗体投薬の形状を開発することは、 20
他のタンパク質組成物同様に、抗体組成物が長期にわたる組成物中の抗体の物理的・化学的分解に関して同じ懸念下にあるため、重大なチャレンジとなる。

【0003】

物理的分解は高次タンパク質構造(二次、三次および四次)における変化であり、タンパク質の共有結合の変化は含まない。物理的分解の例は、凝集、断片化、吸着、変性、および沈降などである。それに対して、化学的分解はタンパク質の一次構造が結合の形成または切断で変化することであり、それによって新しい化学因子を生じることである。化学的分解の例は、脱アミド、ラセミ化、異性化、ベータ脱離、ジスルフィド交換および加水分解などである。一方、技術的に異なる物理的・化学的分解はしばしば相互に関係をもつ。例えば、部分的に変性したタンパク質(物理的に分解した)は酸化(化学的分解)を受け易くなる。一般に、抗体組成物は期待される範囲の貯蔵および使用条件下で許容し得る化学的・物理的安定性を示すべきである；すなわち、十分な貯蔵期限をもち、なお生物活性を保持すべきである。 30

【0004】

ヒトでの使用を企図する多くの抗体製剤は、変性、凝集および他の変化を予防するために、製剤の使用に先立ち、タンパク質に様々な安定剤を加える必要がある。この不安定性は抗体製剤を長期間保存した場合、および輸送に際し、しばしば増大する。

【0005】

例えば、米国公開出願番号20050059113号は、ヒトIgG2抗-M-CSF抗体、20mM酢酸ナトリウム、および140mM塩化ナトリウムを含有する組成物(pH5.5)を報告している。 40

米国特許第6,682,736号はリン酸バッファー塩溶液中にヒトIgG2抗-CTLA-4抗体を含有する組成物を報告している。

国際特許出願番号PCT/US2005/000370は、ヒトIgG2抗-MAdCAM抗体、20mM酢酸ナトリウム、0.2mg/mlポリソルベート80、および140mM塩化ナトリウム(pH5.5)を含有する組成物を報告している。

【0006】

WO2004007520は、酸化に脆弱なタンパク質が該タンパク質を保護するためのDTPA、EGTAおよび/またはDEFなどの選択した金属キレート化剤により製剤化し得ることを報告している。しかし、WO2004007520は、金属キレート化剤 50

E D T A の添加が製剤化したタンパク質に対する酸化損傷およびその凝集を事実上増大させた」と記している。

W O 2 0 0 3 0 3 9 4 8 5 は、1 0 0 m g / m l のヒト化 I g G 1 抗 - I L - 2 抗体、5 0 m M のヒスチジン、1 1 5 m M の塩化ナトリウム、0 . 0 3 % T w e e n (登録商標) 8 0、および 0 . 0 5 % E D T A (p H 6 . 0) を含有する水性組成物を報告している。

【0 0 0 7】

W O 9 7 / 4 5 1 4 0 は、1 0 0 m g / m l の抗 - C D 4 抗体、1 0 0 m M のクエン酸ナトリウム、および 0 . 0 5 m M の E D T A (p H 6 . 0) を含有する水性組成物を報告している。

10

米国公開出願番号 2 0 0 4 0 1 9 1 2 4 3 号は、1 0 0 m g / m l のヒト I g G 2 抗 - I L 8 抗体、4 0 m M のヒスチジン、4 0 m M のアルギニン、1 5 0 m M のスクロース、および 0 . 0 4 % ポリソルベート 2 0 を含有する水性組成物を報告している。

米国特許第 6, 2 6 7, 9 5 8 号は、1 0 0 m g / m l のヒト化 I g G 1 抗体、2 0 m M のヒスチジン、3 4 0 m M のスクロース、0 . 0 4 % ポリソルベート 2 0、および 0 . 9 % ベンジルアルコール (p H 6 . 0) を含有する再構築組成物を報告している。

【0 0 0 8】

米国特許第 6, 1 7 1, 5 8 6 号は、2 5 m g / m l のヒト化 I g G 1 抗 - C D 2 0 抗体、2 5 m M アセテート、1 5 0 m M のトレハロース、0 . 9 % ベンジルアルコール、および 0 . 0 2 % ポリソルベート 2 0 (p H 5) を含有する水性抗体組成物を報告している。

20

米国特許第 5, 6 5 4, 4 0 3 号は、ヒト化 I g G 1 抗 - C D 5 2 抗体、リン酸バッファ塩溶液、および 0 . 0 5 m M ないし 5 m M の銅イオンのキレート化剤を含有する液状組成物を報告している。

【0 0 0 9】

従って、抗体薬組成物開発の主目的は、タンパク質の安定性、溶解性、および生物活性を維持することにある。抗体製品を製造するために必要な時間と資源を仮定すれば、製品のロスを減少させる組成物が望ましい。従って、本出願は、文献にすでに開示された抗体組成物に比べて、改善された化学的および／または物理的安定性を示す新規抗体組成物を開示する。

【発明の開示】

30

【0 0 1 0】

要約

一態様において、本発明は少なくとも 1 種のヒト I g G₂ 抗体およびキレート化剤とを含有してなる組成物を提供する。

本発明はまた少なくとも 1 種のモノクローナル・ヒト I g G 2 抗体およびキレート化剤とを含有してなる組成物であって、該組成物が約 4 0 °C の温度で少なくとも約 2 6 週間維持したときに、その組成物を安定化するために十分な量のキレート化剤を含有してなる組成物を提供する。

【0 0 1 1】

本発明は少なくとも 1 種のヒト I g G 2 モノクローナル抗体および医薬的に許容し得るキレート化剤とを含有してなる液状医薬組成物であって、その抗体のモル濃度が約 0 . 0 0 0 6 ミリモルないし約 1 . 3 5 ミリモルの範囲であり、またキレート化剤のモル濃度が約 0 . 0 0 3 ミリモルないし約 5 0 ミリモルの範囲であり、さらに抗体とキレート化剤との比が約 0 . 0 0 0 0 1 ないし約 4 5 0 の範囲である組成物を提供する。

40

本発明はまた少なくとも 1 種のヒト I g G 2 抗体溶液と、少なくとも 1 種のキレート化剤とを混合することの特徴とする液状ヒト I g G 2 医薬組成物の製造法を提供する。

【0 0 1 2】

本発明はまた少なくとも 1 種のモノクローナル・ヒト I g G 2 抗体およびキレート化剤とを含有してなる安定な組成物であって、該組成物を約 4 0 °C の温度に約 2 4 週間保存した後の、モノクローナルヒト I g G 2 抗体およびキレート化剤とを含有してなる安定な液

50

状医薬組成物の凝集塊クロマトグラムのピーク面積と、40℃の温度に約24週間保存したキレート化剤を欠く以外は同一である組成物の凝集塊クロマトグラムのピーク面積との間の減少が、少なくとも約2%である組成物を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

発明の詳細な説明

本発明の方法および技術は技術上周知の常套的方法に従い、また特に断りのない限り、本明細書全般で引用し、考察した種々の一般的小およびより具体的文献に記載されているように、一般に実施する。参照例：Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); and Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992); and Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)。酵素反応および精製法は、製造業者の説明書に従い、技術上一般に実施されるように、または本明細書に記載されているよう実施する。本明細書に記載の分析化学、合成有機化学、および医学薬学化学に関連して使用される用語、およびそれらの実験室手法と技法は、技術上周知の、また共通して使用されるものである。化学合成、化学分析、医薬製剤、組成物、および被験対象への引渡しおよび処置については標準的技法が使用される。

【0014】

定義

以下の詳細な説明を読者が理解するようにするために、以下の定義を提供する：

本明細書にて使用する場合、「抗体」という用語は、未処理抗体または特異結合する未処理抗体と競合する抗原結合部分をいう。一般参照文献：Fundamental Immunology, Ch.7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)。抗原結合部分は組換えDNA技法により、または未処理抗体の酵素もしくは化学的切断により産生し得る。一部の態様において、抗原結合部分は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、および相補性決定領域(CDR)フラグメント、一本鎖抗体(scFv)、キメラ抗体、ジアボディ(diabody)、およびポリペプチドに特異的抗原を結合させるに十分な抗体の少なくとも一部を含むポリペプチドなどである。N-末端からC-末端まで、成熟軽鎖および重鎖の可変ドメインは共に、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4の領域を含んでなる。各ドメインに対するアミノ酸の割り振りは、文献(Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (国立保健研究所、ベセスダ、メリーランド(1987 and 1991)), Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987), or Chothia et al., *Nature* 342: 878-883 (1989))の定義に従う。

【0015】

一部の態様において、抗体は一本鎖抗体(scFv)であり、そのV_LおよびV_Hドメインは一本のタンパク鎖を形成し得るような合成リンカーを介して対合し、一価の分子を形成する。(Bird et al., *Science* 242: 423-426 (1988) and Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883 (1988))。一部の態様において、抗体はジアボディ、すなわち、二価の抗体であり、そのV_HとV_Lドメインは一本のポリペプチド鎖上に発現するが、同じ鎖上の2つのドメイン間で対合し得るには短すぎるリンカーを使用しているために、該ドメインが別の鎖の相補的ドメインと対合せざるを得なくなり、2つの抗原結合部位を創出する。(参照例:Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993); and Poljak R.J. et al., *Structure* 2: 1121-1123 (1994))。一部の態様において、本発明抗体からの1種以上のCDRは、共有結合により、または共有結合によらずに分子内に取り込ませ、所望のヒト抗原に特異的に結合する免疫アドヘシンとすることができる。かかる態様において、CDRはより大きなポリペプチド鎖の一部として取り込むことが可能であるか、共有結合により他のポリペプチド鎖に連結し得るか、または共有結合によらずに取り込むことができる。シグナルポリペプチドを同定するDNA配列は、本明細書の配列アイデンティファイアー(配列番号)により同定し得るが、抗体ではシグナルポ

リペプチドが一般に翻訳後の修飾に際して除去されるため、シグナルポリペプチドを含まない。本発明の種々の態様において、ヒト IgG2 抗体の重鎖および軽鎖の一方または両方は、シグナル配列（またはシグナル配列の一部）を含む。本発明の他の態様においては、ヒト IgG2 抗体の重鎖も軽鎖もシグナル配列を含まない。

【0016】

本明細書にて使用する場合、番号により言及する抗体は、同じ番号のハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体と同じものである。例えば、モノクローナル抗体 8.10.3F は、ハイブリドーマ 8.10.3F から得られるものと同じ抗体である。従って、モノクローナル抗体 8.10.3F は、ハイブリドーマ 8.10.3F から得られるものと同じ重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する。従って、抗体 8.10.3F というときは、配列番号 2 および 4 にそれぞれ示す重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する抗体を含む。これは、通常、製造に際して抗体の一部が失われているため、重鎖上の末端リジンを欠く抗体も包含する。

【0017】

本明細書にて使用する場合、Fd フラグメントは V_H および C_H1 からなる抗体フラグメントを意味する；Fv フラグメントは抗体の一本の腕の V_L および V_H ドメインからなる；また、dAb フラグメント (Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)) は V_H ドメインからなる。

本明細書にて使用する場合、「ポリペプチド」という用語は、未変性の、もしくは人工のタンパク質、タンパク質フラグメントおよびタンパク質配列のポリペプチド類似体を包含する。ポリペプチドはモノマーであっても、ポリマーであってもよい。

【0018】

「またはその抗原結合部分」という用語は、これを用語「抗体」と共に使用する場合、アミノ末端および／またはカルボキシ末端欠失をもつポリペプチドであるが、残りのアミノ酸配列が天然産配列の対応する位置と同じであるポリペプチドをいう。一部の態様において、その抗原結合部分とはアミノ酸の長さが少なくとも 14 個、少なくとも 20 個、少なくとも 50 個、または少なくとも 70、80、90、100、150 個または少なくとも 200 個のものである。

【0019】

本明細書にて使用する場合、「特異的に結合し得る」という用語は、抗体が抗原に結合する場合、解離定数が $\leq 1 \mu M$ 、好ましくは $\leq 1 nM$ 、および最も好ましくは $\leq 10 pM$ であることをいう。特定の態様において、 K_D は $1 pM$ ないし $500 pM$ である。他の態様において、 K_D は $500 pM$ ないし $1 \mu M$ である。他の態様において、 K_D は $1 \mu M$ ないし $100 nM$ である。他の態様において、 K_D は $100 mM$ ないし $10 nM$ である。

【0020】

本明細書にて使用する場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる 1 抗体、すなわち、該集団を構成する個々の抗体をいうが、ただし、少量存在し得る自然界で生じる可能性のある当然変異または C 末端リジンの欠失は例外とする。モノクローナル抗体は高特異性であり、単一の抗原部位に向けられる。さらに、常套の（ポリクローナル）抗体調製と対照的に、各モノクローナル抗体は抗原の単一の抗原決定基に向けられる；ポリクローナル抗体は典型的に異なる抗体を含み、異なる抗原決定基（エпитープ）に向けられる。モデファイア「モノクローナル」とは実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の性質を意味し、特定の方法による抗体の製造を必要とするものと解釈されるものではない。例えば、本発明に従い使用されるべきモノクローナル抗体はコーラーら (Kohler et al., Nature 256:495 (1975)) が最初に記載したハイブリドーマ法により作製し得るか、または組換え DNA 法（参照：米国特許第 4,816,567 号）により作製し得る。「モノクローナル抗体」はまたファージ抗体ライブラリーから、例えば、文献 (Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) and Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)) 記載の技法により単離し得る。

【0021】

「単離タンパク質」、「単離ポリペプチド」または「単離抗体」という用語は、その由来の起源または出所によって、以下の４項目を有するタンパク質、ポリペプチドまたは抗体である：（１）その本来の状態においては、それを伴う天然関連成分と会合していない；（２）同じ種からの他のタンパク質を含まない；（３）異なる種からの細胞が発現する；または（４）自然界に存在しない。従って、化学的に合成されるか、または本来起源とする細胞とは異なる細胞系で合成されるポリペプチドは、その天然関連成分から単離されることとなる。単離されたタンパク質／抗体は、技術上周知のタンパク質精製法を用いる単離により、天然関連細胞成分を実質的に含まないものとし得る。

【００２２】

単離／精製抗体の例は、ヒト IgG2 抗体、例えば、抗-CTLA-4 抗体であり、このものは CTLA-4 などの抗原を用いてアフィニティ精製したもの、および／またはハイブリドーマまたは他の細胞株により合成した抗-CTLA-4 抗体、および／またはトランスジェニックマウスから誘導されるヒト抗-CTLA-4 抗体である。従って、好適な態様において、抗-CTLA-4 抗体は少なくとも約 95% の純度を有し（w/w-抗-CTLA-4 抗体重量／医薬的に許容し得る賦形剤以外の成分重量）、さらなる態様において、抗-CTLA-4 抗体は約 95% w/w ないし約 99.5% w/w の純度を有する。

【００２３】

抗体はサンプルの少なくとも約 60～75% が単一種の抗体を有する場合、それは「実質的に純粋」であるか、「実質的に均一」であるか、または「実質的に精製」されている。抗体はモノマーでもマルチマーでもよい。実質的に純粋な抗体は一般的に、抗体サンプルの約 50%、60%、70%、80% または 90% w/w を構成し、より一般的には約 95%、好ましくは 99% 以上の純度である。抗体の純度または均一性は多くの周知の技術手段により示すことが可能であり、例えば、抗体サンプルをポリアクリルアミドゲル電気泳動に付し、次いで、技術上周知の染色剤によりゲルを染色して単一のポリペプチドバンドを可視化する。特定の目的のために、HPLC またはその他の技術上周知の精製手段を用いることにより、高分解を達成することができる。

【００２４】

本明細書にて使用する場合、「ヒト抗体」という用語は、ヒトの生殖系列免疫グロブリン配列から誘導される可変領域および定常領域をもつ抗体を含めることを意図する。本発明のヒト抗体は、ヒトの生殖系列免疫グロブリン配列、例えば、CDR、特に CDR3、がエンコードしないアミノ酸配列を含み得る（例えば、無作為もしくは部位特異的インビトロ変異誘発によるか、または体細胞インビボ突然変異により導入される突然変異）。しかし、「ヒト抗体」という用語は、本明細書にて使用する場合、マウスなど他の哺乳動物種の生殖系列から誘導される CDR 配列がヒト枠組み配列に移植されている抗体を含めようとするものではない。

【００２５】

本明細書にて使用する場合、「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段により調製、発現、創出または単離するヒト抗体のすべてを包含するものとする；例えば、宿主細胞に形質移入した組換え発現ベクターを用いて発現した抗体、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離した抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子を導入した動物（例えば、マウス）から単離した抗体（参照例：Taylor, L.D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295）、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他の DNA 配列にスプライスすることからなる他の手段により調製、発現、創出または単離される抗体である。かかる組換えヒト抗体は、ヒトの生殖系列免疫グロブリン配列から誘導される可変領域および定常領域をもつ。しかし、特定の態様においては、かかる組換えヒト抗体はインビトロの突然変異誘発（または、ヒト Ig 配列を遺伝子導入した動物を使用する場合は、インビボ体細胞突然変異）に付され、従って、組換え抗体の V_H および V_L 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列の V_H および V_L 配列から誘導され、関連するものではあるが、ヒト抗体生殖系列のインビボレパートリー内に当然に存在し得るものではない。

【0026】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンもしくはT細胞レセプターに特異的に結合し得るか、またはさもなくばある分子と相互作用し得るタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は、一般にアミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基形成からなり、一般に特異的三次元構造特性ならびに特異的電荷特性を有する。エピトープは「線状」または「立体配座」であり得る。線状エピトープでは、タンパク質とその相互作用分子（抗体など）間の相互作用点のすべてが、タンパク質の一次アミノ酸配列に沿って直線的に生じる。立体配座エピトープでは、相互作用点が互いに分離するタンパク質上のアミノ酸残基にまたがって生じる。

【0027】

本明細書にて使用する場合、「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、本明細書では相互に使用され、長さが少なくとも10塩基のヌクレオチドのポリマー形状、すなわち、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドであるか、または両タイプのヌクレオチドの修飾形状を意味する。この用語は一本鎖および二本鎖の形状を包含する。「ポリヌクレオチド」または「核酸」配列は、特に断りのない限り、その相補鎖も包含する。従って、特定の配列をもつ核酸について言及する場合、それはその相補性配列をもつ相補鎖も包含すると理解すべきである。

【0028】

本明細書にて使用する場合、「単離ポリヌクレオチド」または「単離核酸」という用語は、ゲノム、cDNA、または合成起源もしくはそのある種の組合わせのポリヌクレオチドを意味し、その誘導の起源または出所により、単離ポリヌクレオチドは以下の1ないし3の項目を有する：（1）自然状態で「単離ポリヌクレオチド」と共に見出されるポリヌクレオチドの全部または一部と会合していない；（2）自然状態では結合していないポリヌクレオチドに操作可能に結合する；または（3）より大きな配列の一部として自然状態では存在しない。

【0029】

本明細書にて使用する場合の「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然産および非天然産オリゴヌクレオチド結合により共につながった天然産および修飾ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは一般に長さが200個以下の塩基からなるポリヌクレオチドのサブセットである。好ましくは、オリゴヌクレオチドは長さが10～60個の塩基であり、好ましくは12、13、14、15、16、17、18、19、または20～40塩基の長さである。オリゴヌクレオチドは、例えば、プライマーおよびプローブ用には、通常一本鎖である；しかし、例えば、遺伝子変異体の構築に使用するオリゴヌクレオチドは二本鎖でよい。本発明のオリゴヌクレオチドはセンスまたはアンチセンス・オリゴヌクレオチドでもあり得る。

【0030】

本明細書にて使用する場合、「天然産ヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。「修飾ヌクレオチド」という用語は、本明細書にて使用する場合、修飾した、または置換基を有する糖基などをもつヌクレオチドを含む。本明細書にて引用する「オリゴヌクレオチド連鎖」という用語は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニラデート、ホスホロアミデートなどのオリゴヌクレオチド連鎖を含む。参照例：LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); 米国特許第5,151,510号;Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990)。オリゴヌクレオチドは、要すれば、検出用の標識を含み得る。

【0031】

本明細書にて使用する場合、「選択的にハイブリッド形成する」という用語は、検出可能に、また特異的に結合することを意味する。本発明によるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよびそのフラグメントは、ハイブリダイゼーションおよび洗浄（非特異的核酸に検出可能に結合する認知可能量を最少とする）条件下に核酸鎖に選択的にハイブリッド形成する。「高緊縮性」または「高緊縮性の」条件は、技術上既知の、本明細書で検討した選択的ハイブリダイゼーション条件を達成するために使用し得る。「高緊縮性」または「高緊縮性の」条件の一例は、ポリヌクレオチドと別のポリヌクレオチドとのインキュベーションであり、この場合、1ポリヌクレオチドを6×SSPEまたはSSC、50%ホルムアミド、5×デンハード試薬、0.5%SDS、100μg/mlの変性フラグメント化サケ精子DNAからなるハイブリダイゼーションバッファー中、膜などの固体表面に、42℃のハイブリダイゼーション温度で12～16時間貼着させ、次いで1×SSC、0.5%SDSからなる洗浄バッファーを用いて、55℃で2回洗浄する。上記、Sambrook et al., pp. 9.50-9.55も参照。

10

【0032】

ポリヌクレオチドに適用する場合、「実質的同一性」、「パーセント同一性」または「%同一」という用語は、第一の相接する配列を第二の相接する配列に比較し、最大に対応するように整列したときの残基のパーセントを意味する。配列同一性比較の長さは、少なくとも約9個のヌクレオチド、通常は少なくとも約18個のヌクレオチド、さらに通常は少なくとも約24個のヌクレオチド、典型的には少なくとも約28個のヌクレオチド、さらに典型的には少なくとも約32個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約36、48個またはそれ以上のヌクレオチドの伸張に及び得る。「実質的同一性」、「パーセント同一性」または「%同一」という用語は、ポリヌクレオチド分子を適切なヌクレオチド挿入もしくは欠失と共に、他のポリヌクレオチド分子（またはその相補性鎖）と直線状に整列した場合、FASTA、BLASTまたはギャップ（Gap）などの配列同一性の周知のアルゴリズムにより測定して、ヌクレオチド塩基の少なくとも約85%、好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%または99%にポリヌクレオチド配列同一性が存在することを意味する。技術上既知の多くの異なるアルゴリズムが存在し、それらはポリヌクレオチドの配列同一性を測定するために使用し得る。例えば、ポリヌクレオチド配列はFASTA、ギャップ、またはベストフィットなどを用いて比較し得る；これらはウィスコンシン・パッケージ・バージョン10.0 (Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin)のプログラムである。FASTAは、例えば、プログラムFASTA2およびFASTA3を含み、疑問とする配列と検索配列間の重なりが最善となる領域の整列およびパーセント配列同一性を提供する (Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84 (1998))。特に断りのない限り、特定のプログラムまたはアルゴリズムのためにデフォルト・パラメータを用いる。例えば、核酸配列間のパーセント配列同一性は、FASTAを用い、そのデフォルト・パラメータ（ワードサイズ6およびスコアリング・マトリックス用のNOPAMファクター）により、またはギャップを用い、GCGバージョン6.1に提供されているようなデフォルト・パラメータにより決定することができる；参照により本明細書の一部とする。

20

30

40

【0033】

ポリペプチドに適用する場合、「実質的同一性」、「パーセント同一性」または「%同一」という用語は、2種類のペプチド配列が、プログラムGAPまたはBESTFITによるなど、該プログラムが備えているように、デフォルト・ギャップ・ウェイトを用いて最適に整列させた場合、少なくとも70%、75%または80%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%または95%の配列同一性、そしてより好ましくは少なくとも97%、98%または99%の配列同一性を共有する。特定の態様において、一致しない残基の位置は同類アミノ酸置換により異なる。「同類アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似の化学的性質（例えば、電荷または疎水性）をもつ側鎖R基を有する別のアミノ酸残基に

50

置換わることである。一般に、同類アミノ酸置換はタンパク質の機能的性質を実質的に変化させない。2つ以上のアミノ酸配列が同類置換により互いに異なる場合、パーセント配列同一性は置換の保存的性質を訂正するために、上方調節することができる。これを調節する手段は当業者周知である。参照例：Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994)。化学的性質が類似する側鎖をもつアミノ酸群の例は：1) 脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン；2) 脂肪族ヒドロキシル側鎖：セリンおよびスレオニン；3) アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン；4) 芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン；5) 塩基性側鎖：リジン、アルギニン、およびヒスジン；6) 酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸；および7) イオウ含有側鎖：システインおよびメチオニン；である。同類アミノ酸置換群は、バリンーロイシンーイソロイシン、フェニルアラニンーチロシン、リジンーアルギニン、アラニンーバリン、グルタメートーアスパルテート、およびアスパラギンーグルタミンである。ポリペプチドの配列同一性は、一般に配列分析ソフトウェアを用いて判定する。タンパク質分析ソフトウェアは同一性評価を用いて配列を調和させ、種々の置換、欠失および他の修飾、例えば、同類アミノ酸置換などに割り振る。

10

【0034】

例えば、GCGは「ギャップ」および「ベネフィット」などのプログラムを含むが、このプログラムはプログラムにより特定したデフォルト・パラメータと共に用い、密接に関連するポリペプチド、例えば、異なる種の生体からの相同性ポリペプチド間、または野生型タンパク質とその突然変異体間の配列相同性または配列同一性を決定し得る。参照例：GCGバージョン6.1。ポリペプチド配列はデフォルトまたは推奨されたパラメータを用いるFASTAを用いて比較することができる。参照：GCGバージョン6.1. (ウィスコンシン大学WI) FASTA (例：FASTA2およびFASTA3) は問題の配列と検索配列間の最善の重なり領域の整列およびパーセント配列同一性を提供する (Pearson, *Methods Enzymol.*, 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000))。もう一つの好適なアルゴリズムは、異なる生体からの大量の配列を含むデータベースに本発明の配列を比較する場合のもので、コンピュータプログラムBLAST (ブラスト)、取分け、blastpまたはtblastnであり、該プログラムが提供するデフォルト・パラメータを使用する。参照例：Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschutl et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997)。相同性について比較したポリペプチド配列の長さは、一般に少なくとも約16個のアミノ酸残基であり、通常少なくとも約20残基、より一般的には少なくとも約24残基、典型的には少なくとも約28残基であり、好ましくは約35残基を超える。大量の異なる生体からの配列を含むデータベースを検索する場合には、アミノ酸配列を比較することが好ましい。

20

30

【0035】

「操作可能に連結する」配列は、対象遺伝子と相接する発現調節配列、および対象遺伝子を制御するためにトランスに、または距離をおいて作用する発現調節配列の両方を含む。本明細書にて使用する場合の「発現調節配列」という用語は、ポリヌクレオチド配列が連結するコーディング配列の発現とプロセッシングを実行するために必要なポリヌクレオチド配列を意味する。発現調節配列は適切な転写開始、終止、プロモーターおよびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどの効率的なRNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を上げる配列（すなわち、コザック・共通配列）；タンパク質安定性を高める配列；および必要な場合のタンパク質分泌を高める配列などである。かかる調節配列の性質は宿主生物により異なる；原核細胞では、かかる調節配列は一般にプロモーター、リボソーム結合部位、および転写終止配列を含む；真核細胞では、一般に、かかる調節配列はプロモーターおよび転写終止配列を含む。「調節配列」という用語は、少なくとも、存在することが発現とプロセッシングにとって必須であるすべての成分を包含し、また存在することが有利となるさらなる成分、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列をも包含する。

40

【0036】

50

本明細書にて使用する場合、「ベクター」という用語は核酸分子であって、それが連結する別の核酸を輸送し得る分子を意味する。一部態様において、ベクターはプラスミド、すなわち、環状二本鎖DNAループであり、そこに追加のDNAセグメントを連結し得る。一部の態様において、該ベクターはウイルスベクターであり、その場合、追加のDNAセグメントはウイルスゲノムに連結し得る。一部態様において、ベクターはベクターを導入した宿主細胞中で自律複製し得る（例えば、バクテリアの複製起源をもつバクテリアベクターおよび遺伝子副体哺乳動物ベクター）。他の態様において、ベクター（例えば、非遺伝子副体哺乳動物ベクター）は宿主細胞に導入することにより、宿主細胞のゲノムに組み込むことが可能であり、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらにある種ベクターは、それらが操作可能に結合する遺伝子の発現を指令し得る。かかるベクターは「組換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」）と本明細書ではいう。 10

【0037】

本明細書にて使用する場合、「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）という用語は、組換え発現ベクターを導入した細胞を意味する。「組換え宿主細胞」および「宿主細胞」は、特定の対象細胞のみならず、かかる細胞の子孫をも意味すると理解すべきである。突然変異または環境的影響のために次の代では特定の修飾が起こり得るので、かかる子孫は事実上親細胞に一致はしないが、本明細書で使用する場合の用語「宿主細胞」の範囲内になお含まれる。

【0038】

「治療有効量」とは所望の治療結果を達成するために必要な投与量および期間で有効な量をいい、炎症性疾患および異常増殖障害などの症状の処置または予防的防御を達成する量である。投与量の数値は軽快すべき症状の重篤度により変わり得ることに留意すべきである。さらに理解すべきことは、特定の被験対象に対しては個々の必要性および該組成物の投与を管理または監督する者の専門的判断に応じて、長期にわたり特定の投薬計画を調整すべきこと、また本明細書に示す投与量範囲は単なる例示であって、請求項記載の組成物の範囲または実践を制限しようとするものではないことである。同様に、抗体または抗体部分の治療有効量は、個体の病態、年齢、性別、および体重、個体において所望の応答を引き出す抗体または抗体部分の能力、および抗体組成物の所望の投与経路などのファクターにより変わり得る。また、治療有効量は、治療的に有益な作用が抗体または抗体部分の毒性作用または有害作用に勝る量を包含する。 20 30

【0039】

本明細書にて使用する場合、処置を目的とする「被験対象」という用語は、いずれの対象をも含み、好ましくは、炎症性または異常増殖障害の処置を必要とする被験対象である。予防目的の場合、被験対象はいずれの対象をも含み、好ましくは、炎症性または異常増殖障害の発症する危険があるか、または罹患し易い状態にある被験対象である。「被験対象」という用語は、生物体、例えば、原核細胞および真核細胞などを含むものである。被験対象の例は、哺乳動物、例えば、ヒト、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、マウス、ウサギ、ラット、および遺伝子導入非ヒト動物である。本発明の特定態様において、被験対象はヒトである。

【0040】

本明細書にて使用する場合、「異常増殖」および「異常増殖障害」という用語は、本明細書では相互に使用可能であって、正常増殖調節に対する反応性を失ったことから生じる新しい細胞の増殖、例えば、「新生物」細胞増殖をいう。異常増殖はまた本明細書においては「癌」という用語と相互に使用可能であって、本発明の目的とするものである；癌は異常増殖のサブタイプである。本明細書にて使用する場合、「異常増殖障害」という用語は、過形成、組織分化および形成異常などの他の細胞性異常をも包含する。用語の異常増殖、組織分化、形成異常および過形成とは本明細書において相互に使用可能であり、一般には異常な細胞増殖を経験する細胞についていう。 40

【0041】

本明細書にて使用する場合、「処置」という用語は治療処置および予防または防御的手 50

段をいい、その目的は標的とする病状または症状を予防または減退（軽減）させることである。処置を必要とするものは、すでにその症状をもつもの、ならびにその症状をもつ傾向のあるもの、またはその症状を防御すべきものである。

【0042】

本発明の要素または好適なその態様を導入する場合、不定冠詞および定冠詞はその要素が1つ以上あることを意味するものである。本明細書および請求項全体をとおして、用語「含んでなる」、「含有してなる」、「含有する」、「含む」および「有する」という用語は、包括的であるものとし、掲載した要素以外の要素も存在し得るものとする。

【0043】

ヒト I g G 2 抗体：

本発明によると、モノクローナルヒト I g G 2 抗体の安定性は、該抗体をエチレンジアミン四酢酸（“ E D T A ”）などのキレート化剤と混合することにより改善し得ることが発見された。

理論に囚われるつもりはないが、信じ得ることは、本発明組成物中のキレート化剤の存在が、以下の1つ以上の発生を低減させることにより、抗体ポリペプチドの安定性を改善する一助となることである：抗体の凝集、断片化、酸化、凍結／融解不安定性、変色、および／または脱アミノ化。本発明はすでに開示されている抗体組成物に比較して、化学的および／または物理的安定性の改善されたヒト I g G 2 抗体組成物を提供する。

【0044】

従って、一定の局面において、本発明は E D T A などのキレート化剤およびモノクローナルヒト I g G 2 抗体またはその抗原結合部分を含有してなる組成物を提供する。さらに他の局面において、キレート化剤を含有してなる前記のヒト I g G 2 抗体組成物は、追加の医薬的に許容し得る添加剤、例えば、限定されるものではないが、バッファ、等調化剤、海面活性剤、抗酸化剤、およびその混合物から選択される1種以上の添加物を含有し得る。

【0045】

十分理解されるように、抗原発現細胞を殺すことは一般に望ましいことではない。むしろ一般には抗原の結合を単に阻害することが望まれる。抗体が細胞を殺す主要メカニズムの一つは、補体の固定化と C D C での関与によるものである。抗体の定常領域は補体を固定し、C D C に関与する抗体能力と関連して重要な役割を演ずる。従って、補体固定化能力を提供するか、またはしないためには、イソタイプの抗体が一般に選択される。本発明の場合、一般には上に述べたように、細胞を殺す抗体を利用することは一般に好ましくない。補体固定化と C D C に関わり得る多数のイソタイプ抗体が存在する；それらは限定されるものではないが、以下のものである：マウス I g M、マウス I g G 2 a、マウス I g G 2 b、マウス I g G 3、ヒト I g M、ヒト I g G 1、およびヒト I g G 3。対照的に、補体固定化と C D C に関わり得ない好適なイソタイプは、限定されるものではないが、ヒト I g G 2 である。重鎖配列の相違に加えて、I g G 抗体はジスルフィド結合の数とヒンジ領域の長さに基づき、そのサブクラス内で異なっている。例えば、I g G 2 サブクラスは他のサブクラスとは明瞭な幾つもの差異を有する。I g G 2 および I g G 4 サブクラスはそのヒンジ領域内に4つのジスルフィド結合をもつことが知られているが、I g G 1 は2つ、I g G 3 は11のジスルフィド結合を有する。I g G 2 抗体についての他の相違はそれらが胎盤を通過する能力に劣ること、また I g G 2 抗体はリンパ球 F c 受容体に結合し得ないことである。従って、特定の態様において、ヒト抗体はサブクラスの I g G 2 である。

【0046】

また十分理解されるように、マウス、キメラまたはヒト化抗体に対比して、完全にヒトの抗体を利用することが一般的に望ましい。完全にはヒトのものでない抗体は、ヒト患者の免疫原性の増大と関連し、これが急速なクリアランスに導き、有効性を低下させ、注入反応の危険性を増大させる；これは比較的良性の発熱と発疹から心肺系およびアナフラキシー様有害事象の範囲に及び得る。参照例：Lonberg, N., Nature Biotechnology 23, 11

10

20

30

40

50

17-1125 (2005)。

本発明での使用に適したヒト I g G 2 抗体の幾つかの例は以下の抗体であるが、これらに限定されるものではない。

【0047】

ヒト I g G 2 抗-M-C S F 抗体：

特定態様において、本発明での使用に適したヒト I g G 2 抗体は抗-M-C S F 抗体を含む。適切な抗-M-C S F 抗体およびそれらを調製する方法は、米国公開出願番号 2 0 0 5 0 0 5 9 1 1 3 (Bedian, et al.) に記載されている。他の態様において、本発明での使用に適した抗-M-C S F 抗体、米国公開出願番号 2 0 0 5 0 0 5 9 1 1 3 (Bedian, et al.) に記載されている抗体番号 2 5 2、8 8、1 0 0、3. 8. 3、2. 7. 3、1. 1 2 0. 1、9. 1 4. 4 1、9. 7. 2 1 F、9. 1 4. 4、8. 1 0. 3、9. 7. 2、9. 7. 2 C-Ser、9. 1 4. 4 C-Ser、8. 1 0. 3 C-Ser、8. 1 0. 3-CG 2、9. 7. 2-CG 2、9. 7. 2-CG 4、9. 1 4. 4-CG 2、9. 1 4. 4-CG 4、9. 1 4. 4-Ser、9. 7. 2-Ser、8. 1 0. 3-Ser、8. 1 0. 3-CG 4、8. 1 0. 3 F G 1 または 9. 1 4. 4 G 1 の重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する抗-M-C S F モノクローナル抗体の 1 種以上である。さらに他の態様において、本発明での使用に適した抗-M-C S F 抗体は、米国公開出願番号 2 0 0 5 0 0 5 9 1 1 3 (Bedian, et al.) に 8. 1 0. 3 F と命名される抗体の重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する抗-M-C S F モノクローナル抗体を含む。

【0048】

さらに、かかる抗-M-C S F 抗体はその重鎖の定常領域のアミノ酸配列の差異に基づき選択し得る。例えば、抗-M-C S F 抗体は I g G 2 クラスから選択可能であり、このものは「ガンマ」タイプの重鎖をもつ。抗-M-C S F 抗体のクラスおよびサブクラスは技術上既知の方法により決定し得る。一般に、抗体のクラスおよびサブクラスは、抗体の特定のクラスおよびサブクラスに特異的な抗体を用いて決定し得る。かかる抗体は市販品として入手し得る。クラスおよびサブクラスは E L I S A、またはウエスタンブロットならびに他の技法により決定し得る。あるいは、クラスおよびサブクラスは抗体の重鎖および／または軽鎖の定常領域の全部または一部を配列決定し、そのアミノ酸配列を種々のクラスおよびサブクラスの免疫グロブリンの既知アミノ酸配列と比較し、その抗体のクラスおよびサブクラスを決めることにより決定し得る。

【0049】

他の態様において、適切な抗-M-C S F 抗体はその重鎖のアミノ酸配列の差異に基づき選択し得る。例えば、本発明の抗-M-C S F 抗体は、以下のヒト V_H 生殖系列遺伝子：V_H 1、V_H 2、V_H 3、V_H 4、または V_H 5 のいずれかを利用するガンマタイプの重鎖を有し得る。特定の態様において、抗-M-C S F 抗体はヒト V_H 3 生殖系列遺伝子を利用する。さらなる態様において、抗-M-C S F 抗体はヒト V_H 3-4 8 生殖系列遺伝子を利用する。なおさらなる態様において、抗-M-C S F 抗体は D 1-2 6 ヒト D_H 遺伝子を利用する。なおさらなる態様において、抗-M-C S F 抗体は J_H 4 ヒト J_H 遺伝子を利用する。本発明の目的上、「重鎖可変領域」はしばしば用語 (V_H) と略記する。

【0050】

さらなる態様において、抗-M-C S F 抗体はその軽鎖のアミノ酸配列の差に基づき選択し得る。例えば、適切な抗-M-C S F 抗体は、ラムダ軽鎖またはカッパ軽鎖を有し得る。しかし、特定の態様において、本発明の抗-M-C S F 抗体はカッパ軽鎖を有する。一部態様において、抗-M-C S F 抗体がカッパ軽鎖を含む場合、軽鎖の可変領域をエンコードするポリヌクレオチドは、ヒト V_K L 5、O 1 2、L 2、B 3、L 1 5、または A 2 7 遺伝子およびヒト J_K 1、J_K 2、J_K 3、J_K 4、または J_K 5 遺伝子を含む。一部の態様において、該抗体がカッパ軽鎖を含む場合、該軽鎖の可変領域 (V_L) はヒト V_K A 2 7 遺伝子とヒト J_K 4 遺伝子の一部エンコードされている。本発明の特定態様においては、軽鎖可変領域がヒト V_K A 2 7 / J_K 3 遺伝子にエンコードされている。

表 1 は抗-M-C S F モノクローナル抗体 8. 1 0. 3 F についての重鎖および軽鎖ヒ

ト生殖系列遺伝子由来および配列を掲載する。

【0051】

【表1】

表1：重鎖および軽鎖ヒト遺伝子利用および配列

抗体	重鎖				軽鎖		
	配列番号	V _H	D _H	J _H	配列番号	V _K	J _K
8.10.3F	1(核酸)	3-48	1-26	4b	3(核酸)	A27	4
	2(アミノ酸)				4(アミノ酸)		

10

【0052】

本発明による抗-M-C-S-F抗体の一部ものは、ヒトV_H3-48重鎖可変領域を利用するバイアスがかかって生成された。Xenomouse（商標）マウスにおいては、抗体の生成に関わる30種を超える別個の機能的重鎖可変遺伝子が存在する。それ故、バイアスは抗原に対する結合と機能的活性の組合わさった性質に関して、抗体-抗原相互作用の好適な結合モチーフを暗示している。

【0053】

一部態様において、核酸分子はヒトV、DまたはJ遺伝子の生殖系列アミノ酸配列に比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17または18の突然変異を含むアミノ酸配列をエンコードする。一部態様において、当該突然変異は重鎖可変領域に存在する。一部態様において、当該突然変異はCDR領域に存在する。

20

【0054】

一部態様において、核酸分子はモノクローナル抗体8.10.3FのV_Hに見出されるアミノ酸突然変異に一致する生殖系列配列に比較して、1個以上のアミノ酸突然変異をエンコードする。一部態様において、該核酸は上記掲載モノクローナル抗体の一つに見出される少なくとも3つのアミノ酸変異に一致する生殖系列配列に比較して、少なくとも3つのアミノ酸突然変異をエンコードする。

30

【0055】

一部態様において、核酸分子は抗体8.10.3Fの一つのV_Lに見出される突然変異に一致する生殖系列配列に比較して、1つ以上の変異体を含んでなるV_Lアミノ酸配列をエンコードする。

一部態様において、核酸分子は抗体8.10.3のV_Lに見出される生殖系列配列に比較して、少なくとも3つのアミノ酸突然変異をエンコードする。

【0056】

一部態様において、該抗体は一本鎖抗体（scFv）であり、そのV_LおよびV_Hドメインは一本のタンパク鎖を形成し得るような合成リンカーを介して対合し、一価の分子を形成する。Bird et al., Science 242:423-426 (1988) and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)。一部態様において、抗体はジアボディ、すなわち、二価の抗体であり、そのV_HとV_Lドメインは一本のポリペプチド鎖上に発現するが、同じ鎖上の2つのドメイン間で対合し得るには短すぎるリンカーを使用しているために、該ドメインが別の鎖の相補的ドメインと対合せざるを得なくなり、2つの抗原結合部位を創出する。参照例：Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993); and Poljak R.J. et al., Structure 2: 1121-1123 (1994)。一部態様において、本発明抗体からの1種以上のCDRは、共有結合により、または共有結合によらずに分子内に取り込ませ、M-C-S-Fに特異的に結合する免疫アドヘンシンとすることができる。かかる態様において、CDRはより大きなポリペプチド鎖の一部として取り込むことが可能で

40

50

あるか、共有結合により他のポリペプチド鎖に連結し得るか、または共有結合によらずに取り込むことができる。

【0057】

もう一つの態様において、抗-M-C S F抗体は他のポリペプチドに対する選択性よりも少なくとも100倍大きいM-C S Fに対する選択性（特異性）を有する。一部の態様において、抗-M-C S F抗体はM-C S F以外の他のいずれのタンパク質に対しても、認知し得る特異結合性を示さない。M-C S Fに対する抗-M-C S F抗体の選択性は、技術上周知の方法を用いて、明細書の教示に従い判定することができる。例えば、その選択性はウエスタンブロット、F A C S、E L I S A、またはR I Aなどにより判定し得る。従って、一部の態様において、モノクローナル抗-M-C S F抗体は抗原であるM-C S Fに特異的に結合することができる。

10

【0058】

一部の態様において、本発明抗-M-C S F抗体の重鎖のC末端リジンは存在しない。本発明の様々な態様において、抗-M-C S F抗体の重鎖および軽鎖は、任意にシグナル配列を含み得る。

表1は抗-M-C S Fモノクローナル抗体8. 10. 3 Fの重鎖および軽鎖を構成する核酸および対応する予測されるアミノ酸配列の配列アイデンティファイア（配列番号）を掲載する。シグナルペプチドをエンコードするD N A配列は、配列アイデンティファイアで示されるが、シグナルポリペプチドは翻訳後修飾に際して一般に除去されるので、該抗体は典型的にはシグナルポリペプチドを含まない。本発明の様々な態様においては、抗-M-C S F抗体の重鎖および軽鎖の一方または両方がシグナル配列（またはシグナル配列の一部）を含む。本発明の他の態様において、抗-M-C S F抗体の重鎖も軽鎖もシグナル配列を含まない。

20

【0059】

一部の態様において、該核酸分子は軽鎖アミノ酸配列をエンコードし、その配列は少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%、配列番号4の抗体8. 10. 3 Fの軽鎖アミノ酸配列または配列番号6のV_Lアミノ酸配列に一致する。本発明の核酸分子は、上記に説明したような高度緊縮条件下で、配列番号4の軽鎖アミノ酸配列をエンコードする核酸配列にハイブリッド形成する核酸であるか、または配列番号3のポリヌクレオチド配列を有する核酸である。

30

【0060】

一部の態様において、該核酸分子はモノクローナル抗体8. 10. 3 Fの軽鎖アミノ酸配列またはその一部をエンコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる。一部の態様において、該核酸分子は配列番号3のモノクローナル抗体8. 10. 3 Fの軽鎖ポリヌクレオチドまたはその一部をエンコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる。一部の態様において、該核酸分子は配列番号6のモノクローナル抗体8. 10. 3 FのV_Lアミノ酸配列またはその一部をエンコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる。一部の態様において、当該部分は少なくともC D R 2領域を含む。一部の態様において、該核酸は当該抗体の軽鎖C D Rのアミノ酸配列をエンコードする。一部の態様において、当該部分はC D R 1-C D R 3を含む隣接する部分である。

40

【0061】

一部の態様において、該核酸分子は重鎖アミノ酸配列をエンコードし、その配列は少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%、配列番号2の抗体8. 10. 3 Fの重鎖アミノ酸配列または配列番号5のV_Hアミノ酸配列に一致する。本発明の核酸分子は、上記に説明したような高度緊縮条件下で、配列番号2の重鎖アミノ酸配列をエンコードする核酸配列にハイブリッド形成する核酸であるか、または配列番号1のポリヌクレオチド配列を有する核酸である。

【0062】

一部の態様において、該核酸分子はモノクローナル抗体8. 10. 3 Fの重鎖アミノ酸配列またはその一部をエンコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる。一部の態様に

50

において、該核酸分子は配列番号2のモノクローナル抗体8.10.3Fの重鎖ポリヌクレオチド配列またはその一部をエンコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる。一部の態様において、該核酸分子は配列番号5のモノクローナル抗体8.10.3FのV_Hアミノ酸配列またはその一部をエンコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる。一部の態様において、当該部分は少なくともCDR2領域を含む。一部の態様において、該核酸は当該抗体の軽鎖CDRのアミノ酸配列をエンコードする。一部の態様において、当該部分はCDR1-CDR3を含む隣接する部分である。

【0063】

さらなる態様において、該核酸分子は8.10.3FのV_Hアミノ酸配列（配列番号5）の少なくとも一部または同類アミノ酸突然変異および／または全部で3個以下の非同類アミノ酸置換を有する当該配列をエンコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる。様々な態様において、該配列は、1つ以上のCDR領域、好ましくはCDR3領域、3つすべてのCDR領域、CDR1-CDR3を含む隣接部分、または全V_H領域をエンコードする。

【0064】

なおさらなる態様において、該核酸分子は配列番号1の重鎖アミノ酸配列またはその一部をエンコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる。なおさらなる態様において、該核酸分子は配列番号5の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列またはその一部をエンコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる。

【0065】

もう一つの態様において、該核酸は8.10.3Fから選択される抗体の全長軽鎖、または配列番号4のアミノ酸配列と軽鎖の定常領域とを含んでなる軽鎖、または突然変異を含んでなる軽鎖をエンコードする。さらに、該核酸は配列番号3の軽鎖ポリヌクレオチド配列および軽鎖の定常領域をエンコードするポリヌクレオチド配列を含み得るか、または軽鎖をエンコードする核酸分子は突然変異を含み得る。

【0066】

一部の態様において、該核酸分子は8.10.3FのV_Hアミノ酸配列（配列番号5）の少なくとも一部または同類アミノ酸突然変異および／または全部で3個以下の非同類アミノ酸置換を有する当該配列をエンコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる。様々な態様において、該配列は1つ以上のCDR領域、好ましくはCDR3領域、3つすべてのCDR領域、CDR1-CDR3を含む隣接部分、または全V_H領域をエンコードする。

【0067】

本発明のもう一つの側面において、抗-M-CSF抗体は、種および分子両方の選択性を示す。一部の態様において、抗-M-CSF抗体はヒト、カニクイザルおよびマウスのM-CSFに結合する。本明細書の教示に従えば、技術上周知の方法を用いて抗-M-CSF抗体についての種選択性を決定し得る。例えば、ウエスタンブロット、FACS、ELISA、RIA、細胞増殖アッセイ、またはM-CSFレセプター結合アッセイを用いて、種選択性を決定し得る。好適な態様において、種選択性は細胞増殖アッセイまたはELISAを用いて決定し得る。

【0068】

もう一つの態様において、抗-M-CSF抗体はGM-／G-CSFに対するその選択性よりも少なくとも100倍大きいM-CSFに対する選択性を有する。一部の態様において、抗-M-CSF抗体はM-CSF以外のいずれの他のタンパク質に対しても認識し得る特異的結合性を示さない。M-CSFに対する抗-M-CSF抗体の選択性は、本明細書の教示に従い、技術上周知の方法を用いて決定し得る。例えば、選択性はウエスタンブロット、FACS、ELISA、またはRIAを用いて決定し得る。

【0069】

ヒトIgG2抗-CTLA-4抗体：

他の態様において、本発明での使用に適したヒトIgG2抗体は抗-CTLA-4抗体

である。適切な抗-CTLA-4抗体およびその調製方法は米国特許第6,682,736号(Hanson, et al.;1999年12月23日出願)に記載されている。他の態様において、本発明での使用に適した抗-CTLA-4抗体は、米国特許第6,682,736号の11.2.1と命名される抗体の重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する抗-CTLA-4モノクローナル抗体である。他の態様において、本発明での使用に適した抗-CTLA-4抗体は、抗体チシリムマブ(ticilimumab)およびイピリムマブ(ipilimumab)の重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する抗-CTLA-4モノクローナル抗体である。他の態様において、本発明での使用に適した抗-CTLA-4抗体は、抗体チシリムマブの重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する抗-CTLA-4モノクローナル抗体である。

【0070】

本明細書にて使用する場合、番号で参照する抗体は同じ番号のハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体と同じ重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する。例えば、モノクローナル抗体11.2.1はハイブリドーマ11.2.1から得られるものと同じ重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する。従って、抗体11.2.1というときは、抗体チシリムマブ(ticilimumab)(商標)をいい、このものはそれぞれ配列番号22および24に示した重鎖および軽鎖アミノ酸配列、および配列番号25に示す重鎖の可変領域および配列番号26に示す軽鎖の可変領域を有する。また、このものは重鎖上に末端リジンを欠く抗体も包含する；末端リジンは通常製造に際し、抗体の一部で失われる。

【0071】

さらに、かかる抗-CTLA-4抗体はその重鎖の定常領域におけるアミノ酸配列の差に基づき選択し得る。例えば、抗-CTLA-4抗体は「ガンマ」型重鎖を有するIgGクラスから選択し得る。抗-CTLA-4抗体のクラスおよびサブクラスは技術上既知の方法により決定し得る。一般に、抗体のクラスおよびサブクラスは特定のクラスおよびサブクラスの抗体に特異的な抗体を使用して決定し得る。かかる抗体類は市販品として入手し得る。クラスおよびサブクラスはELISA、またはウエスタンブロットならびに他の技法により決定し得る。あるいは、クラスおよびサブクラスは、抗体の重鎖および／または軽鎖の定常ドメインの全部または一部の配列を決定し、そのアミノ酸配列を種々クラスおよびサブクラスの免疫グロブリンの既知アミノ酸配列に比較し、該抗体のクラスおよびサブクラスを決定することにより決定し得る。

【0072】

他の態様において、適切な抗-CTLA-4抗体はその重鎖のアミノ酸配列の差異に基づき選択し得る。例えば、本発明の抗-CTLA-4抗体は、以下のヒトV_H生殖系列遺伝子、すなわち、V_H1、V_H2、V_H3、V_H4、またはV_H5のいずれかを利用するヒトガンマ型重鎖を有し得る。特定の態様において、該抗-CTLA-4抗体はヒトV_H3生殖系列遺伝子を利用する。さらなる態様において、抗-CTLA-4抗体はヒトV_H3生殖系列遺伝子とヒトDP-50またはDP-46重鎖可変領域を利用し、他の態様において、抗-CTLA-4抗体はヒトDP-50重鎖可変領域を利用する。DP-50遺伝子はV_H3-33ファミリー遺伝子ともいう。DP-46遺伝子はV_H3-30.3ファミリー遺伝子ともいう。なおさらなる態様において、抗-CTLA-4抗体はD1-26、DIR4およびDIR3から選択されるヒトD_H遺伝子を利用し、他の態様において、抗-CTLA-4抗体はD1-26ヒトD_H遺伝子を利用する。なおさらなる態様において、抗-CTLA-4抗体は、J_H4およびJ_H6から選択されるヒトJ_H遺伝子を利用し、他の態様においては、抗-CTLA-4抗体がJ_H6ヒトJ_H遺伝子を利用する。

【0073】

さらなる態様において、抗-CTLA-4抗体はその軽鎖のアミノ酸配列の差異に基づき選択し得る。例えば、好適な抗-CTLA-4抗体はラムダ軽鎖またはカッパ軽鎖を有し得る。しかし、特定の態様においては、本発明の抗-CTLA-4抗体はカッパ軽鎖を有する。一部の態様において、該抗-CTLA-4抗体がカッパ軽鎖を含む場合、該軽鎖の可変ドメインをエンコードするポリヌクレオチドは、ヒトV_KL5、O12、L2、B3、L15、またはA27遺伝子、およびヒトJ_K1、J_K2、J_K3、J_K4、またはJ_K

10

20

30

40

50

5 遺伝子を含んでなる。一部の態様において、該抗体がカッパ軽鎖を含む場合、軽鎖可変ドメイン (V_L) は一部ヒト $V_K O 1 2$ または $V_K A 2 7$ 遺伝子およびヒト $J_K 3$ または $J_K 4$ 遺伝子によりエンコードされる。本発明の特定態様において、軽鎖可変ドメインはヒト $V_K O 1 2 / J_K 3$ 遺伝子によりエンコードされている。

【0074】

さらに、該抗体は $V_H 3-30$ または $3-33$ 遺伝子に由来するヒト CDR アミノ酸配列を含む重鎖アミノ酸配列、またはその同類置換もしくは体細胞突然変異を含み得る。該 $V_H 3-33$ 遺伝子は抗体分子の重鎖可変領域の FR1 から FR3 をエンコードすると理解される。従って、本発明は抗体チシリムマブの FR1 から FR3 の配列と、少なくとも 85%、より好ましくは少なくとも 90%、さらにより好ましくは少なくとも 91%、なおより好ましくは少なくとも 94%、さらにより好ましくは少なくとも 95%、より好ましくは少なくとも 97%、なおより好ましくは少なくとも 98%、さらにより好ましくは少なくとも 99%、そしてもっとも好ましくは 100% 同一性を有する抗体を包含する。 10

【0075】

該抗体はさらに A27 または O12 遺伝子由来の軽鎖の CDR 領域を含み得るか、または抗体チシリムマブの CDR 領域を含み得る。

本発明の他の態様において、該抗体は CTLA4 と B7-1、B7-2、またはその両方との結合を阻害する。好ましくは、該抗体は B7-1 との結合を阻害可能であり、その IC_{50} は約 100 nM 以下、より好ましくは約 10 nM 以下、例えば、約 5 nM 以下、さらにより好ましくは約 2 nM 以下、またはなおより好ましくは、例えば、約 1 nM 以下である。同様に、該抗体は B7-2 との結合を阻害可能であり、その IC_{50} は約 100 nM 以下、より好ましくは約 10 nM 以下、例えば、なおより好ましくは約 5 nM 以下、さらにより好ましくは約 2 nM 以下、またはなおより好ましくは約 1 nM 以下である。 20

【0076】

さらに、もう一つの態様において、抗-CTLA-4 抗体は CTLA4 に対する結合親和性を有し、その親和性は約 10^{-8} 以上、より好ましくは約 10^{-9} 以上、より好ましくは約 10^{-10} 以上、またさらにより好ましくは約 10^{-11} 以上である。

抗-CTLA-4 抗体は抗体チシリムマブの重鎖および軽鎖アミノ酸配列をもつ抗体と結合競合する抗体を包含する。さらに、抗-CTLA-4 抗体は結合に対し、抗体イピリムマブと競合し得る。 30

【0077】

もう一つの態様において、該抗体は、好ましくは、抗体チシリムマブの重鎖および軽鎖配列、可変重鎖および可変軽鎖配列、および／または重鎖および軽鎖 CDR 配列を有する抗体と交差競合する。例えば、該抗体は、抗体チシリムマブの重鎖および軽鎖アミノ酸配列、可変配列、および／または CDR 配列を有する抗体が結合するエピトープに結合し得る。もう一つの態様において、該抗体は MDX-D010 の重鎖および軽鎖配列、または抗原結合配列を有する抗体と交差競合する。

【0078】

もう一つの態様において、本発明は抗体チシリムマブの CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を含む重鎖、および CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列、または同類変化、非同類置換、付加および欠失からなる群より選択される CDR 配列からの変化をもつ配列を含む軽鎖を含んでなる抗-CTLA-4 抗体を用いて実施する；この場合、同類変化は、非極性残基と他の非極性残基との置換、極性荷電残基と他の極性非荷電残基との置換、極性荷電残基と他の極性荷電残基との置換、および構造的に類似の残基の置換からなる群より選択される；ただし、非同類置換は極性荷電残基と極性非荷電残基との置換および非極性残基と極性残基との置換からなる群より選択される。 40

【0079】

本発明のさらなる態様において、該抗体は枠組みまたは CDR 領域における生殖系列配列からの 10、7、5、または 3 未満のアミノ酸変化を含む。もう一つの態様において、 50

該抗体は枠組み領域において5未満のアミノ酸変化と、CDR領域において10未満の変化を含む。好適な一態様において、該抗体は枠組み領域において3未満のアミノ酸変化と、CDR領域において7未満の変化を含む。好適な態様において、枠組み領域における変化は保存的であり、CDR領域における変化は体細胞突然変異である。

【0080】

なおより好適には、該抗体は、抗体チシリムマブの重鎖および軽鎖に関し、または重鎖もしくは軽鎖と、それぞれ100%の配列同一性または配列類似性を共有する。

もう一つの態様において、該抗体は生殖系列V_KA27、生殖系列V_KO12、および生殖系列DP50（V_H3-33遺伝子座の対立遺伝子である）の配列と、重鎖および軽鎖全長配列に関し、または重鎖または軽鎖に関し、それぞれに、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、なおより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも94%、より好ましくは少なくとも95%、なおより好ましくは少なくとも99%の配列同一性または配列類似性を共有する。なおより好ましくは、該抗体は生殖系列DP50の重鎖配列に関し、および／または生殖系列A27または生殖系列O12の軽鎖配列と100%の配列同一性または配列類似性を共有する。 10

【0081】

一態様において、該抗体は、抗体3.1.1、4.1.1、4.8.1、4.10.2、4.13.1、4.14.3、6.1.1、チシリムマブ、11.6.1、11.7.1、12.3.1.1、12.9.1.1、イピリムマブの配列と、重鎖および軽鎖可変領域配列に関して、または重鎖または軽鎖可変領域配列に関して、それぞれに、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、なおより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも94%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも99%の配列（例えば、アミノ酸、核酸、または両方）同一性または配列類似性を共有する。なおより好ましくは、該抗体は、抗体3.1.1、4.1.1、4.8.1、4.10.2、4.13.1、4.14.3、6.1.1、チシリムマブ、11.6.1、11.7.1、12.3.1.1、12.9.1.1、イピリムマブから選択される抗体の重鎖および軽鎖可変領域配列に関して、または重鎖または軽鎖可変領域配列と、100%の配列同一性または配列類似性を共有する。 20

【0082】

もう一つの態様において、該抗体は重生殖系列DP50の重鎖可変配列（V_H3-33遺伝子座の対立遺伝子である）と、または生殖系列V_KA27もしくは生殖系列V_KO12の軽鎖可変配列と、重鎖可変領域配列に関して、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、なおより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも94%、より好ましくは少なくとも95%、なおより好ましくは少なくとも99%の配列同一性または配列類似性を共有する。なおより好ましくは、該抗体の重鎖領域配列は生殖系列DP50の配列と、または生殖系列A27または生殖系列O12の軽鎖配列と、100%の配列同一性または配列類似性を共有する。 30

【0083】

本発明の一態様において、該抗体は、抗体チシリムマブのFR1ないしFR4領域配列と、FR1ないしFR4の重鎖、軽鎖、またはその両方の配列で、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、なおより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも99%の配列同一性または配列類似性を共有する。なおより好ましくは、該抗体は抗体チシリムマブと、FR1ないしFR4の重鎖、軽鎖、またはその両方で、100%の配列同一性または配列類似性を共有する。 40

【0084】

本発明のもう一つの態様において、該抗体は、生殖系列DP50のFR1ないしFR3領域の配列と、FR1ないしFR3の重鎖配列で、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、なおより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも99%、もっとも好ましくは100%の配列同一性または配列類似性を共有する。 50

【0085】

本発明のさらにもう一つの態様において、該抗体は、生殖系列 $V_K A 27$ または生殖系列 $V_K O 12$ の $FR 1$ ないし $FR 4$ 領域配列と、 $FR 1$ ないし $FR 4$ の軽鎖配列で、少なくとも 80% 、より好ましくは少なくとも 85% 、なおより好ましくは少なくとも 90% 、さらにより好ましくは少なくとも 95% 、より好ましくは少なくとも 99% 、もっとも好ましくは 100% の配列同一性または配列類似性を共有する。

【0086】

本発明の一態様において、該抗体は、抗体チシリムマブの重鎖、軽鎖、またはその両方の $CDR-1$ 、 $CDR-2$ および $CDR-3$ 配列と、少なくとも 80% 、より好ましくは少なくとも 85% 、なおより好ましくは少なくとも 90% 、さらにより好ましくは少なくとも 95% 、より好ましくは少なくとも 99% の配列同一性または配列類似性を共有する。なおより好ましくは、該抗体は抗体チシリムマブと、重鎖、軽鎖、またはその両方の $CDR-1$ 、 $CDR-2$ および $CDR-3$ 配列に関して、 100% の配列同一性または配列類似性を共有する。

【0087】

本発明のもう一つの態様において、該抗体は、生殖系列 $DP 50$ の $CDR-1$ および $CDR-2$ 配列と、重鎖 $CDR-1$ および $CDR-2$ 配列で、少なくとも 80% 、より好ましくは少なくとも 85% 、なおより好ましくは少なくとも 90% 、さらにより好ましくは少なくとも 95% 、より好ましくは少なくとも 99% 、また、もっとも好ましくは約 100% の配列同一性または配列類似性を共有する。

【0088】

本発明のさらにもう一つの態様において、該抗体は、生殖系列 $V_K A 27$ または生殖系列 $V_K O 12$ の $CDR-1$ 、 $CDR-2$ および $CDR-3$ 配列と、軽鎖 $CDR-1$ 、 $CDR-2$ および $CDR-3$ 配列で、少なくとも 80% 、より好ましくは少なくとも 85% 、なおより好ましくは少なくとも 90% 、さらにより好ましくは少なくとも 95% 、より好ましくは少なくとも 99% 、また、もっとも好ましくは約 100% の配列同一性または配列類似性を共有する。

一態様において、抗- $CTLA-4$ 抗体はチシリムマブとして知られる抗体である。

表2は抗- $CTLA-4$ モノクローナル抗体 11. 2. 1 (すなわち、チシリムマブ) の重鎖および軽鎖ヒト生殖系列遺伝子の由来を掲載する。

【0089】

【表2】

表2

クローン	重鎖 DNA				軽鎖 DNA		
	配列番号	V_H	D_H	J_H	配列番号	V_K	J_K
11. 2. 1	21 (cDNA) (全長)	DP-50 (3-33)	D1-26	6	23 (cDNA) (全長)	012	3

【0090】

本発明による抗体は、観察されるように、その生成に $DP-50$ 重鎖可変領域を利用する強いバイアスをもっていた。 $DP-50$ 遺伝子は $V_H 3-33$ ファミリー遺伝子ともいう。 $Xenomouse$ (商標) マウスには、抗体を生成するための 30 種を超える機能的重鎖可変遺伝子が存在する。従って、バイアスは抗原に対する結合と機能的活性の組合わさった性質に関して、抗体-抗原相互作用の好適な結合モチーフについて暗示している。

【0091】

一部の態様において、該抗体は、 V_L と V_H ドメインが対合して、一本のタンパク鎖を形成し得るようにする合成リンカーを介し、一価の分子を形成する一本鎖抗体（scFv）である。Bird et al., Science 242:423-426 (1988) and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)。一部の態様において、該抗体はジアボディ、すなわち、二価の抗体であり、その V_H と V_L ドメインは一本のポリペプチド鎖上に発現するが、同じ鎖上の2つのドメイン間で対合し得るには短すぎるリンカーを使用しているために、該ドメインが別の鎖の相補的ドメインと対合せざるを得なくなり、2つの抗原結合部位を創出する。参照例：Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993), and Poljak R. J. et al., Structure 2:1121-1123 (1994)。一部の態様において、本発明抗体からの1種以上のCDRは、共有結合によるか、または非共有結合により分子に取り込まれ、CTLA-4に特異的に結合する免疫アドヘンシとなり得る。かかる態様において、CDRはポリペプチド鎖の部分として取り込まれ得るか、別のポリペプチド鎖に共有結合により結合するか、または非共有結合により取り込まれ得る。

【0092】

もう一つの態様において、抗-CTLA-4抗体はCTLA-4に対し、他のいずれのポリペプチドに対する選択性よりも少なくとも100倍大きな選択性を有する。一部の態様において、抗-CTLA-4抗体はCTLA-4以外の他のいずれのタンパク質に対しても認知し得る特異的結合性を示さない。CTLA-4に対する抗-CTLA-4抗体の選択性は、本明細書の教示に従い、技術上周知の方法を用いて決定し得る。例えば、選択性はウエスタンブロット、FACS、ELISA、またはRIAを用いて決定し得る。従って、一部の態様において、モノクローナル抗-CTLA-4抗体はCTLA-4に特異的に結合し得る。

【0093】

一部の態様においては、本発明の抗-CTLA-4抗体重鎖のC末端リジンが存在しない。本発明の様々な態様において、抗-CTLA-4抗体の重鎖および軽鎖はシグナル配列を任意に含み得る。

表3は抗-CTLA-4モノクローナル抗体11.2.1についての重鎖および軽鎖をエンコードする核酸および対応する予測されるアミノ酸配列の配列アイデンティファイアー（配列番号）を掲載する。

【0094】

【表3】

表3

ヒト抗-CTLA-4抗体 11.2.1				
MAb	配列アイデンティファイアー (配列番号)			
	重		軽	
	cDNA	アミノ酸	cDNA	アミノ酸
11.2.1(全長)	21	22	23	24

【0095】

一部の態様において、核酸分子はモノクローナル抗体11.2.1の軽鎖配列をエンコードするヌクレオチド配列（配列番号23）またはその一部を含んでなる。一部の態様において、該核酸分子はモノクローナル抗体11.2.1の V_L アミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列（配列番号26）またはその一部を含んでなる。一部の態様において、該核酸分子はモノクローナル抗体11.2.1の軽鎖アミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列（配列番号24）またはその一部を含んでなる。一部の態様において、

当該一部分は少なくとも C D R 2 領域を含んでなる。一部の態様において、該核酸は当該抗体の軽鎖 C D R のアミノ酸配列をエンコードする。一部の態様において、当該一部分は C D R 1 - C D R 3 を含んでなる隣接部分である。特定の側面において、軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列は配列番号 30 により、また軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列は配列番号 31 により、また軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列は配列番号 32 により示される。

【0096】

他の態様において、該核酸分子は配列番号 24 の軽鎖アミノ酸配列に少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一である軽鎖アミノ酸をエンコードする。

一部の態様において、該核酸分子はモノクローナル抗体 11. 2. 1 の重鎖配列をエンコードするヌクレオチド配列（配列番号 21）またはその一部を含んでなる。一部の態様において、該核酸分子はモノクローナル抗体 11. 2. 1 の V_H アミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列（配列番号 25）またはその一部を含んでなる。他の態様において、該核酸分子は配列番号 24 の重鎖アミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列またはその一部を含んでなる。本発明の核酸分子は本明細書に記載の条件など、高度緊縮条件下に、配列番号 24 の軽鎖アミノ酸配列をエンコードする核酸配列にハイブリッド形成する核酸を包含する。

10

【0097】

さらなる態様において、該核酸分子は 11. 2. 1 の V_H アミノ酸配列（配列番号 25）または同類アミノ酸変異および／または合計 3 以下の非同類アミノ酸置換をもつ当該配列の、少なくとも一部をエンコードするヌクレオチド配列を含んでなる。様々な態様において、該配列は 1 つ以上の C D R 領域、好ましくは C D R 3 領域、3 つすべての C D R 領域、C D R 1 - C D R 3 を含む隣接部分、または全 V_H 領域をエンコードする。特定の側面において、重鎖 C D R 1 アミノ酸配列は配列番号 27 により、また重鎖 C D R 2 アミノ酸配列は配列番号 28 により、また重鎖 C D R 3 アミノ酸配列は配列番号 29 により示される。

20

【0098】

特定の側面において、本発明は C T L A - 4 に結合する少なくとも 1 種の単離ヒト抗体（ただし、抗体はヒト V_H 3 - 3 3 生殖系列遺伝子を利用する V_H アミノ酸配列を含んでなる）およびキレート化剤を含んでなる医薬的に許容し得る添加剤を含んでなる液状医薬組成物を提供する。

30

他の側面において、本発明は C T L A - 4 に結合する少なくとも 1 種の単離ヒト抗体を含んでなる液状医薬組成物を提供する；ただし、該抗体は配列番号 22 に少なくとも 90 % の配列同一性をもつ重鎖アミノ酸配列および配列番号 24 に少なくとも 90 % の配列同一性をもつ軽鎖アミノ酸配列を含んでなる。

【0099】

他の側面において、本発明は C T L A - 4 に結合する少なくとも 1 種の単離ヒト抗体を含んでなる液状医薬組成物を提供する；ただし、該抗体は配列番号 22 に少なくとも 95 % の配列同一性をもつ重鎖アミノ酸配列および配列番号 24 に少なくとも 95 % の配列同一性をもつ軽鎖アミノ酸配列を含んでなる。

40

他の側面において、本発明は C T L A - 4 に結合する少なくとも 1 種の単離ヒト抗体を含んでなる液状医薬組成物を提供する；ただし、該抗体は配列番号 22 に少なくとも 99 % の配列同一性をもつ重鎖アミノ酸配列および配列番号 24 に少なくとも 99 % の配列同一性をもつ軽鎖アミノ酸配列を含んでなる。

【0100】

さらに他の側面において、抗 - C T L A - 4 抗体は配列番号 22 の可変領域を含む重鎖アミノ酸配列および配列番号 24 の可変領域を含む軽鎖アミノ酸配列を含んでなる。さらなる側面において、抗 - C T L A - 4 抗体は配列番号 25 を含んでなる重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号 26 を含んでなる軽鎖可変領域アミノ酸配列を含んでなる。さらなる側面において、抗 - C T L A - 4 抗体は配列番号 22 を含んでなる重鎖アミノ酸配列

50

および配列番号 24 を含んでなる軽鎖アミノ酸配列を含んでなる。さらに他の側面において、抗-C T L A-4 抗体は C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列と枠内で操作可能に結合したヒト V_H 3-33 遺伝子ファミリーを利用するヒト F R 1、F R 2、および F R 3 配列を含んでなる V_H アミノ酸配列を含んでなる。

【0101】

一態様において、抗-C T L A-4 抗体はチシリムマブ (C P-675, 206 としても知られる) であり、この抗体は抗体チシリムマブの重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する。本発明の一態様において、抗-C T L A-4 抗体は特異的にヒト C T L A-4 上の立体配座エピトープに結合する。他の態様において、抗-C T L A-4 抗体は被験対象に投与後、ヒト腫瘍増殖を阻害する。

10

【0102】

ヒト I g G 2 抗-M A d C A M 抗体:

他の態様において、本発明での使用に適するヒト I g G 2 抗体は抗-M A d C A M 抗体である。適切な抗-M A d C A M 抗体およびその調製方法は、国際出願番号 P C T / U S 2005 / 000370 (2005 年 1 月 7 日出願; 2005 年 7 月 28 日公開) に記載されている。他の態様において、本発明での使用に適する抗-M A d C A M 抗体は、抗-M A d C A M モノクローナル抗体であり、国際出願番号 P C T / U S 2005 / 000370 の 7.16.6 と命名される抗体の重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する。

【0103】

本発明での使用に適する抗-M A d C A M 抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体から選択し得る。特定の側面において、モノクローナル抗-M A d C A M 抗体はヒト抗体でもよい。さらなる態様において、モノクローナル抗-M A d C A M 抗体はヒトモノクローナル抗-M A d C A M 抗体である。抗-M A d C A M 抗体はヒト I g G 2 抗体でもよい。

20

【0104】

さらに、かかる抗-M A d C A M 抗体は、その重鎖の定常領域におけるアミノ酸配列の差異に基づき選択し得る。例えば、該抗-M A d C A M 抗体は「ガンマ」型重鎖を有する I g G クラスから選択し得る。抗-M A d C A M 抗体のクラスおよびサブクラスは、技術上既知の方法により決定し得る。一般に、抗体のクラスおよびサブクラスは、抗体の特定のクラスおよびサブクラスに特異的な抗体を用いて決定し得る。かかる抗体は市販品として入手し得る。該クラスおよびサブクラスは E L I S A、またはウェスタンブロットならびに他の技法により決定し得る。あるいは、クラスおよびサブクラスは該抗体の重鎖および/または軽鎖の定常ドメインの全部または一部を配列決定し、そのアミノ酸配列を種々クラスおよびサブクラスの免疫グロブリンに比較し、抗体のクラスおよびサブクラスを決定することにより決定し得る。

30

【0105】

一部の態様において、該抗体は一本鎖抗体 (s c F v) であり、その V_L および V_H ドメインは一本のタンパク鎖を形成し得るような合成リンカーを介して対合し、一価の分子を形成する。(Bird et al., Science 242: 423-426 (1988) and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85.: 5879-5883 (1988))。一部の態様において、抗体はジアボディ、すなわち、二価の抗体であり、その V_H と V_L ドメインは一本のポリペプチド鎖上に発現するが、同じ鎖上の 2 つのドメイン間で対合し得るには短すぎるリンカーを使用しているために、該ドメインが別の鎖の相補的ドメインと対合せざるを得なくなり、2 つの抗原結合部位を創出する。(参照例: Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993); and Poljak R.J. et al., Structure 2: 1121-1123 (1994))。一部の態様において、本発明抗体からの 1 種以上の C D R は、共有結合により、または共有結合によらずに分子内に取り込ませ、M A d C A M に特異的に結合する免疫アドヘンシンとすることができる。かかる態様において、C D R はより大きなポリペプチド鎖の一部として取り込むことが可能であるか、共有結合により他のポリペプチド鎖に連結し得るか、または共有結合によらずに取り込むことができる。

40

50

【0106】

もう一つの態様において、抗-MAdCAM抗体は他のポリペプチドに対する選択性よりも少なくとも100倍大きいMAdCAMに対する選択性（特異性）を有する。一部の態様において、抗-MAdCAM抗体はMAdCAM以外の他のいずれのタンパク質に対しても認知し得る特異結合性を示さない。MAdCAMに対する抗-MAdCAM抗体の選択性は、技術上周知の方法を用いて、明細書の教示に従い判定することができる。例えば、その選択性はウエスタンブロット、FACS、ELISA、またはRIAなどにより判定し得る。従って、一部の態様において、モノクローナル抗-MAdCAM抗は抗原であるMAdCAMに特異的に結合することができる。

一部の態様においては、本発明抗-MAdCAM抗体の重鎖にC末端リジンが存在しない。本発明の様々な態様において、抗-MAdCAM抗体の重鎖および軽鎖は、シグナル配列を任意に含み得る。

【0107】

表4は抗-MAdCAM抗体モノクローナル抗体7.16.6についての重鎖および軽鎖をエンコードする核酸および対応する予測されるアミノ酸配列の配列アイデンティファイアー（配列番号）を掲載する。シグナルポリペプチドをエンコードするDNA配列は配列アイデンティファイアー（配列番号）に示すが、抗体は、シグナルポリペプチドが一般に翻訳後修飾に際して除去されるため、一般にはシグナルポリペプチドを含まない。本発明の種々の態様において、抗-MAdCAM抗体の重鎖および軽鎖の一方または両方は、シグナル配列（またはシグナル配列の一部）を含む。本発明の他の態様においては、抗-MAdCAM抗体の重鎖も軽鎖もシグナル配列を含まない。

【0108】

【表4】

表4

ヒト抗-MAdCAM抗体 7.16.6				
MAb	配列アイデンティファイアー (配列番号)			
	重		軽	
	DNA	アミノ酸	DNA	アミノ酸
7.16.6	41	42	43	44

【0109】

一部の態様において、該核酸分子はモノクローナル抗体7.16.6のV_Lアミノ酸配列（配列番号44）またはその一部をエンコードするヌクレオチド配列を含んでなる。一部の態様において、当該部分は少なくともCDR2領域を含む。一部の態様において、該核酸は当該抗体の軽鎖CDRのアミノ酸配列をエンコードする。一部の態様において、当該部分はCDR1-CDR3を含む隣接する部分である。

【0110】

さらに他の態様において、該核酸分子はV_Lアミノ酸配列をエンコードし、その配列は少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%、抗体7.16.6のV_Lアミノ酸配列または配列番号44のアミノ酸配列に一致する。本発明の核酸分子は、上記に説明したような高度緊縮条件下で、配列番号44の軽鎖アミノ酸配列をエンコードする核酸配列にハイブリッド形成する核酸である。

【0111】

さらなる態様において、該核酸分子は7.16.6のV_Hアミノ酸配列（配列番号42

）または同類アミノ酸変異および／または合計 3 以下の非同類アミノ酸置換をもつ当該配列の、少なくとも一部をエンコードするヌクレオチド配列を含んでなる。様々な態様において、該配列は 1 つ以上の C D R 領域、好ましくは C D R 3 領域、3 つすべての C D R 領域、C D R 1 - C D R 3 を含む隣接部分、または全 V_H 領域をエンコードする。

【0112】

一部の態様において、該核酸分子は V_H アミノ酸配列をエンコードし、その配列は少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 %、配列番号 42 の V_H アミノ酸配列に一致する。本発明の核酸分子は、上記に説明したような高度緊縮条件下で、配列番号 42 の重鎖アミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列にハイブリッド形成する核酸である。

10

【0113】

他の側面において、本発明は M A d C A M に結合する少なくとも 1 種の精製ヒト抗体を含有してなる組成物を提供する；ただし、該抗体は配列番号 42 に少なくとも 95 % の配列同一性を有する重鎖アミノ酸配列、および配列番号 44 に少なくとも 95 % の配列同一性を有する軽鎖アミノ酸配列を含んでなる。他の側面において、該抗体は配列番号 42 に少なくとも 99 % の配列同一性を有する重鎖アミノ酸配列、および配列番号 44 に少なくとも 99 % の配列同一性を有する軽鎖アミノ酸配列を含んでなる。さらに他の側面において、該抗体は配列番号 42 の可変領域を含んでなる重鎖アミノ酸配列、および配列番号 44 の可変領域を含んでなる軽鎖アミノ酸配列を含んでなる。さらなる側面において、該抗体は配列番号 42 を含んでなる重鎖アミノ酸配列、および配列番号 44 を含んでなる軽鎖アミノ酸配列を含んでなる。

20

【0114】

本発明の一態様において、抗-M A d C A M 抗体はヒト M A d C A M 上の立体配座エピソードに特異的に結合する。他の態様において、抗-M A d C A M 抗体は被験対象に投与後、ヒトの腫瘍増殖を阻害する。

【0115】

モノクローナルヒト I g G 2 抗体組成物の調製：

ヒト I g G 2 抗体は一般に被験対象に非経口投与するための医薬組成物として製剤化する。特定の態様において、該医薬組成物は液状組成物である。

一態様において、本発明はヒト I g G 2 抗体およびキレート化剤を含有してなる組成物を目的とする。もう一つの態様において、本発明はヒト I g G 2 抗体およびキレート化剤を含有してなる液状組成物を目的とする。もう一つの態様において、本発明はヒト I g G 2 抗体および E D T A を含有してなる組成物を目的とする。もう一つの態様において、本発明はヒト I g G 2 抗体および E D T A を含有してなる液状医薬組成物を目的とする。

30

【0116】

用語「医薬組成物」とは有効成分の生物活性を有効とするような形状の製剤をいう。一部の態様において、医薬組成物は液状医薬組成物である。「医薬的に許容し得る添加剤」（媒体、添加物）は、採用される有効成分の有効量を提供するために、被験対象に合理的に（すなわち、安全に）投与し得る添加剤である。用語「添加剤」または「担体」は、本明細書にて使用する場合、不活性な物質であり、通常、医薬用の希釈剤、媒体、保存剤、結合剤または安定剤として使用される物質である。本明細書に使用される場合、「希釈剤」という用語は、医薬的に許容し得る（ヒトへの投与に安全で非毒性の）溶媒をいい、本明細書の液状組成物の調製に有用である。例示となる希釈剤は無菌水および注射用静菌水（B W F I）であるが、限定されるものではない。

40

【0117】

本発明の組成物は、1 種以上の本発明ヒト I g G 2 モノクローナル抗体を、キレート化剤を含んでなる医薬的に許容し得る添加剤と組合わせて含む。本発明の液状組成物は、1 種以上の本発明ヒト I g G 2 モノクローナル抗体を、キレート化剤を含んでなる医薬的に許容し得る添加剤と組合わせて含む。一態様において、本発明はヒトモノクローナル I g G 2 抗体の重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する少なくとも 1 種の抗体とキレート化剤と

50

を含有してなる組成物を包含する。もう一つの態様において、本発明はヒトモノクローナル I g G 2 抗体の重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する少なくとも 1 種の抗体、キレート化剤、および選択肢としてさらに追加の医薬的に許容し得る添加剤とを含有してなる液状組成物を包含する。

【0118】

本発明組成物におけるヒト I g G 2 抗体の濃度は、一般に、1 ミリリットルあたり少なくとも約 0.1 ミリグラム (mg/ml) 以上、少なくとも約 1.0 mg/ml 以上、少なくとも約 10 mg/ml 以上、少なくとも約 20 mg/ml 以上、少なくとも約 50 mg/ml 以上、少なくとも約 100 mg/ml 以上、または少なくとも約 200 mg/ml 以上である。特定の態様において、ヒト I g G 2 抗体の濃度は一般に約 0.1 mg/ml ないし約 200 mg/ml、約 0.5 mg/ml ないし約 100 mg/ml、約 1 mg/ml ないし約 50 mg/ml、約 2.0 mg/ml ないし約 35 mg/ml、約 5.0 mg/ml ないし約 25 mg/ml、または約 7 mg/ml ないし約 15 mg/ml の範囲である。一態様において、本発明組成物におけるヒト I g G 2 抗体の濃度は、一般に約 5 mg/ml、約 10 mg/ml、約 20 mg/ml、約 50 mg/ml、約 65 mg/ml、約 70 mg/ml、約 75 mg/ml、約 80 mg/ml、約 85 mg/ml、または約 100 mg/ml である。もう一つの態様において、該組成物におけるヒト I g G 2 抗体の濃度は、約 1 mg/ml ないし約 50 mg/ml の範囲である。一態様において、該組成物におけるヒト I g G 2 抗体の濃度は、約 10 mg/ml である。もう一つの態様において、ヒト I g G 2 抗体の濃度は、約 75 mg/ml である。

【0119】

もう 1 つの実施形態では、組成物中のヒト I g G 2 抗体の濃度は、約 50 mg/ml ~ 約 100 mg/ml の範囲である。組成物が皮下送達用に意図される場合には、より高い抗体濃度を用いる実施形態もある。

【0120】

本明細書において、用語「キレート剤」とは、一般に、金属イオンと少なくとも 1 つの結合（例えば、共有、イオン、または別の）を形成し得る賦形剤を指す。キレート剤とは、通常、選択した液体組成物において、不安定性を促進し得る種を含む錯体に対して安定化剤として使用できる多座配位子である。キレート剤として作用し得る化合物は、電子が豊富な官能基を含むことが多い。適した、電子が豊富な官能基としては、カルボン酸基、ヒドロキシ基およびアミノ基が挙げられる。アミノポリカルボン酸、ヒドロキシポリカルボン酸、ヒドロキシアミノカルボン酸などにおけるこれらの基の配置によって、金属と結合する能力を有する部分が生じる。

【0121】

しかし、本発明は、主に、金属イオンと結合を形成するキレート剤の能力によるキレート剤に限定されるよう意図されるものではない。したがって、本発明は、本発明の組成物においてキレート剤が作用する、いずれかの具体的な機構によって限定されるよう意図されるものではなく、本明細書においてキレート剤と呼ばれる賦形剤は、金属イオンと結合を形成するキレート剤の能力とは全く無関係な機構によって特性を達成する場合もある。

【0122】

本発明に用いるのに適したキレート剤としては、それだけには限らないが、アミノポリカルボン酸、ヒドロキシアミノカルボン酸、N-置換グリシン、2-(2-アミノ-2-オキソクチル)アミノエタンスルホン酸 (BES)、デフェロキサミン (DEF)、クエン酸、ナイアシナミド、およびデスオキコレートが挙げられる。適したアミノポリカルボン酸の例としては、エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA)、ニトリロトリ酢酸 (NTA)、N-2-アセトアミド-2-イミノジ酢酸 (ADA)、ビス(アミノエチル)グリコールエーテル、N, N, N', N'-テトラ酢酸 (EGTA)、トランス-ジアミノシクロヘキサンテトラ酢酸 (DCTA)、グルタミン酸、およびアスパラギン酸が挙げられる。適したヒドロキシアミノカルボン酸の例としては、N-ヒドロキシエチルイミノジ酢酸 (HIMDA)、N, N-ビス-ヒド

ロキシエチルグリシン（ピシン）およびN-（トリスヒドロキシメチルメチル）10グリシン（トリシン）が挙げられる。適したN-置換グリシンの例としては、グリシルグリシンがある。適したデスオキシコレートの例としては、デスオキシコール酸ナトリウムがある。2種以上のキレート剤の混合物も本発明に包含される。

【0123】

本発明に用いるキレート剤は、可能であれば、化合物の遊離酸または遊離塩基の形（例えば、本明細書では、同義的に「EDTA」または「エドト酸塩」と呼ばれる）として、または対応する塩の形（例えば、対応する酸付加塩または塩基付加塩、例えば、エドト酸二ナトリウム）として存在し得る。適した酸付加塩としては、例えば、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウムまたはカリウム塩）、アルカリ土類金属塩（例えば、カルシウム塩）
10
が挙げられ、塩はその他の弱く結合される金属イオンを用いても調製できる。当技術分野では公知であるが、塩の性質および中和されるべき電荷数は、存在するカルボキシル基の数および安定化キレート剤が供給されるpHに応じて変わる。当技術分野では公知であるが、キレート剤は、個々の標的イオンが結合される様々な強さを有する。さらなる例示としては、EDTAの適した塩として、エドト酸二カリウム、エドト酸二ナトリウム、エドト酸カルシウム二ナトリウム、エドト酸ナトリウム、エドト酸三ナトリウム、およびエドト酸カリウムが挙げられ、デフェロキサミン（DEF）の適した塩としては、デフェロキサミンメシレート（DFM）がある。

【0124】

本発明に用いるキレート剤は、化合物または対応する塩の無水物の形、溶媒和物の形または水和物の形として存在する場合もある。キレート剤が溶媒和物の形または水和物の形である場合には、溶媒和または水和の種々の状態で存在し得る（例えば、無水物の形、水和物の形、二水和物の形、および三水和物の形を含む）。さらなる例示としては、EDTAの適した水和物として、EDTA二ナトリウム二水和物があり、クエン酸の適した形としては、無水クエン酸、クエン酸一水和物、およびクエン酸三ナトリウム二水和物が挙げられる。

【0125】

また、本発明の抗体組成物に用いる適したキレート剤としては、例えば、溶液中で金属イオンと結合し、それらを、利用可能なO₂と反応できなくし、それによって、抗体と自由に反応し、分解するヒドロキシルラジカルの生成を最小化するか防ぐものが挙げられる
30
。キレート剤は、本発明の組成物において、還元された酸素種の形成を低下させ、酸性種（脱アミド）形成を減少させ、抗体凝集を減少させ、かつ／または抗体断片化を減少させることができる。このようなキレート剤は、キレート剤で保護されずに製剤された抗体の分解を減少または阻止することができる。

【0126】

キレート剤の濃度が記載される場合には、記載された濃度は遊離酸または遊離塩基の形のキレート剤のモル濃度を表すものとする。例えば、特定の液体薬剤組成物では、キレート剤の濃度は、通常、約0.01マイクロモル～約50ミリモル、約1マイクロモル～約10.0ミリモル、約15マイクロモル～約5.0ミリモル、約0.01ミリモル～約1.0ミリモル、約0.03ミリモル～約0.5ミリモルの範囲である。特定の実施形態では、液体薬剤組成物中のキレート剤の濃度は、約0.01ミリモル、0.02ミリモル、0.027ミリモル、0.03ミリモル、約0.04ミリモル、約0.05ミリモル、約0.06ミリモル、約0.07ミリモル、約0.10ミリモル、約0.20ミリモル、約0.26ミリモル、約0.27ミリモル、約0.30ミリモル、約0.31ミリモル、約0.34ミリモル、約0.40ミリモル、約0.50ミリモル、または約1.0ミリモルであり得る。特定の実施形態では、キレート剤の濃度は約0.027ミリモル、約0.05ミリモル、約0.13ミリモル、または約0.27ミリモルである。一実施形態では、キレート剤の濃度は、約0.05ミリモルである。もう1つの実施形態では、キレート剤の濃度は、約0.13ミリモルである。
40

【0127】

特に断りのない限り、本明細書に列举した濃度は周囲条件（すわなち、25℃および大気圧）での濃度である。前記のキレート剤濃度の中間にある範囲も本発明の一部であるものとする。例えば、上限および／または下限として、いずれかの前記の値の組合せを用いる値の範囲も含まれるものとする。

【0128】

一実施形態では、キレート剤はEDTA、DTPA、DFM、およびそれらの混合物からなる群から選択される。もう1つの実施形態では、キレート剤はDFMである。もう1つの実施形態では、キレート剤はEDTAである。もう1つの実施形態では、キレート剤はDTPAである。もう1つの実施形態では、本組成物は、通常、約0.01マイクロモル～約50ミリモル、約1マイクロモル～約20.0ミリモル、約15マイクロモル～約10.0ミリモル、約0.01ミリモル～約5.0ミリモル、または約0.03ミリモル～約1ミリモルの範囲の量のEDTAを含んでなる。特定の実施形態では、組成物中のEDTAの濃度は、約0.01ミリモル、0.02ミリモル、0.027ミリモル、0.03ミリモル、約0.04ミリモル、約0.05ミリモル、約0.06ミリモル、約0.07ミリモル、約0.10ミリモル、約0.20ミリモル、約0.26ミリモル、約0.27ミリモル、約0.30ミリモル、約0.31ミリモル、約0.34ミリモル、約0.40ミリモル、約0.50ミリモル、または約1.0ミリモルであり得る。特定の実施形態では、EDTAの濃度は約0.027ミリモル、約0.05ミリモル、約0.13ミリモル、または約0.27ミリモルである。一実施形態では、EDTAの濃度は約0.05ミリモルである。もう1つの実施形態では、EDTAの濃度は約0.13ミリモルである。

【0129】

前記のように、本発明の組成物は、キレート剤に加え、バッファーをさらに含んでなる場合もある。本明細書において、用語「バッファー」とは、液体抗体組成物がpHの変化に耐えるのを可能にする、添加される組成物を指す。

【0130】

特定の実施形態では、添加されるバッファーにより、組成物が（液体形態の場合には）、その酸-塩基共役成分の作用によってpHの変化に耐えることが可能となる。例えば、緩衝された組成物は、所望のpHに到達するのに適当な量のL-ヒスチジン-HCl（L-ヒスチジン-ヒドロクロリド）およびL-ヒスチジンを添加することによって調製できる。しかしながら、他の実施形態では、添加されるバッファーによって、液体抗体組成物が、その酸-塩基共役成分の作用によってpHの変化に耐えることが可能となる。第2の例として、緩衝された組成物は、所望のpHに到達するのに適当な量の酸、例えば、塩酸、およびL-ヒスチジンを添加することによって調製できる。

【0131】

適したバッファーの例としては、それだけには限らないが、酢酸塩（例えば、酢酸ナトリウム）、コハク酸塩（例えば、コハク酸ナトリウム）、グルコン酸塩、クエン酸塩（例えば、および、それだけには限らないが、アミノ酸（例えば、ヒスチジン）、酢酸、リン酸およびリン酸塩、アスコルビン酸塩、酒石酸、マレイン酸、グリシン、乳酸塩、乳酸、アスコルビン酸、イミダゾール、カルボン酸および重炭酸塩、コハク酸、安息香酸ナトリウムおよび安息香酸塩、グルコン酸塩、エデト酸塩（EDTA）、酢酸塩、リンゴ酸塩、イミダゾール、トリス、リン酸塩、およびそれらの混合物などのバッファーをはじめとするその他の有機酸バッファーが挙げられる。一実施形態では、バッファーは酢酸塩である。

【0132】

もう1つの実施形態では、バッファーはヒスチジンである。本発明の組成物を調製するために用いるヒスチジン出発物質は、種々の形で存在し得る。例えば、ヒスチジンは、ヒスチジンの鏡像異性体（例えば、L-またはD-鏡像異性体）またはラセミ体の形、ヒスチジンの遊離酸または遊離塩基の形、ヒスチジンの塩の形（例えば、一塩酸塩、二塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、または酢酸塩）、ヒスチジンの溶媒和物の形、ヒスチジンの水和物の形（例えば、一水和物）、またはヒスチジンの無水物の形であり得る。組成物を調

製するために用いるヒスチジン塩基および／または塩の純度は、通常、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、または少なくとも約 99.5 % であり得る。本明細書において、用語「純度」とは、ヒスチジンとの関連では、当技術分野で理解されるような、例えば、ザ・メルク・インデックス(The Merck Index)、第 13 版、オニールら編(メルク社(Merck&Co.))、2001)に記載されるような、ヒスチジンの化学純度を指す。

【0133】

バッファの濃度が記載される場合には、記載された濃度は遊離酸または遊離塩基の形のバッファのモル濃度を表すものとする。例えば、特定の液体薬剤組成物中に存在する場合、バッファの濃度は約 0.1 ミリモル(mM)～約 100 mM の範囲であり得る。一実施形態では、バッファの濃度は約 1 mM～約 50 mM である。もう 1 つの実施形態では、バッファの濃度は約 5 mM～約 30 mM である。種々の実施形態では、バッファの濃度は、約 1 mM、約 5 mM、約 10 mM、約 15 mM、約 20 mM、約 25 mM、約 30 mM、約 35 mM、約 40 mM、約 45 mM、約 50 mM、約 55 mM、約 60 mM、約 65 mM、約 70 mM、約 75 mM、約 80 mM、約 85 mM、約 90 mM、約 95 mM、約 100 mM である。一実施形態では、本薬剤組成物中のヒスチジンの濃度は、約 10 mM である。もう 1 つの実施形態では、薬剤組成物は約 10 mM の L-ヒスチジン(塩基の形の)を含む。もう 1 つの実施形態では、本薬剤組成物中のヒスチジンの濃度は、約 20 mM である。もう 1 つの実施形態では、本薬剤組成物は約 20 mM の L-ヒスチジン(塩基の形の)を含む。前記のヒスチジン濃度の中間にある範囲も本発明の一部であるものとする。例えば、上限および／または下限として、いずれかの前記の値の組合せを用いる値の範囲も含まれるものとする。

【0134】

一般に、バッファは、組成物中の(抗体安定性に影響を及ぼし得る)許容される pH レベルを維持するために用いる。通常、本組成物は、約 4～約 8、約 4.5～約 7、約 5.0～約 6.5、約 5.2～約 5.8、または約 5.2～約 6.3 の範囲の pH を維持するよう緩衝される。前記の pH の中間にある範囲も本発明の一部であるものとする。例えば、上限および／または下限として、いずれかの前記の値の組合せを用いる値の範囲も含まれるものとする。一実施形態では、本組成物は約 5.5 の pH を維持するよう緩衝される。もう 1 つの実施形態では、本組成物は約 6.0 の pH を維持するよう緩衝される。

【0135】

前記のように、本発明の組成物は、キレート剤に加え、製薬上許容される等張化剤をさらに含んでなる場合もある。本明細書において、用語「等張化剤(tonicity agent)」または「等張化剤(tonicifier)」とは、液体抗体組成物の浸透圧を調節できる賦形剤を指す。特定の実施形態では、等張化剤は液体抗体組成物の浸透圧を調節し、抗体組成物が、被験体の身体組織の細胞と生理学的に適合するよう等張にすることができる。さらにその他の実施形態では、「等張化剤」は、本明細書に記載した、いずれかのヒト IgG2 抗体の安定性の向上に寄与し得る。「等張」組成物とは、ヒト血液と本質的に同じ浸透圧を有するものである。等張組成物は、通常、約 250～350 mOsm の浸透圧を有する。用語「低張の」とは、浸透圧がヒト血液のものよりも低い組成物を説明する。これに対して、用語「高張の」とは、浸透圧がヒト血液のものよりも高い組成物を説明するために用いる。等張性は、例えば、蒸気圧浸透圧計またはアイスフリージング浸透圧計を用いて測定できる。

【0136】

本発明の組成物を調製するために用いる等張化剤は、種々の形で存在し得る。等張化剤が記載される場合には、等張化剤の名称に、これら種々の形の全てが包含されるものとする。例えば、等張化剤は鏡像異性体の形(例えば、L-もしくは D-鏡像異性体)またはラセミ体の形； α 、 α 、または β 、 β 、または α 、 β 、または β 、 α をはじめとする、 α または β などの異性体；遊離酸または遊離塩基の形；水和物の形(例えば、一水和物)、または無水物の形であり得る。

【0137】

一実施形態では、等張化剤はサッカライドである。本明細書において、用語「サッカライド」とは、多価アルコールの誘導体である分子の種類を指す。サッカライドは、通常、糖質と呼ばれ、種々の量の糖（サッカライド）単位、例えば、単糖、二糖および多糖を含み得る。本発明において等張化剤として用いるのに適したサッカライドとしては、それだけには限らないが、フルクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、ラクトース、マルトース、スクロース、デキストラン、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、水溶性グルカン、およびそれらの混合物からなる群から選択されるサッカライドが挙げられる。

【0138】

もう1つの実施形態では、等張化剤はポリオールである。本明細書において、用語「ポリオール」とは、複数のヒドロキシル基を有する賦形剤を指し、これとしては、糖（還元糖および非還元糖）、糖アルコールおよび糖酸が挙げられる。一実施形態では、ポリオールの分子量は約600kD未満（例えば、約120～約400kDの範囲）である。「還元糖」とは、金属イオンを還元できるか、タンパク質中のリジンおよび他のアミノ基と共有結合的に反応できるヘミアセタール基を含むものとし、「非還元糖」とは、還元糖のこういった特性を持たないものとする。本発明において等張化剤として用いるのに適したポリオールとしては、それだけには限らないが、マンニトール、トレハロース、ソルビトール、エリスリトール、イソマルト、ラクチトール、マルチトール、キシリトール、グリセロール、ラクチトール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、イノシトールおよびそれらの混合物からなる群から選択されるポリオールが挙げられる。一実施形態では、等張化剤は、トレハロース、スクロース、およびそれらの混合物からなる群から選択される非還元糖である。一実施形態では、等張化剤は、塩化ナトリウムなどの塩である。

【0139】

一実施形態では、等張化剤はマンニトールである。もう1つの実施形態では、等張化剤はD-マンニトールである。もう1つの実施形態では、等張化剤はトレハロースである。もう1つの実施形態では、等張化剤は α -トレハロース二水和物である。もう1つの実施形態では、等張化剤はスクロースである。もう1つの実施形態では、等張化剤は、塩化ナトリウムである。

【0140】

一実施形態では、組成物中の等張化剤の濃度は、約1ミリモル～約600ミリモル、約1ミリモル～約400ミリモル、1ミリモル～約300ミリモル、または200ミリモル～約275ミリモルの範囲である。別の一実施形態では、等張化剤はマンニトールであり、液体薬剤組成物中に約247ミリモルの濃度で存在する。もう1つの実施形態では、等張化剤はトレハロースであり、組成物中に約222ミリモルの濃度で存在する。もう1つの実施形態では、等張化剤はトレハロースであり、組成物中に約238ミリモルの濃度で存在する。もう1つの実施形態では、等張化剤はスクロースであり、組成物中に約263ミリモルの濃度で存在する。

【0141】

一実施形態では、組成物中の等張化剤の濃度は、約1mg/ml～約300mg/ml、約1mg/ml～約200mg/ml、約50mg/ml～約150mg/mlの範囲である。もう1つの実施形態では、等張化剤はマンニトールであり、組成物中に約45mg/mlの濃度で存在する。もう1つの実施形態では、等張化剤はトレハロースであり、組成物中に約84mg/mlの濃度で存在する。もう1つの実施形態では、等張化剤はトレハロースであり、組成物中に約90mg/mlの濃度で存在する。もう1つの実施形態では、等張化剤はトレハロースであり、組成物中に約104mg/mlの濃度で存在する。もう1つの実施形態では、等張化剤はスクロースであり、組成物中に約90mg/mlの濃度で存在する。もう1つの実施形態では、等張化剤はスクロースであり、組成物中に約94mg/mlの濃度で存在する。

【0142】

一実施形態では、等張化剤が塩である場合、組成物中の塩の濃度は約1mg/ml～約

20 mg/ml の範囲である。もう1つの実施形態では、等張化剤は塩化ナトリウムであり、組成物中の塩化ナトリウムの濃度は約 8.18 mg/ml である。

【0143】

前記の等張化剤濃度の中間にある範囲も本発明の一部であるものとする。例えば、上限および/または下限として、いずれかの前記の値の組合せを用いる値の範囲も含まれるものとする。

【0144】

前記のように、本発明の組成物は、キレート剤に加え、製薬上許容される界面活性剤をさらに含んでなる場合もある。本明細書において、用語「界面活性剤」とは、液体抗体組成物の表面張力を変更することができる賦形剤を指す。特定の実施形態では、界面活性剤は液体抗体組成物の表面張力を低下させる。さらに他の実施形態では、「界面活性剤」は、本明細書に記載した、いずれかのヒト IgG2 抗体の安定性の向上に寄与し得る。例えば、界面活性剤は製剤された抗体の凝集を減少させ、かつ/または組成物中の粒子の形成を最小化し、かつ/または吸着を減少させることができる。界面活性剤はまた、凍結/解凍サイクルの間およびその後の抗体の安定性を向上させることができる。

10

【0145】

適した界面活性剤としては、ポリソルベート界面活性剤、ポロキサマー（例えば、ポロキサマー 18 および 407）、Triton X-100（登録商標）などのトリトン界面活性剤、Tween 20（登録商標）および Tween 80（登録商標）などのポリソルベート界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ナトリウムオクタヒドログリオキシド、ラウリルスルホベタイン、ミリスチルスルホベタイン、リノレイルスルホベタイン、ステアリルスルホベタイン、ラウリルサルコシン、ミリスチルサルコシン、リノレイルサルコシン、ステアリルサルコシン、リノレイルベタイン、ミリスチルベタイン、セチルベタイン、ラウロアミドプロピルベタイン、コカミドプロピルベタイン、リノールアミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルベタイン、パルミドプロピルベタイン、イソステアラミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルジメチルアミン、パルミドプロピルジメチルアミン、イソステアラミドプロピルジメチルアミン、メチルココイルタウリン酸ナトリウム、メチルオレイルタウリン酸二ナトリウム、ジヒドロキシプロピルPEG5 リノールアンモニウムクロリド、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、およびそれらの混合物が挙げられる。

20

30

【0146】

一実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート 20、ポリソルベート 21、ポリソルベート 40、ポリソルベート 60、ポリソルベート 61、ポリソルベート 65、ポリソルベート 80、ポリソルベート 81、ポリソルベート 85、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1種の賦形剤を含んでなるポリソルベート界面活性剤である。もう1つの実施形態では、本組成物はポリソルベート 80 を含んでなる。

【0147】

界面活性剤の濃度は、組成物中に存在する場合は、通常、約 0.01 mg/ml ~ 約 10 mg/ml、約 0.05 mg/ml ~ 約 5.0 mg/ml、約 0.1 mg/ml ~ 約 1.0 mg/ml、または約 0.2 mg/ml ~ 約 0.7 mg/ml の範囲である。もう1つの実施形態では、界面活性剤の濃度は、約 0.05 ミリモル ~ 約 1.0 ミリモルの範囲である。もう1つの実施形態では、界面活性剤は約 0.2 mg/ml である量で存在する。もう1つの実施形態では、界面活性剤は約 0.4 mg/ml である量で存在する。一実施形態では、本組成物は約 0.2 mg/ml のポリソルベート 80 を含む。もう1つの実施形態では、本組成物は約 0.4 mg/ml のポリソルベート 80 を含む。もう1つの実施形態では、本組成物は約 0.5 mg/ml のポリソルベート 80 を含む。

40

【0148】

前記の界面活性剤濃度の中間にある範囲も本発明の一部であるものとする。例えば、上

50

限および／または下限として、いずれかの前記の値の組合せを用いる値の範囲も含まれるものとする。

【0149】

前記のように、本発明の組成物は、キレート剤に加え、製薬上許容される抗酸化剤をさらに含んでなる場合もある。適した抗酸化剤としては、それだけには限らないが、メチオニン、チオ硫酸ナトリウム、カタラーゼ、およびプラチナが挙げられる。例えば、本組成物は1 mM～約100 mMの範囲の、特に、約27 mMである濃度のメチオニンを含み得る。

【0150】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなる組成物を包含する。 10

【0151】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と製薬上許容されるキレート剤とを含んでなる液体薬剤組成物を包含する。

【0152】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と、製薬上許容されるキレート剤とを含んでなり、さらなる製薬上許容される賦形剤を場合によって含む液体薬剤組成物を包含する。

【0153】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなり、抗体の純度が少なくとも約90%、95%または100%である組成物を包含する。 20

【0154】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなり、その抗体濃度が約0.1 mg/ml～約200 mg/mlである組成物を包含する。

【0155】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなり、少なくとも約5 mg/ml、少なくとも約10 mg/ml、少なくとも約15 mg/ml、少なくとも約20 mg/ml、または少なくとも約25 mg/mlである抗体の濃度を含む組成物を包含する。 30

【0156】

一実施形態では、本発明は少なくとも1種のヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなり、少なくとも約60 mg/ml、少なくとも約70 mg/ml、少なくとも約75 mg/ml、少なくとも約80 mg/ml、または少なくとも約90 mg/mlである抗体の濃度を含む組成物を包含する。

【0157】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と約0.001ミリモル～約5.0ミリモルのキレート剤とを含んでなり、その抗体濃度が約0.1 mg/ml～約200 mg/mlである組成物を包含する。 40

【0158】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と約0.001ミリモル～約1.0ミリモルのキレート剤とを含んでなり、その抗体濃度が約0.1 mg/ml～約200 mg/mlである液体薬剤組成物を包含する。

【0159】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と約0.001ミリモル～約0.5ミリモルのキレート剤とを含んでなり、その抗体濃度が約0.1 mg/ml～約200 mg/mlである液体薬剤組成物を包含する。

【0160】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と約0.01ミリモル 50

～約 0.5 ミリモルの EDTA とを含んでなり、その抗体濃度が約 0.1 mg/ml ～約 200 mg/ml である液体薬剤組成物を包含する。

【0161】

本発明の一態様では、本組成物は少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、キレート剤とバッファーとを含んでなる。

【0162】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、キレート剤と、バッファーと、等張化剤とを含んでなる。

【0163】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、キレート剤と、バッファーと、スクロースを含んでなる等張化剤とを含んでなる。 10

【0164】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、キレート剤と、バッファーと、マンニトールを含んでなる等張化剤とを含んでなる。

【0165】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、キレート剤と、バッファーと、トレハロースを含んでなる等張化剤とを含んでなる。 20

【0166】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、キレート剤と、バッファーと、塩化ナトリウムを含んでなる等張化剤とを含んでなる。

【0167】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、キレート剤と、バッファーと、等張化剤と、界面活性剤とを含んでなる。

【0168】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、EDTA と、バッファーとを含んでなる。 30

【0169】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、EDTA と、酢酸塩とを含んでなる。

【0170】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、EDTA と、ヒスチジンとを含んでなる。

【0171】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、EDTA と、バッファーと、等張化剤とを含んでなる。

【0172】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、EDTA と、バッファーと、等張化剤と、界面活性剤とを含んでなる。 40

【0173】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、EDTA と、ヒスチジンと、等張化剤と、界面活性剤とを含んでなる。

【0174】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG2 抗体と、EDTA と、ヒスチジンと、トレハロースと、界面活性剤とを含んでなる。

【0175】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも 1 種のモノクローナルヒト IgG 50

2抗体と、キレート剤と、ヒスチジンと、トレハロースと、ポリソルベート80とを含んでなる。

【0176】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、EDTAと、ヒスチジンと、トレハロースと、ポリソルベート80とを含んでなる。

【0177】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、EDTAと、ヒスチジンと、スクロースと、ポリソルベート80とを含んでなる。

10

【0178】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、EDTAと、ヒスチジンと、マンニトールと、ポリソルベート80とを含んでなる。

【0179】

本発明のその他の態様では、本組成物は、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、EDTAと、ヒスチジンと、塩化ナトリウムと、ポリソルベート80とを含んでなる。

【0180】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と、約0.01ミリモル～約1.0ミリモルのキレート剤と、約1ミリモル～約100ミリモルのバッファーとを含んでなり、その抗体濃度が約0.1mg/ml～約200mg/mlである組成物を包含する。

20

【0181】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と、約0.01ミリモル～約1.0ミリモルのキレート剤と、約1ミリモル～約50ミリモルのヒスチジンとを含んでなり、その抗体濃度が約0.1mg/ml～約200mg/mlである組成物を包含する。

【0182】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と、約0.01ミリモル～約1.0ミリモルのEDTAと、約1ミリモル～約50ミリモルのヒスチジンを含んでなり、その抗体濃度が約0.1mg/ml～約200mg/mlである組成物を包含する。

30

【0183】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と、約0.01ミリモル～約1.0ミリモルのキレート剤と、約1ミリモル～約50ミリモルのバッファーと、約100ミリモル～約600ミリモルの等張化剤とを含んでなり、その抗体濃度が約0.1mg/ml～約200mg/mlである組成物を包含する。

【0184】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と、約0.01ミリモル～約1.0ミリモルのキレート剤と、約1ミリモル～約50ミリモルのヒスチジンと、約100ミリモル～約600ミリモルの等張化剤とを含んでなり、その抗体濃度が約0.1mg/ml～約200mg/mlである組成物を包含する。

40

【0185】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と、約0.01ミリモル～約1.0ミリモルのキレート剤と、約1ミリモル～約50ミリモルのバッファーと、約100ミリモル～約600ミリモルの等張化剤と、約0.005ミリモル～約10ミリモルの界面活性剤とを含んでなり、その抗体濃度が約0.1mg/ml～約200mg/mlである組成物を包含する。

【0186】

50

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と、約0.01ミリモル～約1.0ミリモルのEDTAと、約1ミリモル～約50ミリモルのバッファーと、約100ミリモル～約600ミリモルの等張化剤と、約0.005ミリモル～約10ミリモルの界面活性剤とを含んでなり、その抗体濃度が約0.1mg/ml～約200mg/mlである組成物を包含する。

【0187】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と、約0.01ミリモル～約1.0ミリモルのキレート剤と、約1ミリモル～約50ミリモルのヒスチジンと、約100ミリモル～約600ミリモルのトレハロースと、約0.005ミリモル～約10ミリモルのポリソルベート80とを含んでなり、その抗体濃度が約0.1mg/ml～約200mg/mlである組成物を包含する。 10

【0188】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体と、約0.01ミリモル～約1.0ミリモルのEDTAと、約1ミリモル～約50ミリモルのヒスチジンと、約100ミリモル～約600ミリモルのトレハロースと、約0.005ミリモル～約10ミリモルのポリソルベート80とを含んでなり、その抗体濃度が約0.1mg/ml～約200mg/mlである組成物を包含する。

【0189】

一実施形態では、本組成物は、約0.01mg/ml～約200mg/mlの少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、約1mM～約100mMのヒスチジンとを含んでなる。 20

【0190】

本発明のその他の態様では、液体薬剤組成物は、約1mg/ml～約100mg/mlのモノクローナルヒトIgG2抗体と、約10mM～約30mMのヒスチジンと、約0.05ミリモル～約0.5ミリモルのポリソルベート80と、約0.01ミリモル～約1ミリモルのEDTAと、約200ミリモル～約400ミリモルのトレハロースとを含んでなる。

【0191】

本発明のその他の態様では、液体薬剤組成物は、約1mg/ml～約100mg/mlのモノクローナルヒトIgG2抗体と、約10mM～約30mMのヒスチジンと、約0.05ミリモル～約0.5ミリモルのポリソルベート80と、約0.01ミリモル～約1ミリモルのEDTAと、約200ミリモル～約300ミリモルのトレハロースとを含んでなる。 30

【0192】

もう1つの実施形態では、本発明は少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体とDTPAとを含んでなる組成物を対象とする。

【0193】

本発明の特定の態様では、液体ヒトIgG2抗体組成物は、約1mg/ml～約100mg/mlの少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、約1mM～約50mMのヒスチジンと、約0.01mg/ml～約5mg/mlのポリソルベート80と、約0.001mg/ml～約0.5mg/mlのEDTAと、約10mg/ml～約200mg/mlのスクロースとを含んでなる。 40

【0194】

本発明のその他の態様では、ヒトIgG2抗体組成物は、約50mg/ml～約100mg/mlの少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、約10mM～約30mMのヒスチジンと、約0.05ミリモル～約1ミリモルのポリソルベート80と、約0.01ミリモル～約1ミリモルのEDTAと、約100ミリモル～約400ミリモルのスクロースとを含んでなる。

【0195】

もう1つの実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体とキレート剤 50

とを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.01ミリモル～約2ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.001ミリモル～約5ミリモルの範囲であり、抗体対キレート剤のモル比が約0.002～約2000、約0.01～約500、約0.05～約100、約0.1～約50、約0.5～約10、約1～約5、約1～約3の範囲、または約1.6である組成物を対象とする。

【0196】

もう1つの実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.01ミリモル～約2ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.001ミリモル～約5ミリモルの範囲であり、抗体対キレート剤のモル比が約0.002～約2000、約0.01～約500、約0.05～約100、約0.1～約50、約0.5～約10、約1～約5の範囲、または約3.8である組成物を対象とする。

10

【0197】

もう1つの実施形態では、本発明は、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2とキレート剤と、ヒスチジンとを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.01ミリモル～約2ミリモルの範囲であり、ヒスチジンのモル濃度が約1ミリモル～約100ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.001ミリモル～約5ミリモルの範囲であり、抗体対キレート剤のモル比が約0.002～約2000、約0.01～約500、約0.05～約100、約0.1～約50、約0.5～約10、約1～約5の範囲、または約3.8である組成物を対象とする。

20

【0198】

もう1つの実施形態では、本発明は、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2とキレート剤と、ヒスチジンとを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.01ミリモル～約2ミリモルの範囲であり、ヒスチジンのモル濃度が約5ミリモル～約30ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.001ミリモル～約5ミリモルの範囲であり、抗体対キレート剤のモル比が約0.002～約2000、約0.01～約500、約0.05～約100、約0.1～約50、約0.5～約10、約1～約5の範囲、または約3.8である組成物を対象とする。

【0199】

もう1つの実施形態では、本発明は、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と製薬上許容されるキレート剤とを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.0006ミリモル～約1.35ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.003ミリモル～約50ミリモルの範囲であり、抗体対キレート剤のモル比が約0.00001～約450、約0.0001～約100、約0.005～約50、約0.001～約10、約0.01～約5、約0.1～約1の範囲、または約0.5である組成物を対象とする。

30

【0200】

もう1つの実施形態では、本発明は、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、製薬上許容されるキレート剤と、ヒスチジンとを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.0006ミリモル～約1.35ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.003ミリモル～約50ミリモルの範囲であり、ヒスチジンのモル濃度が約1ミリモル～約100ミリモルの範囲であり、抗体対キレート剤のモル比が約0.00001～約450、約0.0001～約100、約0.005～約50、約0.001～約10、約0.01～約5、約0.1～約1の範囲、または約0.5である組成物を対象とする。

40

【0201】

もう1つの実施形態では、本発明は、ヒトIgG2抗体と製薬上許容されるキレート剤とを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.0006ミリモル～約1.35ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.003ミリモル～約50ミリモルの範囲であり、抗体対キレート剤のモル比が約0.00001～約450、約0.0001～約100、約0.005～約50、約0.001～約10、約0.01～約5、約0.1～約3の範囲、または約1.9である組成物を対象とする。

50

【0202】

もう1つの実施形態では、本発明は、ヒトIgG2抗体と、製薬上許容されるキレート剤と、ヒスチジンとを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.0006ミリモル～約1.35ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.003ミリモル～約50ミリモルの範囲であり、ヒスチジンのモル濃度が約1ミリモル～約100ミリモルの範囲であり、抗体対キレート剤のモル比が約0.00001～約450、約0.0001～約100、約0.005～約50、約0.001～約10、約0.01～約5、約0.1～約1の範囲、または約0.5である組成物を対象とする。

【0203】

もう1つの実施形態では、本発明は、ヒトIgG2抗体と、製薬上許容されるキレート剤と、ヒスチジンとを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.0006ミリモル～約1.35ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.003ミリモル～約50ミリモルの範囲であり、ヒスチジンのモル濃度が約5ミリモル～約30ミリモルの範囲であり、抗体対キレート剤のモル比が約0.0001～約100、約0.005～約50、約0.001～約10、約0.01～約5、約0.1～約3の範囲、または約1.9である組成物を対象とする。 10

【0204】

もう1つの実施形態では、本発明は、ヒトIgG2抗体と、製薬上許容されるキレート剤と、ヒスチジンとを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.0006ミリモル～約1.35ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.003ミリモル～約50ミリモルの範囲であり、ヒスチジンのモル濃度が約5ミリモル～約20ミリモルの範囲であり、抗体対キレート剤のモル比が約0.005～約50、約0.001～約10、約0.01～約5、約0.1～約3の範囲、または約1.9である組成物を対象とする。 20

【0205】

もう1つの実施形態では、本発明は、ヒトIgG2抗体と、製薬上許容されるキレート剤と、ヒスチジンとを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.0006ミリモル～約1.35ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.003ミリモル～約50ミリモルの範囲であり、ヒスチジンのモル濃度が約5ミリモル～約20ミリモルの範囲であり、抗体対キレート剤のモル比が約0.001～約10、約0.01～約5、約0.1～約3の範囲、または約1.9である組成物を対象とする。 30

【0206】

もう1つの実施形態では、本発明は、ヒトIgG2抗体と、製薬上許容されるキレート剤と、ヒスチジンとを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.0006ミリモル～約1.35ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.003ミリモル～約50ミリモルの範囲であり、ヒスチジンのモル濃度が約20ミリモルであり、抗体対キレート剤のモル比が約0.001～約10、約0.01～約5、約0.1～約3の範囲、または約1.9である組成物を対象とする。

【0207】

もう1つの実施形態では、本発明は、少なくとも1種のヒトIgG2モノクローナル抗体と製薬上許容されるキレート剤とを含んでなり、抗体のモル濃度が約0.0006ミリモル～約1.35ミリモルの範囲であり、キレート剤のモル濃度が約0.003ミリモル～約50ミリモルの範囲であり、抗体対キレート剤のモル比が約0.00001～約2000、約0.01～約500、約0.05～約100、約0.1～約10の範囲、または約0.5～約4である液体薬剤組成物を対象とする。 40

【0208】

ヒトIgG2抗体および抗体産生細胞株の作製方法

本発明にしたがう抗体は、ヒト抗体産生ゲノムの大部分が挿入されているが内因性マウス抗体の産生を欠損させられたトランスジェニックマウスを利用して調製できる。その結果、このようなマウスはヒト免疫グロブリン分子および抗体を産生でき、マウス免疫グロブリン分子および抗体の産生を欠損している。これを達成するために利用する技術を以下 50

に論じる。

【0209】

内因性免疫グロブリンの産生がなく、免疫すると、ヒト抗体の全レパートリーを産生できるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作製することが可能である。しかしながら、詳しくは、マウスのトランスジェニック作製およびそれに由来する抗体についてのいくつかの実施形態は、ハンソン（Hanson）らの米国特許第6,682,736号、ベジアン（Bedian）らの米国公開出願第20050059113号、および国際特許出願PCT/US2005/000370に開示されている。当業者であれば、このような技術を用いることによって、M-CSF、CTLA-4、およびMAdCAMなどのヒト抗原と結合する完全なヒト抗体、ならびにこのような抗体を産生するハイブリドーマを調製できる。 10

【0210】

ヒト抗体は、マウスまたはラット可変および／または定常領域を有する抗体と関連する、可能性ある問題を避ける。このようなマウスまたはラット由来タンパク質の存在は、抗体の急速なクリアランスをもたらす場合があり、またこのような抗体の投与を受ける被験体による、抗体に対する免疫応答の発生をもたらす場合もある。

【0211】

例えば、キメラの、生殖細胞系突然変異マウスにおける抗体重鎖結合領域（J_H）遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体産生の完全阻害をもたらすと記載されている。このような生殖細胞系突然変異マウスにおけるヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの導入は、抗原チャレンジ後にヒト抗体の産生をもたらす。例えば、ジャコボビッツ（Jakobovits）ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ジ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、90、2551頁(1993)、ジャコボビッツら、ネイチャー(Nature)、362、255～258頁(1993)、ブリュッグマン(Bruggerman)ら、ザ・イヤー・イン・イミュノロジー(The year in Immunology)、7、33(1993)、およびデュショサル(Duchosal)ら、ネイチャー355、258(1992)参照。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーから得ることもできる（ホーゲンブーム(Hoogenboom)ら、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology)、227、381頁(1991)、マークス(Marks)ら、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、222、581～597頁(1991)、ヴォーン(Vaughan)ら、ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotechnology)14、309頁(1996))。 20 30

【0212】

いくつかの実施形態では、非ヒトトランスジェニック動物、例えば、ゲノムにヒト免疫グロブリン遺伝子を含んでなり、その結果、組換えマウスによってヒト抗体が産生されるXenomouse（商標）マウスを免疫することによってヒトIgG2抗体を作製することができる。Xenomouse（商標）マウスとは、ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子座の大きな断片を含んでなり、かつ、マウス抗体産生を欠損している、操作されたマウス株である。Xenomouse（商標）マウスは、完全ヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、抗原特異的ヒト抗体を産生する。いくつかの実施形態では、Xenomouse（商標）マウスには、ヒト重鎖遺伝子座およびκ軽鎖遺伝子座の、メガ塩基対の、生殖系列立体配置酵母人工染色体（YAC）断片の導入によって約80%のヒト抗体V遺伝子レパートリーが含まれている。その他の実施形態では、Xenomouse（商標）マウスには、ほぼ全てのλ軽鎖遺伝子座がさらに含まれている。例えば、グリーン(Green)ら、ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genetics)7、13～21頁(1994)および米国特許第5,916,771号、同5,939,598号、同5,985,615号、同5,998,209号、同6,075,181号、同6,091,001号、同6,114,598号、同6,130,364号、同6,162,963号および同6,150,584号参照。また、WO91/10741、WO94/02602、WO96/34096、WO96/33735、WO98/16654、WO98/24893、WO9 40 50

8 / 5 0 4 3 3、W O 9 9 / 4 5 0 3 1、W O 9 9 / 5 3 0 4 9、W O 0 0 / 0 9 5 6 0、およびW O 0 0 / 0 3 7 5 0 4も参照。

【0213】

いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含んでなる非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン「ミニローカス」を有する動物である。ミニローカスアプローチでは、I g 遺伝子座に由来する個々の遺伝子を含めることによって外来I g 遺伝子座を模倣する。したがって、1以上のV_H遺伝子、1以上のD_H遺伝子、1以上のJ_H遺伝子、m u 定常ドメイン、および第2の定常ドメイン（好ましくは、γ 定常ドメイン）が、動物に挿入するための構築物に形成される。このアプローチは、特に、米国特許第5, 545, 807号、同5, 545, 806号、同5, 569, 825号、同5, 625, 126号、同5, 633, 425号、同5, 661, 016号、同5, 770, 429号、同5, 789, 650号、同5, 814, 318号、同5, 591, 669号、同5, 612, 205号、同5, 721, 367法、同5, 789, 215号、および同5, 643, 763号に記載されている。

10

【0214】

したがって、いくつかの実施形態では、ヒト抗体は、ゲノムにヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子座のいくらかまたはすべてを含んでなる非ヒト動物を、所望の抗原で免疫することによって産生され得る。

【0215】

いくつかの実施形態では、所望の抗原を単離および／または精製する。好ましい実施形態では、抗原はヒト抗原である。いくつかの実施形態では、抗原は所望の抗原の断片である。いくつかの実施形態では、断片は所望の抗原の少なくとも1つのエピトープを含んでなる。その他の実施形態では、抗原は、抗原またはその免疫原性断片を、その表面に発現または過剰発現する細胞である。さらにその他の実施形態では、抗原は抗原融合タンパク質である。所望の抗原は天然の供給源から既知の技術を用いて精製してもよい。さらに、多数の組換え体抗原が市販されている。

20

【0216】

好ましい実施形態では、非ヒト動物はX e n o M o u s e（商標）動物（アブジェニックス社（A b g e n i x I n c.）、カリフォルニア州、フレモント）である。使用できるもう1つの非ヒト動物としては、メダレックス（メダレックス社（M e d a r e x I n c.）、ニュージャージー州、プリンストン）製のトランスジェニックマウスがある。

30

【0217】

動物の免疫化は当業者に公知のいずれの方法で行ってもよい。例えば、ハーロ(Harlow)およびレーン(Lane)、アンチボディーズ(Antibodies):ア・ラボラトリー・マニュアル(A Laboratory Manual)、ニューヨーク:コールド・スプリング・ハーバー・プレス(Cold Spring Harbor Press)、1990参照。マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシおよびウマなどの非ヒト動物を免疫する方法は当技術分野ではよく知られている。例えば、ハーローおよびレーン、上記および米国特許第5, 994, 619号参照。好ましい実施形態では、所望の抗原を、アジュバントとともに投与して免疫応答を刺激する。例示的アジュバントとしては、完全または不完全フロイントアジュバント、R I B I（ムラミルジペプチド）またはI S C O M（免疫刺激複合体）が挙げられる。このようなアジュバントは、限局性沈着にポリペプチドを捕捉することによって急速な分散からそれを保護することができ、またはマクロファージおよび免疫系のその他の成分にとって走化性である因子を分泌するよう宿主を刺激する物質を含む場合もある。ポリペプチドを投与する場合には、免疫スケジュールが数週間にわたって展開する、2回以上のポリペプチドの投与を含み得ることが好ましい。

40

【0218】

動物を抗原で免疫した後、その動物から抗体および／または抗体産生細胞を得ることができる。いくつかの実施形態では、動物を出血させるか屠殺することによって動物から完

50

全ヒト I g G 2 抗体含有血清を得る。血清は動物から得られるので用いることができ、血清から免疫グロブリン画分を得ることができ、または血清から抗体を精製できる。

【0219】

いくつかの実施形態では、免疫した動物から単離した細胞から抗体産生不死化細胞株を調製する。免疫化後、動物を屠殺し、リンパ節および／または脾臓 B 細胞を不死化する。細胞を不死化する方法としては、それだけには限らないが、それらをオンコジーンでトランスフェクトすること、それらに腫瘍ウイルスを感染させること、不死化細胞を選択する条件下でそれらを培養すること、それらを発癌性化合物または突然変異誘発性化合物に付すこと、それらを不死化細胞、例えば、骨髄腫細胞と融合すること、および腫瘍抑制遺伝子を不活化することが挙げられる。例えば、ハーローおよびレーン、上記参照。好ましい実施形態では、免疫される動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する非ヒト動物であり、脾臓 B 細胞を、非ヒト動物と同種に由来する骨髄腫細胞株と融合する。より好ましい実施形態では、免疫される動物は X e n o M o u s e (商標) 動物であり、骨髄腫細胞株は非分泌性マウス骨髄腫である。さらに好ましい実施形態では、骨髄腫細胞株は P 3 - X 6 3 - A G 8 - 6 5 3 である。骨髄腫細胞との融合を用いる場合、骨髄腫細胞は免疫グロブリンポリペプチドを分泌しないこと(非分泌性細胞株)が好ましい。不死化細胞は所望の抗原、その一部、または所望の抗原を発現する細胞を用いてスクリーニングする。好ましい実施形態では、酵素結合免疫測定法 (E L I S A) またはラジオイムノアッセイを用いて初期スクリーニングを実施する。E L I S A スクリーニングの一例は、W O O O / 3 7 5 0 4 に提供されている。

10

20

【0220】

完全ヒト I g G 2 抗体産生細胞、例えば、ハイブリドーマを選択し、クローニングし、力強い増殖、高い抗体産生および以下にさらに論じるような望ましい抗体特性をはじめとする望ましい特性についてさらにスクリーニングする。ハイブリドーマは、同系動物において、免疫系を欠く動物、例えば、ヌードマウスにおいて i n v i v o で、細胞培養物において i n v i t r o で増殖させることができる。ハイブリドーマを選択し、クローニングし、増殖させる方法は、当業者にはよく知られている。

【0221】

理解されるであろうが、本発明にしたがう抗体は、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株において組換え発現させることができる。個々の抗体の c D N A をコードする核酸配列またはゲノムクローンをを用いて、適した哺乳類または非哺乳類宿主細胞を形質転換できる。

30

【0222】

本発明はまた、ヒト I g G 2 抗体をコードする核酸分子を包含する。いくつかの実施形態では、異なる核酸分子が、ヒト I g G 2 免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をコードしている。その他の実施形態では、同一の核酸分子がヒト I g G 2 免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をコードしている。一実施形態では、核酸は本発明のヒト I g G 2 抗体をコードしている。

【0223】

ヒト I g G 2 抗体の重鎖もしくは全軽鎖をコードする核酸分子またはその一部は、このような抗体を産生するいずれかの供給源から単離できる。種々の実施形態では、核酸分子を、ヒト I g G 2 抗体を発現する、所望の抗原で免疫した動物から単離した B 細胞から、またはこのような B 細胞に由来する不死化細胞から単離する。抗体をコードする m R N A を単離する方法は当技術分野ではよく知られている。例えば、サμβロック (Sambrook) ら、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 第 3 版、第 3 巻 (1989) 参照。m R N A を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) または抗体遺伝子の c D N A クローニングに用いるための c D N A を作製できる。好ましい実施形態では、その融合パートナーの一方として非ヒトトランスジェニック動物に由来するヒト免疫グロブリン産生細胞を含むハイブリドーマから核酸分子を単離する。いっそうより好ましい実施形態では、ヒト免疫グロブリン産生細胞を、X e n o M o u s e (商標) 動物から単離する。もう 1 つの実施形態では、ヒト免疫グロブリン産生細胞は、前記のような非ヒト、非マウストランスジェニッ

40

50

ク動物に由来する。もう1つの実施形態では、核酸を非ヒト、非トランスジェニック動物から単離する。非ヒト動物から単離した核酸分子は、例えば、ヒト化抗体のために使用できる。

【0224】

いくつかの実施形態では、本発明のヒトIgG2抗体の重鎖をコードする核酸は、いずれかの供給源に由来する重鎖定常ドメインをコードするヌクレオチド配列とインフレームで結合している、本発明のV_Hドメインをコードするヌクレオチド配列を含んでなる場合もある。同様に、本発明の抗CTL A-4抗体の軽鎖をコードする核酸分子は、いずれかの供給源に由来する軽鎖定常ドメインをコードするヌクレオチド配列とインフレームで結合している、本発明のV_Lドメインをコードするヌクレオチド配列を含んでなる場合もある。

10

【0225】

本発明のさらなる態様では、重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)の可変ドメインをコードする核酸分子を全長抗体遺伝子に「変える」。一実施形態では、それぞれ、重鎖定常(C_H)または軽鎖(C_L)定常ドメインをすでにコードしている発現ベクターに、ベクター内でV_HセグメントがC_Hセグメントに機能しうる形で結合されるように、またベクター内でV_LセグメントがC_Lセグメントに機能しうる形で結合されるように挿入することによって、V_HまたはV_Lドメインをコードする核酸分子を、全長抗体遺伝子に変える。もう1つの実施形態では、標準的な分子生物学技術を用いて、V_Hおよび/またはV_Lドメインをコードする核酸分子をC_Hおよび/またはC_Lドメインをコードする核酸分子に結合すること、例えば、連結することによって、V_Hおよび/またはV_Lドメインをコードする核酸分子を全長抗体遺伝子に変える。ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン定常ドメイン遺伝子の核酸配列は当技術分野では公知である。例えば、カバット(Kabat)ら、シークエンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インテレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、第5版、N I H刊行物番号91-3242、1991参照。次いで、全長重鎖および/または軽鎖をコードする核酸分子を、それらが導入されている細胞から発現させ、ヒトIgG2抗体を単離することができる。

20

【0226】

本発明はまた、本発明のヒトIgG2抗体の重鎖またはその抗原結合部分をコードする核酸分子を含んでなるベクターを提供する。本発明はまた、このような抗体の軽鎖またはその抗原結合部分をコードする核酸分子を含んでなるベクターを提供する。本発明は、融合タンパク質、改変された抗体、抗体断片およびそのプローブをコードする核酸分子を含んでなるベクターをさらに提供する。

30

【0227】

いくつかの実施形態では、前記のように得た、部分または全長軽鎖および重鎖をコードするDNAを、これらの遺伝子が転写および翻訳制御配列などの必要な発現制御配列に機能しうる形で連結されるように発現ベクターに挿入することによって、本発明のヒトIgG2抗体、または抗原結合部分を発現させる。発現ベクターとしては、プラスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルスなどの植物ウイルス、コスミド、YAC、EBV由来エピソームなどが挙げられる。抗体遺伝子を、ベクター内の転写および翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を制御するというその意図される機能を果たすようにベクターにライゲーションする。発現ベクターおよび発現制御配列は、用いる発現宿主細胞と適合するよう選択する。抗体軽鎖遺伝子と抗体重鎖遺伝子は、別個のベクターに挿入してもよい。好ましい実施形態では、両遺伝子を同一発現ベクターに挿入する。抗体遺伝子は標準法(例えば、抗体遺伝子断片とベクターの相補制限部位のライゲーション、または制限部位が全く存在しない場合には平滑末端来ゲーション)によって発現ベクターに挿入する。

40

【0228】

好都合なベクターとしては、機能的に完全なヒトC_HまたはC_L免疫グロブリン配列をコードし、前記のように、いずれのV_HまたはV_L配列も容易に挿入でき、発現させられるよ

50

う操作される適当な制限部位を含むものがある。このようなベクターでは、通常、スプライシングは、挿入されたJ領域中のスプライドナー部位とヒトCドメインの前のスプライスアクセプター部位との間で、およびヒトC_Hエキソン内に生じるスプライス領域でも起こる。ポリアデニル化および転写終結は、コード領域の下流の天然の染色体の部位で起こる。組換え発現ベクターはまた、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を容易にするシグナルペプチドもコードできる。抗体鎖遺伝子を、シグナルペプチドが免疫グロブリン鎖のアミノ末端とインフレームで連結されるようベクターにクローニングしてもよい。シグナルペプチドは免疫グロブリンシグナルペプチドであってもよいし、異種シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であってもよい。

【0229】

本発明の組換え発現ベクターは、抗体鎖遺伝子に加え、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する制御配列を保持する。当業者には当然であろうが、制御配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質発現レベル等といった因子に応じて変わり得る。哺乳類宿主細胞発現にとって好ましい制御配列としては、哺乳類細胞において高レベルのタンパク質発現を導くウイルスエレメント、例えば、レトロウイルス由来のプロモーターおよび／またはエンハンサー（レトロウイルスLTRなど）、サイトメガロウイルス（CMV）由来のもの（CMVプロモーター／エンハンサーなど）、シミアンウイルス40（SV40）由来のもの（SV40プロモーター／エンハンサーなど）、アデノウイルス由来のもの（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP））、ポリオーマならびに天然免疫グロブリンおよびアクチンプロモーターなどの強力な哺乳類プロモーターが挙げられる。ウイルス制御エレメント、およびその配列のさらなる説明については、例えば、米国特許第5,168,062号、同4,510,245号、および同4,968,615号参照。プロモーターおよびベクター、ならびに植物の形質転換についての説明を含む植物において抗体を発現させる方法は当技術分野では公知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,517,529号参照。細菌細胞または真菌細胞、例えば、酵母細胞においてポリペプチドを発現させる方法もまた、当技術分野では周知である。

【0230】

本発明の組換え発現ベクターは、抗体鎖遺伝子および制御配列に加え、さらなる配列、例えば、宿主細胞においてベクターの複製を制御する配列（例えば、複製開始点）および選択マーカー遺伝子を保持し得る。選択マーカー遺伝子により、ベクターが導入されている宿主細胞を選択することが容易になる（例えば、米国特許第4,399,216号、同4,634,665号および同5,179,017号参照）。例えば、通常、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞に、薬剤、例えば、G418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートに対する耐性を付与する。好ましい選択マーカー遺伝子としては、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子（DHFR宿主細胞においてメトトレキサート選抜／増幅とともに用いるための）、ネオマイシン耐性遺伝子（G418選抜用）およびグルタミン合成酵素遺伝子が挙げられる。

【0231】

完全ヒトIgG2抗体をコードする核酸分子およびこれらの核酸分子を含んでなるベクターを、適した哺乳類、植物、細菌または酵母宿主細胞の形質転換に使用できる。本発明の抗体は、注目する免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列についてトランスジェニックである哺乳類または植物の作製とそれからの修復可能な形の抗体の産生によって、遺伝子導入で作製することができる。

【0232】

形質転換は、米国特許第4,399,216号、同4,912,040号、同4,740,461号、および同4,959,455号によって例示されるような、例えば、ポリヌクレオチドをウイルスに（またはウイルスベクターに）パッケージングし、宿主細胞をウイルス（またはベクター）を用いて形質導入することを含む、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための公知の方法であればいずれで行ってもよいし、当技術分野で公知の

10

20

30

40

50

トランスフェクション手順によって行ってもよい。用いる形質転換手順は、形質転換される宿主に応じて変わる。異種ポリヌクレオチドを哺乳類細胞に導入する方法は当技術分野では周知であり、それだけには限らないが、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、粒子衝突、リポソームへのポリヌクレオチドの封入、ペプチドコンジュゲート、デンドリマー、およびDNAの核への直接マイクロインジェクションが挙げられる。

【0233】

発現のための宿主として利用できる哺乳類細胞株は当技術分野では周知であり、これにはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection) (ATCC)から入手できる多数の不死化細胞株が含まれ、それだけには限らないが、チャイニーズ・ハムスター卵巣(CHO)細胞、NSO細胞、ヒーラ細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓細胞(COS)、ヒト肝臓癌細胞(例えば、Hep G2)、およびいくつかのその他の細胞株が挙げられる。それだけには限らないが、細菌、酵母、昆虫、および植物をはじめとする非哺乳類細胞を用いて組換え抗体を発現させることもできる。非ヒトグリコシル化に起因する、免疫原性、薬物動態、および／またはエフェクター機能のいずれかの変化を防ぐためには、グリコシル化を排除するための抗体CH2ドメインの部位特異的突然変異誘発が好ましい場合もある。発現方法は、どのシステムによって最も高い発現レベルが得られ、所望の抗原結合特性を有する抗体が産生されるかを調べることによって選択する。

【0234】

さらに、産生細胞株からの本発明の抗体(またはそれら由来するその他の部分)の発現は、いくつかの既知の技術を用いて増強することができる。例えば、グルタミン合成酵素およびDHFR遺伝子発現系は、特定の条件下で発現を増強するための、よくあるアプローチである。従来技術、例えば、限定希釈クローニングおよびマイクロドロップ技術を用いて高発現細胞クローンを同定できる。グルタミン合成酵素系は、全部または一部において、欧州特許第0216846号、同0256055号および0323997号ならびに欧州特許出願第89303964.4に関連して論じられている。

【0235】

哺乳類におけるトランスジェニック生産に関連して、抗体はヤギ、ウシまたはその他の哺乳類のミルクで生産し、それから回収することもできる。例えば、米国特許第5,827,690号、同5,756,687号、同5,750,172号、および同5,741,957号参照。

【0236】

前記のような細胞株で発現されたヒトIgG2抗体は、関連する細胞物質から精製および／または単離できる。抗体は全細胞に存在する場合もあるし、細胞溶解物中に存在する場合もあるし、部分精製された形または実質的に純粋な形で存在する場合もある。精製は、その他の細胞成分またはその他の夾雑物、例えば、その他の細胞核酸またはタンパク質を排除するために、アルカリ/SDS処理、カラムクロマトグラフィーおよび当技術分野で周知のその他のものをはじめとする標準技術によって実施する。オースベル(Ausubel)、F.ら編、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology)、グリーン・パブリッシング・アンド・ウィレー・インターサイエンス(Greene Publishing and Wiley Interscience)、ニューヨーク(1987)参照。

【0237】

本発明では、種々の細胞株によって、またはトランスジェニック動物において発現された本発明のヒトIgG2抗体が互いに異なるグリコシル化パターンを有することが可能である。しかし、本明細書に提供される核酸およびアミノ酸によってコードされるヒトIgG2抗体のすべてが、そのグリコシル化パターンまたはその修飾もしくは欠失にかかわらず、本発明の一部と考えられる。したがって、本発明の目的上は、ヒトIgG2抗体はグリコシル化であっても、非グリコシル化であってもよい。ヒトIgG2抗体がグリコシル

化されている場合には、それらはいずれの可能性あるグリコシル化パターンも有し得る。さらに、一抗体内の各重鎖が同一のグリコシル化パターンを有する場合もあるし、2つの重鎖が異なるグリコシル化パターンを有する場合もある。非ヒトグリコシル化に起因する、免疫原性、薬物動態、および／またはエフェクター機能のいずれかの変化を防ぐために、グリコシル化を排除するための抗体CH₂ドメインの部位特異的突然変異誘発も本発明に包含される。

【0238】

本明細書において、用語「グリコシル化」とは、抗体に共有結合される糖質単位のパターンを意味する。本明細書においてヒトIgG₂抗体が特定のグリコシル化パターンを有するという場合には、言及されるヒトIgG₂抗体の大部分がその特定のグリコシル化パターンを有することを意味する。その他の態様では、本明細書においてヒトIgG₂抗体が特定のグリコシル化パターンを有するという場合には、言及されるヒトIgG₂抗体の50%、75%、90%、95%、99%以上、または100%がその特定のグリコシル化パターンを有することを意味する。

10

【0239】

本発明のヒトIgG₂抗体はまた、そのグリコシル化変異体（例えば、適したアミノ酸残基の欠失、挿入または置換による、グリコシル化部位の挿入またはいずれかのグリコシル化部位の欠失による）も包含する。

【0240】

ポリペプチドのグリコシル化は、通常、N結合型またはO結合型のいずれかである。抗体ポリペプチドのグリコシル化は、通常、N結合型であり、二分岐構造を形成する。N結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への糖質部分の結合を指す。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン（式中、Xはプロリンを除くいずれかのアミノ酸である）が、アスパラギン側鎖への糖質部分の酵素による結合の認識配列である。したがって、抗体中にこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在することで、可能性あるグリコシル化部位が生じる。

20

【0241】

二分岐グリカンの3つの別個の構造は、グリカンの非還元末端に、それぞれ0個、1個または2個の末端ガラクトース残基を有する「G0」、「G1」および「G2」と名づけられている。ジェフリーズ(Jefferis)ら、バイオケミカル・ジャーナル(Biochemical Journal)、268、529~537頁(1990)参照。グリカン構造が、Nアセチルグルコサミンと結合しているフコース残基を含み、これが抗体中に見られるアスパラギンアミノ酸（例えば、297位）と共有結合する場合もある。フコース(F)が存在する場合には、二分岐グリカン命名を、末端ガラクトース残基の数に応じて「G0F」、「G1F」、または「G2F」に変更する。テイロード(Teillaud)、エキスパート・オピニオン・オン・バイオリジカル・セラピー(Expert Opinion on Biological Therapy)、5(付録1):S15~S27(2005)参照。さらに、抗体が2つの重鎖を双方をも含む場合には、グリカン命名は2つの重鎖の各々について反復する。したがって、「G0F、G0F」グリコフォームとは、両重鎖が、結合されたG0グリカンを含み、各G0グリカンがNアセチルグルコサミンと結合しているフコース(F)残基を含む種である。「G0F、G1F」グリコフォームとは、一方の重鎖が結合されたG0グリカンを含み、もう一方の重鎖は結合されたG1グリカンを含み、G0グリカンとG1グリカン各々が、Nアセチルグルコサミンと結合しているフコース(F)残基を含む種である。特定の実施形態では、ヒトIgG₂抗体は、「G0F、G0F」、「G0F、G1F」、「G1F、G1F」、「G1F、G2F」およびそれらの混合物からなる群から選択されるグリコシル化パターンを有する。

30

40

【0242】

投与経路および投与量

本発明の組成物は液体溶液（例えば、注射用および注入用溶液）であり得る。好ましい形は、意図される投与様式および治療適用に応じて変わる。典型的な好ましい組成物としては、注射用または注入用溶液の形のもの、例えば、ヒトの受動免疫に用いるものと類似

50

の組成物がある。好ましい投与様式は、無菌注射用液体または油性懸濁液の形で、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋内、皮内、および胸骨内）、または注入技術によってである。当業者には当然であろうが、投与経路および／または様式は、所望の結果に応じて変わる。好ましい実施形態では、抗体を静脈内注入または注射によって投与する。もう1つの好ましい実施形態では、抗体を筋内または皮下注射によって投与する。治療用組成物は、通常、無菌であり、製造および保存条件下で安定である。

【0243】

本組成物は溶液、マイクロエマルジョン、分散剤、またはリポソームとして製剤できる。無菌注射用溶液は、必要量のヒト IgG2 抗体を、必要に応じて、前記で列挙した成分の1種またはその組合せを含む適当な賦形剤に組み込み、その後、滅菌（例えば、濾過滅菌）することによって調製できる。一般に、分散剤は、活性化合物を、基本分散媒と前記で列挙したものから必要なその他の成分を含む無菌ビヒクルに組み込むことによって調製する。このような懸濁液は、湿潤剤および懸濁化剤またはその他の許容される薬剤の適した分散物を用いて当技術分野で公知の技術にしたがって製剤できる。無菌注射用調製物はまた、例えば、1, 3-ブタンジオール中の溶液のような、非毒性の非経口で許容される希釈剤または溶媒中の滅菌注射用溶液または懸濁液であり得る。使用できる、許容されるビヒクルおよび溶媒の中には、水、リンガー溶液および生理食塩水がある。さらに、溶媒または懸濁媒として無菌の、不揮発性油を用いることが好都合である。この目的には、合成モノーまたはジグリセリドをはじめ、いずれの無刺激性不揮発性油も使用できる。さらに、n-3 ポリ不飽和脂肪酸も注射物質の調製に使用できる。

10

20

【0244】

無菌注射用溶液を調製するための無菌分散剤の場合には、好ましい調製方法は、予め滅菌濾過した、有効成分およびいずれかのさらなる所望の成分の溶液から、その粉末が得られる真空乾燥および凍結乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レクチンなどのコーティングを用いることによって、分散剤の場合には必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤を用いることによって維持できる。

【0245】

注射用組成物の持続的吸収は、組成物中に吸収を遅延する薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを含めることによって、または組成物を持続的吸収形、例えば、デポー、リポソーム、高分子ミクロスフェア、高分子ゲル、およびインプラントに製剤することによって引き起こすことができる。

30

【0246】

本明細書に記載した抗体のその他の投与方法としては、直接被験体の皮膚に医薬を放出する皮膚パッチが挙げられる。このようなパッチは、接着剤中に溶解および／もしくは分散された、またはポリマー中に分散された、場合によっては緩衝された液体溶液中に本発明の抗体を含み得る。

【0247】

本明細書に記載した抗体のさらにその他の投与方法としては、眼用の液体眼科用液滴が挙げられる。

【0248】

抗体は1回投与してもよいが、複数回投与することがより好ましい。例えば、抗体は毎日1回～6ヶ月またはそれより長い期間に1回投与してもよい。投与は、毎日3回、毎日2回、毎日1回、2日に1回、3日に1回、週1回、2週間に1回、月1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回および6ヶ月に1回などの予定どおりであり得る。

40

【0249】

抗体はミニポンプを介して連続投与することもできる。抗体は身体の患部の部位で投与してもよいし、身体の患部から離れた部位で投与してもよい。抗体は1回、少なくとも2回または少なくとも疾病が治療、軽減、または治癒されるまでの期間投与してもよい。一般に、抗体は疾病が存在する限り投与できる。通常、抗体は、上記の薬剤組成物の一部として投与される。

50

【0250】

本発明の組成物は治療上有効量または予防上有効量の本発明の抗体または抗原結合部分を含み得る。本組成物の調製では、組成物中に存在する治療上有効量のヒトIgG2抗体は、例えば、所望の用量容積および投与様式、治療される状態の性質および重篤度、ならびに被験体の性別および大きさを考慮することによって決定できる。

【0251】

それだけには限らないが、本発明の薬剤組成物を被験体に投与するための例示的な用量範囲は、約0.01mg/kg～約200mg/kg（被験体の体重1キログラム（kg）当たりの投与されるヒトIgG2抗体ミリグラム（mg）という用語で表される）、約0.1mg/kg～約100mg/kg、約1.0mg/kg～約50mg/kg、約5.0mg/kg～約20mg/kg、または約15mg/kgである。本発明の目的上、平均ヒト被験体の体重は約70kgである。本明細書に記載したいずれかの投与量の間にある範囲、たとえば、約0.02mg/kg～199mg/kgも本発明の一部であるものとする。例えば、上限および／または下限として、いずれかの前記の値の組合せを用いる値の範囲も含まれるものとする。

【0252】

また、被験体に数回に分割した用量を時間をかけて投与することによって、投与計画を最適所望応答（例えば、治療応答または予防応答）を提供するように調整することもできるし、用量を、治療状況の要求によって示されるように比例的に減少または増加させてもよい。投与の容易性および投与量の均一性のためには、投与単位形の非経口組成物を製剤することが特に有利である。

【0253】

本明細書において投与単位形とは、治療される哺乳類被験体のための単位投与量として適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要とされる薬剤担体と関連して所望の治療効果を生じるよう算出された所定量の活性化化合物を含む。本発明の投与単位形の仕様は、（a）ヒトIgG2抗体またはその一部の独特の特徴および達成されるべき特定の治療効果または予防効果、ならびに（b）個体の感受性を治療するためのこのような抗体を混合する技術に特有の制限によって決定され、直接それらに応じて変わる。

【0254】

本発明の液体組成物は、単位投与形として調製できる。例えば、バイアルあたりの単位投与形は、1～1000ミリリットル（ml）の種々の濃度のヒトIgG2抗体を含み得る。その他の実施形態では、バイアルあたりの単位投与形は、約1ml、2ml、3ml、4ml、5ml、6ml、7ml、8ml、9ml、10ml、15ml、20ml、30ml、40ml、50mlまたは100mlの種々の濃度のヒトIgG2抗体を含み得る。必要であれば、各バイアルに無菌希釈剤を添加することによってこれらの調製物を所望の濃度に調整することができる。本発明の液体組成物はまた、静脈投与ラインまたはカテーテルに接続するのに適している、無菌バッグまたは容器に入れた単位投与形として調製できる。

【0255】

安定性評価：

本発明は、本明細書に記載したようなヒトIgG2抗体と、製薬上許容されるキレート剤とを含んでなる安定な液体薬剤組成物を含んでなる。例えば、製品外観および完全性を維持し、その変化（生物学的活性の低下をもたらす可能性のある物理的または化学的分解を含む）に耐えるために、安定な組成物が望まれる。タンパク質安定性を測定するための種々の分析技術および指標は文献で報告されており、これらの技術および指標のいくつかは、ペプチド・アンド・プロテイン・ドラッグ・デリバリー(Peptide and Protein Drug Delivery)、247～301頁、ビンセント・リー(Vincent Lee)編、マーセル・デッカー社(Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク、N. Y. パブリケーションズ(Pubs)(1991)およびジョーンズ(Jones)、A. 推奨、ドラッグ・デリバリー・レビューズ(Drug Delivery Reviews)10、29～90頁(1993)に概説されている。一般に、本発明の液体薬剤組成物は、一

定期間にわたって低い保存温度に付された場合に、および／または1回以上の凍結／解凍サイクルに付された場合に安定性の向上を示す。

【0256】

一実施形態では、本組成物は、約2℃～約8℃の温度で少なくとも約12ヶ月、好ましくは、少なくとも約18ヶ月、およびより好ましくは、少なくとも約24ヶ月保存した場合に、同一条件下で同一時間の間保存される、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物より安定である。

【0257】

もう1つの実施形態では、本組成物は、約25℃～約30℃の温度で少なくとも約3ヶ月、好ましくは、少なくとも約6ヶ月、およびより好ましくは、少なくとも約12ヶ月保存した場合に、同一条件下で同一時間の間保存される、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物より安定である。 10

【0258】

もう1つの実施形態では、本組成物は、約40℃の温度で少なくとも約1ヶ月、好ましくは、少なくとも約2ヶ月、より好ましくは、少なくとも約3ヶ月、およびより好ましくは、少なくとも約26週間保存した場合に、同一条件下で同一時間の間保存される、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物よりも安定である。

【0259】

もう1つの実施形態では、本組成物は、約2℃～約8℃の温度で少なくとも約12ヶ月、好ましくは、少なくとも約18ヶ月、およびより好ましくは、少なくとも約24ヶ月保存した場合に、同一条件下で同一時間の間保存される、キレート剤を欠く等張組成物よりも安定である。 20

【0260】

もう1つの実施形態では、本組成物は、約25℃～約30℃の温度で少なくとも約3ヶ月、好ましくは、少なくとも約6ヶ月、およびより好ましくは、少なくとも約12ヶ月保存した場合に、同一条件下で同一時間の間保存される、キレート剤を欠く等張組成物よりも安定である。

【0261】

もう1つの実施形態では、本組成物は、約40℃の温度で約1ヶ月、好ましくは、少なくとも約2ヶ月、より好ましくは、少なくとも約3ヶ月、およびさらにより好ましくは、少なくとも約26週間保存した場合に、同一条件下で同一時間の間保存される、キレート剤を欠く等張組成物よりも安定である。 30

【0262】

本明細書において、用語「凍結／解凍サイクル」とは、サンプルの温度を液体サンプルを凍結するために0℃以下の温度に低下させ、次いで、サンプルをその液体状態を取り戻す温度に、サンプルの使用を可能にするのに十分な期間付し、その後、好ましくは0℃以下の温度での凍結保存に戻す、凍結保存後に液体抗体サンプルを使用するための技術を指す。本明細書において、用語「凍結保存」とは、先の液体抗体サンプルを0℃以下、好ましくは、-20℃以下の温度で、凍結および維持することを指す。

【0263】

一実施形態では、本組成物は、少なくとも1回の凍結／解凍サイクル、好ましくは、少なくとも2回の凍結／解凍サイクル、より好ましくは、少なくとも3回の凍結／解凍サイクル、さらにより好ましくは、少なくとも4回の凍結／解凍サイクル、さらにより好ましくは、少なくとも5回の凍結／解凍サイクル、およびさらにより好ましくは、少なくとも6回の凍結／解凍サイクルに付された組成物は、同一の凍結／解凍条件に付される、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物より安定である。 40

【0264】

もう1つの実施形態では、少なくとも1回の凍結／解凍サイクル、好ましくは、少なくとも2回の凍結／解凍サイクル、より好ましくは、少なくとも3回の凍結／解凍サイクル、さらにより好ましくは、少なくとも4回の凍結／解凍サイクル、さらにより好ましくは 50

、少なくとも5回の凍結／解凍サイクル、およびさらにより好ましくは、少なくとも6回の凍結／解凍サイクルに付した組成物は、同一の凍結／解凍条件に付される、キレート剤を欠く等張組成物よりもより安定である。

【0265】

もう1つの実施形態では、本組成物は以下の条件の2以上を満たす：

(a) 本組成物は、約2℃～約8℃の温度で少なくとも約12ヶ月、好ましくは、少なくとも約18ヶ月およびより好ましくは、少なくとも約24ヶ月保存した場合、同一条件下で同一時間の間保存されるキレート剤を欠く等張組成物よりもより安定である；

(b) 本組成物は、約25℃～約30℃の温度で少なくとも約3ヶ月、好ましくは、少なくとも約6ヶ月、およびより好ましくは、少なくとも約12ヶ月保存した場合、同一条件下で同一時間の間保存される、キレート剤を欠く等張組成物よりもより安定である； 10

(c) 本組成物は、約40℃の温度で少なくとも約1ヶ月、好ましくは、少なくとも約2ヶ月、より好ましくは、少なくとも約3ヶ月、さらにより好ましくは、少なくとも約26週間保存した場合、同一条件下で同一時間の間保存される、キレート剤を欠く等張組成物よりもより安定である；または

(d) 本組成物は、少なくとも1回の凍結／解凍サイクル、好ましくは、少なくとも2回の凍結／解凍サイクル、より好ましくは、少なくとも3回の凍結／解凍サイクル、さらにより好ましくは、少なくとも4回の凍結／解凍サイクル、さらにより好ましくは、少なくとも5回の凍結／解凍サイクル、およびさらにより好ましくは、少なくとも6回の凍結／解凍サイクルに付した場合、同一凍結／解凍条件に付される、キレート剤を欠く等張組成物よりもより安定である。 20

【0266】

もう1つの実施形態では、本組成物は以下の条件の2以上を満たす：

(a) 本組成物は、約2℃～約8℃の温度で少なくとも約12ヶ月、好ましくは、少なくとも約18ヶ月およびより好ましくは、少なくとも約24ヶ月保存した場合、同一条件下で同一時間の間保存される、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物よりもより安定である；

(b) 本組成物は、約25℃～約30℃の温度で少なくとも約3ヶ月、好ましくは、少なくとも約6ヶ月、およびより好ましくは、少なくとも約12ヶ月保存した場合、同一条件下で同一時間の間保存される、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物よりもより安定である； 30

(c) 本組成物は、約40℃の温度で少なくとも約1ヶ月、好ましくは、少なくとも約2ヶ月、より好ましくは、少なくとも約3ヶ月、さらにより好ましくは、少なくとも約26週間保存した場合、同一条件下で同一時間の間保存される、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物よりもより安定である；または

(d) 本組成物は、少なくとも1回の凍結／解凍サイクル、好ましくは、少なくとも2回の凍結／解凍サイクル、より好ましくは、少なくとも3回の凍結／解凍サイクル、さらにより好ましくは、少なくとも4回の凍結／解凍サイクル、さらにより好ましくは、少なくとも5回の凍結／解凍サイクル、およびさらにより好ましくは、少なくとも6回の凍結／解凍サイクルに付した場合、同一凍結／解凍条件に付される、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物よりもより安定である。 40

【0267】

もう1つの実施形態では、本組成物は直前に論じた条件の3以上を満たす。

【0268】

本願の目的上、例えば、抗体凝集、抗体断片化、および／または組成物変色を、組成物の安定性の指標として用いることができる。一般に、本発明の組成物は、前記の保存または凍結／解凍条件の1以上に付された場合に、同一条件に付される、キレート剤を欠く等張組成物と比較して、抗体凝集、抗体断片化および組成物変色のうち少なくとも1つが低レベルを示す。その他の実施形態では、本発明の組成物は、前記の保存または解凍／凍結条件の1以上に付された場合、同一条件に付される、キレート剤を欠くが、それ以外には 50

同一の組成物と比較して、抗体凝集、抗体断片化および組成物変色のうち少なくとも1つが低レベルを示す。

【0269】

組成物、例えば、液体薬剤組成物中のタンパク質凝集は、当技術分野で公知の種々の方法によって測定できる。このような方法としては、タンパク質をその分子量に基づいて分離するためのゲル濾過クロマトグラフィーが挙げられる。「ゲル」とは、水とポリマー、例えば、アガロースまたは重合アクリルアミドのマトリックスである。本発明はまた、ゲル濾過HPLC（高速液体クロマトグラフィー）の使用も包含する。その他の認められている凝集測定方法としては、陽イオン交換クロマトグラフィーが挙げられ、これは陰イオンカラムを用いるイオン交換クロマトグラフィーという一般的な液体クロマトグラフィー技術である。本発明において交換される陽イオンは、タンパク質分子に由来するものである。多価タンパク質凝集体は単鎖抗原結合タンパク質の正味荷電のいくらかの倍数を有し得るので、凝集体はより強固に保持され得、単鎖分子から分離できる。好ましい陽イオン交換体としてはポリアスパラギン酸カラムがある。したがって、単量体タンパク質は凝集体と容易に区別できる。しかし、当業者ならば、本発明の凝集アッセイは、タンパク質分子の2つの形を分離できる限りは、いずれかの特定の種類のクロマトグラフィーカラムに限定されるものではないということは理解されよう。

10

【0270】

液体薬剤組成物におけるタンパク質断片化は、当技術分野で公知の種々の方法によって測定することができる。このような方法としては、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、紫外検出（例えば、214ナノメートルでの）、SDS-PAGEおよび／またはマトリックス支援レーザー脱離イオン化／飛行時間型質量分析（MALDI/TOF MS）が挙げられる。（例えば、脱アミドの結果として起こる）荷電変更をもたらすタンパク質断片化は、例えば、イオン交換クロマトグラフィーまたは等電点電気泳動（IEF）によって評価できる。

20

【0271】

組成物変色は、一般に、組成物自体の目視観察によって測定できる。キレート剤を含んでなる本液体薬剤組成物は、概して、組成物変色（例えば、ピンク色または黄色）を、キレート剤を含まないが、それ以外には同一の組成物と比較して軽減する。本発明の目的上、用語「変色」とは、色の変化（例えば、透明および無色からピンク色または黄色）と透明度の変化（例えば、透明および無色から不透明な、濁ったおよび／または粒子を含む）の双方を指す。組成物変色は、一般に、さらなる技術を用いて、例えば、214ナノメートルでの紫外検出によって、および／またはキレート剤を含む組成物と含まないものの標準カラースケールに対する目視比較によって測定できる。PhEur 5.0、2005モノグラフ2.2.2参照。

30

【0272】

一実施形態では、本組成物を以下の条件のうち少なくとも1つに付した後に抗体凝集を調べる：

（a）本組成物を約2℃～約8℃の温度で、少なくとも約12ヶ月、好ましくは、少なくとも約18ヶ月およびより好ましくは、少なくとも約24ヶ月保存する；

40

（b）本組成物を約25℃～約30℃の温度で、少なくとも約3ヶ月、好ましくは、少なくとも約6ヶ月、およびより好ましくは、少なくとも約12ヶ月保存する；

（c）本組成物を約40℃の温度で少なくとも約1ヶ月、好ましくは、少なくとも約2ヶ月、より好ましくは、少なくとも約3ヶ月、およびさらにより好ましくは、少なくとも約26週間保存する；または

（d）本組成物を少なくとも1回の凍結／解凍サイクル、好ましくは、少なくとも2回の凍結／解凍サイクル、より好ましくは、少なくとも3回の凍結／解凍サイクル、さらにより好ましくは、少なくとも4回の凍結／解凍サイクル、さらにより好ましくは、少なくとも約5回の凍結／解凍サイクル、およびさらにより好ましくは、少なくとも6回の凍結／解凍サイクルに付す。次いで、抗体凝集体をクロマトグラフィーによって（例えば、H

50

P L Cを用いて) 組成物から分離し、得られたクロマトグラムから凝集度を求める。

【0273】

一実施形態では、本発明はまた、少なくとも1種のヒト I g G 2 抗体と、キレート剤とを含んでなり、抗体が約 5 °C の温度で少なくとも約 2 6 週間安定である組成物を提供する。

【0274】

もう1つの実施形態では、本発明はまた、少なくとも1種のヒト I g G 2 抗体と、キレート剤とを含んでなり、抗体が約 2 5 °C の温度で少なくとも約 2 6 週間安定である組成物を提供する。

【0275】

もう1つの実施形態では、本発明はまた、少なくとも1種のヒト I g G 2 抗体と、キレート剤とを含んでなり、抗体が約 4 0 °C の温度で少なくとも約 2 6 週間安定である組成物を提供する。

【0276】

本発明の安定組成物は、通常、以下のいずれか以下であるクロマトグラムでの凝集体ピーク面積を有する：クロマトグラムでの全ピーク面積の約 8 . 0 %、約 7 . 5 %、約 7 . 0 %、約 6 . 5 %、約 6 . 0 %、約 5 . 5 %、約 5 . 0 %、約 4 . 5 %、約 4 %、約 3 . 5 %、約 3 %、約 2 . 5 %、約 2 %、約 1 . 5 %、約 1 . 0 %、約 0 . 9 %、または約 0 . 8 %。

【0277】

凝集を測定するこの技術の一具体例では、組成物を 4 0 °C で 2 6 週間保存し、次いで、S E - H P L C を用いてクロマトグラフィー分離を実施し、2 1 4 ナノメートルでの紫外検出を行う。凝集を測定するこの技術の一具体例では、組成物を 4 0 °C で 2 4 週間保存し、次いで、S E - H P L C を用いてクロマトグラフィー分離を実施し、2 1 4 ナノメートルで紫外検出を行う。実施例 1 1 - B では、この技術を用いて抗体凝集を測定し、例えば、組成物番号 3 7 - B (キレート剤を含有する) は、約 1 . 1 % のクロマトグラムでの凝集体ピーク面積を示し、他方、組成物 2 6 - B (キレート剤を欠く) は、約 6 . 4 % のクロマトグラムでの凝集体ピーク面積を示した。

【0278】

一般に、本発明の安定組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積と、同一条件に付される、キレート剤を欠く等張組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積間の差異は、少なくとも約 8 . 0 % 以上であり、少なくとも約 7 . 5 % 以上であり、少なくとも約 7 . 0 % 以上であり、少なくとも約 6 . 5 % 以上であり、少なくとも約 6 . 0 % 以上であり、少なくとも約 5 . 5 % 以上であり、少なくとも約 5 . 0 % 以上であり、少なくとも約 4 . 5 % 以上であり、少なくとも約 4 . 0 % 以上であり、少なくとも約 3 . 5 % 以上であり、少なくとも約 3 . 0 % 以上であり、少なくとも約 2 . 5 % 以上であり、少なくとも約 2 . 0 % 以上であり、少なくとも約 1 . 5 % 以下であり、少なくとも約 1 . 0 % 以上であり、少なくとも約 0 . 5 % 以上であり、少なくとも約 0 . 3 % 以上であり、少なくとも約 0 . 2 % 以上であり、または少なくとも約 0 . 1 % 以上である。

【0279】

もう1つの実施形態では、本発明の安定組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積と、同一条件に付される、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積間の差異は、少なくとも約 8 . 0 % 以上であり、少なくとも約 7 . 5 % 以上であり、少なくとも約 7 . 0 % 以上であり、少なくとも約 6 . 5 % 以上であり、少なくとも約 6 . 0 % 以上であり、少なくとも約 5 . 5 % 以上であり、少なくとも約 5 . 0 % 以上であり、少なくとも約 4 . 5 % 以上であり、少なくとも約 4 . 0 % 以上であり、少なくとも約 3 . 5 % 以上であり、少なくとも約 3 . 0 % 以上であり、少なくとも約 2 . 5 % 以上であり、少なくとも約 2 . 0 % 以上であり、少なくとも約 1 . 5 % 以下であり、少なくとも約 1 . 0 % 以上であり、少なくとも約 0 . 5 % 以上であり、少なくとも約 0 . 3 % 以上であり、少なくとも約 0 . 2 % 以上であり、または少なくとも約 0 . 1 % 以上である

10

20

30

40

50

。

【0280】

例えば、前記で論じたように、実施例11-Cで調べた組成物37-B（約1.1%のクロマトグラムでの凝集体ピーク面積）と組成物26-B（約6.4%のクロマトグラムでの凝集体ピーク面積）間のこの差異は、約5.3%である。

【0281】

もう1つの実施形態では、本組成物を以下の条件のうち少なくとも1つに付した後に抗体断片化を調べる：

(a) 本組成物を約2℃～約8℃の温度で、少なくとも約12ヶ月、好ましくは、少なくとも約18ヶ月およびより好ましくは、少なくとも約24ヶ月保存する；

(b) 本組成物を約25℃～約30℃の温度で、少なくとも約3ヶ月、好ましくは、少なくとも約6ヶ月、およびより好ましくは、少なくとも約12ヶ月保存する；

(c) 本組成物を約40℃の温度で少なくとも約1ヶ月、好ましくは、少なくとも約2ヶ月、およびより好ましくは、少なくとも約3ヶ月保存する；または

(d) 本組成物を少なくとも1回の凍結／解凍サイクル、好ましくは、少なくとも2回の凍結／解凍サイクル、より好ましくは、少なくとも3回の凍結／解凍サイクル、さらにより好ましくは、少なくとも4回の凍結／解凍サイクル、さらにより好ましくは、少なくとも約5回の凍結／解凍サイクル、およびさらにより好ましくは、少なくとも6回の凍結／解凍サイクルに付す。次いで、抗体断片を組成物からクロマトグラフィー分離し（例えば、ゲル濾過を用いて）、得られたクロマトグラムから断片化度を求める。本発明の組成物は、通常、クロマトグラムでの全バンド量の約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、または約4.5%未満であるクロマトグラムでの断片バンド量を含む。断片化を測定するこの技術の一具体例では、本組成物を40℃で24週間保存し、次いで、還元SDS-PAGE（γSDS-PAGE）を用いてクロマトグラフィに付し、モレキュラー・ダイナミクス・パーソナル・デンシトメーター（Molecular Dynamics Personal Densitometer）PDQC-90またはバイオーラッド（Bio-Rad）GS800イメージング・デンシトメーター（Imaging Densitometer）のいずれかでのスキニングによってバンド量を求める。実施例11-Bでは、この技術を用いて抗体断片化を測定し、例えば、組成物番号37-B（キレート剤を含有する）は、約4.5%のクロマトグラムでの断片バンド量を示し、他方、組成物26-B（キレート剤を欠く）は、約10.1%のクロマトグラムでの断片バンド量を示した。

【0282】

一般に、本発明の安定液体薬剤組成物の断片バンド量と、同一条件に付される、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物の断片バンド量との間の差異は、少なくとも約0.1%、少なくとも約0.5%、少なくとも約1%、少なくとも約2%、少なくとも約3%、少なくとも約4%、または少なくとも約5%である。例えば、前記で論じたように、実施例11-Bで調べた、組成物37-B（約4.5%のクロマトグラムでの断片バンド量）と組成物26-B（約10.1%のクロマトグラムでの断片バンド量）間のこの差異は、約5.6%である。

【0283】

一実施形態では、本発明はまた、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、安定化量のキレート剤とを含んでなり、組成物を約40℃の温度で約26週間の期間保存した後に、以下の条件の一方または双方が満たされる安定組成物を提供する：少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなる安定組成物の断片クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠く等張組成物の断片クロマトグラムピーク面積間の減少が少なくとも約1%である；または少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなる安定組成物の断片クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠く等張組成物の断片クロマトグラムピーク面積間の減少が少なくとも約0.5%である。

【0284】

もう1つの実施形態では、本発明はまた、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、安定化量のキレート剤とを含んでなり、組成物を約40℃の温度で約26週間の期間保存した後、以下の条件の一方または双方が満たされる安定組成物を提供する：少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、キレート剤とを含んでなる安定組成物の断片クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物の断片クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約1%である；または少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、キレート剤とを含んでなる安定組成物の断片クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物の断片クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約0.5%である。

10

【0285】

もう1つの実施形態では、本発明はまた、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、安定化量のキレート剤とを含んでなり、組成物を約40℃の温度で約26週間の期間保存した後に、以下の条件の一方または双方が満たされる安定組成物を提供する；少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、キレート剤とを含んでなる安定組成物の断片クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物の断片クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約3.5%である；または少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、キレート剤とを含んでなる安定組成物の断片クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物の断片クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約1.7%である。

20

【0286】

もう1つの実施形態では、本発明はまた、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、安定化量のキレート剤とを含んでなり、組成物を約40℃の温度で約26週間の期間保存した後に、以下の条件の一方または双方が満たされる安定組成物を提供する；少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、キレート剤とを含んでなる安定組成物の断片クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠く等張組成物の断片クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約3.5%である；または少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、キレート剤とを含んでなる安定組成物の断片クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠く等張組成物の断片クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約1.7%である。

30

【0287】

もう1つの実施形態では、本発明はまた、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体と、安定化量のキレート剤とを含んでなり、組成物を約40℃の温度で約24週間の期間保存した後に、モノクローナルヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなる安定液体薬剤組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積と、約40℃で約24週間の期間保存される、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約2%である、安定組成物を提供する。

【0288】

もう1つの実施形態では、本発明はまた、抗体と安定化量のキレート剤とを含んでなり、組成物を約40℃の温度で約26週間の期間保存した後に、以下の条件の一方または双方が満たされる組成物を形成する方法を含んでなる、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体を安定化する方法を提供する：モノクローナルヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなる安定組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠く等張組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約1%である、またはモノクローナルヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなる安定組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠く等張組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約0.5%である。

40

【0289】

もう1つの実施形態では、本発明はまた、抗体と安定化量のキレート剤とを含んでなり、組成物を約40℃の温度で約26週間の期間保存した後に、以下の条件の一方または双

50

方が満たされる組成物を形成する方法を含んでなる、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体を安定化する方法を提供する：モノクローナルヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなる安定組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約1%である、またはモノクローナルヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなる安定組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約0.5%である。

【0290】

もう1つの実施形態では、本発明はまた、抗体と安定化量のキレート剤とを含んでなり、組成物を約40℃の温度で約26週間の期間保存した後に、以下の条件の一方または双方が満たされる組成物を形成する方法を含んでなる、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体を安定化する方法を提供する：モノクローナルヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなる安定組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠く等張組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約11.6%である、および／またはモノクローナルヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなる安定組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠く等張組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約4.9%である。

【0291】

もう1つの実施形態では、本発明はまた、抗体と安定化量のキレート剤とを含んでなり、組成物を約40℃の温度で約26週間の期間保存した後に、以下の条件の一方または双方が満たされる組成物を形成する方法を含んでなる、少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体を安定化する方法を提供する：モノクローナルヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなる安定組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約11.6%である、および／またはモノクローナルヒトIgG2抗体とキレート剤とを含んでなる安定組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積と、キレート剤を欠くが、それ以外には同一の組成物の凝集体クロマトグラムピーク面積間の減少が、少なくとも約4.9%である。

【0292】

したがって、本発明は、組成物中で抗体を、抗体の化学的および／または物理的不安定性を低下させる量のキレート剤と組み合わせることによって、少なくとも1種のヒトIgG2抗体を安定化する方法を提供する。

【0293】

治療法

本明細書に記載された抗体のいずれのタイプも、治療上、被検者において使用され得る。好ましい実施態様において、被検者は、ヒト被検者である。あるいは、被検者は、ヒトIgG2抗体が交差反応をする抗原／蛋白質を発現する哺乳動物であっても良い。抗体は、獣医学的目的で、又はヒト疾患の動物モデルとして抗体が交差反応する抗原を発現する非ヒト哺乳動物（すなわち霊長類）に投与され得る。かかる動物モデルは、本発明の抗体の治療効力を評価するために有用であり得る。

【0294】

本発明は、被検者においていかなる公知の又は最近発見された疾患又は障害も、かつある実施態様では、被検者において炎症又は新生物形成疾患を治療する方法であって、ヒトIgG2抗体；及びキレート剤を、単独又は緩衝液、等張化剤、酸化防止剤又は界面活性剤、及びその混合物から選択される他の賦形剤と組み合わせて含む液体医薬組成物を被検者に投与することを含む方法を提供する。更なる実施態様において、前述の被検者は、新生物形成疾患の予防又は治療を必要とする者である。更なる実施態様において、前述の被検者は、炎症疾患の予防又は治療を必要とする者である。

【0295】

もう一つの実施態様において、本発明は、被検者において炎症疾患を治療する方法であ

って、少なくとも1種の医薬上許容し得るキレート剤及び少なくとも1種のヒトIgG2抗体を含む治療上有効量の液体医薬組成物を被検者に投与することを含む方法も提供する。

【0296】

もう一つの実施態様において、本発明は、被検者において新生物形成疾患を治療する方法であって、少なくとも1種の医薬上許容し得るキレート剤及び少なくとも1種のヒトIgG2抗体を含む治療上有効量の液体医薬組成物を被検者に投与することを含む方法も提供する。

【0297】

もう一つの実施態様において、本発明は、被検者において炎症又は新生物形成疾患を治療する方法であって、ヒトIgG2抗体；及びキレート剤を単独又は緩衝液、等張化剤、酸化防止剤又は界面活性剤、及びその混合物から選択される他の賦形剤と組み合わせて含む医薬上許容し得る賦形剤を含む液体医薬組成物を被検者に投与することを含む方法を提供する。 10

【0298】

更なる実施態様において、前述の被検者は、炎症疾患の治療を必要とする者である。他の実施態様において、本発明の方法及び組成物は、種々の炎症疾患の治療を包含し、その中で炎症疾患は、クローン病、潰瘍性大腸炎、憩室疾患、胃炎、肝疾患、原発性胆汁性硬化症、硬化性胆管炎を含む胃腸管の炎症疾患であっても良いが、それらに限定されない。炎症疾患は、（腹膜炎、虫垂炎、胆道疾患を含む）腹部疾患、急性横断性脊髄炎、（アレルギー性皮膚、アレルギー性湿疹、皮膚アトピー、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、皮膚炎症、炎症性湿疹、炎症性皮膚炎、ノミ皮膚(flea skin)、軍隊皮膚炎(military dermatitis)、軍隊湿疹(military eczema)、イエダニ皮膚を含む）アレルギー性皮膚炎、強直性脊椎炎（ライター症候群）、喘息、気道炎症、アテローム硬化症、動脈硬化症、胆道閉鎖、膀胱炎症、乳癌、（血管炎、リウマチ様爪郭梗塞、下腿潰瘍、多発性筋炎、慢性血管炎症、心膜炎、慢性閉塞性肺疾患を含む）心臓血管炎症、慢性膵炎、神経周囲炎症、（アメーバ性大腸炎、感染性大腸炎、細菌性大腸炎、クローン大腸炎、虚血性大腸炎、潰瘍性大腸炎、特発性直腸結腸炎、炎症性腸疾患、偽膜性大腸炎を含む）大腸炎、膠原血管障害（リウマチ様関節炎、SLE、進行性全身性硬化症、混合結合組織病、真性糖尿病）、クローン病（局所性腸炎、肉芽腫性回腸炎、回結腸炎、消化器系炎症）、（脊髄炎、多発硬化症、散在性硬化症、急性散在性脳脊髄炎、静脈周囲脱髄、ビタミンB12欠乏症、ギランバレー症候群、MS関連レトロウイルスを含む）脱髄性疾患、皮膚筋炎、憩室炎、滲出性下痢、胃炎、肉芽腫性肝炎、肉芽腫性炎、胆嚢炎、インシュリン依存性真性糖尿病、肝炎疾患（肝線維症原発性胆汁性肝硬変、肝炎、硬化性胆管炎）、肺炎症（特発性肺線維症、肺の好酸球性肉芽腫、肺ヒスチオサイトーシスX、細気管支周囲炎症、急性気管支炎）、性病性リンパ肉芽腫、悪性黒色腫、（歯肉炎、歯周病を含む）口腔／歯疾患、粘膜炎、筋骨格系炎症（筋炎）、非アルコール性脂肪肝炎（非アルコール性脂肪肝疾患）、（ブドウ膜炎、視神経炎、末梢リウマチ様潰瘍、末梢角膜炎を含む）眼球及び眼窩炎症、骨関節炎、骨髓炎、咽頭炎症、多発性関節炎、直腸炎、乾癬、放射線傷害、サルコイドーシス、鎌状赤血球、ニューロパシー、表在性血栓静脈炎、全身性炎症反応症候群、甲状腺炎、全身性紅斑性狼瘡、移植片対宿主病、急性熱傷、ベーチェット症候群及びシェーグレン症候群も含むが、それらに限定されない。 20 30 40

【0299】

もう一つの実施態様において、本発明の方法及び組成物は、アテローム硬化症、敗血症、喘息、自己免疫疾患、骨粗しょう症、リウマチ様関節炎、及び骨関節炎から選択される炎症疾患の治療を包含する。

【0300】

もう一つの実施態様において、本発明の方法及び組成物は、筋ジストロフィー及び虚弱性の治療を包含する。

【0301】

もう一つの実施態様において、本発明は、被検者において新生物形成障害を治療する方法であって、ヒト I g G 2 抗体；及びキレート剤を単独又は緩衝液、酸化防止剤、等張化剤又は界面活性剤、及びその混合物から選択される他の賦形剤と組み合わせて含む医薬上許容し得る賦形剤を含む治療上有効量の液体医薬組成物を被検者に投与することを含む方法を提供する。更なる実施態様において、前述の被検者は、新生物形成障害の治療を必要とする者である。

【0302】

用語「新生物形成」、「新生物形成疾患」、及び「新生物形成障害」は、「新生物」又は腫瘍を指し、それは、良性、前悪性、転移性、又は悪性であり得る。良性、前悪性、転移性、又は悪性新生物形成が、同様に本発明に包含される。良性、前悪性、転移性、又は悪性腫瘍が、同様に本発明に包含される。従って全ての良性、前悪性、転移性、又は悪性新生物形成又は腫瘍が、本発明に包含され、かつ新生物形成、新生物又は新生物形成関連状態と、同義的に呼ばれ得る。腫瘍は、一般的に新生物形成又は「新生」細胞の腫瘍であることが技術的に公知である。とはいえ、1個の新生細胞でも、本発明の目的で、新生物、あるいは新生物形成と考えられることが理解されるべきである。

10

【0303】

本発明の抗 M-C S F 抗体によって治療され得る新生物形成障害は、いかなる組織又は器官も関係させることができ、かつ骨、脳、肺、扁平上皮細胞、膀胱、胃、脾臓、胸部、頭部、頸部、肝臓、腎臓、卵巣、前立腺、結腸直腸、食道、婦人科（例えば子宮頸部及び卵巣）、鼻咽頭、又は甲状腺癌を含むが、それらに限定されない。同様に、骨転移、黒色腫、リンパ腫、白血病及び多発性骨髄腫が、用語新生物形成障害に包含される。特に本発明の抗 M-C S F 抗体組成物は、胸部、前立腺、結腸及び肺の癌を治療するために有用である。

20

【0304】

他の実施態様において、本発明の方法及び組成物は、末端性ほくろ性黒色腫、光線性角化症、腺癌、腺様嚢胞癌、腺腫、家族性腺腫様ポリープ症、家族性ポリープ、大腸ポリープ、ポリープ、腺肉腫、腺扁平上皮癌、副腎表皮細胞癌、A I D S 関連リンパ腫、肛門癌、星状細胞腫、バルトリン腺癌、基底細胞癌、胆管癌、膀胱癌、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、乳癌、気管支腺癌、毛細管癌、カルチノイド、癌腫、卵管癌、子宮内膜癌、癌肉腫、海綿状、中枢神経系リンパ腫、脳星状細胞腫、胆管癌、軟骨肉腫、脈絡叢乳頭腫／癌、明細胞癌、皮膚癌、脳癌、大腸癌、結腸直腸癌、皮膚 T 細胞リンパ腫、嚢胞腺癌、内胚葉洞腫瘍、子宮内膜増殖症、子宮内膜間質部肉腫、類子宮内膜腺癌、上衣、類上皮、食道癌、ユーイング肉腫、性腺外胚細胞腫瘍、線維層板(fibrolamellar)、巣状結節性過形成、胆嚢癌、ガストリノーマ、胚細胞腫瘍、妊娠栄養膜腫瘍、グリア芽細胞腫、神経膠腫、グルカゴノーマ、血管芽細胞腫、血管内皮腫、血管腫、肝腺腫、肝腺腫症、肝細胞癌、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、視床下部及び視覚路神経膠腫、インシュリノーマ、上皮内新生物形成、上皮間扁平細胞新生物形成、眼内黒色腫、侵食扁平上皮細胞癌、大細胞癌、島細胞癌、カボジ肉腫、腎臓癌、喉頭癌、平滑筋肉腫、ほくろ悪性黒色腫、白血病関連状態、口唇及び口腔癌、肝臓癌、肺癌、リンパ腫、悪性中皮腫、悪性胸腺腫、髓芽細胞腫、髓上皮腫、黒色腫、髄膜、メルケル細胞癌、中皮、転移性癌、粘液性類表皮癌、多発性骨髄腫／形質細胞新生物、菌状息肉腫、脊髄形成異常症候群、骨髄増殖性状態、鼻腔及び副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、神経上皮腺癌結節性黒色腫、中枢神経系新生物（例えば原発性 C N S リンパ腫、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫又は下垂体腺腫）、非ホジキンリンパ腫、燕麦細胞癌、乏突起膠細胞、口腔癌、口腔咽頭癌、骨肉腫、脾臓ポリペプチド、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、脾癌、乳頭状漿液性腺癌、松果体細胞、下垂体腫瘍、形質細胞腫、偽肉腫、肺芽細胞腫、副甲状腺癌、陰茎癌、褐色細胞腫、松果体及びテント上原始神経外胚葉腫瘍、下垂体腫瘍、形質細胞新生物、胸膜肺芽細胞腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、漿液癌、小細胞癌、小腸癌、軟組織癌、ソマトスタチン分泌腫瘍、扁平上皮癌、有棘細胞癌、中皮下、表在拡大型黒色腫、テント上原始神経外胚葉腫瘍、甲状腺癌、未分化癌、尿道癌、子宮癌、ブドウ膜黒色腫、いぼ状癌、腔癌、ビポーマ

30

40

50

、外陰癌、ワルデンストレームマクログロブリン血症、分化癌、及びウィルムス腫瘍からなる群から選択される新生物形成障害の予防及び治療を包含する。

【0305】

より好ましい実施態様において、ヒトIgG2抗体は、乳癌、前立腺癌、肺癌又は大腸癌を有する被検者に投与される。更により好ましい実施態様において、方法は、癌が異常に増殖することを停止させるか、又は重量若しくは体積を増加させない、又は重量若しくは体積を減少させる。

【0306】

製造物品

本発明のもう一つの実施態様において、医薬上許容し得るキレート剤と組み合わせて本発明の少なくとも1種のモノクローナルヒトIgG2抗体を含む組成物を保持し、かつ任意で使用上の注意を提供する容器を含む製造品が、提供される。適切な容器は、例えば瓶、袋、バイアル及び注射器を含む。容器は、ガラス又はプラスチックのような種々の材料から形成され得る。代表的な容器は、3～20ccの使い捨てガラスバイアルである。あるいは、複数用量の組成物に関して、容器は3～100ccのガラスバイアルであっても良い。容器は、組成物及びその上に又は付随してラベルを保持し、容器は、使用説明書を示しても良い。製造品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、注射器、並びに使用上の注意、禁忌及び／又は潜在的副作用一覧のある添付文書を含む、商業的及び使用者の観点から望ましい他の材料を更に含んでも良い。

【0307】

本発明は、溶液中に少なくとも1種のヒトIgG2抗体を含む第1容器、及び医薬上許容し得るキレート剤を含む第2容器を含む、抗体の液体医薬組成物を調製するキットも提供する。

【0308】

次の実施例は、本発明の実施態様を記載する。ここでの請求項の範囲内の他の実施態様は、ここで開示されるような本発明の明細書の検討又は実践から、当業者にとって明らかであろう。明細書は、実施例と共に、単に代表的であると考えられ、本発明の範囲及び精神は、実施例の後に続く請求項によって示されることが意図される。実施例において、全ての率は、特に指示のない限り、重量ベースで表される。当業者は、実施例に列挙された重量及び／又は比重が、列挙された成分の技術的に認められた分子量を使用して、モル及び／又はモル濃度に変換され得ることを認識するであろう。ここで例示される重量（例えばグラム）は、（例えば緩衝溶液、抗体組成物等の）列挙される容量用である。当業者は、異なる組成物容量が望まれる時に、重量が比例的に調整され得ることを認識するであろう。

【実施例】

【0309】

実施例1-A

この実施例は、Bedian, et al.の米国特許出願公開第20050059113号に記載されたような抗M-CSF抗体を生成するハイブリドーマ細胞系の発生を示す。

免疫化及びハイブリドーマ発生

生後8～10週のXENOMOUSE（商標）マウスが、ヒトM-CSF（10μg／用量／マウス）によって腹腔内又は後足蹠において免疫化された。この用量は、3から8週の期間にわたって5から7回反復された。融合の4日前に、マウスは、リン酸緩衝食塩水（PBS）中のヒトM-CSFの最終注入を与えられた。免疫化マウスの脾臓及びリンパ節リンパ球は、非分泌性骨髓腫P3-X63-Ag8.653細胞系と融合され、かつ融合細胞は、HAT選択を受けた。Galfre, G.及びMilstein, C., 「Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures.」 Methods Enzymol. 73:3-46(1981)を参照。全部がM-CSF特異性ヒトIgG2及びIgG4抗体を分泌するハイブリドーマの集団が、回収された。抗体は同様に、Babcock, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48, 1996に記載されたようなXENOMAX（商標）技術を使用して、発生した。本発

10

20

30

40

50

明の抗体を生成するように設計された9つの細胞系が、更なる研究のために選択され、かつ252、88、100、3.8.3、2.7.3、1.120.1、9.14.4、8.10.3及び9.7.2と指定された。ハイブリドーマは、ブダペスト条約に従った条項に基づき、2003年8月8日にAmerican Type Culture Collection(ATCC),10801 University Blvd.,Manassas,VA 20110-2209に寄託された。ハイブリドーマには、次の受け入れ番号が割り当てられた。

ハイブリドーマ3.8.3(LN15891)	P T A-5390
ハイブリドーマ2.7.3(LN15892)	P T A-5391
ハイブリドーマ1.120.1(LN15893)	P T A-5392
ハイブリドーマ9.7.2(LN15894)	P T A-5393
ハイブリドーマ9.14.4(LN15895)	P T A-5394
ハイブリドーマ8.10.3(LN15896)	P T A-5395
ハイブリドーマ88-ガンマ(U C 25489)	P T A-5396
ハイブリドーマ88-カップ(U C 25490)	P T A-5397
ハイブリドーマ100-ガンマ(U C 25491)	P T A-5398
ハイブリドーマ100-カップ(U C 25492)	P T A-5399
ハイブリドーマ252-ガンマ(U C 25493)	P T A-5400
ハイブリドーマ252-カップ(U C 25494)	P T A-5401

10

【0310】

実施例2-A

20

この実施例は、抗M-C S F抗体を生成する組換え哺乳動物細胞系の発生を示す。

モノクローナル抗体8.10.3の重鎖及び軽鎖をコード化するDNAは、それぞれのハイブリドーマ細胞系8.10.3からクローニングされ、かつDNA配列は、当業者に公知の方法によって決定された。ハイブリドーマ細胞系8.10.3からのDNAは、8.10.3Fを得るために、種々のドメイン中の特異フレームワーク領域で突然変異させられた。抗体8.10.3Fの核酸配列及び予測されるアミノ酸配列から、各抗体鎖の遺伝子使用の同一性が(「V B A S E」)によって決定された。表5は、本発明による抗体8.10.3Fの遺伝子利用を示す。

【0311】

【表5】

30

表5：重鎖及び軽鎖ヒト遺伝子の使用及び配列

抗体	重鎖				軽鎖		
	配列番号	V _H	D _H	J _H	配列番号	V _K	J _K
8.10.3F	1(核酸)	3-48	1-26	4b	3(核酸)	A27	4
	2(アミノ酸)				4(アミノ酸)		

【0312】

40

抗体8.10.3FのDNA配列インサートが、ハイブリドーマ細胞系から得られ、かつ発現ベクターにサブクローニングされた。次に発現ベクターは、8.10.3Fの重鎖及び軽鎖配列を有する抗M-C S F抗体を生成する一次トランスフェクタント細胞系を発生させるために、マウス骨髄腫(NS0)宿主細胞系にトランスフェクトされた。最後に、NS0細胞系を生成する8.10.3F抗体の試料は、凍結され、かつ液体窒素中に貯蔵された。

【0313】

実施例3-A

この実施例は、実施例2-Aにより発生したNS0細胞系からの抗M-C S F8.10.3F抗体の生成を示す。

50

8. 10. 3 FサブクローニングNSO細胞のバイアルは、実施例2-Aに記載されたような液体窒素貯蔵器から除去された。凍結細胞は、最後の氷晶が見えなくなるまで37℃で急速に解凍された。次に解凍されたバイアルの全含量(1ミリリットル)が、75 cm²のTフラスコにピペットで移された。(Invitrogen, Carlsbad, CAから入手可能な)ウシ胎児血清を含む10% Low Ig Gを含む14ミリリットルの予熱された(36.5℃±1.0℃)の(Invitrogen, Carlsbad, CAから入手可能な)CDハイブリドーマ増殖培地が、Tフラスコにゆっくりとピペットで移された。

【0314】

フラスコは、約 2.0×10^5 から約 5.0×10^5 細胞/mlの標的生細胞密度で植え付けられた。フラスコは、次に9%の二酸化炭素レベル及び36.5℃の温度を有するインキュベータ内に置かれ、かつ細胞は約3日間培養された。この期間の終了時に、標的細胞数は、約1.0から 3.0×10^5 細胞/mlであった。

【0315】

細胞は、約3日間培養された後、 2.5×10^5 +/− 0.5×10^5 の標的細胞密度が、得られるように分割され、かつ次に使い捨て振盪フラスコ(すなわち、種子フラスコ(seed flasks))が、細胞密度に基づき、接種された。各振盪フラスコは、ウシ胎児血清を含む10% Low Ig Gを含むCDハイブリドーマ増殖培地を含んだ。フラスコは、次に約3日間、100+/−10回転/分、36.5℃±1.0℃で振り動かされた。この期間の終了時での各フラスコ内の細胞密度は、1.0から 3.0×10^5 細胞/mlであり、かつ80%を超える細胞が、生存可能であった。

【0316】

細胞が、約3日間培養された後、ブロスが採取された。清澄ブロスが、7000回転/分で15分の遠心分離、及び滅菌TC-Tech(商標)バッグへの滅菌0.22 μm 4インチOpticap(商標)Millipore(商標)フィルタによるその後の濾過の後に得られた。

【0317】

実施例4-A

この実施例は、実施例3-Aの抗M-CSF抗体の精製を示す。

清澄ブロスは、蛋白質Aアフィニティカラム及び2つのイオン交換カラムを含む3つのクロマトグラフステップによって次に精製された。工程におけるいかなる潜在的ウイルスも取り除くために、低pH不活性化及びウイルス濾過も同様になされた。生成物は、抗M-CSF抗体組成物を作製するために、濃縮され、かつ組成物緩衝液へのダイアフィルトレーションが行われる。

【0318】

蛋白質Aカラム(Amersham Pharmacia)は、3カラム容量の8M尿素によって洗浄すること、及びその後20 mM トリス(pH 8)による平衡洗浄によって調製された。実施例3の最終濾液は、重力滴下方式によって蛋白質Aカラムに装入される前に、2% v/vの1M トリス pH 8.3及び0.02% Na₃がスパイクされた。装入が完了した後、樹脂は、5カラム容量の20 mM トリス(pH 8)及びその後5カラム容量の溶出緩衝液(0.1M グリシン、pH 3.0)によって洗浄された。いかなる沈殿も観察され、かつ次に10% v/vスパイクの1M トリス pH 8.3が、溶出抗体に添加された。溶出蛋白質は、次に透析緩衝液(例えば140 mM 塩化ナトリウム/20 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.5)の溶出材料の容量の100倍に透析された。透析に続き、抗体は、0.22 μm フィルタによって滅菌濾過され、かつ更に使用されるまで貯蔵された。

【0319】

実施例5-A

モノクローナル抗M-CSF抗体8.10.3 Fを含む液体組成物中の変色、凝集及び断片化に対するEDTA及びヒスチジンの影響を評価するために、研究が行われた。かかる液体組成物中の変色及び凝集は、生成物の美的観点、生成物の完成性観点、又は両方から、一般的に望ましくない。

10

20

30

40

50

【0320】

組成物の調製

本発明の医薬組成物は、次の手順に従って作製された。組成物の調製に使用された材料には：氷酢酸 99.9% (分子量 (MW) 60.05)、濃縮水酸化ナトリウム 18.94 N (50% w/w、MW 40.0)、濃縮塩酸 37.8% (12.44 N、MW 36.46)、ヒスチジン (MW 155.16)、塩化ナトリウム (MW 58.44)、マンニトール (MW 182.17)、ポリソルベート 80 (c r i l l e t (登録商標) 4HP)、酢酸ナトリウム三水和物 (MW 136.08)、クエン酸ナトリウム二水和物 (MW 294.1)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (MW 292.2)、コハク酸 (MW 118.1)、抗体 8.10.3 F バルク溶液 (実施例 2-4 により調製された、酢酸ナトリウム、pH 5.5 中で約 10 mg/ml)、及び注入用の水 (M i l l i - Q 水) が含まれる。これらの溶液が、調製され、かつ次に 1 L ナルゲン (N a l g e n e) ボトルに滅菌濾過され、かつ 5℃で貯蔵された。

【0321】

評価された抗体組成物は、下記表 6 に一覧にする。各組成物を調製するために、最初に組成緩衝液が、緩衝液のみによってか、緩衝液及び (ポリソルベート 80 のような界面活性剤の添加を除き) 等張化剤のような追加の賦形剤によって (表 6 中で報告する)、及びその後 pH の所望のレベルへの調整によって作製された。緩衝溶液は、次に滅菌フィルタ (0.22 ミクロン孔径) を通して滅菌された容器に濾過された。実施例 4-A に記載された精製工程の抗体バルク溶液は、20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.5 及び 140 mM 塩化ナトリウム中で約 10~15 mg/mL で得られた。上記組成物溶液へのこのバルク溶液の緩衝液交換は、約 4500 x g で動かされる E p p e n d o r f 5810 R 遠心分離機上で (例えば 30 kD 遮断膜による) A m i c o n (登録商標) 遠心分離濃縮機により実行された。それぞれの緩衝液中の各組成物に関して、少なくとも 8 回の容量交換がなされた。約 2~5 ミリリットルの組成物 1-A から 13-A が調製された。抗体濃度は、280 nm で $1.43 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ の減衰係数を使用して、紫外線可視分光測定 (U V - V i s) 法によって決定された。抗体溶液の最終容量は、所望の抗体濃度を得るために、適切な希釈によって調整された。20 mg/mL ポリソルベート 80 (P S 80) 溶液が、上記のように調製された適切な組成物緩衝液によるポリソルベート 80 の希釈及び溶解によって調製された。組成物 9-A から 13-A に関して、必要量の 20 g/L ポリソルベート 80 溶液の添加が、抗体組成物中で 0.2 g/L ポリソルベート 80 を得るためになされた。その成分全部が含まれる組成物は、次に滅菌 0.22 ミクロン膜フィルタを通した濾過によって滅菌された。

【0322】

組成物番号 11-A (すなわち、ヒスチジン、マンニトール、ポリソルベート 80 及び E D T A) に関して、1 モル (M) 塩酸溶液が、注入用の水による濃塩酸からの適切な希釈によって最初に調製された。個々の溶液が次に、約 90% の注入用の水中で、次の事前に重量を測定した成分を溶解させることによって、調製された：45 グラム/リットル (g/L) のマンニトール、1.55 g/L のヒスチジン、0.02 g/L のエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物。ポリソルベート 80 を除く賦形剤全部の添加後、溶解が得られ、かつ溶液の pH は、上記のように調製された 1 M 塩酸溶液によって pH 6 に調整された。塩酸溶液の添加後、最終量の水が添加された。緩衝溶液は次に、滅菌フィルタ (0.22 ミクロン孔径) を通して滅菌容器に濾過された。

【0323】

20 g/L ポリソルベート 80 溶液は、組成緩衝液 (45 g/L のマンニトール、1.55 g/L のヒスチジン、0.02 g/L のエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、pH 6) によるポリソルベート 80 の適切な希釈によって調製された。

【0324】

濾過された組成物は、次にバイアルに充填された。バイアルは、13 mm D a i k y o 777-1 血清栓のように、洗浄され、かつ加圧滅菌された。0.25~1 ml の充

填容量は、2 ml タイプ1 ガラスバイアル中で使用された。バイアルは、D a i k y o 7 7 7 - 1 F l u r o t e c (登録商標) コーティングされた栓によって閉鎖され、クrimpシールされ、かつ安定チャンバ内に置かれた。

【0325】

組成物外観分析

各組成物は、粒子形成、変色、及び濁り度変化に関して初期（すなわちゼロ時間）及びその後所望の試料採取間隔（週）で目視評価された。目視観察は、表6に報告した。外観検定は、白黒の背景を備えたライトボックス内で行われる目視検査によった。抗体濃度は、280nmで1.34 (mg/ml)⁻¹cm⁻¹の減衰係数を使用して、紫外線可視分光測定 (UV-Vis) 法によって決定された。

10

【0326】

【表6】

表6：抗M-CSF 8.10.3F抗体組成物の説明、外観及び濃度

組成物 番号	組成物の説明	pH	目視評価	8.10.3F 抗体濃度 (mg/ml)
1-A	20mM酢酸ナトリウム	4.0	透明かつ無色	8.2
2-A	5mM酢酸ナトリウム、5mMクエン酸ナトリウム、5mMヒスチジン、5mMコハク酸	5.0	透明かつ無色	11.9
3-A	5mM酢酸ナトリウム、5mMクエン酸ナトリウム、5mMヒスチジン、5mMコハク酸	5.5	透明かつ無色	8.2
4-A	20mMヒスチジン	6.0	透明かつ無色	8.2
5-A	20mMクエン酸ナトリウム	5.5	透明かつ無色	8.1
6-A	20mM酢酸ナトリウム	5.5	透明かつ無色	8.1
7-A	20mMコハク酸ナトリウム	5.5	透明かつ無色	8.4
8-A	20mM EDTA二ナトリウム二水和物	5.5	透明かつ無色	8.1
9-A	20mM酢酸ナトリウム、140mM NaCl、0.2 mg/ml ポリソルベート80	5.5	透明かつ無色	8.4
10-A	10mM酢酸ナトリウム、45mg/ml マンニトール、0.02mg/ml EDTA、0.2mg/ml ポリソルベート80	5.5	透明かつ無色	9.0
11-A	10mMヒスチジン、45mg/ml マンニトール、0.02mg/ml EDTA二ナトリウム二水和物、0.2mg/ml ポリソルベート80	6.0	透明かつ無色	8.4
12-A	10mMクエン酸ナトリウム、45mg/ml マンニトール、0.02mg/ml EDTA二ナトリウム二水和物、0.2mg/ml ポリソルベート80	5.5	透明かつ無色	8.4
13-A	10mMコハク酸ナトリウム、45mg/ml マンニトール、0.02mg/ml EDTA二ナトリウム二水和物、0.2mg/ml ポリソルベート80	5.5	透明かつ無色	8.6

20

30

40

【0327】

表6中の結果は、初期時点（すなわち時間＝ゼロ）で、全ての試験を受けた抗体8.3.10F組成物に、有意な変色がなく、有意な濁り度がなく、かつ有意な粒子形成がないことを示す。

【0328】

50

実施例 6 - A

種々の組成物及び pH の抗 M - C S F 抗体 8 . 1 0 . 3 F 断片化に対する影響を評価するために、研究が行われた。

【 0 3 2 9 】

断片化分析：

上述のように、表 6 及び実施例 5 - A により調製された抗体組成物は、40℃の温度で貯蔵された。0（初期）、2、4 及び 6 週に、40℃の組成物は、還元 SDS - PAGE（r SDS - PAGE）を使用して断片化に関して分析された。組成物バイアルは、各時点で無菌で試料採取され、かつバイアルからのアリコートは、コロイド状青（クーマシー）染色を有する Nu PAGE 4 ~ 12 % ビスートリスゲルへ装入された。ゲル還元は、Nu PAGE（登録商標）還元剤の使用によって得られた。還元ゲル中の断片化率（すなわち 11 キロダルトン（kD）ポリペプチド断片及び他の断片の存在）は、100% - （重鎖% + 軽鎖%）によって濃度測定により推定され、かつ表 7 に報告された。図 1 は、SDS - PAGE 還元ゲルから推定された断片化率（すなわち重鎖（約 50 kD）及び軽鎖（約 25 kD）以外のポリペプチドの存在）を示す線グラフを示す。還元断片化は、5.5 ~ 6.0 の pH 範囲で見られた。ゲルデータは、40 kD 及び 11 kD のおよその分子質量を有する断片バンドを示した。

10

【 0 3 3 0 】

【表 7】

20

表 7：40℃で貯蔵後の表 6 の組成物の断片化率：

組成物番号	初期	2週間 40℃	4週間 40℃	6週間 40℃
1-A	0	7%	20.1%	24.5%
2-A	0	5.3%	13.1%	18.1%
3-A	0	2.6%	6.6%	10.8%
4-A	0	2.5%	10.9%	12%
5-A	0	2.4%	4.7%	2.2%
6-A	0	0	2.2%	2.6%
7-A	0	0	6.2%	5.5%
8-A	0	2.7%	8.8%	9.4%
9-A	0	-	-	4.1%
10-A	0	-	-	2.9%
11-A	0	-	-	5.0%
12-A	0	-	-	4.6%
13-A	0	-	-	3.7%

30

40

【 0 3 3 1 】

図 1 は、表 7 に詳述した各試料組成物に関する断片化率（すなわち重鎖（約 50 kD）及び軽鎖（約 25 kD）以外のポリペプチドの存在）を示す。減少した断片化レベルが、5.5 ~ 6.0 の pH 範囲を有する組成物において見られた。減少した断片化レベルは、酢酸塩無しであるが、キレート剤を有する組成物においても見られた。

【 0 3 3 2 】

実施例 7 - A

種々の組成物及び pH の抗 M - C S F 抗体 8 . 1 0 . 3 F 荷電種発生に対する影響を評価するために、研究が行われた。主要な等電点電気泳動（IEF）バンド率が、6 週間にわたって 40℃で貯蔵された抗体試料を有する IEF ゲルから推定された。

50

【0333】

酸性及び塩基性種の形成

表6及び実施例5-Aにより調製された抗体組成物1-Aから4-Aが、40℃の温度で貯蔵された。6週間貯蔵した後、各組成物は、等電点電気泳動（IEF）を使用して酸性及び塩基性種の形成に関して分析された。撮像キャピラリー電気泳動が、荷電不均一性評価のためにConvergent Biosciences iCE₂₈₀分析器を使用して行われた。Convergent iCE₂₈₀は、撮像キャピラリー等電点電気泳動（IEF）装置であり、使用者が、キャピラリー中に含まれる分離された試料を撮像することを可能にする。IEF検定は、pH3～10.5ポリアクリルアミドゲル及びクーマシー青染色を使用して行われた。試料蛋白質成分は、それらの相対等電点（pI）に基づき、分離された。主要種は、初期試料における特定pIでの最高濃度測定バンドの強度に基づき割り当てられた。主要種率の変化は、貯蔵期間に応じて起きた。初期値からの主要種率の損失は、酸性及び塩基性種の形成程度の尺度である。

10

【0334】

酸性及び塩基性種の形成は、撮像キャピラリー電気泳動（iCE）によっても観察された。iCEが、荷電不均一性評価のためにConvergent Biosciences iCE₂₈₀分析器を使用して行われた。Convergent iCE₂₈₀は、撮像キャピラリー等電点電気泳動装置であり、使用者が、キャピラリー中に含まれる分離された試料を撮像することを可能にする。試料は、電気泳動両性電解質、メチルセルロース、校正マーカー及び水の混合物中で調製された。試料は、iCE₂₈₀に導入され、かつ高電位／電圧が加えられた。試料蛋白質成分は、それらの相対等電点（pI）に基づき、分離された。相対量の各分離成分は、撮像CCDカメラによって観察された。データは次に、従来のクロマトグラフ統合ソフトウェアを使用して処理され、かつ主なピークの損失（すなわち酸性及び塩基性種の形成）として報告された。

20

【0335】

図2は、6週間にわたって40℃で貯蔵された組成物1～4を有するIEFゲルから推定された主要IEFバンド率を示す。図2に見られるように、pH5.5及び6.0での主要IEFバンドのより小さな減少程度は、5.5～6.0のpHでの改良された安定性を示唆した（すなわち組成物番号3-A及び4-A）。

【0336】

30

実施例8-A

EDTAの抗M-CSF抗体8.10.3F凝集に対する影響を評価するために、研究が行われた。

【0337】

特に、試料組成物番号3-A、5-A、6-A、7-A及び8-Aが、表6及び実施例5-Aに従って、EDTA有り及びEDTA無しで調製され、かつ0（初期）、2、4及び6週間、40℃で数個のガラスバイアル中に貯蔵された。ガラスバイアルは次に、0、2、4及び6週の時点で、組成物中の抗体8.11.3F凝集レベルを測定するために、無菌で試料採取された。その上、組成物11-A（EDTA有り）も、表6に従って調製され、かつ26週間、40℃で数個のガラスバイアル中に貯蔵された。

40

【0338】

凝集分析：

0、2、4及び6週間後、各組成物は、サイズ排除クロマトグラフィを使用して凝集に関して分析された。サイズ排除クロマトグラフィ（すなわちSE-HPLC）は、TSK gel G3000SWXL-G2000SWXLカラム、pH7.0、1ml／分の流量での移動相0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液、及び214nmでの紫外線検出を使用して行われた。表8は、各組成物処理に関して該当する時間で測定された、溶出高分子量種（すなわち抗M-CSF抗体8.11.3Fの凝集塊）の率を示す。凝集レベルは、各組成物のクロマトグラムピークの領域を積分し、かつ高分子量種ピークの積分領域を全ピーク領域率として報告することによって計算された（表8参照）。

50

【0339】

【表8】

表8：40℃で貯蔵後の組成物3、5、6、7及び8の凝集率：

組成物番号	初期	2週間 40℃	4週間 40℃	6週間 40℃
3-A	0.2%	1.3%	1.9%	3.2%
5-A	0.2%	1.5%	2.2%	3.8%
6-A	0.2%	1.1%	1.9%	3%
7-A	0.2%	1.2%	-	2.9%
8-A	0.2%	1.1%	1.4%	2.6%

10

【0340】

表8及び図3に見られるように、EDTA含有組成物（すなわち組成物8-A）は、EDTA無しの組成物と比較して、時間が経っても低い凝集レベルを示した。図11は、40℃で26週間、組成物11-A中に貯蔵されたモノクローナル抗M-CSF抗体8.10.3Fに関するサイズ排除クロマトグラムを示す。

20

【0341】

実施例9-A

EDTAの抗M-CSF抗体8.10.3F凝集及び断片化に対する影響を評価するために、研究が行われた。

【0342】

特に、試料組成物番号9-A、10-A、11-A、12-A及び13-Aが、表6及び実施例5-Aに従って、EDTA有り及びEDTA無しで調製され、かつ0（初期）、4、6、8、12及び26週間、40℃で数個のガラスバイアル中に貯蔵された。ガラスバイアルは次に、所定の時点で、組成物中の抗体8.11.3F凝集レベルを測定するために、無菌で試料採取された。

30

【0343】

凝集分析：

0、4、6、8、12及び26週に、各組成物は、サイズ排除クロマトグラフィを使用して凝集に関して分析された。サイズ排除-高圧液体クロマトグラフィ（SE-HPLC）は、TSK gel G3000SWXL-G2000SWXLカラム、pH7.0、1ml／分の流量での移動相0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液、及び214nmでの紫外線検出を使用して行われた。表9は、各組成物処理に関して該当する時間で測定された、溶出高分子量種（すなわち抗M-CSF抗体8.11.3Fの凝集塊）の率を示す。凝集レベルは、各組成物のクロマトグラムピークの領域を積分し、かつ高分子量種ピークの積分領域を全ピーク領域率として報告することによって計算された（表9参照）。

40

【0344】

【表 9】

表 9 : 40℃で貯蔵後の組成物9-A、10-A、11-A、12-A及び13-Aの凝集率：

組成物番号	初期	4週間 40℃	6週間 40℃	8週間 40℃	12週間 40℃	26週間 40℃
9-A	0.2%	2.0%	2.6%	3.9%	5.8%	11.6%
10-A	0.1%	0.9%	1.4%	1.6%	2.7%	4.7%
11-A	0.2%	1.0%	1.4%	1.8%	2.6%	4.9%
12-A	0.2%	1.8%	2.3%	2.9%	3.9%	7.0%
13-A	0.2%	1.4%	1.9%	2.4%	3.5%	6.2%

10

【0345】

表 9 及び図 4 に見られるように、EDTA 含有組成物（すなわち組成物 10-A、11-A、12-A 及び 13-A）は、EDTA 無しの組成物（すなわち組成物 9-A）と比較して、時間が経っても低い凝集レベルを示した。

【0346】

断片化分析：

0、4、6、8、12 及び 26 週に、組成物番号 9-A、10-A、11-A、12-A 及び 13-A は、断片化に関して同様に分析された。

20

【0347】

有機サイズ排除－高圧液体クロマトグラフィ（SE-HPLC）が、抗体の約 11 kD 断片に関する断片化率を決定するために、0、4、6、8、12 及び 26 週の時点で試料に対して行われた。試料は、0.50 mL/分の流量での定組成移動相の 40% アセトニトリル + 0.1% TFA、及び 214 nm での紫外線検出を使用して、TSK gel Super SW3000 サイズ排除カラムに注入された。溶出種率は、ピークの領域を積分することによって決定された。

【0348】

30

【表 10】

表 10 : 40℃で貯蔵後の組成物9-A、10-A、11-A、12-A及び13-Aに関する約11kD断片の断片化率：

組成物番号	初期	8週間 40℃	12週間 40℃	26週間 40℃
9-A	0.1%	1.6%	2.3%	3.5%
10-A	0.1%	0.7%	0.9%	1.7%
11-A	0.1%	0.6%	0.8%	1.7%
12-A	0.1%	1.5%	2.1%	4.1%
13-A	0.1%	1.0%	1.4%	3.0%

40

【0349】

表 10 及び図 5 に見られるように、EDTA 含有組成物（すなわち組成物 10-A、11-A、12-A 及び 13-A）は、EDTA 無しの組成物（すなわち組成物 9-A）と比較して、時間が経っても低いレベルの 11 kD の断片を生む断片化を示した。その上、ヒスチジン含有組成物（すなわち組成物 11-A）は、ヒスチジン無しの組成物（すなわち組成物 9-A、12-A 及び 13-A）と比較して、時間が経っても低いレベルの 11

50

k Dの断片を生む断片化を示した。

【0350】

その上、SDS-PAGEゲルも、NuPAGE 4～12%ビストリスゲル、及びコロイド状青（クーマシー）染色を使用して、0、4、6、8、12及び26週の時点で試料と共に流された。還元ゲルに関して、還元は、NuPAGE（登録商標）還元剤によって得られた。還元ゲル中の断片化率は、100%－（重鎖%＋軽鎖%）によって濃度測定により推定された。ゲルデータは、40 kD及び11 kDのおおよその分子質量を有する断片バンドを示した。図6は、組成物試料によりSDS-PAGE還元ゲルデータから推定された断片化率を示す。図7は、組成物試料によりSDS-PAGE非還元ゲルデータから推定された抗体のモノマー率を示す。

10

【0351】

図4～7は、組成物9-A、10-A、12-A及び13-Aと比較して、減少した凝集（図4）、11 kD断片化の減少した量（図5）、減少した断片化種（図6）、及び最高の無傷な抗体モノマー率を保持すること（図7）に関する組成物11-A（10 mMヒスチジン、45 mg/ml マンニトール、0.02 mg/ml EDTA二ナトリウム二水和物、及び0.2 mg/ml ポリソルベート80）の改良された抗M-CSF抗体の安定性を示す。

【0352】

実施例10-A

EDTA及びヒスチジンの抗M-CSF抗体8.10.3 F断片化に対する影響を評価するために、研究が行われた。

20

【0353】

抗体8.10.3 Fの数種の実験組成物は、図9に示すような、還元SDS-PAGEゲルの写真に現れる約40 kD及び11 kDでのバンド形成によって観察されるように、6週間、40℃の応力状態で、切断された種（すなわち断片）を発生させた。最も豊富なクリップ部位（clip site）の同一性は、分子の重鎖上の残渣Asp99及びPro100の間にあるように決定された。軽鎖中の幾つかの小さな切断部位が、一方は残渣Gly213及びGlu214の間で、かつ他方はGlu214及びCys215の間で同様に観察された。切断レベルは、組成物によって変わり、かつこれまでは高温で（例えば40℃）、すなわち応力状態でのみ観察された。

30

【0354】

酢酸ナトリウム及び塩化ナトリウム中で配合され、かつ26週間、40℃で貯蔵された抗体8.10.3 Fの試料（組成物番号9-A）は、有機SEC-HPLCを使用して、ヒスチジン及びEDTAを含む組成物（組成物番号11-A）よりも高い11 kD断片の存在を有するように、観察された（図8参照）。

【0355】

この試料は次に、切断部位を決定するために、有機サイズ排除クロマトグラフィ／質量分光測定（SEC/MS）によって分析された。試料は、0.50 mL/分の流量での定組成移動相の40%アセトニトリル＋0.1% TFAを使用して、サイズ排除カラム（Phenomenex SEC3000、4.6×250 mm）に注入された。カラムの溶出液は、流れのおおよそ半分がエレクトロスプレー質量分析計（Micromass Q-ToF Micro（商標）、Waters Inc.）のソースに向けられるように、分割された。各クロマトグラフピークの質量スペクトルは、オペレーティングソフトウェアに含まれるMaxEntアルゴリズムを使用して、解析された（deconvoluted）。測定分子質量は、次に抗体8.10.3 Fの予想されたアミノ酸配列に基づく理論分子質量と比較された。

40

【0356】

質量分光同定が後に続く、214 nm検出による有機SEC-HPLC分離は、対照試料と比較して、6週間、40℃で貯蔵された組成物番号1-A中で抗体8.10.3 Fに関して実行された。図10は、上部グラフとして40℃の貯蔵を、かつ下部グラフとして5

50

℃の対照を有する、結果として生じたクロマトグラムを示す。クロマトグラム測定質量は、集計され、かつ表11の仮定種の理論質量と比較された。

【0357】

【表11】

表11：仮定種の理論質量と比較された、試料中で観察された種の測定質量。測定分子量全体は、仮定種の理論分子量の実験誤差内であった。

ピークRT (保持時間) (分)	測定MW (Da)	同一性	理論MW (Da)
4.45	147,220	8.10.3F (「親」)	147,223*
4.45	136,424	親— (重鎖 1-99)	136,431*
4.45	125,634	親—クリップ2x (重鎖 1-99)	125,633*
6.53	10,816	(重鎖 1-99)	10,816

* 重鎖上の「G0, G0」グリコフォーム及びdes-Lys C末端と一致する。「G0, G1」、「G1, G1」及び「G1, G2」グリコフォームも観察された。Jefferis et al., Biochem. J., 268, 529-537 (1990)に記載されたように、「G0, G0」グリコフォームは、両方の重鎖がG0グリカンを付着させる種である。G1及びG2グリカンは、グリカンの非還元末端にそれぞれ1つ及び2つのガラクトース残渣を有する。抗体は、重鎖の残渣297でN-グリコシル化された。

【0358】

応力状態で、抗体8.10.3Fは、開裂を受け、かつ切断種を発生させることができる。主な開裂部位は、1つ及び2つの切断生成物を引いた対応する親種と共に10,816 Da (すなわち約11 kD) 種を発生させる、8.10.3Fの重鎖中のAsp-Pro結合の開裂と一致する。

【0359】

実施例11-A

種々の緩衝液の抗M-CSF抗体8.10.3F凝集に対する影響を評価するために、研究が行われた。

【0360】

特に、試料組成物番号6-A、3-A、5-A及び8-Aが、表11及び実施例5-Aにより調製され、かつ6週間、40℃でガラスバイアル中に貯蔵された。ガラスバイアルは次に、6週の時点での組成物中の抗体8.11.3Fの凝集レベルを測定するために、無菌で試料採取された。

【0361】

凝集分析：

6週の時点で、各組成物は、サイズ排除クロマトグラフィを使用して凝集に関して分析された。サイズ排除クロマトグラフィ (すなわちSE-HPLC) は、TSK gel G3000SWXL-G2000SWXLカラム、pH7.0、1ml/分の流量での移動相0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液、及び214nmでの紫外線検出を使用して行われた。表11は、各組成物処理に関して該当する時間で測定された、溶出高分子量種 (すなわち抗M-CSF抗体8.11.3Fの凝集塊) の率を示す。凝集レベルは、各組成物のクロマトグラムピークの領域を積分し、かつ抗体モノマーに先立って溶出した高分子量種

ピーク（すなわち無傷の非凝集ポリペプチド）の積分領域を全ピーク領域率として報告することによって計算された（表 1 1 参照）。

【0362】

【表 1 2】

表12：40℃での貯蔵後の組成物6-A、3-A、5-A及び8-Aの凝集率：

組成物番号	8.10.3F 抗体濃度 (mg/ml)	組成物の説明	凝集%
6-A	8±2	20mM酢酸塩、pH5.5	3.0%
3-A	8±2	組み合わせ、pH5.5（酢酸塩5mM、クエン酸塩5mM、ヒスチジン5mM、コハク酸塩5mM）	3.2%
5-A	8±2	20mMクエン酸塩、pH5.5	3.8%
8-A	8±2	20mM EDTA、pH5.5	2.6%

10

【0363】

表 1 1 に見られるように、EDTA 含有組成物（すなわち組成物 8 - A）は、EDTA 無しの組成物（すなわち組成物 6 - A、3 - A 及び 5 - A）と比較して、減少した凝集レベルを示した。

20

【0364】

実施例 1 2 - A

種々の賦形剤の抗 M - C S F 抗体 8 . 1 0 . 3 F 凝集及び断片化に対する影響を評価するために、研究が行われた。

【0365】

特に、試料組成物番号 1 8 - A、1 9 - A、2 0 - A、2 9 - A、3 0 - A 及び 3 1 - A が、表 1 2 及び実施例 5 - A により調製され、かつ 6 週間、4 0 °C でガラスバイアル中に貯蔵された。ガラスバイアルは次に、6 週の時点での組成物中の抗体 8 . 1 1 . 3 F の凝集及び断片化レベルを測定するために、無菌で試料採取された。

30

【0366】

凝集分析：

6 週の時点で、各組成物は、サイズ排除クロマトグラフィを使用して凝集に関して分析された。サイズ排除クロマトグラフィ（すなわち S E - H P L C）は、T S K g e l G 3 0 0 0 S W X L - G 2 0 0 0 S W X L カラム、p H 7 . 0、1 m l / 分の流量での移動相 0 . 2 M リン酸ナトリウム緩衝液、及び 2 1 4 n m の紫外線検出を使用して行われた。表 1 2 は、各組成物処理に関して該当する時間で測定された、溶出高分子量種（すなわち抗 M - C S F 抗体 8 . 1 1 . 3 F の凝集塊）の率を示す。凝集レベルは、各組成物のクロマトグラムピークの領域を積分し、かつ抗体モノマーに先立って溶出した高分子量種ピーク（すなわち無傷の非凝集ポリペプチド）の積分領域を全ピーク領域率として報告することによって計算された（表 1 2 参照）。

40

【0367】

断片化分析：

6 週の時点で、各組成物は、有機 S E - H P L C を使用して断片化に関しても分析された。有機 S E - H P L C は、全ポリペプチドの 1 1 k D 断片に関する断片化率を決定するために試料に対して行われた。試料は、0 . 5 0 m l / 分の流量での定組成移動相の 4 0 % アセトニトリル + 0 . 1 % T F A、及び 2 1 4 n m の紫外線検出を使用して、T S K g e l S u p e r S W 3 0 0 0 サイズ排除カラムに注入された。溶出種率は、ピークの領域を積分することによって決定され、かつ表 1 2 に報告された。

【0368】

50

【表 1 3】

表12：抗M-CSF 8. 10. 3F抗体組成物の説明及び40℃での貯蔵後の結果：

組成物 番号	8. 10. 3F mg/ml	緩衝液	賦形剤	PS80	Na ₂ EDTA ・2H ₂ O	凝集%	断片%
29-A	6±2	酢酸ナトリウム △20mM、pH5. 5	塩化ナトリウム △140mM	0. 2	-	2. 0%	1. 2%
18-A	6±2	酢酸ナトリウム △20mM、pH5. 5	マンニトール 45mg/ml	0. 2	-	1. 4%	1. 0%
30-A	6±2	酢酸ナトリウム △20mM、pH5. 5	マンニトール 45mg/ml	0. 2	0. 02 mg/ml	1. 3%	0. 6%
19-A	6±2	酢酸ナトリウム △20mM、pH5. 5	ショ糖 90mg/ml	0. 2	0. 02 mg/ml	1. 2%	0. 5%
20-A	6±2	酢酸ナトリウム △20mM、pH5. 5	トレハロース 90mg/ml	0. 2	0. 02 mg/ml	1. 1%	0. 4%
31-A	6±2	ヒスチジン 10mM、pH6. 0	マンニトール 45mg/ml	0. 2	0. 02 mg/ml	0. 8%	0. 5%

10

20

【0 3 6 9】

表 1 2 に見られるように、E D T A 含有組成物（すなわち組成物 3 0 - A、3 1 - A、1 9 - A 及び 2 0 - A）は、E D T A 無しの組成物（すなわち組成物 2 9 - A 及び 1 8 - A）と比較して、減少した凝集及び断片化レベルを示した。

【0 3 7 0】

実施例 1 3 - A

種々の賦形剤の抗 M - C S F 抗体 8 . 1 0 . 3 F 断片化に対する影響を評価するために、研究が行われた。

【0 3 7 1】

特に、試料組成物番号 2 1 - A から 2 8 - A が、表 1 3 及び実施例 5 - A により調製され、かつ 2 6 週間、4 0 °C でガラスバイアル中に貯蔵された。ガラスバイアルは次に、2 6 週の時点での組成物中の抗体 8 . 1 1 . 3 F の断片化レベルを測定するために、無菌で試料採取された。

30

【0 3 7 2】

断片化分析：

2 6 週の時点で、各組成物は、有機 S E - H P L C を使用して断片化に関して分析された。有機 S E - H P L C は、全ポリペプチドの 1 1 k D 断片に関する断片化率を決定するために試料に対して行われた。試料は、0 . 5 0 m L / 分の流量での定組成移動相の 4 0 % アセトニトリル + 0 . 1 % T F A、及び 2 1 4 n m の紫外線検出を使用して、T S K g e l S u p e r S W 3 0 0 0 サイズ排除カラムに注入された。溶出種率は、ピークの領域を積分することによって決定され、かつ表 1 3 に報告された。

40

【0 3 7 3】

【表 1 4】

表13：抗M-CSF 8. 10. 3F抗体組成物の説明及び40℃での貯蔵後の結果：

組成物 番号	8. 10. 3F mg/ml	緩衝液	賦形剤	PS80 mg/mL	Na ₂ EDTA ・2H ₂ O mg/mL	断片化%
21-A	50±8	酢酸ナトリウム 20mM、pH5. 5	塩化ナトリウム 140mM	0. 2	-	4. 1%
22-A	50±8	酢酸ナトリウム 10mM、pH5. 5	マンニトール 45mg/ml	0. 2	0. 02 mg/ml	2. 3%
23-A	50±8	酢酸ナトリウム 10mM、pH5. 5	シヨ糖 90mg/ml	0. 2	0. 02 mg/ml	3. 0%
24-A	50±8	酢酸ナトリウム 10mM、pH5. 5	トレハロース 90mg/ml	0. 2	0. 02 mg/ml	2. 2%
25-A	50±8	ヒスチジン 10mM、pH6. 0	マンニトール 45mg/ml	0. 2	0. 02 mg/ml	2. 1%
26-A	50±8	ヒスチジン 10mM、pH6. 0	シヨ糖 90mg/ml	0. 2	0. 02 mg/ml	1. 9%
27-A	50±8	ヒスチジン 10mM、pH6. 0	トレハロース 90mg/ml	0. 2	0. 02 mg/ml	1. 8%
28-A	50±8	ヒスチジン 5mM、pH6. 0	マンニトール 45mg/ml	0. 2	0. 02 mg/ml	1. 4%

【0 3 7 4】

表 1 3 に見られるように、E D T A 含有組成物（すなわち組成物 2 2 - A から 2 8 - A）は、E D T A 無しの組成物（すなわち組成物 2 1 - A）と比較して、減少した断片化レベルを示した。同様に、表 1 4 に見られるように、ヒスチジン含有組成物（すなわち組成物 2 5 - A から 2 8 - A）は、ヒスチジン無しの組成物（すなわち組成物 2 1 - A から 2 4 - A）と比較して、減少した断片化レベルを示した。

【0 3 7 5】

実施例 1 - B

この実施例は、Hanson, et al. の米国特許第 6, 6 8 2, 7 3 6 号に記載されたような抗 C T L A - 4 抗体を生成するハイブリドーマ細胞系の発生を示す。

【0 3 7 6】

本発明の抗体は、次のように調製され、選択されかつ検定された：

抗原調製：3つの異なる免疫原が、X e n o M o u s e（商標）マウスの免疫化のために調製された：すなわち（i）C T L A - 4 - I g G 融合蛋白質、（i i）C T L A - 4 ペプチド、及び（i i i）細胞表面に構成性発現される C T L A - 4（Y 2 0 1 V）の突然変異体によってトランスフェクトされた 3 0 0. 1 9 マウスリンパ腫細胞である。

C T L A - 4 - I g G 1 融合蛋白質：

【0 3 7 7】

発現ベクター構造

C T L A - 4 の、c D N A をコード化する成熟細胞外ドメインは、公開された配列（E u r . J I m m u n o l 1 8 : 1 9 0 1 - 1 9 0 5（1 9 8 8））のために設計されたプライマーを使用して、ヒト胸腺 c D N A ライブラリ（C l o n t e c h）から P C R 増幅された。断片は、ヒトオンコスタチン M シグナルペプチド及びヒト I g G ガンマ 1（I g G 1）C H 1 / C H 2 / C H 3 ドメインの間で、p S R 5、シンドビスウイルス発現

プラスミド (InV i t r o g e n) に、方向性サブクロニングされた。融合蛋白質は、ヒンジドメインを含まないが、共有結合ダイマーを形成するために、C T L A - 4 の細胞外ドメイン中にシステイン120を含む。結果として生じたベクターは、C T L A - 4 - I g G 1 / p S R 5 と呼ばれた。ベクター中の完全な C T L A - 4 - I g G 1 c D N A は、両方のストランド中で確認された配列であった。アミノ酸配列 C T L A 4 - I g 蛋白質を以下に示す。C D 4 4 の成熟細胞外ドメインは、ヒトリンパ球ライブラリ (C l o n t e c h) から P C R 増幅され、かつ同一の I g G 1 尾部を有する対照蛋白質を発生させるために、p S i n R e p 5 にサブクロニングされた。

【0378】

【化1】

10

OM-CTLA4-IgG1融合タンパク質:

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVR
VTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC
KVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSLEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPTPEEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

20

下線=シグナル・ペプチド

【0379】

C D 2 8 の成熟細胞外ドメインの c D N A は、ヒトリンパ球ライブラリ (C l o n t e c h) から P C R 増幅され、かつ次にトロンビン開裂及びヒンジ領域の両方を含むヒト I g G 1 融合蛋白質を生成するために、p C D M 8 にサブクロニングされた (J . I m m u n o l . 1 5 1 : 5 2 6 1 - 7 1 (1 9 9 3)) 。マーモセット、カニクイザル (C y n o m o l o g o u s) 、及びアカゲザル C T L A 4 は、標準的な縮退 P C R 技術を使用して、P H A 刺激された P B M C から分離された m R N A からクロニングされた。配列決定は、アカゲザル及びカニクイザルアミノ酸配列が、同一であり、成熟ヒト C T L A 4 細胞外ドメインと3個の相違がある (S 1 3 N、I 1 7 T 及び L 1 0 5 M) ことを示した。マーモセットは、成熟ヒト C T L A 4 細胞外ドメインと10個のアミノ酸の相違を示した (V 2 1 A、V 3 3 I、A 4 1 T、A 5 1 G、5 4 1、S 7 1 F、Q 7 5 K、T 8 8 M、L 1 0 5 M 及び G 1 0 6 S) 。部位特異的突然変異誘発が、ヒト C T L A 4 - I g G との抗体の相互作用に重要なアミノ酸をマッピングするため、マーモセット C T L A 4 において異なる全てのアミノ酸の一点突然変異を作製するために使用された。エピトープマッピングのためのヒト及びマーモセット C T L A - I g G の突然変異は、m a t c h m a k e r 部位特異的突然変異誘発 (P r o m e g a) によって発生した。I g G 融合蛋白質は、C o s 7 細胞の一過性トランスフェクションによって生成され、かつ標準的な蛋白質 A 技術を使用して精製された。突然変異体 C T L A 4 - I g G 蛋白質は、免疫ブロット法による抗体への結合に関して評価され、かつ B I A c o r e 分析を使用した。

30

40

【0380】

組換え蛋白質発現/精製

組換えシンドビスウイルスは、InV i t r o g e n によって記載されたような S P 6 インビトロ転写 C T L A - 4 - I g G 1 / p S R 5 m R N A 及び D H - 2 6 S ヘルパー m R N A を有する仔ハムスター腎細胞を電気穿孔すること (G i b c o) によって発生した。48時間後、組換えウイルスが、採取され、かつチャイニーズハムスター卵巣細胞 (

50

CHO-K1)における最適な蛋白質発現のために滴定された。CHO-K1細胞は、10%熱不活性化ウシ胎児血清(Gibco)、非必須アミノ酸(Gibco)、4mMグルタミン(Gibco)、ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco)、10mM HEPES pH7.5(Gibco)を含むDMEM/F12(Gibco)中の懸濁液中で培養された。CTLA-4-IgGを生成するために、CHO-K1細胞は、DMEM/F12中で 1×10^7 細胞/mlで再懸濁され、かつ室温で1時間、シンドビスウイルスと共にインキュベートされた。次に細胞は、蛋白質Aセファロース(Pharmacia)を使用してウシIgGの放血された1%ウシ胎児血清、非必須アミノ酸、4mMグルタミン、12.5mM HEPES pH7.5及びペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM/F12中で 1×10^6 /mlに希釈された。感染後48時間の細胞は、ペレット化され、かつ馴化培地は、採取され、かつ完全なプロテアーゼ抑制因子タブレット(Boehringer Mannheim)が補充され、7.5にpH調整され、かつ0.2 μ の濾過(Nalgene)がなされた。FPLC(Pharmacia)が、10ml/分の流量で5ml蛋白質A HiTrapカラム(Pharmacia)を使用して、融合蛋白質をアフィニティ精製するために使用された。カラムは、30床容量のPBSによって洗浄され、かつ1ml/分で0.1Mグリシン/HCl pH2.8により溶出された。分画(1ml)は、トリスpH9によってpH7.5に直ちに中和された。CTLA-4-IgG1を含む分画は、SDS-PAGEによって同定され、かつ次に、溶剤としてPBSを使用して1ml/分でセファロース200カラム(Pharmacia)に加えられる前にcentriplus 50(Amicon)を使用して濃縮された。CTLA-4-IgG1を含む分画は、貯留され、0.2 μ の滅菌濾過(Millipore)がなされ、かつアリコートが取られ、かつ-80℃で凍結された。CD44-IgG1が、発現され、かつ同じ方法を使用して精製された。CD28-IgGは、一過性トランスフェクトされたCos7細胞からの馴化培地から精製された。

【0381】

CTLA-4-IgG1の特性決定：

精製CTLA-4-IgG1は、コロイド状クーマシー染色法(Novex)を使用して、SDS-PAGE上で単一バンドとして移動した。非還元状態で、CTLA-4-IgG1は、ダイマー(100kDa)であり、それは50mM DTTによって処理された時に50kDaモノマーに還元された。溶液中の精製CTLA-4-IgG1のアミノ酸配列決定は、CTLA-4のN末端(MHVAQPAVVLA S)、及びオンコスタチンMシグナルペプチドが、成熟融合蛋白質から開裂されたことを確認した。CTLA-4-IgG1は、固定化B7.1-IgGに濃度依存的に結合し、かつ結合は、ハムスター抗ヒト抗CTLA-4抗体(BN13:PharMingen)によって遮断された。滅菌CTLA-4-IgGは、無エンドトキシンであり、かつ減衰係数として1.4を使用してOD280によって定量された。精製CTLA-4-IgGの収率は、0.5~3mg/リットルのCHO-K1細胞の範囲であった。

【0382】

CTLA-4ペプチド：

次のCTLA-4ペプチドが、下記のように調製された。

【0383】

【化2】

NH₂:MHVAQPAVVLA SSGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQ VNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPC-CONH₂

【0384】

10

20

30

40

50

略語／材料：

NMP、N-メチルピロリジノン；TFE、2, 2, 2-トリフルオロエタノール；DCM、ジクロロメタン；FMOC、フルオレニルメトキシカルボニル。全ての試薬は、次の例外を除き、Perkin Elmerによって供給された：TFE、Aldrich Chemical、FMOC-PAL-PEG樹脂、Perseptive Biosystems。Fmoc-Arg(PMC)-OH；FMOC-Asn(Trt)-OH、FMOC-Asp(tBu)-OH、FMOC-Cys(Trt)-OH、FMOC-Glu(tBu)-OH、FMOC-Gln(Trt)-OH、FMOC-His(Boc)-OH、FMOC-Lys(BOC)-OH、FMOC-Ser(tBu)-OH、FMOC-Thr(tBu)-OH及びFMOC-Tyr(tBu)-OHは、側鎖保護基を必要とするアミノ酸に使用された。

10

【0385】ペプチド合成：

ペプチド合成は、301nmでの紫外線吸光度によるフィードバックモニタリングによって改良されたPerkin-Elmer 431Aで行われた(Perkin-Elmer Model 759A検出器)。ペプチド配列は、条件付二重結合サイクルを使用して、FMOC-PAL-PEG樹脂に集められた。強制二重結合は、サイクル10、11、18、19、20及び28から33で行われた。樹脂は、各アシル化サイクルの完了時に、DCM及びTFEの50%混合物によって洗浄され、その後にNMP中の無水酢酸による未反応アミノ基のキャッピングが続いた。樹脂は、サイクル49を完了した後、反応装置から除去され、かつ残部は、完了まで留まった。樹脂からのペプチド開裂は、415mgの樹脂に対して6時間、試薬Kを使用して行われ(King et al. International Journal of Protein and Peptide Research 36:255-266(1990))、186mgの粗CTLA-4ペプチドをもたらした。

20

【0386】ペプチドの特性決定：

粗CTLA-4ペプチドの25mgのアリコートが、pH6.4で5mlの6MグアニジンHCl/100mM K₂PO₃中で溶解され、かつPharmacia Hi Load Superdex 75 16/60カラム(16mm×600mm、120ml床容量)上に溶出され、2MグアニジンHCl/100mM K₂PO₃が、pH6.4、180分間、2ml/分で、5mlの分画を収集した。分画は、1.7µlの分画を、MES流動緩衝液によって流動するNuPAGE Laemelliゲルに装入し、かつDaiichi銀染色手順によって視覚化することにより分析された。分子量標準に対して判断されたように、12kDaの分子量を示すこれらの分画は、一緒に貯留され、かつ4℃で貯蔵された。組み合わせられた分画は、紫外線及びゲル電気泳動によって分析された。アミノ酸配列決定は、(PVDF膜に吸収される)ProSorbカートリッジ中で100マイクロリットルの試料を吸収し、かつ緩衝塩を除去するために洗浄することによって行われた。配列決定は、Applied Biosystems 420シーケンサーで行われた。予期されたN末端配列(MHVAQPAVVLA)が観察された。免疫ブロット法は、ペプチドが、BNi3抗ヒトCTLA-4抗体(PharMingen)によって認識されることを示した。脱塩するために、648µgの材料を含むアリコートは、3500Da MWCO透析管中に置かれ、かつ攪拌して9日間、4℃で0.1%TFA/H₂Oに対して透析された。透析バッグの全内容物は、凍結乾燥され、粉末になった。

30

40

【0387】

CTLA-4 (Y201V) ペプチド抗原によってトランスフェクトされた「300.19」細胞：

CTLA-4 cDNAの全長は、ヒト胸腺cDNAライブラリ(Stratagene)からPCR増幅され、かつpIRESneo(Clontech)にサブクローニングされた。構成性細胞表面発現という結果になるCTLA-4の突然変異は、Match Maker突然変異誘発システム(Promega)を使用して導入された。チロシン、

50

Y201からバリンへの突然変異は、CTLA-4の急速なインターナリゼーションに關与するアダプチン蛋白質AP50の結合を阻害する(Chuang, et al. J. Immunol. 159:144-151(1997))。マイコプラズマの無い300.19マウスリンパ腫細胞は、10%のウシ胎児血清、非必須アミノ酸、ペニシリン/ストレプトマイシン、2mMグルタミン、12.5mM Hepes pH7.5、及び25μMベターメルカプトエタノールを含むRPMI-1640中で培養された。細胞は、200V/1180uF (Gibco Cell Porator) を使用して、20μg CTLA-4-Y201V/pIRESneoによって1mlチャンバ中で電気穿孔された(3×10⁶/0.4ml無血清RPMI)。細胞は、10分間静止され、その後8mlの予熱された完全RPMI培地。48時間で、細胞は、1mg/ml G418 (Gibco) を含む完全RPMI培地中で0.5×10⁶/mlに希釈された。耐性細胞は、拡大され、かつフィコエリトリン (Phar 10 Mingen) と抱合されるBNI3抗体を使用して細胞表面にCTLA-4を発現することが認められた。高レベル発現細胞が、滅菌選別によって分離された。

【0388】

免疫化及びハイブリドーマ生成：

Xenomouse (商標) マウス (生後8~10週) は、(i) 完全フロイントアジュバントによってリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中で再懸濁された、上記のようなCTLA-4を発現するためにトランスフェクトされた1×10⁷の300.19細胞によって、尾底に皮下で、又は(ii) 完全フロイントアジュバントによって乳化された(a) 10μg CTLA-4融合蛋白質又は(b) 10μg CTLA-4ペプチドによって尾底 20 に皮下で免疫化された。各場合において、用量は、不完全フロイントアジュバント中で3又は4回反復された。融合の4日前に、マウスは、PBS中の免疫原又は細胞の最終注入を受けた。免疫化マウスの脾臓及び/又はリンパ節リンパ球は、[マウス非分泌性骨髓腫P3細胞系]と融合され、かつ前記のように、HAT選択を受けた(Galfre, G. 及びMilstein, C., 「Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures」 Methods Enzymol. 73:3-46(1981))。全部がCTLA-4特異性ヒトIgG₂K抗体を分泌するハイブリドーマの大きな集団が、回収された。

【0389】

次のように指定された抗CTLA-4抗体を生成する次のハイブリドーマは、2003年4月29日にAmerican Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209に寄託された。 30

クローン	サブクローン	ATCC寄託番号
11.2.1	11.2.1.4	PTA-5169
4.1.1	4.1.1.1	PTA-5166

【0390】

実施例2-B

この実施例は、抗CTLA-4抗体を生成する組換え哺乳動物細胞系の発生を示す。

モノクローナル抗体11.2.1の重鎖及び軽鎖をコード化するDNAは、それぞれのハイブリドーマ細胞系11.2.1からクローニングされ、かつDNA配列は、当業者に公知の方法によって決定された。抗体11.2.1の核酸配列及び予測されるアミノ酸配列から、各抗体鎖の遺伝子使用の同一性が決定された。 40

【0391】

11.2.1 DNA配列インサートが、次に発現ベクターにサブクローニングされた。その後発現ベクターは、抗CTLA抗体を生成する、種々の一次トランスフェクタント細胞系を発生させるために、マウス骨髓腫(NSO)宿主細胞にトランスフェクトされた。増殖及び生産性分析に基づき、リード(lead)細胞系が、選択された。リード系は、クローン細胞系を発生させるために、その後サブクローニングされた。

【0392】

抗CTLA4抗体は、細胞培養培地を含むバイオリアクター中で細胞系を使用して、細胞培養によって生成された。培地は、生成中に栄養素が補われる。採取基準が達成された 50

後、バイオリアクターは、濾過のみによって、又は遠心分離及びその後の濾過によって採取された。清澄上清が、蛋白質Aアフィニティカラム及び2つのイオン交換カラムを含む3つのクロマトグラフィステップによって次に精製された。工程におけるいかなる潜在的ウイルスも取り除くために、低pH不活性化及びウイルス濾過も同様になされた。生成物は、製剤原料を作製するために、濃縮され、かつ組成緩衝液へのダイアフィルトレーションが行われる。

【0393】

実施例3-B

4種の異なる緩衝液の抗体凝集及び断片化に対する影響を評価するために、研究が行われた。

10

特に、抗CTLA4抗体11.2.1を含み、かつ酢酸塩、コハク酸塩、ヒスチジン又はEDTAによって緩衝液処理される4種の液体組成物が、調製された。組成物は次に、40℃で貯蔵され、かつ抗体凝集及び断片化測定が、0、2、5及び7週に行われた。

【0394】

緩衝溶液の調製：

4種の緩衝溶液は、表13に記載されたように調製された。各溶液は、最初に水中で（表13に一覧にした）大量の緩衝液種を溶解することによって調製された（標的の約80%）。各緩衝溶液のpHは次に、表13に記された、十分な量の酸性又は塩基性溶液の添加によって5.5に調整された。pHの調整後、追加量の水が、20mMの最終緩衝液濃度を提供するために、添加された。20mMの緩衝液濃度は、5.5の選択されたpHで、妥当なpH安定性を確実にするために選択された。次に、緩衝溶液は、その後に使用するため、滅菌フィルタ（0.22ミクロン孔径）を通して滅菌容器に濾過された。

20

【0395】

【表15】

表13：緩衝溶液：

緩衝液タイプ	緩衝液種	緩衝液濃度 (g/L)	酸性／塩基性溶液
酢酸	酢酸ナトリウム三水和物	2.74	1% v/v 氷酢酸
コハク酸	コハク酸	2.36	1M NaOH
ヒスチジン	L-ヒスチジンHCl一水和物	4.19	1M NaOH
EDTA	EDTA二ナトリウム二水和物	7.45	5M HCl

30

【0396】

1% v/v 氷酢酸溶液は、水による氷酢酸（99.9%）の適切な希釈（1mlから100ml）によって調製された。1モル（M）水酸化ナトリウム溶液が、1Lの水中に40gの固体水酸化ナトリウムを溶解させることによって調製された。5モル（M）塩酸が、水による濃塩酸（37.8%）の適切な希釈によって調製された。

40

【0397】

抗体組成物の調製：

評価された抗体組成物を、下記表14に一覧にする。各組成物を調製するために、（表14でmg/mlで報告する）大量の等張化剤(tonicifier)が最初に、示された緩衝溶液に添加され、かつ溶液は、等張化剤が溶解するまで攪拌された。実施例2-Bに記載された精製工程の抗体バルク溶液は、20mM酢酸ナトリウム緩衝液pH5.5+140mM塩化ナトリウム中で13.2mg/mLで得られた。上記組成物溶液へのこのバルク溶液の緩衝液交換は、5℃で6500回転/分で動かされるBeckman Coulter Allegra 21R遠心分離機上で、Amicon Ultra 15 MWCO

50

10 K (U F C 9 0 1 0 2 4) 遠心分離濃縮機により実行された。約 8 回の容量交換がなされ、かつ抗体溶液は、 $27 \sim 30 \text{ mg/ml}$ に濃縮された。約 $3 \sim 4 \text{ ml}$ の組成物 1-B から 18-B が調製された。抗体濃度は、 280 nm で $1.43 (\text{mg/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ の減衰係数を使用して、紫外線可視分光測定 (U V - V i s) 法によって決定された。

【0398】

20 mg/ml ポリソルベート 80 (P S 8 0) 溶液が、上記のように調製された適切な組成緩衝液によるポリソルベート 80 の希釈及び溶解によって調製された。次に下記表 4 の組成物に対応する組成物中で、 20 mg/ml の抗 C T L A - 4 モノクローナル抗体の最終溶液を得るために、ポリソルベート 80 は、適切な量の緩衝液、抗体、等張化剤及び水と共に、 20 mg/ml 濃縮物として抗体及び緩衝溶液に添加された。

10

【0399】

表 14 の組成物 2-B に関して、P E G 3 3 5 0 が、この時点で 200 mg/ml 濃縮物として添加された。

【0400】

次に組成物は、 0.2μ 滅菌グレードフィルタを通して濾過され、かつバイアルに充填された。 0.5 から 1 ml の充填容量が、 2 ml タイプ 1 ガラスバイアル中で使用された。バイアルは、D a i k y o 7 7 7 - 1 F l u r o t e c (登録商標) コーティングされた栓によって閉鎖され、クリンプシールされ、かつ 2、5 及び 7 週間、 40°C で直立させて貯蔵された安定チャンバ内に置かれた。バイアルは、 13 mm D a i k y o 7 7 7 - 1 血清栓のように、洗浄され、かつ加圧滅菌された。重複したバイアルは、凝集及び断片化に関して直ちに分析された。

20

【0401】

【表 16】

表14：検査した抗体組成物：

組成物番号	緩衝液タイプ 20mM, pH5.5	等張化剤 (mg/ml)	界面活性剤 (mg/ml)
1-B	酢酸塩	NaCl (9)	PS80 (0.2)
2-B	酢酸塩	NaCl (9) + PEG3350 (10)	PS80 (0.2)
3-B	酢酸塩	ショ糖 (90)	PS80 (0.2)
4-B	酢酸塩	ソルビトール (48)	PS80 (0.2)
5-B	酢酸塩	イノシトール (48)	PS80 (0.2)
6-B	酢酸塩	マンニトール (41) + グリシン (2)	PS80 (0.2)
7-B	コハク酸塩	ショ糖 (90)	PS80 (0.2)
8-B	コハク酸塩	ソルビトール (48)	PS80 (0.2)
9-B	コハク酸塩	イノシトール (48)	PS80 (0.2)
10-B	コハク酸塩	マンニトール (41) + グリシン (2)	PS80 (0.2)
11-B	ヒスチジン	ショ糖 (90)	PS80 (0.2)
12-B	ヒスチジン	ソルビトール (48)	PS80 (0.2)
13-B	ヒスチジン	イノシトール (48)	PS80 (0.2)
14-B	ヒスチジン	マンニトール (41) + グリシン (2)	PS80 (0.2)
15-B	EDTA	ショ糖 (90)	PS80 (0.2)
16-B	EDTA	ソルビトール (48)	PS80 (0.2)
17-B	EDTA	イノシトール (48)	PS80 (0.2)
18-B	EDTA	マンニトール (41) + グリシン (2)	PS80 (0.2)

【0402】

凝集分析：

表14の抗体組成物は、40℃の温度で貯蔵された。0、2、5及び7週に、各組成物は、サイズ排除クロマトグラフィ（SEC）を使用して凝集に関して分析された。サイズ排除クロマトグラフィは、TSK gel G3000SWXL-G2000SWXLカラム、pH7.0、1ml/分の流量での移動相0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液、及び214nmでの紫外線検出を使用して行われた。図13は、各組成物に関して該当する時間で測定された、溶出高分子量種（すなわち抗CTLA-4モノクローナル抗体11.2.1の凝集塊）の率を示す。凝集レベルは、各組成物のクロマトグラムピークの領域を積分し、かつ高分子量種ピークの積分領域を全ピーク領域率として報告することによって計算された（図13参照）。図13に見られるように、EDTA緩衝液処理された組成物は、最低凝集レベルを示し、その後にヒスチジン、酢酸塩及びコハク酸塩緩衝液処理された組成物が、その順序で続く。

【0403】

断片化分析：

上述のように、表14の抗体組成物は、40℃の温度で貯蔵された。0、2、5及び7週に、各組成物は同様に、rSDS-PAGEを使用して断片化に関して分析された。rSDS-PAGE分析は、NuPAGE4から12%ビスートリスゲル及びコロイド状青（クーマシー）染色を使用して行われた。還元ゲル（rSDS-PAGE）に関して、還

元は、NuPAGE（登録商標）還元剤によって得られた。全加水分解不純物（すなわち、抗CTLA-4モノクローナル抗体11.2.1の断片）は、分子動力学個人濃度計PDQC-90又はBio-Rad GS800撮像濃度計を使用して、走査によって推定された。図14は、各組成物に関して該当する時間で測定された断片化率を示す。断片化レベルは、全バンド容量率として計算された（図14参照）。図14に見られるように、EDTA緩衝液処理された組成物は、最低断片化レベルを示し、その後にヒスチジン-、酢酸塩-及びコハク酸塩-緩衝液処理された組成物が、その順序で続く。

【0404】

下記表15（a）（0週間）、表15（b）（2週間）、表15（c）（5週間）及び表15（d）（7週間）は、図13及び14にグラフによって表した凝集及び断片化データを報告する。 10

【0405】

【表17】

表15(a)：0時点での凝集及び断片化の結果：

組成物番号	凝集率	断片化率
1-B	0.4%	0.62%
2-B	0.4%	0.66%
3-B	0.3%	0.53%
4-B	0.4%	0.49%
5-B	0.4%	0.67%
6-B	0.3%	0.56%
7-B	0.3%	0.46%
8-B	0.4%	0.62%
9-B	0.4%	0.49%
10-B	0.3%	0.51%
11-B	0.3%	0.64%
12-B	0.3%	0.62%
13-B	0.3%	0.47%
14-B	0.3%	0.37%
15-B	0.3%	0.42%
16-B	0.3%	0.50%
17-B	0.3%	0.49%
18-B	0.3%	0.47%

【0406】

20

30

40

【表 1 8】

表15 (b) : 2 週時点での凝集及び断片化の結果 :

組成物番号	凝集率	断片化率
1-B	0.7%	1.52%
2-B	0.7%	1.35%
3-B	0.5%	1.16%
4-B	0.5%	1.13%
5-B	0.5%	1.10%
6-B	0.4%	1.34%
7-B	0.6%	1.34%
8-B	0.6%	1.44%
9-B	0.6%	1.22%
10-B	0.5%	1.16%
11-B	0.4%	1.29%
12-B	0.4%	1.19%
13-B	0.4%	1.00%
14-B	0.4%	0.99%
15-B	0.5%	1.24%
16-B	0.5%	1.00%
17-B	0.5%	1.07%
18-B	0.5%	0.96%

10

20

【0 4 0 7】

【表 1 9】

表15 (c) : 5 週時点での凝集及び断片化の結果 :

組成物番号	凝集率	断片化率
1-B	0.8%	1.40%
2-B	0.9%	1.59%
3-B	1.2%	2.61%
4-B	1.1%	1.49%
5-B	1.0%	2.12%
6-B	0.6%	1.56%
7-B	1.7%	2.50%
8-B	1.4%	1.86%
9-B	1.4%	2.03%
10-B	0.9%	1.46%
11-B	0.6%	1.42%
12-B	0.7%	1.36%
13-B	0.6%	1.03%
14-B	0.5%	1.05%
15-B	0.5%	1.21%
16-B	0.5%	0.78%
17-B	0.6%	1.27%
18-B	0.5%	1.25%

10

20

【0408】

【表 2 0】

表15 (d) : 7 週時点での凝集及び断片化の結果 :

組成物番号	凝集率	断片化率
1-B	1.4%	2.39%
2-B	1.2%	1.90%
3-B	1.4%	1.89%
4-B	1.8%	2.96%
5-B	1.3%	1.92%
6-B	1.1%	1.77%
7-B	1.2%	1.97%
8-B	2.2%	2.91%
9-B	2.4%	3.25%
10-B	1.3%	1.82%
11-B	0.9%	1.34%
12-B	0.9%	1.33%
13-B	0.7%	1.12%
14-B	0.6%	0.92%
15-B	0.6%	1.04%
16-B	0.6%	1.18%
17-B	0.6%	1.01%
18-B	0.6%	1.18%

10

20

【0409】

実施例 4-B

モノクローナル抗 C T L A - 4 抗体 1 1 . 2 . 1 を含む様々な液体組成物の複数の凍結 30
及び解凍サイクルに耐える能力を評価するために、研究が行われた。

【0410】

複数の凍結／解凍サイクルに耐える液体組成物の能力は、後で使用するために組成物が
貯蔵（かつ所望であれば運搬）、凍結及び次に解凍できるか決定するために、しばしば評
価される。

【0411】

評価された組成物は、下記の表 1 6 に一覧にした。組成物を調製するために使用した方
法は、実施例 3-B に記載されたものと同じである。2 . 5 m L の各溶液は、5 m L タイ
プ 1 ガラスバイアル中に入れられ、栓をされ、かつ密封された。以下で番号 1-B から 4
- B、7-B から 8-B、11-B から 12-B、及び 15-B から 16-B として識別 40
される組成物は、実施例 3-B で同じ識別番号を有する組成物と同一であった。

【0412】

【表 2 1】

表16：検査した抗体組成物：

組成物番号	緩衝液タイプ 20mM, pH5. 5	等張化剤 (mg/ml)	界面活性剤 (mg/ml)
1-B	酢酸塩	NaCl (9)	PS80 (0. 2)
2-B	酢酸塩	NaCl (9) +PEG3350 (10)	PS80 (0. 2)
3-B	酢酸塩	ショ糖 (90)	PS80 (0. 2)
4-B	酢酸塩	ソルビトール (48)	PS80 (0. 2)
19-B	酢酸塩	トレハロース (90)	PS80 (0. 2)
20-B	コハク酸塩	NaCl (9)	PS80 (0. 2)
21-B	コハク酸塩	NaCl (9) +PEG3350 (10)	PS80 (0. 2)
7-B	コハク酸塩	ショ糖 (90)	PS80 (0. 2)
8-B	コハク酸塩	ソルビトール (48)	PS80 (0. 2)
22-B	ヒスチジン	NaCl (9)	PS80 (0. 2)
23-B	ヒスチジン	NaCl (9) +PEG3350 (10)	PS80 (0. 2)
11-B	ヒスチジン	ショ糖 (90)	PS80 (0. 2)
12-B	ヒスチジン	ソルビトール (48)	PS80 (0. 2)
24-B	EDTA	NaCl (9)	PS80 (0. 2)
25-B	EDTA	NaCl (9) +PEG3350 (10)	PS80 (0. 2)
15-B	EDTA	ショ糖 (90)	PS80 (0. 2)
16-B	EDTA	ソルビトール (48)	PS80 (0. 2)

10

20

30

40

50

【0 4 1 3】

各組成物は、6回の連続した凍結／解凍サイクルを受けた。最初の3回のサイクルは、制御速度凍結器内で行われた。最後の3回のサイクルは、凍結器又は冷却器内に置かれる高い熱負荷に対応するために多数の水を充填したバイアルによって行われる遅いサイクルであった。サイクル1、2及び3に関して、組成物を含むバイアルは、制御速度凍結器（Planer Kryo 560-16）内に置かれ、かつ次のサイクルを受けた：-70℃の温度に達するまで、0. 2℃／分の速度で組成物を冷却する、1. 5から3時間-70℃で保持する、及び5℃の温度に達するまで、0. 3℃／分の速度で組成物を解凍する。サイクル4、5及び6に関して、バイアルは、他の水を充填したバイアルと共にボックス内に置かれた（各組成物に関して1つの試料バイアル、合計約30の水を充填したバイアルと共に17の組成物バイアル）。次にこのボックスは、最初に約17時間-70℃の温度に維持された凍結器内に、かつ次に約50時間2～8℃の温度に維持された冷却器内に置かれた。ボックス内に置かれた記録サーマルプローブは、凍結工程に関して0. 09℃／分の平均冷却速度を、かつ解凍工程に関して0. 03℃／分の平均加熱速度を測定した。

【0 4 1 4】

各組成物は、各凍結／解凍サイクル後、粒子形成、変色、及び濁り度変化に関して目視評価された。各組成物のかかる目視観察は、白黒の背景に対するライトボックス内で行われ、他方で組成物は、各解凍後になおも冷たかった。（下記）表17に、結果を報告する。

【 0 4 1 5 】

【 表 2 2 】

表17：抗CTLA-4抗体11.2.1の凍結/解凍安定性の目視評価：

No.	ID	1x凍結解凍	2x凍結解凍	3x凍結解凍	4x凍結解凍	5x凍結解凍	6x凍結解凍	粒子増加 % (分)
1-B	Ac+NaCl	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	濁る	多数の 粒子	多数の 粒子	0.7
2-B	Ac+NaCl +PEG	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	フレーク	曇る フレーク有り	少数の 粒子	0
3-B	Ac+ ショ糖	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	0.1
4-B	Ac+ ソルビトール	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	0.1
19-B	Ac+ トレハロース	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	0
20-B	Succ+ NaCl	少数の 粒子	少数の 粒子	更に多数の 粒子	更に多数の 粒子	曇る、 フレーク、 粒子	多数の 粒子	1.3
21-B	Succ+NaCl +PEG	無色 粒子無し	更に少数の 粒子	少数の 粒子	曇る	曇る	少数の 粒子	0.2
7-B	Succ+ ショ糖	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	0.1
8-B	Succ+ ソルビトール	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	0
22-B	Hist+NaCl	無色 粒子無し	濁る	濁る	曇る、 フレーク	曇る	曇る、濁る、 フレーク	1.1
23-B	Hist+NaCl +PEG	無色 粒子無し	濁る	少数の 粒子	無色 粒子無し	曇る、 フレーク、 少数の粒子	少数の 粒子	0.1
11-B	Hist+ショ糖	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	0.1
12-B	Hist+ ソルビトール	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	0
24-B	Ed+NaCl	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	曇る、 更に少数の 粒子	多数の 粒子	多数 の粒子、 曇る	0.1
25-B	Ed+NaCl +PEG	無色 粒子無し	濁る、 更に少数の 粒子	曇る、 フレーク	曇る	曇る、 フレーク	少数の 粒子	0
15-B	Ed+ ショ糖	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	0
16-B	Ed+ ソルビトール	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	無色 粒子無し	0.1

【 0 4 1 6 】

塩化ナトリウム（すなわち塩化物イオン）のみを含む組成物は、トレハロース、ショ糖又はソルビトールを含む組成物よりも、凍結／解凍サイクル後に可溶性粒子レベルの大きな増加を示した。しかしながら、塩化ナトリウムを含む組成物へのPEG添加は、PEGを含まない対応する組成物に関する凍結／解凍サイクリング後に測定された可溶性粒子レベルを減少させるように見えた。

【 0 4 1 7 】

凝集分析：

その上、可溶性粒子の増加率が、サイズ排除クロマトグラフィを使用して6回の連続す

10

20

30

40

50

る凍結／解凍サイクル後に、各組成物に関して測定された。

【0418】

6回目の凍結／解凍サイクル後、各組成物は、サイズ排除クロマトグラフィを使用して凝集に関して分析された。サイズ排除クロマトグラフィは、TSK gel G3000SWXL-G2000SWXLカラム、pH7.0、1ml／分の流量での移動相0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液、及び214nmでの紫外線検出を使用して行われた。表17は、各組成物処理に関して該当する時間で測定された、溶出高分子量種（すなわち抗CTLA-4モノクローナル抗体11.2.1の凝集塊）の率を示す。凝集レベルは、各組成物のクロマトグラムピークの領域を積分し、かつ高分子量種ピークの積分領域を全ピーク領域率として報告することによって計算された（表17参照）。表17に見られるように、EDTA緩衝液処理された組成物は、最低凝集レベルを示し、その後にヒスチジン、酢酸塩、及びコハク酸塩緩衝液処理された組成物が、その順序で続く。 10

【0419】

実施例5-B

EDTA、メチオニン及び嫌気条件の、モノクローナル抗CTLA-4抗体11.2.1を含む液体組成物中の変色及び凝集に対する影響を評価するために、研究が行われた。かかる液体組成物中の変色及び凝集は、生成物の美的観点、生成物の完成性観点、又は両方から、一般的に望ましくない。

【0420】

下記表8は、評価された組成物処理を一覧にする。組成物を調製するために使用された一般的な方法は、実施例3に記載されたものと同じである。この実施例のために、モノクローナル抗CTLA-4抗体11.2.1（5mg／ml）、酢酸ナトリウム緩衝液（20mM）、塩化ナトリウム（8.2mg／ml）及びポリソルベート80（0.2mg／ml）を含み、かつpH5.5を有する開始組成物が、調製され、かつ無菌試料採取を可能にするために密封頂部を含む幾つかの10mLガラスバイアルに添加された。 20

【0421】

種々の処理が、下記表18による開始組成物に対して行われた。図18に記されているように、メチオニンがバイアルの幾つかに添加された。2つの異なる濃度のEDTAが、他のバイアルに添加された。窒素ガスが、選択されたEDTA又はメチオニンを含むバイアルのヘッドスペースに添加された。その上、未処理のままのバイアルの幾つかは、そのヘッドスペースへの窒素ガス注入に先立って脱気された。更に、残りのバイアルの幾つかは、実験対照となるために、未処理のままにされた。 30

【0422】

表18の各処理の2つのバイアルが、0、2、4、6、8、10、14、16及び18週間、40℃で貯蔵された。各時点での2つの貯蔵されたバイアルの一方は、目視色彩評価のために使用され、他方で他のバイアルは、貯蔵後の11.2.1抗体凝集のレベルを測定するために、無菌で試料採取された。表19及び20に、結果を報告する。

【0423】

【表 2 3】

表18：検査した抗体組成物処理：

組成物番号	処理識別	処理
26-B	処理せず	なし
27-B	+ヘッドスペース中に N ₂ ガス	排出及び取替えによって凍結乾燥器中でバイアルのヘッドスペースを窒素ガスに代える
28-B	+脱気 +ヘッドスペース中に N ₂ ガス	凍結乾燥器中で脱気され、上記 2 番のように凍結乾燥器中でバイアル中のヘッドスペースを窒素ガスに代える
29-B	+26. 6mM メチオニン	26. 6mMのメチオニンを固体として添加
30-B	+ヘッドスペース中に N ₂ ガス +26. 6mM メチオニン	26. 6mMのメチオニンを固体として添加、かつ上記 2 番のように凍結乾燥器中でバイアルのヘッドスペースを窒素ガスに代える
31-B	+0. 005% Na ₂ EDTA	0. 005% Na ₂ EDTA. 2H ₂ Oを固体として添加
32-B	+26. 6mM メチオニン +0. 005% Na ₂ EDTA	26. 6mMのメチオニン及び0. 005% Na ₂ EDTA. 2H ₂ Oを固体として添加
33-B	+0. 01% Na ₂ EDTA	0. 01% Na ₂ EDTA. 2H ₂ Oを固体として添加

10

20

【0 4 2 4】

組成物外観分析：

各組成物は、粒子形成、変色、及び濁り度変化に関して0（初期）、2、4、6、8、10、14、16、及び18週間後に目視評価された。目視観察は、表19に報告した。

【0 4 2 5】

【表 2 4】

表19：表18の組成物処理後の目視評価：

番号	バイアル 処理	初期	40℃ 2週間	40℃ 4週間	40℃ 6週間	40℃ 8週間	40℃ 10週間	40℃ 12週間	40℃ 14週間	40℃ 16週間	40℃ 18週間
26-B	処理せず	透明かつ 無色	透明かつ 無色	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
27-B	+N ₂	透明かつ 無色	透明かつ 無色	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
28-B	+脱気 +N ₂	透明かつ 無色	透明かつ 無色	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
29-B	+26.6mM メチオニン	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色
30-B	+N ₂ +26.6mM メチオニン	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色
31-B	+0.005% Na ₂ EDTA	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色
32-B	+26.6mM メチオニン +0.005% Na ₂ EDTA	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色
33-B	+0.01% Na ₂ EDTA	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色

10

20

【0 4 2 6】

表19の結果は、EDTA及び／又はメチオニンの無い組成物が、40℃で少なくとも4週間の貯蔵後にバイアル中でピンクの着色を発現したことを示している。いかなる特定の理論にもとらわれることを望まないが、本発明の1つの実施態様において、この変色は、少なくとも部分的に酸化工程に起因し得ると思われる。しかしながら、他の実施態様において、変色は、酸化に無関係な、任意の数の他の工程に起因し得る。

30

【0 4 2 7】

バイアルのヘッドスペースへの窒素ガスの添加は、メチオニン及び／又はEDTAの添加よりも、変色を減少させることにおいて、少ない影響を有するよう見えた。

【0 4 2 8】

凝集分析：

表18により処理された抗体組成物は、40℃の温度で貯蔵された。0、2、6、8、10、14、16及び18週に、各組成物は、サイズ排除クロマトグラフィを使用して凝集に関して分析された。サイズ排除クロマトグラフィは、TSK gel G3000SWXL-G2000SWXLカラム、pH7.0、1ml/分の流量での移動相0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液、及び214nmでの紫外線検出を使用して行われた。表20は、各組成物処理に関して該当する時間で測定された、溶出高分子量種（すなわち抗CTL A-4抗体11.2.1の凝集塊）の率を示す。凝集レベルは、各組成物のクロマトグラムピークの領域を積分し、かつ高分子量種ピークの積分領域を全ピーク領域率として報告することによって計算された（表20参照）。

40

【0 4 2 9】

【表 2 5】

表20：表18の組成物処理の凝集率：

番号	バイアル 処理	初期	40℃ 2週間	40℃ 4週間	40℃ 6週間	40℃ 8週間	40℃ 10週間	40℃ 12週間	40℃ 14週間	40℃ 16週間	40℃ 18週間
26-B	処理せず	0.2%	0.8%	2.3%	3.5%	4.6%	5.31%	4.3%	8.8%	7.7%	7.1%
27-B	+N ₂	0.2%	0.7%	2.3%	3.8%	4.4%	4.82%	4.5%	6.5%	6.0%	5.5%
28-B	+脱気 +N ₂	0.2%	0.3%	0.9%	1.4%	2.5%	3.68%	4.3%	-	4.6%	4.8%
29-B	+26.6mM メチオニン	0.2%	0.2%	0.5%	0.5%	0.6%	0.59%	0.5%	0.7%	0.8%	0.7%
30-B	+N ₂ +26.6mM メチオニン	0.2%	0.2%	0.5%	0.4%	0.4%	0.51%	0.5%	0.5%	0.7%	0.7%
31-B	+0.005% Na ₂ EDTA	0.2%	0.2%	0.4%	0.6%	0.5%	0.69%	0.8%	1.0%	1.0%	0.8%
32-B	+26.6mM メチオニン +0.005% Na ₂ EDTA	0.2%	0.3%	0.3%	0.4%	0.4%	0.35%	0.4%	0.8%	0.5%	0.7%
33-B	+0.01% Na ₂ EDTA	0.2%	0.2%	0.4%	0.6%	0.6%	0.73%	0.3%	1.2%	1.0%	1.2%

10

20

【0430】

表19の結果は、EDTA及び／又はメチオニンの無い組成物が、40℃で少なくとも4週間の貯蔵後にバイアル中でピンクの着色を発現し始めることを示している。表20に見られるように、EDTA及び／又はメチオニン処理組成物は、最低凝集レベルを示し、その後に窒素ガス処理及び未処理の対照組成物が続く。

30

【0431】

実施例6-B

液体組成物としての貯蔵後の抗CTLA-4抗体11.2.1中の数種のメチオニンアミノ酸残渣の酸化に対するメチオニン及びEDTAの影響を評価するために、研究が行われた。

【0432】

メチオニン酸化分析：

抗CTLA-4抗体11.2.1中のアミノ酸位置256及び432でのメチオニン残渣の酸化レベルは、40℃で8週間の貯蔵後、リシン-Cマッピング方法によって測定された。

【0433】

組成物番号26-B、29-B及び33-B（表18）、及び実施例5-Bのそれらの処理を含むガラスバイアルは、8週の時点で無菌で試料採取された。次に試料は、標準条件で、pH8.0、トリス緩衝液中でLyc-C酵素によって消化され、かつ逆相高速液体クロマトグラフィによって分析された。分離は、水中に0.1%のTFA、かつアセトニトリル勾配溶出中に0.085%のTFAで、Grace Vydac Protein C4分析カラムを使用して遂行された。

40

【0434】

【表 2 6】

表21：表18の処理後の抗CTLA-4抗体11. 2. 1中のメチオニンアミノ酸の酸化率：

組成物番号	処理	酸化率 Met 432	酸化率 Met 256
	初期	2. 3%	4. 9%
26-B	処理せず	15. 4%	32. 9%
29-B	+26. 6mM メチオニン	0. 5%	1. 1%
33-B	+0. 01% Na ₂ EDTA	1. 6%	3. 3%

10

【0 4 3 5】

表 1 1 の結果は、メチオニン又は E D T A の、1 1 . 2 . 1 抗体組成物への添加が、E D T A 又はメチオニン無しで貯蔵された組成物と比較して、2 つの示したメチオニン残渣で、酸化率を減少させることを示している。

【0 4 3 6】

実施例 7 - B

抗 C T L A - 4 抗体 1 1 . 2 . 1 中の数種のトリプトファン及びチロシンアミノ酸残渣の酸化を評価するために、研究が行われた。

20

【0 4 3 7】

時間が経つとピンクの変色を発現する抗 C T L A - 4 抗体 1 1 . 2 . 1 組成物は、紫外線／可視分光測定 (U V - V i s) を行った後に、5 0 0 n m で特性吸収極大を有することが判った。

【0 4 3 8】

組成物を調製するために使用される方法は、実施例 3 - B に記載されたものと同じである。この実施例に関して、2 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液中のモノクローナル抗 C T L A - 4 抗体 1 1 . 2 . 1 の 5 m g / m l 溶液、8 . 2 m g / m l 塩化ナトリウム、及び 0 . 2 m g / m l ポリソルベート 8 0 を含む組成物 (p H 5 . 5) が、4 0 ° C で 4 週間、2 つのガラスバイアル中に貯蔵され、その時点で組成物が、ピンクの変色を発現した。

30

【0 4 3 9】

次に、変色したバイアル組成物の一方の中の溶液は、分子量 (カットオフ) 濾過を受け、それは、組成物賦形剤が、抗体を後に残して、濾過装置を通過することを可能にする。濾過溶出液 (例えば水及び賦形剤) は、透明かつ無色であり、他方で収集された分画 (例えば抗体 1 1 . 2 . 1) は、ピンクのままであった。それ故、濾過実験は、ピンクの変色が、組成物の賦形剤に起因することとは、全く異なり、抗体 1 1 . 2 . 1 自体に関連することを示した。

【0 4 4 0】

次に、ピンクの変色を有する第 2 バイアルは、標準条件でトリプシンによって消化され、かつ質量分析が併用される逆相高速液体クロマトグラフィ (L C - M S) によって分析された。分離は、水中に 0 . 1 % の T F A 、かつアセトニトリル勾配溶出中に 0 . 0 8 5 % の T F A で、G r a c e V y d a c P r o t e i n C 4 分析カラムを使用して遂行された。5 0 0 n m の消化ペプチド U V - V i s 吸光度が、観察され、かつ対応するペプチドが、その分子量に基づき同定された。

40

【0 4 4 1】

5 0 0 n m 吸光度ピークと相関するトリプシンペプチドは、アミノ酸配列：G L E W V A V I W Y D G S N K を有した。ペプチド配列 G L E W V A V I W Y D G S N K は次に、標準条件で、A s p - N プロテアーゼによって更に消化され、かつ 5 0 0 n m 吸光度 (U V - V i s) ピークは、アミノ酸配列：G L E W V A V I W Y を有する A s p - N プロテアーゼ消化ペプチドと共に移動した。

50

【0442】

従って、いかなる特定の理論にもとらわれることを意図しないが、プロテアーゼ消化ペプチド (GLEWVAVIWY) 中のチロシン残渣 (Y) 又は2種のトリプトファンアミノ酸残渣 (W) のいずれか一方又は両方が、この実施例における抗体 11. 2. 1 組成物のピンク変色に関与し得た、可能性のある酸化部位と思われる。特定の実施態様において、プロテアーゼ消化ペプチド (GLEWVAVIWY) 中の2種のトリプトファンアミノ酸残渣 (W) のいずれか一方又は両方が、ピンク変色に関与し得た、可能性のある酸化部位と思われる。

【0443】

しかしながら、酸化以外のメカニズムが、ここで評価される種々の組成物中で見られる特定の变色 (例えばピンク及び黄色) のいずれか一つ又はそれ以上に関与し得た可能性もある。 10

【0444】

実施例 8-B

EDTA 及び DTPA の、抗 CTLA-4 抗体 11. 2. 1 の变色、凝集及び断片化に対する影響を評価するために、研究が行われた。

【0445】

特に、EDTA 及び DTPA 有り、及び無しの抗体 11. 2. 1 を含む3種の液体組成物が調製された。組成物は、40℃で貯蔵され、かつ抗体の变色、凝集及び断片化の評価が0、2、4、6、8及び10週で行われた。 20

【0446】

この実施例に関して、8.2mg/ml 塩化ナトリウム、及び0.2mg/ml ポリソルベート80を有する20mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.5 中の抗 CTLA-4 抗体の20mg/ml 溶液が調製され、かつ実施例3に記載されたように数個のガラスバイアルの中で分割され、かつ次に EDTA 又は DTPA の添加によって処理された。EDTA 及び DTPA は、固体として組成物バイアルに添加された。数個のバイアルは、变色、凝集及び断片化レベルに関して直ちに分析され、数個の他の重複したバイアルも、2、4、6、8及び10週間、40℃で直立させて貯蔵された。

【0447】

次に処理及び未処理のバイアルは、2、4、6、8及び10週の時点での組成物中の抗体 11. 2. 1 の凝集及び断片化レベルを測定するために、無菌で試料採取され、かつ变色に関して観察された。表22及び23に、結果を報告する。 30

【0448】

組成物外観分析：

各組成物は、粒子形成、变色、及び濁り度変化に関して0 (初期)、2、4、6、8及び10週間後に目視評価された。目視観察は、表22に報告した。

【0449】

【表 2 7】

表22：EDTA及びDTPA組成物処理の目視評価：

番号	処理	0週間 初期	2週間 40℃	4週間 40℃	6週間 40℃	8週間 40℃	10週間 40℃
26-B	処理せず	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	ピンク	ピンク	ピンク
33-B	+0.01% Na ₂ EDTA・2H ₂ O	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色
34-B	+0.01% DTPA	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色	透明かつ 無色

10

【0 4 5 0】

表 2 2 の結果は、E D T A 又は D T P A 無しの組成物が、4 0 ℃での少なくとも 6 週間の貯蔵後に、バイアル中でピンク着色を発現したことを示す。

【0 4 5 1】

凝集分析：

表 2 2 により処理された抗体組成物は、4 0 ℃の温度で貯蔵された。0、2、6、8 及び 1 0 週に、各組成物は、サイズ排除クロマトグラフィを使用して凝集に関して分析された。サイズ排除クロマトグラフィは、T S K g e l G 3 0 0 0 S W X L - G 2 0 0 0 S W X L カラム、p H 7. 0、1 m l / 分の流量での移動相 0. 2 M リン酸ナトリウム緩衝液、及び 2 1 4 n m の紫外線検出を使用して行われた。表 2 3 は、各組成物処理に関して該当する時間で測定された、溶出高分子量種（すなわち抗 C T L A - 4 抗体 1 1. 2. 1 の凝集塊）の率を示す。凝集レベルは、各組成物のクロマトグラムピークの領域を積分し、かつ高分子量種ピークの積分領域を全ピーク領域率として報告することによって計算された（表 2 3 参照）。

20

【0 4 5 2】

【表 2 8】

30

表23：EDTA及びDTPA組成物処理の凝集率：

番号	処理	0週間 初期	2週間 40℃	4週間 40℃	6週間 40℃	8週間 40℃	10週間 40℃
26-B	処理せず	0.6%	0.9%	1.4%	2.2%	2.6%	3.2%
33-B	+0.01% Na ₂ EDTA・2H ₂ O	0.7%	0.8%	0.9%	0.9%	1.0%	1.2%
34-B	+0.01% DTPA	0.5%	0.7%	0.8%	0.9%	0.9%	0.9%

40

【0 4 5 3】

表 2 3 に見られるように、E D T A 及び D T P A 含有組成物の両方とも、E D T A 又は D T P A 無しの組成物と比較して低い凝集レベルを示した。

【0 4 5 4】

実施例 9 - B

E D T A 及び窒素ガスの、抗 C T L A - 4 抗体 1 1. 2. 1 の安定性に対する影響を評価するために、研究が行われた。

特に、E D T A 及び窒素ガスの抗体 1 1. 2. 1 の安定性に対する衝撃が、トレハロー

50

ス及びポリソルベート 80 を含む、ヒスチジン緩衝液処理された組成物中での、変色、凝集、酸化、断片化及び荷電種形成に関して分析された。

【0455】

評価された組成物は、下記表 23 に一覧にする。組成物を調製するために使用された方法は、後段で実施例 10-B に記載されるものと同じである。組成物は、40℃で貯蔵され、かつ安定性評価が 0、4、8、12 及び 24 週で行われた。

【0456】

この実施例に関して、84 mg/ml トレハロース、及び 0.2 mg/ml ポリソルベート 80 を有する pH 5.5 の 20 mM ヒスチジン緩衝液中の抗 CTLA-4 抗体の 20 mg/ml 溶液が、実施例 10-B のように調製された。組成物の一部は、トレハロース及びポリソルベート 80 の原液によって抗体の濃縮原液を、20 mg/ml 抗 CTLA-4 抗体での最終組成物に希釈することによって調製された。組成物の第二部分は、0.1 mg/ml の最終濃度を得るために、Na₂EDTA・2H₂O の 10 mg/ml 濃縮物を添加する追加ステップを除き、同様に調製された。次に組成物は、2 ml ガラスバイアルにつき 1 ml で分配された。次に各組成物のバイアルの半分は、凍結乾燥器内に置かれ、かつヘッドスペースは、排出後、窒素に代えられた。バイアルが窒素で充満された後、その酸素レベルを測定すると、約 1.5% から 1.6% の酸素が報告され、他方でヘッドスペース中に空気を有するバイアルでは、約 19.7% から 20% の酸素が報告された。

【0457】

数個のバイアルは、変色、凝集、断片化、酸化及び荷電種形成レベルに関して直ちに分析され、数個の他の重複したバイアルも、2、4、8、12 及び 24 週間、40℃で直立させて貯蔵された。各時点で、処理毎に 2 つの貯蔵バイアルが、組成物中の抗体 11.2 の凝集、断片化、酸化及び荷電種形成レベルを測定するために、各条件から除去され、かつ変色に関して観察された。表 24 から 28 に結果を報告する。

【0458】

【表 29】

表23：検査した抗体組成物：

番号	バイアル ヘッドスペース	緩衝液	等張化剤	界面活性剤	キレート剤
35-B	空気	ヒスチジン	トレハロース	ポリソルベート80	-
36-B	窒素	ヒスチジン	トレハロース	ポリソルベート80	-
37-B	空気	ヒスチジン	トレハロース	ポリソルベート80	EDTA
38-B	窒素	ヒスチジン	トレハロース	ポリソルベート80	EDTA

【0459】

組成物外観分析：

各組成物は、粒子形成、変色、及び濁り度変化に関して 0（初期）、4、8、12 及び 24 週間後に目視評価された。目視観察は、表 24 に報告した。

【0460】

【表 3 0】

表24：表23の組成物処理後の目視評価：

番号	処理	0週間 初期	4週間 40℃	8週間 40℃	12週間 40℃	24週間 40℃
35-B	+ヘッドスペース中に空気	透明、 粒子無し	非常に僅かに ピンク、 粒子3個未満	非常に僅かに ピンク、 粒子無し	僅かに ピンク、 粒子無し	僅かに ピンク、 粒子無し
36-B	+ヘッドスペース中に窒素	透明、 粒子無し	透明、 粒子無し	透明、 粒子無し	非常に僅かに ピンク、 粒子無し	非常に僅かに ピンク、 粒子無し
37-B	+ヘッドスペース中に空気 +EDTA	透明、 粒子無し	透明、 粒子無し	透明、 粒子3個未満	透明、 粒子無し	透明、 粒子無し
38-B	+ヘッドスペース中に窒素 +EDTA	透明、 粒子無し	透明、 粒子無し	透明、 粒子無し	透明、 粒子無し	透明、 粒子無し

10

【0 4 6 1】

20

表 2 4 の結果は、E D T A 又は窒素ガス無しの組成物が、4 0 ℃での 4 週間の貯蔵後に、バイアル中でピンク着色を発現したことを示す。表 2 4 は、窒素ガスと取り替えられるバイアルヘッドスペースの空気を有する組成物が、1 2 週までピンク変色の開始を遅延させたことも示す。E D T A を含む両方の組成物は、少なくとも 2 4 週間、目に見える変色がなかった。

【0 4 6 2】

凝集分析：

表 2 3 により調製された抗体組成物は、4 0 ℃の温度で貯蔵された。0、4、8、1 2 及び 2 4 週に、各組成物は、サイズ排除クロマトグラフィを使用して凝集に関して分析された。組成物バイアルは、各時点で無菌で試料採取された。サイズ排除クロマトグラフィは、T S K g e l G 3 0 0 0 S W X L - G 2 0 0 0 S W X L カラム、p H 7 . 0、1 m l / 分の流量での移動相 0 . 2 M リン酸ナトリウム緩衝液、及び 2 1 4 n m での紫外線検出を使用して、試料に対して行われた。表 2 5 は、各組成物処理に関して該当する時間で測定された、溶出高分子量種（すなわち抗 C T L A - 4 抗体 1 1 . 2 . 1 の凝集塊）の率を示す。凝集レベルは、各組成物のクロマトグラムピークの領域を積分し、かつ高分子量種ピークの積分領域を全ピーク領域率として報告することによって計算された（表 2 5 参照）。

30

【0 4 6 3】

【表 3 1】

表25：表23の組成物の凝集率：

組成物 番号	処理	0週間 初期	4週間 40℃	8週間 40℃	12週間 40℃	24週間 40℃
35-B	+ヘッドスペース 中に空気	0.7%	0.9%	1.3%	1.5%	3.9%
36-B	+ヘッドスペース 中に窒素	0.7%	0.6%	0.7%	1%	1.5%
37-B	+ヘッドスペース 中に空気 +EDTA	0.7%	0.6%	0.8%	0.9%	1.5%
38-B	+ヘッドスペース 中に窒素 +EDTA	0.7%	0.6%	0.6%	0.8%	1.1%

10

【0464】

表25に見られるように、EDTA含有組成物、窒素ガス組成物、及びEDTAプラス窒素ガス組成物は、EDTA無しで、ヘッドスペース中に空気を有する組成物と比較して時間が経っても低い凝集レベルを示した。

20

【0465】

断片化分析：

表23により調製された抗体組成物は、40℃の温度で貯蔵された。0、4、8、12及び24週に、各組成物は、還元SDS-PAGE（rSDS-PAGE）を使用して全加水分解不純物（すなわち断片化）に関して分析された。組成物バイアルは、各時点で無菌で試料採取され、かつコロイド状青（クーマシー）染色を有するNuPAGE4～12%ビストリスゲルへ装入された。ゲル還元は、NuPAGE（登録商標）還元剤の使用によって得られた。還元ゲル中の各試料バンドの不純物（すなわち断片化）率は、分子動力学個人濃度計PDQC-90又はBio-Rad GS800撮像濃度計で走査によって推定された。断片化レベルは、全バンド容量率として計算された（表26参照）。

30

【0466】

【表 3 2】

表26：表23の組成物の全(不純物)断片化率：

組成物 番号	処理	0週間 初期	4週間 40℃	8週間 40℃	12週間 40℃	24週間 40℃
35-B	+ヘッドスペース 中に空気	1.3%	4.1%	5.5%	8.0%	12.4%
36-B	+ヘッドスペース 中に窒素	1.2%	3.5%	4.4%	6.3%	10.6%
37-B	+ヘッドスペース 中に空気 +EDTA	1.3%	3.2%	4.4%	5.9%	10.6%
38-B	+ヘッドスペース 中に窒素 +EDTA	1.3%	3.5%	4.1%	5.6%	10.2%

10

【0467】

表26に見られるように、EDTA含有組成物、窒素ガス組成物、及びEDTAプラス窒素ガス組成物は、EDTA無しで、ヘッドスペース中に空気を有する組成物と比較して時間が経っても低い断片化レベルを示した。

20

【0468】

酸性及び塩基性種の形成

表23により調製された抗体組成物は、40℃の温度で貯蔵された。0、4、12及び24週に、各組成物は、撮像キャピラリー電気泳動(iCE)を使用して酸性及び塩基性種の形成に関して分析された。撮像キャピラリー電気泳動が、荷電不均一性評価のためにConvergent Biosciences iCE₂₈₀分析器を使用して行われた。Convergent iCE₂₈₀は、撮像キャピラリー等電点電気泳動(IEF)装置であり、使用者が、キャピラリー中に含まれる分離された試料を撮像することを可能にする。

30

【0469】

組成物バイアルは、各時点で無菌で試料採取された。次に試料は、電気泳動両性電解質、メチルセルロース、校正マーカー及び水の混合物中で調製された。試料は、iCE₂₈₀に導入され、かつ高電位/電圧が加えられた。IEF検定は、クーマシー青染色を使用する、手動で調製されたpH3~10.5ポリアクリルアミドゲルを使用して行われた。試料蛋白質成分は、それらの相対等電点(pI)及びそれらの位置に基づき、分離された。相対量の各分離成分は、撮像CCDカメラによって観察された。データは次に、従来のクロマトグラフ統合ソフトウェアを使用して処理され、かつ主なピークの損失(すなわち酸性及び塩基性種の形成)として報告された(表27参照)。

40

【0470】

【表 3 3】

表27：表23の組成物の主なピークの損失：

組成物 番号	処理	0週間 初期	4週間 40℃	8週間 40℃	12週間 40℃	24週間 40℃
35-B	+ヘッドスペース 中に空気	65.3	50.3	---	28.8	15.5
36-B	+ヘッドスペース 中に窒素	63.8	52.2	---	33.1	22.7
37-B	+ヘッドスペース 中に空気 +EDTA	62.3	55.4	---	37.0	23.4
38-B	+ヘッドスペース 中に窒素 +EDTA	63.9	56.6	---	40.0	24.8

10

【0471】

表27に見られるように、EDTA含有組成物、窒素ガス組成物、及びEDTAプラス窒素ガス組成物は、EDTA無しで、ヘッドスペース中に空気を有する組成物と比較して時間が経っても高いレベルの無傷の主なピークを示した。それ故、酸性及び塩基性種の形成量は、EDTA及び／又はヘッドスペース中の窒素を欠く組成物において、時間が経っても高い。

20

【0472】

アミノ酸酸化分析：

抗CTLA-4抗体11.2.1中のアミノ酸位置256及び432でのメチオニン残渣の酸化レベルは、40℃で12週間の貯蔵後、リシン-Cマッピング方法によって測定された。

【0473】

表23の組成物を含むバイアルは、12週の時点で無菌で試料採取された。次に試料は、標準条件、pH8.0でトリス緩衝液中のリシルエンドペプチダーゼ(Lys-C)酵素によって消化され、かつ逆相高速液体クロマトグラフィによって分析された。分離は、水中に0.1%のTFA、かつアセトニトリル勾配溶出中に0.085%のTFAで、Grace Vydac Protein C4分析カラムを使用して遂行された。

30

【0474】

【表 3 4】

表28：表23の組成物中の抗CTLA-4抗体11.2.1中のメチオニンアミノ酸の酸化率：

組成物 番号	処理	アミノ酸残渣	酸化率 0週間	酸化率 12週間
35-B	+ヘッドスペース中に空気	Met-432	1.6%	7.3%
		Met-256	5%	17.9%
36-B	+ヘッドスペース中に窒素	Met-432	1.6%	3.3%
		Met-256	5%	7.8%
37-B	+ヘッドスペース中に空気 +EDTA	Met-432	1.6%	3.9%
		Met-256	5%	9.7%
38-B	+ヘッドスペース中に窒素 +EDTA	Met-432	1.6%	2.6%
		Met-256	5%	5.9%

10

【0475】

表28の結果は、11.2.1抗体組成物へのEDTAの添加、及び／又はバイアルヘッドスペースへの窒素の添加が、EDTA無しで、ヘッドスペース中に空気を有する組成物と比較して、2種の示されたメチオニン残渣での酸化率を減少させたことを示す。

20

【0476】

実施例10-B

酢酸ナトリウム緩衝液及び塩化ナトリウム（すなわち塩化物イオン）を含む抗CTLA-4抗体11.2.1組成物、対ヒスチジン緩衝液及びトレハロースを含む組成物の安定性に対する影響を比較するために、研究が行われた。

特に、抗体11.2.1の安定性に対する衝撃が、変色、凝集、及び断片化に関して分析された。

【0477】

評価された組成物は、下記表29に一覧にする。組成物を調製するために使用された方法は、実施例3-Bに記載されたものと同じである。

30

【0478】

表29の組成物は、20mM酢酸ナトリウム緩衝液pH5.5中の抗体11.2.1の11.9mg/ml原液、140mM塩化ナトリウムを選び、かつPellicon XL PBTk 30K 50cm²膜により、Millipore Lab Scale TFF Systemにおいて限外濾過／ダイアフィルトレーション（UF/DF）ステップを受けさせることによって調製された。次に、抗体11.2.1の濃縮溶液は、20mM酢酸ナトリウム又は20mMヒスチジン緩衝液中で35から40mg/mlの範囲で調製された。

【0479】

等張化剤の濃縮物は、標的最終濃度の3倍で、酢酸ナトリウム又はヒスチジン緩衝液中で調製された。ポリソルベート80の濃縮溶液が、20mg/mlで、かつNa₂EDTA・2H₂Oが、10mg/mlで、各緩衝液中で調製された。個別の組成物は、濃縮溶液を適切に希釈することによって調製された。次に組成物は、0.2μ減菌グレードフィルタを通して濾過され、かつ数個の重複したバイアルに充填された。1mlの充填容量が、2mlタイプ1ガラスバイアル中で使用された。バイアルは、Daikyo 777-1 Fluotec（登録商標）コーティングされた栓によって閉鎖され、クrimpシールされ、かつ25℃及び40℃で安定チャンバ内に直立させて貯蔵された。もう一組のバイアルも、4週間、-20℃に置かれ、かつもう一組は、実施例4-Bに記載したように、4×凍結／解凍サイクル（水を充填したバイアルボックス）を受けた。全ての組成物

40

50

は、5.5のpHを有し、かつ抗CTLA-4抗体11.2.1は、20mg/mlの濃度を有した。

【0480】

数個のバイアルは、変色、凝集、及び断片化レベルに関して直ちに分析され、かつ数個の他の重複したバイアルも、4、8、12、18、24及び36週間、25℃及び40℃で直立させて貯蔵された。各時点で、組成物毎に2つの貯蔵バイアルが、抗体11.2.1の凝集、断片化レベルを測定するために、各条件から除去され、かつ変色に対しても観察された。表30から34、並びに図15及び16に結果を報告する。

【0481】

【表 3 5】

表29：検査した抗体組成物：

番号	酢酸塩 (mM)	ヒスチジン (mM)	ツイーン80 (mg/ml)	塩化 ナトリウム (mg/ml)	マンニトール (mg/ml)	トレハロース (mg/ml)	グリシン (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	PEG 3350 (mg/ml)	メチオニン (mg/ml)
26-B	20	—	0.2	8.2	—	—	—	—	—	—
39-B	20	—	0.2	5.0	18	—	—	0.1	—	—
40-B	-	20	0.2	—	—	84	—	—	—	—
37-B	-	20	0.2	—	—	84	—	0.1	—	—
41-B	-	20	0.2	—	—	84	—	0.1	—	2
42-B	-	20	0.4	—	—	84	—	0.1	—	—
43-B	-	20	0.2	—	41	10	—	—	—	—
44-B	-	20	0.2	—	41	10	—	0.1	—	—

【0482】

組成物外観分析：

各組成物は、1) 組成物を最初に混合した後、2) 4週間、-20℃で組成物を凍結させた後、及び3) (実施例4-Bに記載されたような水を充填したバイアルと共に、ボッ

10

20

30

40

50

クス内で -70°C から 5°C の) 4回の凍結／解凍サイクル後に目視評価された。各組成物は、粒子形成、変色、及び濁り度変化に関して0 (初期)、8、12及び24週間後、目視評価された。組成物は、粒子形成、変色、及び濁り度変化に関して評価され、かつ表30 (凍結／解凍)、表31 (25°C での貯蔵) 及び表32 (40°C での貯蔵) に報告された。

【0483】

【表36】

表30：凍結／解凍後の表29の組成物の目視評価：

番号	初期	4週間、 -20°C での 凍結後	4回の 凍結／解凍サイクル後
26-B	透明、無色 粒子無し	非常に僅かに曇る 3個を超える粒子	非常に僅かに曇る 多数の粒子
39-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子
40-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子
37-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子
41-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子
42-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子
43-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子
44-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 粒子無し

10

20

30

【0484】

【表 3 7】

表31：25℃での貯蔵後の表29の組成物の目視評価：

番号	初期	8週間 25℃	12週間 25℃	24週間 25℃
26-B	透明、無色 粒子無し	非常に僅かに曇る 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子
39-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	---
40-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
37-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
41-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
42-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
43-B	透明、無色 粒子無し	---	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
44-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	非常に僅かに曇る 粒子無し

10

20

【 0 4 8 5 】

【表 3 8】

表32：40℃での貯蔵後の表29の組成物の目視評価：

番号	初期	8週間 40℃	12週間 40℃	24週間 40℃
26-B	透明、無色 粒子無し	非常に僅かに曇る 粒子無し	透明、無色 粒子無し	僅かにピンク 粒子無し
39-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	---
40-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	僅かにピンク 粒子無し
37-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
41-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
42-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
43-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	僅かにピンク 粒子無し
44-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し

30

40

50

【0486】

表20から22の結果は、EDTAを含む抗体11.2.1組成物が、EDTAを含まない組成物と比較して、変色減少、濁り度減少、かつ粒子形成減少があることを示す。全体として、塩化ナトリウムを含む組成物は、EDTAを有するが、塩化ナトリウム無しの組成物と比較して、変色、濁り度及び粒子形成を増加させた。

【0487】

凝集分析：

表29により調製された抗体組成物は、25℃及び40℃の温度で貯蔵された。0（初期）、4、8、12、24及び36週に、25℃の組成物は、サイズ排除クロマトグラフィを使用して凝集に関して分析された。4、8、12及び24週に、40℃の組成物は、サイズ排除クロマトグラフィを使用して凝集に関して分析された。組成物バイアルは、各時点で無菌で試料採取された。サイズ排除クロマトグラフィは、TSK gel G3000SWXL-G2000SWXLカラム、pH7.0、1ml／分の流量での移動相0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液、及び214nmでの紫外線検出を使用して、試料に対して行われた。表33（a）及び33（b）は、各組成物処理に関して該当する時間で測定された、抗体11.2.1の凝集率を示す。凝集レベルは、各組成物のクロマトグラムピークの領域を積分し、かつ高分子量種ピークの積分領域を全ピーク領域率として報告することによって計算された（表33（a）及び33（b）参照）。

10

【0488】

【表39】

20

表33(a)：25℃での貯蔵後の表29の組成物の凝集率：

番号	初期	4週間 25℃	8週間 25℃	12週間 25℃	18週間 25℃	24週間 25℃	36週間 25℃
26-B	0.7%	0.9%	0.9%	1.1%	1.8%	1.8%	3.0%
39-B	0.7%	0.8%	0.8%	1.1%	---	---	---
40-B	0.6%	0.6%	0.7%	0.9%	0.95%	0.8%	0.9%
37-B	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%	0.7%	0.8%
41-B	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%	0.7%	0.7%
42-B	0.6%	0.6%	0.6%	0.8%	0.8%	0.8%	0.8%
43-B	0.6%	0.6%	---	---	0.7%	0.8%	0.9%
44-B	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%	0.8%	0.8%

30

【0489】

下記表33（b）に、図15にグラフによって表した凝集データを報告する。

【0490】

【表 4 0】

表33 (b) : 40℃での貯蔵後の表29の組成物の凝集率 :

番号	初期	4週間 40℃	8週間 40℃	12週間 40℃	24週間 40℃
26-B	0.7%	1.0%	1.3%	2.8%	4.7%
39-B	0.6%	1.0%	1.0%	1.4%	---
40-B	0.6%	0.7%	0.9%	1.0%	1.4%
37-B	0.6%	0.6%	0.6%	0.8%	1.1%
41-B	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.8%
42-B	0.6%	0.6%	0.6%	0.8%	1.1%
43-B	0.6%	0.8%	---	---	1.7%
44-B	0.6%	0.6%	0.6%	0.8%	0.9%

10

【0491】

表33 (a)、33 (b) 及び図15に見られるように、EDTA含有組成物は、25℃及び40℃での貯蔵後に、EDTAを欠くが、酢酸塩緩衝液及び塩化ナトリウムを有する組成物と比較して減少した凝集レベルを示した。その上、(EDTA無しで)ヒスチジン緩衝液を含む組成物は、EDTAを欠くが、酢酸塩緩衝液及び塩化ナトリウムを含む組成物と比較して減少した凝集量を有した。

20

【0492】

断片化分析 :

表29により調製された抗体組成物は、25℃及び40℃の温度で貯蔵された。0 (初期)、4、8、12、18及び36週に、各組成物は、還元SDS-PAGE (rSDS-PAGE) を使用して全加水分解不純物 (すなわち断片化) に関して分析された。組成物バイアルは、各時点で無菌で試料採取され、かつコロイド状青 (クーマシー) 染色を有するNuPAGE 4~12%ビスートリスゲルへ装入された。ゲル還元は、NuPAGE (登録商標) 還元剤の使用によって得られた。還元ゲル中の各試料バンドの不純物 (すなわち断片化) 率は、分子動力学個人濃度計PDQC-90又はBio-Rad GS800撮像濃度計で走査によって推定された。断片化レベルは、全バンド容量率として計算された (表34 (a) 及び34 (b) 参照)。

30

【0493】

【表 4 1】

表34 (a) : 25℃での貯蔵後の表29の組成物の断片化率 :

番号	初期	4週間 25℃	8週間 25℃	12週間 25℃	18週間 25℃	24週間 25℃	36週間 25℃
26-B	1.8%	1.6%	2.6%	2.4%	1.3%	3.5%	3.7%
39-B	1.6%	1.4%	2.4%	1.5%	---	---	---
40-B	1.6%	1.7%	2.6%	1.4%	1.4%	3.3%	3.2%
37-B	1.6%	1.6%	2.5%	1.4%	1.4%	3.3%	3.1%
41-B	1.6%	1.6%	2.6%	1.4%	1.2%	3.3%	2.9%
42-B	1.9%	1.8%	2.5%	1.6%	1.2%	3.0%	2.9%
43-B	1.8%	1.8%	---	---	1.2%	3.2%	3.1%
44-B	1.7%	1.7%	2.6%	1.4%	1.3%	3.1%	2.8%

10

【0 4 9 4】

下記表 3 4 (b) に、図 1 6 にグラフによって表した断片化データを報告する。

【0 4 9 5】

20

【表 4 2】

表34 (b) : 40℃での貯蔵後の表29の組成物の断片化率 :

番号	初期	4週間 40℃	8週間 40℃	12週間 40℃	24週間 40℃
26-B	1.8%	5.2%	6.1%	7.8%	11.7%
39-B	1.6%	5.3%	6.7%	6.5%	---
40-B	1.6%	5.3%	6.8%	6.2%	10.0%
37-B	1.6%	5.2%	6.6%	5.5%	10.2%
41-B	1.6%	5.2%	5.0%	5.5%	10.0%
42-B	1.9%	5.3%	5.1%	5.8%	9.7%
43-B	1.8%	5.3%	---	---	11.0%
44-B	1.7%	4.5%	5.2%	5.5%	9.5%

30

【0 4 9 6】

表 3 4 (a)、3 4 (b) 及び図 1 6 に見られるように、E D T A 含有組成物は、2 5℃及び4 0℃での貯蔵後に、E D T A を欠くが、酢酸塩緩衝液及び塩化ナトリウムを有する組成物と比較して減少した断片化レベルを示した。

40

【0 4 9 7】

実施例 1 1 - B

抗 C T L A - 4 抗体 1 1 . 2 . 1 組成物の安定性に対する様々な濃度の E D T A の影響を比較するために、研究が行われた。トレハロースの一部をマンニトールに置き換えることによって、ヒスチジン緩衝液-トレハロース組成物に代わるものの試験が、同様に行われた。

【0 4 9 8】

特に、抗体 1 1 . 2 . 1 の安定性に対する衝撃が、変色、凝集、断片化、及び酸化に関して分析された。

50

【0499】

評価された組成物は、下記表35に一覧にする。組成物を調製するために使用された方法は、実施例10-Bに記載されたものと同じである。

【0500】

表35の組成物は、20mM酢酸ナトリウム緩衝液pH5.5中の抗体11.2.1の11.9mg/ml原液、140mM塩化ナトリウムを選び、かつPellicon XL PBTk 30K 50cm²膜により、Millipore Lab Scale TFF Systemにおいて限外濾過／ダイアフィルトレーション(UF/DF)ステップを受けさせることによって調製された。次に、抗体11.2.1の濃縮溶液は、20mM酢酸ナトリウム又は20mMヒスチジン緩衝液中で35から40mg/mlの範囲で調製された。 10

【0501】

等張化剤の濃縮物は、標的最終濃度の3倍で、酢酸ナトリウム又はヒスチジン緩衝液中で調製された。ポリソルベート80の濃縮溶液が、20mg/mlで、かつNa₂EDTA・2H₂Oが、10mg/mlで、各緩衝液中で調製された。個別の組成物は、濃縮溶液を適切に希釈することによって調製された。(Na₂EDTA・2H₂Oのような)EDTA濃度は、0~0.1mg/mlの範囲で検査された。次に組成物は、0.2μ滅菌グレードフィルタを通して濾過され、かつ数個の重複したバイアルに充填された。1mlの充填容量が、2mlタイプ1ガラスバイアル中で使用された。

【0502】

バイアルは、Daikyo 777-1 Flurotec (登録商標)コーティングされた栓によって閉鎖され、クrimpシールされ、かつ25℃及び40℃で安定チャンバ内に直立させて貯蔵された。もう一組のバイアルは、実施例10-Bに記載したように、4×凍結／解凍サイクルを受けた。全ての組成物は、5.5のpHを有し、かつ抗CTLA-4抗体11.2.1は、20mg/mlの濃度を有した。 20

【0503】

数個のバイアルは、変色、凝集、断片化、及び酸化レベルに関して直ちに分析され、かつ数個の他の重複したバイアルも、4、8、13、18及び24週間、25℃及び40℃で直立させて貯蔵された。各時点で、各条件からの組成物毎に2つの貯蔵バイアルが、抗体11.2.1の凝集、断片化レベルを測定するために、除去され、かつ変色に関しても 30
観察された。表36から41、及び図17から22に結果を報告する。

【0504】

【表 4 3】

表35：検査した抗体組成物：

番号	酢酸塩 (mM)	ヒスチジン (mM)	ツイーン80 (mg/ml)	マンニトール (mg/ml)	トレハロース (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	塩化ナトリウム (mg/ml)
26-B	20	---	0.2	---	---	---	8.4
40-B	---	20	0.2	---	84	---	---
45-B	---	20	0.2	---	84	0.001	---
46-B	---	20	0.2	---	84	0.005	---
47-B	---	20	0.2	---	84	0.01	---
48-B	---	20	0.2	---	84	0.05	---
37-B	---	20	0.2	---	84	0.1	---
49-B	---	20	0.2	10	70	0.001	---
50-B	---	20	0.4	10	70	0.01	---
51-B	---	20	0.2	10	70	0.1	---
52-B	---	20	0.2	20	50	0.001	---
53-B	---	20	0.2	20	50	0.01	---
54-B	---	20	0.2	20	50	0.1	---

10

20

【0505】

組成物外観分析：

各組成物は、1) 組成物を最初に混合した後、2) 4回の凍結／解凍サイクル後、及び3) 4、8、13、18及び24週間、25℃及び40℃での貯蔵後に目視評価された。組成物は、粒子形成、変色、及び濁り度変化に関して評価され、かつ表36から38に報告された。

【0506】

30

【表 4 4】

表36：凍結/解凍後の表35の組成物の目視評価：

組成物番号	初期	4回の凍結/解凍サイクル後
26-B	透明、無色、粒子無し	非常に僅かに曇る、粒子無し
40-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子
45-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子
46-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子
47-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子
48-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個を超える粒子
37-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、粒子無し
49-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個を超える粒子
50-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子
51-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子
52-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、粒子無し
53-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子
54-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子

10

20

【0 5 0 7】

【表 4 5】

表37：25℃での貯蔵後の表35の組成物の目視評価：

番号	初期	13週間 25℃	18週間 25℃	24週間 25℃
26-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	非常に僅かに ピンク、粒子無し	
40-B	透明、無色 粒子無し	非常に僅かに ピンク、粒子無し	---	透明、Y6 [*] 、 粒子無し
45-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
46-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	---	透明、無色 粒子無し
47-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
48-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	---	透明、無色 粒子無し
37-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
49-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	---	透明、無色 粒子無し
50-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	---	透明、無色 粒子無し
51-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	---	透明、無色 粒子無し
52-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	---	透明、無色 粒子無し
53-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	---	透明、無色 粒子無し
54-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	---	透明、無色 粒子無し

* Y6及びY4は、EPイエロースケールでのカラースケール表記法である。Y6は、Y4よりも淡い黄色である。(参照：PhEur 5.0, 2005 Monograph 2.2.2)。

10

20

30

【表 4 6】

表38：40℃での貯蔵後の表35の組成物の目視評価：

番号	初期	8週間 40℃	13週間 40℃	18週間 40℃	24週間 40℃
26-B	透明、無色 粒子無し	非常に僅かに ピンク 粒子無し	非常に僅かに ピンク 粒子無し	ピンク 粒子無し	ピンク 粒子無し
40-B	透明、無色 粒子無し	非常に僅かに ピンク 粒子無し	非常に僅かに ピンク 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、Y4 ⁺ 、 粒子無し
45-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
46-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	---	透明、無色 粒子無し
47-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
48-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	---	透明、無色 粒子無し
37-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
49-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 粒子無し	---	透明、無色 粒子無し
50-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 3個未満の粒子	---	透明、無色 粒子無し
51-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	---	透明、無色 粒子無し
52-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	---	透明、無色 粒子無し
53-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	---	透明、無色 粒子無し
54-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	---	透明、無色 粒子無し

* Y6及びY4は、EPイエロースケールでのカラスケール表記法である。Y6は、Y4よりも淡い黄色である。(参照：PhEur 5.0, 2005 Monograph 2.2.2)。

【0509】

表36から38の結果は、全ての試験を受けたEDTA濃度を含む抗体11.2.1組成物が、EDTAを含まない組成物と比較して、変色減少、濁り度減少、かつ粒子形成減少があることを示す。

【0510】

全体として、塩化ナトリウムを含む組成物は、EDTAを有するが、塩化ナトリウム無しの組成物と比較して、変色、濁り度及び粒子形成増加によって立証されるように、凍結／解凍保護を縮小した。

【0511】

凝集分析：

表35により調製された抗体組成物は、25℃及び40℃の温度で貯蔵された。0（初期）、4、8、13、18及び24週に、25℃及び40℃の組成物は、サイズ排除クロ

10

20

30

40

50

マトグラフィを使用して凝集に関して分析された。組成物バイアルは、各時点で無菌で試料採取された。サイズ排除クロマトグラフィは、TSK gel G3000SWXLーG2000SWXLカラム、pH7.0、1ml／分の流量での移動相0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液、及び214nmでの紫外線検出を使用して、試料に対して行われた。表39(a)は、各組成物処理に関して該当する時間で、25℃での貯蔵後に測定された、抗体11.2.1の凝集率を示す。表39(b)は、40℃での貯蔵後に測定された、抗体11.2.1の凝集率を示す。凝集レベルは、各組成物のクロマトグラムピークの領域を積分し、かつ高分子量種ピークの積分領域を全ピーク領域率として報告することによって計算された(表39(a)及び39(b)参照)。

【0512】

10

【表47】

表39(a) : 25℃での貯蔵後の表25の組成物の凝集率 :

番号	初期	4週間 25℃	8週間 25℃	13週間 25℃	18週間 25℃	24週間 25℃
26-B	0.8%	---	---	1.1%	1.6%	---
40-B	0.7%	---	---	0.7%	0.8%	0.8%
45-B	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%
46-B	0.7%	---	---	0.6%	0.7%	0.7%
47-B	0.7%	0.7%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%
48-B	0.7%			0.6%	0.7%	0.7%
37-B	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%
49-B	0.7%	---	---	0.6%	---	---
50-B	0.7%	---	---	0.6%	---	---
51-B	0.7%	---	---	0.6%	---	0.7%
52-B	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	---	---
53-B	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	---	0.7%
54-B	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	---	---

20

30

【0513】

下記表39(b)に、図17にグラフによって表した凝集データを報告する。

【0514】

【表 4 8】

表39 (b) : 40℃での貯蔵後の表25の組成物の凝集率 :

番号	初期	4週間 40℃	8週間 40℃	13週間 40℃	18週間 40℃	24週間 40℃
26-B	0.8%	---	3.1%	4.3%	5.2%	---
40-B	0.7%	---	0.9%	1.2%	1.8%	2.7%
45-B	0.7%	0.6%	0.8%	0.8%	1.0%	1.4%
46-B	0.7%	---	0.7%	0.8%	1.0%	1.3%
47-B	0.7%	0.6%	0.7%	0.8%	0.8%	1.1%
48-B	0.7%		0.7%	0.8%	0.9%	1.3%
37-B	0.7%	0.7%	0.7%	0.8%	1.0%	1.1%
49-B	0.7%	---	0.8%	0.8%	---	---
50-B	0.7%	---	0.7%	0.8%	---	---
51-B	0.7%	---	0.8%	0.8%	---	1.2%
52-B	0.7%	0.6%	0.7%	0.8%	---	---
53-B	0.7%	0.7%	0.7%	0.7%	---	1.2%
54-B	0.7%	0.6%	0.8%	0.7%	---	---

10

20

【0515】

表39 (a)、39 (b) 及び図17に見られるように、EDTA含有組成物は、25℃及び40℃での貯蔵後に、EDTAを欠くが、酢酸塩緩衝液及び塩化ナトリウムを有する組成物と比較して、全ての試験を受けたEDTA濃度で減少した凝集レベルを示した。図17に、EDTA濃度に応じた表35の組成物に関する凝集率減少をグラフによって要約した。

【0516】

断片化分析 :

表35により調製された抗体組成物は、25℃及び40℃の温度で貯蔵された。0 (初期)、4、8、13、18及び24週に、25℃及び40℃の組成物は、還元SDS-PAGE (rSDS-PAGE) を使用して全加水分解不純物 (すなわち断片化) に関して分析された。組成物バイアルは、各時点で無菌で試料採取され、かつコロイド状青 (クーマシー) 染色を有するNuPAGE 4~12%ビスートリスゲルへ装入された。ゲル還元は、NuPAGE (登録商標) 還元剤の使用によって得られた。還元ゲル中の各試料バンドの不純物 (すなわち断片化) 率は、分子動力学個人濃度計PDQC-90又はBio-Rad GS800撮像濃度計で走査によって推定された。断片化レベルは、全バンド容量率として計算された (表40 (a) 及び40 (b) 参照)。

30

【0517】

40

【表 4 9】

表40 (a) : 25℃での貯蔵後の表35の組成物の断片化率 :

番号	初期	4週間 25℃	8週間 25℃	13週間 25℃	18週間 25℃	24週間 25℃
26-B	1.3%	---	---	3.3%	3.7%	---
40-B	1.1%	---	---	2.6%	3.1%	3.1%
45-B	1.5%	2.7%	2.3%	3.1%	3.0%	3.4%
46-B	1.0%	---	---	2.5%	3.1%	2.9%
47-B	2.5%	2.5%	2.3%	3.1%	3.0%	3.3%
48-B	3.1%	---	---	2.5%	3.2%	2.9%
37-B	3.6%	2.6%	2.3%	3.1%	3.0%	3.3%
49-B	1.0%	---	---	2.6%	---	---
50-B	1.1%	---	---	2.7%	---	---
51-B	1.2%	---	---	2.7%	---	2.9%
52-B	2.4%	2.7%	2.3%	3.1%	---	---
53-B	1.6%	2.4%	2.3%	2.9%	---	3.4%
54-B	1.6%	2.7%	2.2%	3.2%	---	---

10

20

【0518】

下記表40 (b) に、図18にグラフによって表した断片化データを報告する。

【0519】

【表50】

表40 (b) : 40℃での貯蔵後の表35の組成物の断片化率 :

番号	初期	4週間 40℃	8週間 40℃	13週間 40℃	18週間 40℃	24週間 40℃
26-B	---	---	6.2%	7.3%	8.7%	10.1%
40-B	---	---	3.9%	6.9%	8.2%	7.2%
45-B	---	2.9%	4.3%	4.2%	6.7%	6.7%
46-B	---	---	4.1%	5.6%	7.1%	6.1%
47-B	---	1.9%	2.8%	3.4%	5.4%	5.6%
48-B	---	---	2.0%	4.2%	5.0%	4.0%
37-B	---	0.7%	1.5%	2.2%	5.0%	4.5%
49-B	---	---	4.1%	5.8%	---	---
50-B	---	---	3.7%	5.5%	---	---
51-B	---	---	3.7%	5.5%	---	5.4%
52-B	---	1.8%	2.4%	3.1%	---	---
53-B	---	2.4%	3.3%	4.1%	---	6.6%
54-B	---	2.3%	3.1%	3.8%	---	---

30

40

【0520】

表40 (a)、40 (b) 及び図18に見られるように、EDTA含有組成物は、25℃及び40℃での貯蔵後に、EDTAを欠くが、酢酸塩緩衝液及び塩化ナトリウムを有す

50

る組成物と比較して減少した断片化レベルを示した。その上、E D T A無しでヒスチジン及びトレハロースを含む組成物は、E D T A無しで塩化ナトリウムを含む組成物に対して減少した断片化を示した。

【0521】

図20に、E D T A濃度に応じた表35の組成物に関する断片化率減少をグラフによって要約した。

【0522】

アミノ酸酸化分析：

抗C T L A-4抗体11.2.1中のアミノ酸位置256及び432での数種のメチオニン残渣の酸化レベルは、リシン-Cマッピング方法によって測定された。表35の組成物を含むバイアルは、40℃での貯蔵後、18週及び24週の時点で無菌で試料採取された。次に試料は、標準条件、pH8.0でトリス緩衝液中のリシルエンドペプチダーゼ（L y s - C）酵素によって消化され、かつ逆相高速液体クロマトグラフィによって分析された。分離は、水中に0.1%のT F A、かつアセトニトリル勾配溶出中に0.085%のT F Aで、G r a c e V y d a c P r o t e i n C 4分析カラムを使用して遂行された。表41に結果を報告する。

【0523】

【表51】

表41：表35の組成物中の抗CTLA-4抗体11.2.1中のメチオニンアミノ酸の酸化率：

番号	アミノ酸残渣	初期	18週間	24週間
26-B	Met 432	1.6%	5.5%	6.9%
	Met 256	5%	12.8%	13.6%
40-B	Met 432	1.6%	5.6%	8.8%
	Met 256	5%	14.0%	16.1%
45-B	Met 432	1.6%	4.8%	6.2%
	Met 256	5%	11.6%	12.8%
46-B	Met 432	1.6%	3.5%	6.1%
	Met 256	5%	8.8%	12.5%
47-B	Met 432	1.6%	3.4%	4.2%
	Met 256	5%	8.4%	8.3%
48-B	Met 432	1.6%	2.8%	5.7%
	Met 256	5%	7.6%	12.6%
37-B	Met 432	1.6%	4.5%	4.7%
	Met 256	5%	11.0%	9.4%

【0524】

表41に見られるように、抗体11.2.1組成物中のE D T Aの存在は、時間が経つにつれ発生するメチオニン酸化レベルを減少させる。

【0525】

実施例12-B

抗C T L A-4抗体11.2.1組成物の安定性に対するマンニトール及びソルビトールの影響を比較するために、研究が行われた。この実施例において、トレハロースの一部を様々な濃度のマンニトール及び／又はソルビトールに置き換えることによって、ヒスチジントレハロース組成物に代わるものの試験が、行われた（表32）。（N a₂E D T A・2H₂Oのような）E D T A濃度は、0から0.1mg/mlの範囲で検査された。

【0526】

特に、抗体11.2.1の安定性に対する衝撃が、変色、凝集、断片化、及び酸化に関して分析された。

【0527】

評価された組成物は、下記表42に一覧にする。組成物を調製するために使用された方法は、実施例10-Bに記載されたものと同じである。

【0528】

表42の組成物は、20mM酢酸ナトリウム緩衝液pH5.5中の抗体11.2.1の11.9mg/ml原液、140mM塩化ナトリウムを選び、かつPellicon XL PBTk 30K 50cm²膜により、Millipore Lab Scale TFF Systemにおいて限外濾過/ダイアフィルトレーション(UF/DF)ステップを受けさせることによって調製された。次に、抗体11.2.1の濃縮溶液は、20mM酢酸ナトリウム又は20mMヒスチジン緩衝液中で35から40mg/mlの範囲で調製された。

【0529】

等張化剤の濃縮物は、標的最終濃度の3倍で、酢酸ナトリウム又はヒスチジン緩衝液中で調製された。ポリソルベート80の濃縮溶液が、20mg/mlで、かつNa₂EDTA・2H₂Oが、10mg/mlで、各緩衝液中で調製された。個別の組成物は、濃縮溶液を適切に希釈することによって調製された。次に組成物は、0.2μ減菌グレードフィルタを通して濾過され、かつ数個の重複したバイアルに充填された。1mlの充填容量が、2mlタイプ1ガラスバイアル中で使用された。

【0530】

バイアルは、Daikyo 777-1 Flurotec（登録商標）コーティングされた栓によって閉鎖され、クリンプシールされ、かつ25℃及び40℃で安定チャンバ内に直立させて貯蔵された。もう一組のバイアルは、実施例10-Bに記載したように、4×凍結/解凍サイクルを受けた。全ての組成物は、5.5のpHを有し、かつ抗CTL A-4抗体11.2.1は、20mg/mlの濃度を有した。

【0531】

数個のバイアルは、変色、凝集、断片化、及び酸化レベルに関して直ちに分析され、かつ数個の他の重複したバイアルも、4、8、13、18及び24週間、25℃及び40℃で直立させて貯蔵された。各時点で、組成物毎に2つの貯蔵バイアルが、抗体11.2.1の凝集、断片化レベルを測定するために、各条件から除去され、かつ変色に対しても観察された。表43から47、並びに図21及び22に結果を報告する。

【0532】

【表 5 2】

表42：検査した抗体組成物：

番号	酢酸塩 (mM)	ヒスチジン (mM)	PS80 (mg/ml)	マンニトール (mg/ml)	ソルビトール (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	塩化ナトリウム (mg/ml)
26-B	20	---	0.2	---	---	---	8.4
55-B	---	20	0.2	---	45	0.001	---
56-B	---	20	0.2	---	45	0.01	---
57-B	---	20	0.2	---	45	0.1	---
58-B	---	20	0.2	5	40	0.001	---
59-B	---	20	0.2	5	40	0.01	---
60-B	---	20	0.2	5	40	0.1	---
61-B	---	20	0.2	15	30	0.001	---
62-B	---	20	0.2	15	30	0.01	---
63-B	---	20	0.2	15	30	0.1	---

10

【0533】

20

組成物外観分析：

各組成物は、1) 組成物を最初に混合した後、2) (実施例4のボックス内で水を充填したバイアルと共に、-70℃から5℃の) 4回の凍結／解凍サイクル後、及び3) 8、13及び24週間、25℃及び40℃での貯蔵後に目視評価された。組成物は、粒子形成、変色、及び濁り度変化に関して評価され、かつ表43から45に報告された。

【0534】

【表 5 3】

表43：凍結/解凍後の表42の組成物の目視評価：

番号	初期	4X凍結/解凍サイクル後
26-B	透明、無色、粒子無し	非常に僅かに曇る、粒子無し
55-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子
56-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子
57-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、粒子無し
58-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子
59-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子
60-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、3個未満の粒子
61-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、粒子無し
62-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、粒子無し
63-B	透明、無色、粒子無し	透明、無色、粒子無し

30

40

【0535】

【表 5 4】

表44：25℃での貯蔵後の表42の組成物の目視評価：

番号	初期	13週間 25℃	24週間 25℃
26-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	---
55-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 粒子無し
56-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 粒子無し
57-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 粒子無し
58-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
59-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
60-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
61-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
62-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
63-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し

10

20

【 0 5 3 6 】

30

【表 5 5】

表45：40℃での貯蔵後の表42の組成物の目視評価：

番号	初期	8週間 40℃	13週間 40℃	24週間 40℃
26-B	透明、無色 粒子無し	非常に僅かに ピンク、粒子無し	非常に僅かに ピンク、粒子無し	ピンク 粒子無し
55-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
56-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
57-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 粒子無し
58-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 粒子無し
59-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
60-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
61-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 粒子無し
62-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 3個未満の粒子	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し
63-B	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し	透明、無色 粒子無し

10

20

【0537】

表43から45の結果は、塩化ナトリウムを含むがEDTA無しの抗体11.2.1組成物が、EDTAを有するが、塩化ナトリウム無しの組成物と比較して、変色、濁り度及び粒子形成増加によって立証されるように、縮小した凍結／解凍保護を有したことを示す。結果は、全ての試験を受けたEDTA濃度を含む抗体11.2.1組成物が、EDTAを含まない組成物と比較して、変色減少、濁り度減少、かつ粒子形成減少があることも示す。

30

【0538】

凝集分析：

表42により調製された抗体組成物は、25℃及び40℃の温度で貯蔵された。0（初期）、4、8、13、18及び24週に、25℃及び40℃の組成物は、サイズ排除クロマトグラフィを使用して凝集に関して分析された。組成物バイアルは、各時点で無菌で試料採取された。サイズ排除クロマトグラフィは、TSK gel G3000SWXL-G2000SWXLカラム、pH7.0、1ml／分の流量での移動相0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液、及び214nmでの紫外線検出を使用して、試料に対して行われた。表46（a）は、各組成物処理に関して該当する時間で、25℃での貯蔵後に測定された、抗体11.2.1の凝集率を示す。表46（b）は、40℃での貯蔵後に測定された、抗体11.2.1の凝集率を示す。凝集レベルは、各組成物のクロマトグラムピークの領域を積分し、かつ高分子量種ピークの積分領域を全ピーク領域率として報告することによって計算された（表46（a）及び46（b）参照）。

40

【0539】

50

【表 5 6】

表46 (a) : 25℃での貯蔵後の表42の組成物の凝集率 :

番号	初期	4週間 25℃	8週間 25℃	13週間 25℃	18週間 25℃	24週間 25℃
26-B	0.8%	---	---	1.1%	1.6%	---
55-B	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	---	---
56-B	0.7%	0.6%	0.7%	0.6%	---	---
57-B	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	---	0.7%
58-B	0.7%	---	---	0.6%	---	---
59-B	0.7%	---	---	0.6%	---	---
60-B	0.7%	---	---	0.6%	---	---
61-B	0.7%	0.7%	0.6%	0.6%	---	---
62-B	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	---	---
63-B	0.7%	0.6%	0.8%	0.6%	---	---

10

【0 5 4 0】

20

下記表 4 6 (b) に、図 2 1 にグラフによって表した凝集データを報告する。

【0 5 4 1】

【表 5 7】

表46 (b) : 40℃での貯蔵後の表42の組成物の凝集率 :

番号	初期	4週間 40℃	8週間 40℃	13週間 40℃	18週間 40℃	24週間 40℃
26-B	0.8%	3.1%	4.3%	5.2%	6.4%	---
55-B	0.6%	0.7%	0.8%	0.8%	---	---
56-B	0.6%	0.7%	0.8%	0.7%	---	---
57-B	0.7%	0.7%	0.8%	0.8%	---	1.2%
58-B	0.7%	---	0.8%	0.8%	---	---
59-B	0.7%	---	0.8%	0.8%	---	---
60-B	0.6%	---	0.7%	0.8%	---	---
61-B	0.7%	0.7%	0.7%	0.8%	---	---
62-B	0.6%	0.7%	0.8%	0.8%	---	---
63-B	0.7%	0.7%	0.7%	0.8%	---	---

30

40

【0 5 4 2】

表 4 6 (a)、4 6 (b) 及び図 2 1 に見られるように、E D T A 含有組成物は、2 5℃及び4 0℃での貯蔵後に、E D T A を欠くが、酢酸塩緩衝液及び塩化ナトリウム等張化剤を有する組成物と比較して、全ての試験を受けた E D T A 濃度で減少した凝集レベルを示した。図 2 1 に、表 4 2 の組成物に関する凝集率減少をグラフによって要約した。

【0 5 4 3】

断片化分析 :

表 4 2 により調製された抗体組成物は、2 5℃及び4 0℃の温度で貯蔵された。0 (初期)、4、8、13、18 及び 24 週に、2 5℃及び4 0℃の組成物は、還元 S D S - P

50

AGE (rSDS-PAGE) を使用して全加水分解不純物 (すなわち断片化) に関して分析された。組成物バイアルは、各時点で無菌で試料採取され、かつコロイド状青 (クーマシー) 染色を有する NuPAGE 4~12% ビスートリスゲルへ装入された。ゲル還元は、NuPAGE (登録商標) 還元剤の使用によって得られた。還元ゲル中の各試料バンドの不純物 (すなわち断片化) 率は、分子動力学個人濃度計 PDQC-90 又は Bio-Rad GS800 撮像濃度計で走査によって推定された。断片化レベルは、全バンド容量率として計算された (表 47 (a) 及び 47 (b) 参照)。

【0544】

【表58】

10

表47 (a) : 25℃での貯蔵後の表42の組成物の断片化率 :

番号	初期	4週間 25℃	8週間 25℃	13週間 25℃	18週間 25℃	24週間 25℃
26-B	1.3%	---	---	3.3%	3.7%	---
55-B	1.6%	---	---	2.9%	---	---
56-B	1.6%	---	---	2.5%	---	---
57-B	1.6%	---	---	2.4%	---	2.9%
58-B	1.0%	---	---	2.5%	---	---
59-B	1.1%	---	---	2.6%	---	---
60-B	1.2%	---	---	2.6%	---	---
61-B	1.1%	---	---	2.5%	---	---
62-B	1.0%	---	---	2.5%	---	---
63-B	1.1%	2.3%	2.1%	2.6%	---	---

20

【0545】

下記表 47 (b) に、図 22 にグラフによって表した断片化データを報告する。

【0546】

30

【表59】

表47 (b) : 40℃での貯蔵後の表42の組成物の断片化率 :

番号	初期	4週間 40℃	8週間 40℃	13週間 40℃	18週間 40℃	24週間 40℃
26-B	---	---	6.2%	7.3%	8.7%	10.1%
55-B	---	1.6%	2.3%	5.7%	---	---
56-B	---	1.9%	2.3%	4.8%	---	---
57-B	---	2.0%	2.6%	4.7%	---	5.3%
58-B	---	---	3.7%	5.6%	---	---
59-B	---	---	3.6%	5.7%	---	---
60-B	---	---	3.5%	5.3%	---	---
61-B	---	2.5%	3.3%	5.5%	---	---
62-B	---	2.6%	3.6%	5.9%	---	---
63-B	---	2.6%	3.6%	5.3%	---	---

40

【0547】

50

表47(a)、47(b)及び図22に見られるように、EDTA含有組成物は、25℃及び40℃での貯蔵後に、EDTAを欠くが、酢酸塩緩衝液及び塩化ナトリウムを有する組成物と比較して減少した断片化レベルを示した。

【0548】

実施例13-B

この実施例は、抗CTLA-4抗体チシリムマブ(ticilimumab)、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、 α -アトレハロース二水和物及びポリソルベート80を含む液状医薬組成物の生成を説明する。

【0549】

本発明の液状医薬組成物は、次の成分を得ることによって形成される：抗CTLA-4抗体チシリムマブ（実施例1によるATCC受け入れ番号PTA-5169で寄託されたハイブリドーマ細胞系11.2.1.4から入手可能、又は実施例2による哺乳動物細胞系から組換えによって調製される）、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物（Ajinomoto、Raleigh、NCから入手可能）、L-ヒスチジン（Ajinomoto、Raleigh、NCから入手可能）、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物（Merck KGaA、Darmstadt、GermanyからTitriflex I I Iとして入手可能）、 α -アトレハロース二水和物（Ferro Pfanstiehl、Waukegan ILから製品番号T-104-1-MCとして入手可能）、及びポリソルベート80（Croda Inc.、Mill Hall PAからCrill et 4 HPとして入手可能）。

【0550】

液状医薬組成物は、抗CTLA-4抗体チシリムマブ、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、 α -アトレハロース二水和物及びポリソルベート80の幾つかの原液を最初に調製することによって、調製された。20mMヒスチジン緩衝液pH5.5は、3.27mg/ml（15.6mM）L-ヒスチジンHCl一水和物、及び0.68mg/ml（4.4mM）L-ヒスチジンを水中で溶解することによって調製された。1×組成物緩衝液は、3.27mg/ml（15.6mM）L-ヒスチジンHCl一水和物、及び0.68mg/ml（4.4mM）L-ヒスチジン、84mg/mL（222mM） α -アトレハロース二水和物、0.2mg/mLポリソルベート80、及び0.1mg/mL（0.268mM）エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物を水中で溶解することによって調製された。2×組成物緩衝液は、3.27mg/ml（15.6mM）L-ヒスチジンHCl一水和物、及び0.68mg/ml（4.4mM）L-ヒスチジン、168mg/mL（444mM） α -アトレハロース二水和物、0.4mg/mLポリソルベート80、及び0.2mg/mL（0.536mM）エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物を水中で溶解することによって調製された。抗CTLA-4抗体チシリムマブの原液は、実施例2により調製され、かつタイプ50kDの膜（BioMax PES）により行われる限外濾過工程を使用して、ヒスチジン緩衝液中で42から55mg/mlの間（標的45mg/mL）に濃縮された。

【0551】

医薬組成物を生成するために、等量の抗CTLA-4抗体チシリムマブ濃縮原液及び2×組成物緩衝液が、液体組成物を密接に混合させることに適した容器に添加される。混合後、少量の溶液が、除去され、かつ抗体濃度が、 $1.43(\text{mg/mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$ の減衰係数を使用して、紫外線可視分光測定（UV-Vis）法によって決定された（予測範囲21から27.5mg/mL、標的22.5mg/mL）。最後に、抗体を20mg/mL（18～22mg/mLの範囲）の標的濃度に至らせるために、適切に計算された量の1×組成物緩衝液が、添加され、かつ混合された。

【0552】

次に医薬組成物は、0.2 μ 滅菌グレードフィルタを通して濾過され、かつバイアルに充填された。20ミリリットルの公称充填容量が、20ミリリットルタイプ1ガラスバイアル中で使用された。バイアルは、Daikyo 777-1 Flurotec（登録

商標) コーティングされた栓によって閉鎖され、かつクリンプシールされた。ガラスバイアルは、20mm Dai ky o 777-1 血清栓のように、滅菌された。

【0553】

各単一のバイアルユニットは、約400mgの抗CTLA-4抗体チシリムマブ、65.4mgのL-ヒスチジン塩酸塩一水和物、13.6mgのL-ヒスチジン、2mgのエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、1680mgのαα-トレハロース二水和物及び4mgのポリソルベート80を含む。

【0554】

実施例14-B

この実施例は、抗CTLA-4抗体チシリムマブ、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物、エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム、αα-トレハロース二水和物及びポリソルベート80を含む液状医薬組成物の予期される生成を説明する。

【0555】

本発明の液状医薬組成物は、次の成分を得ることによって形成され得る：抗CTLA-4抗体チシリムマブ（実施例1によるATCC受け入れ番号PTA-5169で寄託されたハイブリドーマ細胞系11.2.1.4から入手可能、又は実施例2-Bによる哺乳動物細胞系から組換えによって調製される）、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物（Ajinomoto、Raleigh、NCから入手可能）、L-ヒスチジン（Ajinomoto、Raleigh、NCから入手可能）、エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム（Sigma-Aldrich、St. Louis、MOから入手可能）、αα-トレハロース二水和物（Ferro Pfanstiehl、Waukegan ILから製品番号T-104-1-MCとして入手可能）、及びポリソルベート80（Croda Inc.、Mill Hall PAからCrillett 4 HPとして入手可能）。

【0556】

液状医薬組成物は、抗CTLA-4抗体チシリムマブ、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、αα-トレハロース二水和物及びポリソルベート80の幾つかの原液を最初に調製することによって、調製され得る。20mMヒスチジン緩衝液pH5.5は、3.27mg/ml（15.6mM）L-ヒスチジンHCl一水和物、及び0.68mg/mL（4.4mM）L-ヒスチジンを水中で溶解することによって調製され得る。1×組成物緩衝液は、3.27mg/ml（15.6mM）L-ヒスチジンHCl一水和物、及び0.68mg/ml（4.4mM）L-ヒスチジン、84mg/ml（222mM）αα-トレハロース二水和物、0.2mg/mLポリソルベート80、及び0.1003mg/mL（0.268mM）エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウムを水中で溶解することによって調製され得る。2×組成物緩衝液は、3.27mg/ml（15.6mM）L-ヒスチジンHCl一水和物、及び0.68mg/ml（4.4mM）L-ヒスチジン、168mg/ml（444mM）αα-トレハロース二水和物、0.4mg/mLポリソルベート80、及び0.2006mg/mL（0.536mM）エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウムを水中で溶解することによって調製され得る。抗CTLA-4抗体チシリムマブの原液は、実施例2-Bにより調製され、かつタイプ50kDの膜（Bio max PES）により行われる限外濾過工程を使用して、ヒスチジン緩衝液中で42から55mg/mlの間（標的45mg/ml）に濃縮され得る。

【0557】

医薬組成物を生成するために、等量の抗CTLA-4抗体チシリムマブ濃縮原液及び2×組成物緩衝液が、液体組成物を密接に混合させることに適した容器に添加され得る。混合後、少量の溶液が、除去され、かつ抗体濃度が、1.43（mg/mL）⁻¹cm⁻¹の減衰係数を使用して、紫外線可視分光測定（UV-Vis）法によって決定され得る（予測範囲21から27.5mg/mL、標的22.5mg/mL）。最後に、抗体を20mg/mL（18～22mg/mLの範囲）の標的濃度に至らせるために、適切に計算された

量の1×組成物緩衝液が、添加され、かつ混合され得る。

【0558】

次に医薬組成物は、0.2 μ滅菌グレードフィルタを通して濾過され、かつバイアルに充填され得る。20ミリリットルの公称充填容量が、20ミリリットルタイプ1ガラスバイアル中で使用され得る。次にバイアルは、Daikyo 777-1 Flurotec（登録商標）コーティングされた栓によって閉鎖され、かつクリンプシールされ得る。ガラスバイアルは、20mm Daikyo 777-1血清栓と同様に、滅菌され得る。

【0559】

各単一のバイアルユニットは、約400mgの抗CTLA-4抗体チシリムマブ、65.4mgのL-ヒスチジン塩酸塩一水和物、13.6mgのL-ヒスチジン、2.006mgのエチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム、1680mgのαα-トレハロース二水和物及び4mgのポリソルベート80を含み得る。

【0560】

実施例15-B

この実施例は、抗CTLA-4抗体チシリムマブ、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物、エチレンジアミン四酢酸三ナトリウム、αα-トレハロース二水和物及びポリソルベート80を含む液状医薬組成物の予期される生成を説明する。

【0561】

本発明の液状医薬組成物は、次の成分を得ることによって形成された：抗CTLA-4抗体チシリムマブ（実施例1によるATCC受け入れ番号PTA-5169で寄託されたハイブリドーマ細胞系11.2.1.4から入手可能、又は実施例2-Bによる哺乳動物細胞系から組換えによって調製される）、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物（Ajinomoto、Raleigh、NCから入手可能）、L-ヒスチジン（Ajinomoto、Raleigh、NCから入手可能）、エチレンジアミン四酢酸三ナトリウム（Sigma-Aldrich、St. Louis、MOから入手可能）、αα-トレハロース二水和物（Ferro Pfanstiehl、Waukegan ILから製品番号T-104-1-MCとして入手可能）、及びポリソルベート80（Croda Inc.、Mill Hall PAからCrillett 4 HPとして入手可能）。

【0562】

液状医薬組成物は、抗CTLA-4抗体チシリムマブ、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物、エチレンジアミン四酢酸三ナトリウム、αα-トレハロース二水和物及びポリソルベート80の幾つかの原液を最初に調製することによって、調製された。20mMヒスチジン緩衝液pH5.5は、3.27mg/ml（15.6mM）L-ヒスチジンHCl一水和物、及び0.68mg/ml（4.4mM）L-ヒスチジンを水中で溶解することによって調製される。1×組成物緩衝液は、3.27mg/ml（15.6mM）L-ヒスチジンHCl一水和物、及び0.68mg/ml（4.4mM）L-ヒスチジン、84mg/ml（222mM）αα-トレハロース二水和物、0.2mg/mLポリソルベート80、及び0.096mg/mL（0.268mM）エチレンジアミン四酢酸三ナトリウムを水中で溶解することによって調製される。2×組成物緩衝液は、3.27mg/ml（15.6mM）L-ヒスチジンHCl一水和物、及び0.68mg/ml（4.4mM）L-ヒスチジン、168mg/ml（444mM）αα-トレハロース二水和物、0.4mg/mLポリソルベート80、及び0.192mg/mL（0.536mM）エチレンジアミン四酢酸三ナトリウムを水中で溶解することによって調製される。抗CTLA-4抗体チシリムマブの原液は、実施例2-Bにより調製され、かつタイプ50kDの膜（Bio-max PES）により行われる限外濾過工程を使用して、ヒスチジン緩衝液中で42から55mg/mlの間（標的45mg/mL）に濃縮される。

【0563】

医薬組成物を生成するために、等量の抗CTLA-4抗体チシリムマブ濃縮原液及び2×組成物緩衝液が、液体組成物を密接に混合させることに適した容器に添加される。混合後、少量の溶液が、除去され、かつ抗体濃度が、1.43（mg/mL）⁻¹cm⁻¹の減衰

10

20

30

40

50

係数を使用して、紫外線可視分光測定（UV-Vis）法によって決定される（予測範囲 21 から 27.5 mg/mL、標的 22.5 mg/mL）。最後に、抗体を 20 mg/mL（18～22 mg/mL の範囲）の標的濃度に至らせるために、適切に計算された量の 1×組成物緩衝液が、添加され、かつ混合される。

【0564】

次に医薬組成物は、0.2 μ 滅菌グレードフィルタを通して濾過され、かつバイアルに充填される。20 ミリリットルの公称充填容量が、20 ミリリットルタイプ 1 ガラスバイアル中で使用された。バイアルは、Daikyo 777-1 Flurotec（登録商標）コーティングされた栓によって閉鎖され、かつクリンプシールされた。ガラスバイアルは、20 mm Daikyo 777-1 血清栓のように、滅菌された。

10

【0565】

各単一のバイアルユニットは、約 400 mg の抗 CTLA-4 抗体チシリムマブ、65.4 mg の L-ヒスチジン塩酸塩一水和物、13.6 mg の L-ヒスチジン、1.92 mg のエチレンジアミン四酢酸三ナトリウム、1680 mg の α-アトレハロース二水和物及び 4 mg のポリソルベート 80 を含む。

【0566】

実施例 1-C

抗 MadCAM 生成ハイブリドーマの発生

本発明の抗体は、本実施例に従って調製された。PCT/US 2005/000370 を参照せよ。

20

【0567】

一次免疫原の調製：

2 種の免疫原が、Xenomouse（商標）マウスの免疫化のために調製された：（i）MadCAM-IgG₁ Fc 融合蛋白質、及び（ii）MadCAM によって安定的にトランスフェクトされた細胞から調製された細胞膜である。

【0568】

（i）MadCAM-IgG₁ Fc 融合蛋白質

発現ベクターの構造：

MadCAM の成熟細胞外、免疫グロブリン様ドメインをコード化する EcoRI/BglII cDNA 断片は、インフレーション IgG₁ Fc 融合を発生させるために、pINCY Incyte クローン（3279276）から切除され、かつ pIG1 ベクターの EcoRI/BamHI 部位にクローニングされた（Simmons, D. L. (1993) in Cellular Interactions in Development: A Practical Approach, ed. Hartley, D. A. (Oxford Univ. Press, Oxford), pp. 93-127.）。結果として生じたインサートは、EcoRI/NotI によって切除され、かつ pCDNA3.1+（インビトロゲン）にクローニングされた。ベクター中の MadCAM-IgG₁ Fc cDNA は、確認された配列である。MadCAM-IgG₁ Fc 融合蛋白質のアミノ酸配列を以下に示す：

30

【0569】

40

【化 3】

MAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質：

MDFGLALLLAGLLGLLGQSLQVKPLQVEPPEPVVAVALGASRQLTCRLACADRGASVQWRG
LDTSLGAVQSDTGRSVLTVRNASLSAAGTRVCVCGGRTFQHTVQLLVYAFPDQLTVSPAA
LVPGDPEVACTAHKVTPVDPNALSFSLLVGGQELEGAQALGPEVQEEEEEPQGDVLFVRT
ERWRLPPLGTPVPPALYCQATMRLPGLLELSHRQAIPVLHSPTSPEPPDTTSPESPDTTSPESP
DTTSQEPPDTTSPESPDTTSPESPDTTSPESPDKTSPEPAPQQGSTHTPRSPGSTRTRRPEIQ
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5)

10

下線：シグナル・ペプチド

太字：MAdCAM細胞外ドメイン

【0570】

組換え蛋白質発現／精製

20

CHO-DHFR細胞は、600 μg/mL G418及び100 ng/mLメトトレキセートを含むIscove培地中で選択された安定クローン発現MAdCAM-IgG₁ Fc融合蛋白質及びMAdCAM-IgG₁ Fc融合蛋白質cDNAを含むpCDNA3.1+ベクターによってトランスフェクトされた。蛋白質発現のために、ホローファイバーバイオリアクターは、10% low IgGウシ胎児血清 (Gibco)、非必須アミノ酸 (Gibco)、2 mM グルタミン (Gibco)、ピルビン酸ナトリウム (Gibco)、100 μg/mL G418及び100 ng/mLメトトレキセートを含むIscove培地中の安定発現MAdCAM-IgG₁ Fc CHOが細胞接種され、かつ濃縮培地上清を発生させるために使用された。MAdCAM-IgG₁ Fc融合蛋白質は、アフィニティークロマトグラフィにより採取された上清から精製された。簡潔に言 30
えば、上清は、HiTrap蛋白質Gセファロース (5 mL、Pharmacia) カラム (2 mL/分) に加えられ、25 mM トリス pH 8、150 mM NaCl (5 カラム容量) によって洗浄され、かつ100 mM グリシン pH 2.5 (1 mL/分) によって溶出され、1 M トリス pH 8 によって分画を pH 7.5 に直ちに中和させた。MAdCAM-IgG₁ Fc融合蛋白質を含む分画は、SDS-PAGEによって同定され、一緒に貯留され、かつセファクリルS100カラム (Pharmacia) に加えられ、35 mM ビストリス pH 6.5、150 mM NaCl によって予め平衡にされた。ゲル濾過は、0.35 mL/分で行われ、約3×5 mL分画中にMAdCAM-IgG₁ Fc融合蛋白質のピークを収集した。これらの試料は、貯留され、かつResource Q (6 mL、Pharmacia) カラムに加えられ、35 mM ビストリス pH 6.5 中で予め 40
平衡にされた。カラムは、5 カラム容量の35 mM ビストリス pH 6.5、150 mM NaCl (6 mL/分) によって洗浄され、かつMAdCAM-IgG₁ Fc融合蛋白質は、35 mM ビストリス pH 6.5、400 mM NaCl によって4~6 mL分画に溶出した。この段階で、蛋白質は、90% 純粋であり、かつSDS-PAGEによって約68 kDで単一バンドとして移動した。免疫原及びその後のあらゆるアッセイとして使用するために、材料は、25 mM HEPES pH 7.5、1 mM EDTA、1 mM DTT、100 mM NaCl、50% グリセロールに緩衝液交換され、かつ-80℃でアリコートとして貯蔵された。

【0571】

(ii) MAdCAMを安定的に発現する細胞膜

50

公開されたMAdCAM配列 (シャイジャン(Shyjan AM)ら著、「ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.)」、1996年、第156巻、p.2851-7) のヌクレオチド645～1222を含んでなるSacI/NotIフラグメントは、結腸cDNAライブラリからPCR増幅され、p1ND-Hygroベクター (インビトロジェン(Invitrogen)) のSacI/NotI部位へクローン化された。付加的な5'コード配列を含んでなるSacIフラグメントは、pCDNA3.1 MAdCAM-IgG₁Fcからのこの構築物中へサブクローン化され、完全長のMAsCAMcDNAを生成した。MAdCAMcDNAを含有するKpnI/NotIフラグメントは次に、pEF5FRTV5GWCAベクター (インビトロジェン) 中の対応する部位へクローン化され、CATコード配列を置換えた。cDNAインサートは配列確認され、トランスフェクションに使用されて、Flp10
10
pリコンビナーゼ技術により、製造業者の使用説明書に従って、Flp1n NIH3T3細胞 (インビトロジェン) において単一の安定した発現クローンを生成した。安定に発現しているクローンは、下文に概説された、 $\alpha_4\beta_7^+$ JYヒトBリンパ芽球様細胞株 (チャン (Chan BM) 著、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)」、1992年、第267巻、p.8366-70) の結合を支持するそれらの能力によって選択された。MAdCAMを発現するCHO細胞の安定なクローンは、同様の方法で、Flp1nCHO細胞を用いて調製された。

【0572】

MAdCAM発現性のFlp1n NIH-3T3細胞は、2mML-グルタミン、10%ドナー(Donor) 仔ウシ血清 (ギブコ (Gibco))、および200 μ g/mLハイグロマイシン (Hygromycin) B (インビトロジェン) を含有するダルベッコ変法イーグル培地 (ギブコ) 中で増殖され、ローラーボトル内で拡大された。MAdCAM発現性のFlp1n CHO細胞は、2mML-グルタミン、10%ドナー仔ウシ血清 (ギブコ)、および350 μ g/mL ハイグロマイシンB (インビトロジェン) を含有するハム (Ham) F12/ダルベッコ変法イーグル培地 (ギブコ) 中で増殖され、ローラーボトル内で拡大された。細胞は非酵素的な細胞分離溶液 (シグマ (Sigma)) および、かき落とし、遠心分離によるリン酸緩衝食塩水中での洗浄の使用により収獲された。細胞膜は、細胞ペレットから、25mMビスートリスpH8、10mM MgCl₂、0.015% (w/v) アプロチニン、100U/mLバシトラシン中でのポリトロンによるホモジナイゼーションと、遠心分離との2回りによって調製された。最終的なペレットは、同じ緩衝液中に再懸濁され、50x10⁵細胞当量が肉厚のエッペンドルフ内へ分取され、>100,000gで回転されて、Xenomouseマウスの免疫化のための細胞膜ペレットを生じた。上清はデカンテーションされ、膜はエッペンドルフ中で-80℃において、必要とされるまで貯蔵された。細胞膜におけるタンパク質発現の確認は、SDS-PAGEおよび、MAdCAMのN-末端残基 ([C]-KPLQVEPPEP) に対して高められた、ウサギ抗ペプチド抗体を用いたウェスタンブロッティングにより決定された。

【0573】

免疫化およびハイブリドーマ発生：

8～10週齢のXenomouse (商標) マウスは、精製された組換えMAdCAM-IgG₁Fc融合タンパク質 (10 μ g/用量/マウス) かまたは、安定に発現しているMAdCAM-CHOまたはNIH3T3細胞 (10x10⁶細胞/用量/マウス) から調製された細胞膜を用いて、膜副腔内または後肢足蹠内へ免疫化された。この用量は、3～8週間の期間にわたり、5～7回反復された。融合の4日前に、マウスはPBS中のヒトMAdCAMの細胞外ドメインの最後の注射を受けた。免疫化されたマウスからの脾臓およびリンパ節リンパ球は、非分泌型骨髓腫P3-X63-Ag8, 653細胞株と融合され、先に記述されたようにHAT選択にかけられた (ガルフレ (Galfre) およびミルSTEIN (Milstein) 著、「メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods Enzymol.)」、1981年、第73巻、p.3-46)。MAdCAM特異ヒトIgG₂ κ を分泌しているハイブリドーマのパネル株は回収され、サブクローン化された。

【0574】

以下のように指定された抗MAdCAM抗体を産生する以下のハイブリドーマは、2003年9月9日、ヨーロッパ・コレクション・オブ・セル・カルチャーズ（ECCACC）、ウィルトシャー州SP4 0JG、ソールズベリ、ポートンダウン、CAMRに寄託された：ハイブリドーマ7.16.6、寄託番号03090909。

【0575】

実施例2-C

抗体組成物

以下の組成は、以下の実施例において参照される：

【0576】

10

【表60】

表47

組成物 ID (識別番号)	mAb 7.16.6 mg/ml	緩衝剤 mM; pH	浸透圧剤 mg/ml	界面活性剤 mg/ml	キレート剤 mg/ml	他の 賦形剤
1-C	10±1	酢酸塩、 20mM, pH5.5				
2-C	10±1	酢酸塩、 7mM クエン酸塩、 7mM リン酸塩、 7mM, pH5.5				
3-C	10±1	EDTA, 20mM pH5.5				
4-C	8±1	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5.5				NaCl, 140mM
5-C	8±1	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5.5	マンニトール、 45mg/ml			
6-C	8±1	酢酸ナトリウム、 10mM, pH5.5				
7-C	8±1	EDTAナトリウム、 10mM, pH5.5				

20

30

【0577】

【表 6 1】

8-C	8±1	EDTAナトリウム、 10mM, pH5. 5				NaCl, 140mM
9-C	8±1	EDTAナトリウム、 10mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml			
10-C	8±2	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml		
11-C	8±2	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/ml	
12-C	8±2	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	NaCl, 8. 2mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml		
13-C	8±2	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	CaCl ₂ . 2H ₂ O, 0. 3mg/ml	
14-C	30±6	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 4mg/ml		
15-C	30±6	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 4mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/ml	
16-C	30±6	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	NaCl, 8. 2mg/ml	PS80, 0. 4mg/ml		
17-C	30±6	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 4mg/ml	CaCl ₂ . 2H ₂ O, 0. 3mg/ml	

10

20

【 0 5 7 8 】

【表 6 2】

18-C	50±6	ヒスチジン、 10mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/ml	
19-C	10±2	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/ml	
20-C	10±2	ヒスチジン、 10mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/ml	
21-C	10±2	ヒスチジン、 10mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/ml	
22-C	50±6	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 4mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/ml	
23-C	50±6	ヒスチジン、 10mM, pH6. 0	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/ml	
24-C	150±6	ヒスチジン、 10mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/ml	
25-C	50±5	ヒスチジン、 10mM, pH5. 5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 05mg/ml	
26-C	75±5	ヒスチジン、 10mM, pH5. 5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 05mg/ml	
27-C	100±7	ヒスチジン、 10mM, pH5. 5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 05mg/ml	
28-C	150±10	ヒスチジン、 10mM, pH5. 5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 05mg/ml	
29-C	190±2	ヒスチジン、 10mM, pH5. 5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0. 2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 05mg/ml	

10

20

30

【 0 5 7 9 】

【表 6 3】

30-C	80±10	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.02mg/ml	
31-C	80±10	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.10mg/ml	
32-C	80±10	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.4mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.05mg/ml	
33-C	80±10	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 1.0mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.05mg/ml	
34-C	85±15	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.10mg/ml	
35-C	85±15	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.4mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.10mg/ml	
36-C	85±15	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 1.0mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.10mg/ml	
37-C	80±10	クエン酸塩、 5mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.05mg/ml	
38-C	80±10	コハク酸塩、 5mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.05mg/ml	
39-C	80±10	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	スクラロース、 85mg/ml	PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.05mg/ml	
40-C	80±10	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	ソルビトール、 45mg/ml	PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.05mg/ml	
41-C	80±10	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	キシリトール、 35mg/ml	PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.05mg/ml	
42-C	80±10	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PEG ₃₃₅₀ , 10mg/ml	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0.05mg/ml	

10

20

30

【0580】

【表 6 4】

43-C	80±10	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	NOF PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA・2H ₂ O, 0.05mg/ml	
44-C	80±10	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	ホ°ロキサマ-407, 1.0mg/ml	Na ₂ EDTA・2H ₂ O, 0.05mg/ml	
45-C	80±10	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	ホ°ロキサマ-188, 1.0mg/ml	Na ₂ EDTA・2H ₂ O, 0.05mg/ml	
46-C	50±5	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA・2H ₂ O, 0.05mg/ml	
47-C	50±5	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA・2H ₂ O, 0.05mg/ml	
48-C	75±15	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.4mg/ml	Na ₂ EDTA・2H ₂ O, 0.05mg/ml	
49-C	75±15	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA・2H ₂ O, 0.05mg/ml	
50-C	75±15	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	スクロース、 85mg/ml	PS80, 0.4mg/ml	Na ₂ EDTA・2H ₂ O, 0.05mg/ml	
51-C	75±5	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.2mg/ml	Na ₂ EDTA・2H ₂ O, 0.05mg/ml	
52-C	75±5	ヒスチジン、 10mM, pH5.5	トレハロース、 90mg/ml	PS80, 0.4mg/ml	Na ₂ EDTA・2H ₂ O, 0.10mg/ml	

10

20

【0581】

実施例 3-C

研究は、抗MAdCAM抗体7.16.6の凝集に対する、いくつかの異なる緩衝剤の影響を評価するべく行われた。

【0582】

緩衝液の調製：

緩衝液は、まず、ある量の緩衝剤種を水（ターゲットの約90%）へ溶解することにより調製された。次いで各々の緩衝液のpHは、充分量の酸または塩基溶液の添加により5.5に調整された。pHの調整後、追加量の水が添加され、最終的な緩衝剤濃度を20mMとした。20mMの緩衝剤濃度は、選択されたpH5.5における妥当なpH安定性を確保するべく選択された。緩衝液は次に、その後の使用のため、滅菌フィルタ（ポアサイズ0.22ミクロン）を通して、滅菌された容器内へ濾過された。

30

【0583】

抗体組成物の調整：

抗体組成物は以下のように調製された。抗体のバルク溶液は、20mM酢酸ナトリウム緩衝液pH5.5+140mM塩化ナトリウム中の、10.5mg/mlとして得られた。このバルク溶液の、組成物溶液への緩衝剤交換は、4500xgでの遠心分離により、限外濾過膜（たとえば、30kD）を用いて行われた。約8体積の交換が行われ、最終的な抗体溶液は約10mg/mlの濃度で調製された。抗体濃度は紫外-可視分光（UV-Vis）法により、280nmにおける吸光係数1.56（mg/ml）⁻¹cm⁻¹を用いて測定された。全ての成分をもつ組成物は次いで、無菌の0.22ミクロンの膜フィルタを通した濾過により滅菌された。濾過された組成物は次に、洗浄およびオートクレーブされたバイアルへ注がれ、Daikyo 777-1 Flurotec（登録商標）コートされたストッパーで閉じられ、クリンプシールされ、スタビリティ・チャンバー内に静置された。

40

50

【0584】

特に、抗MAdCAM抗体7.16.6を含んでなり、酢酸塩か、EDTAか、または、酢酸塩、クエン酸塩、およびリン酸塩の組合せを用いて緩衝化された、三つの液体組成物が調製された。組成物は40℃において6週間貯蔵され、凝集測定が行われた。

【0585】

【表65】

表48:

組成物 ID	7.16.6mAb mg/mL	説明	%凝集	%凝集における 相対増加*
1-C	10±1	20mM酢酸塩 pH5.5	0.8	70
2-C	10±1	組合せ、pH5.5 (酢酸塩7mM, クエン酸塩7mM, リン酸6mM)	0.7	60
3-C	10±1	20mM EDTA, pH5.5	0.5	40

* %凝集における相対増加は、

$\{[(6 \text{ 週間}/40^\circ\text{C} \text{ の } \% \text{ 凝集}) - (\text{最初の } \% \text{ 凝集})] \times 100\} / [\text{最初の } \% \text{ 凝集}]$ で計算される。

10

20

【0586】

凝集分析:

抗体組成物は40℃において貯蔵された。6週間で、各組成物はサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）により、凝集について分析された。サイズ排除クロマトグラフィーは、TSKゲルG3000SWXL-G2000SWXLカラム、0.2Mリン酸ナトリウム、pH7の移動相、0.7mL/分の流速、および214nmにおけるUV検出を用いて行われた。凝集レベルは、クロマトグラムピーク下の面積を各組成物について積算すること、および高分子量種のピーク下にある積算された面積を全ピーク面積のパーセントとして記録することにより計算された。表48に示されたように、EDTA緩衝化組成物は、最も低いレベルの凝集および、凝集の最も低い相対増加を示した。

30

【0587】

実施例4-C

研究は、抗MAdCAM抗体7.16.6の断片化に対する、緩衝剤濃度および、他の賦形剤の存在／不在の影響を評価するべく行われた。

【0588】

表49に示された組成物は、実施例2-Cに記述された方法によって調製され、実施例3-Cの方法によって評価された。

【0589】

【表 6 6】

表49：

組成物 ID	7.16.6 mAb mg/mL	緩衝剤	賦形剤	%断片化
4-C	8±1	20mM酢酸ナトリウム、 pH5.5	NaCl, 140mM	0.9
5-C	8±1	20mM酢酸ナトリウム、 pH5.5	マンニトール、 45mg/ml	0.6
6-C	8±1	10mM酢酸ナトリウム、 pH5.5	-	0.5
7-C	8±1	10mM EDTAナトリウム、 pH5.5	-	0
8-C	8±1	10mM EDTAナトリウム、 pH5.5	NaCl, 140mM	0
9-C	8±1	10mM EDTAナトリウム、 pH5.5	マンニトール、 45mg/ml	0

10

20

【0590】

表49に示されたように、液体組成物中のEDTAの存在は、EDTAを含まない組成物におけるものよりも少ないLMM形成を生じる結果となる。

【0591】

実施例5-C

研究は、凝集および断片化に対する、液体の抗MAdCAM抗体組成物中のEDTAの影響を評価するべく行われた。

【0592】

緩衝液は、実施例3-Cに記述された方法によって調製された。抗体組成物は以下のよう
に調製された。抗体のバルク溶液は20mMの酢酸ナトリウム緩衝液pH5.5中の9
.6mg/mlとして得られた。このバルク溶液の、組成物溶液への緩衝剤交換は、50
000xgにおける遠心分離により、限外濾過膜（たとえば、30kD）を用いて行われた
。約8体積の交換が行われ、最終的な抗体溶液は、約8mg/mlまたは約30mg/ml
のタンパク質濃度で調製された。抗体濃度は、紫外-可視分光（UV-Vis）法によ
り、280nmにおける吸光係数 $1.56(\text{mg/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて測定された。
ポリソルベート80（PS80）（典型的には20mg/ml）の濃縮液は、適当な緩衝
液によるPS80の希釈および溶解により調製された。PS80濃縮液は次に、抗体溶液
へ添加され、記述された最終組成物を得た。すべての成分をもつ組成物は次に、滅菌フ
ィルタ（ポアサイズ0.22ミクロン）を通した濾過により滅菌された。濾過された組成物
は次に、洗浄およびオートクレーブされたバイアルへ注がれた。このバイアルは、Dai
kymo 777-1 Fluotec（登録商標）コートされたストッパーで閉じられ
、クrimpシールされ、スタビリティ・チャンバー内に静置された。

30

40

【0593】

表50の組成物は40℃で26週間貯蔵され、実施例3-Cに記述されたSEC法により評価された。

【0594】

【表 6 7】

表50

組成物 ID	7. 16. 6 mAb mg/mL	緩衝剤 (pH5. 5)	賦形剤	PS-80, mg/mL	他の 賦形剤	%凝集	%断片化
10-C	8±2	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 2	—	6. 9	0. 6
11-C	8±2	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 2	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/mL	3. 7	0
12-C	8±2	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	NaCl, 8. 2mg/mL	0. 2	—	6. 0	0. 5
13-C	8±2	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 2	CaCl ₂ . 2H ₂ O, 0. 3mg/mL	6. 8	0. 8
14-C	30±6	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 4	—	7. 2	0. 2
15-C	30±6	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 4	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/ml	3. 7	0
16-C	30±6	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	NaCl, 8. 2mg/mL	0. 4	—	7. 7	0. 4
17-C	30±6	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 4	CaCl ₂ . 2H ₂ O, 0. 3mg/mL	9. 8	0. 7

10

20

【0 5 9 5】

表 5 1 の組成物は 2 5 °C で 2 6 週間貯蔵され、実施例 3 - C に記述された S E C 法により評価された。

【0 5 9 6】

【表 6 8】

30

表51

組成物 ID	7. 16. 6 mAb, mg/mL	緩衝剤	賦形剤	PS-80, mg/mL	他の賦形剤	%凝集
14-C	30±6	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 4	—	1. 6
15-C	30±6	酢酸ナトリウム、 20mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 4	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/mL	0. 7
18-C	50±6	ヒスチジン、 10mM, pH5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 2	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, 0. 02mg/mL	0. 5

40

【0 5 9 7】

この実施例は、液体組成物中の E D T A の存在が、少ない凝集および少ない L M M 種の形成を生じる結果となることを示している。

【0 5 9 8】

実施例 6 - C

50

研究は、抗MAdCAM抗体7.16.6の凝集および断片化に対する、酢酸塩およびヒスチジンの影響を比較するべく行われた。表52および53に示された組成物は、実施例5-Cに記述された方法により調製された。表52の組成物は40℃で26週間貯蔵され、実施例3-Cに記述されたSEC法により分析された。

【0599】

【表69】

表52：

組成物 ID	7.16.6 mAb mg/mL	緩衝剤	pH	賦形剤	PS-80, mg/mL	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, mg/mL	%凝集	%断片化
19-C	10±2	酢酸ナトリウム、 20mM	5.5	マンニトール、 45mg/mL	0.2	0.02	3.8	0
20-C	10±2	ヒスチジン 10mM	6.0	マンニトール、 45mg/mL	0.2	0.02	1.2	0
21-C	10±2	ヒスチジン 10mM	5.5	マンニトール、 45mg/mL	0.2	0.02	1.5	0
22-C	50±6	酢酸ナトリウム、 20mM	5.5	マンニトール、 45mg/mL	0.4	0.02	5.2	0
23-C	50±6	ヒスチジン 10mM	6.0	マンニトール、 45mg/mL	0.2	0.02	2.3	0
18-C	50±6	ヒスチジン 10mM	5.5	マンニトール、 45mg/mL	0.2	0.02	2.8	0.1

10

20

【0600】

表53の組成物は25℃で52週間貯蔵され、実施例3-Cに記述されたSEC法により分析された。

【0601】

30

【表 7 0】

表53：

組成物 ID	7. 16. 6 mAb mg/mL	緩衝剤	pH	賦形剤	PS-80, mg/mL	Na ₂ EDTA, 2H ₂ O, mg/mL	%凝集	%断片化
19-C	10±2	酢酸ナトリウム、 20mM	5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 2	0. 02	0. 9	0
20-C	10±2	ヒスチジン 10mM	6. 0	マンニトール、 45mg/mL	0. 2	0. 02	0. 4	0
21-C	10±2	ヒスチジン 10mM	5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 2	0. 02	0. 3	0
22-C	50±6	酢酸ナトリウム、 20mM	5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 4	0. 02	1. 3	0
23-C	50±6	ヒスチジン 10mM	6. 0	マンニトール、 45mg/mL	0. 2	0. 02	0. 8	0
18-C	50±6	ヒスチジン 10mM	5. 5	マンニトール、 45mg/mL	0. 2	0. 02	0. 9	0

10

20

【0 6 0 2】

この実施例は、緩衝剤としてヒスチジンを用いた組成物が、同じ pH では酢酸塩を用いた組成物よりも少ない凝集体を形成することを示している。

【0 6 0 3】

実施例 7 - C

研究は、種々の抗体濃度における抗 M A d C A M 抗体 7. 1 6. 6 の、凝集傾向を評価するべく行われた。この研究では、実施例 5 - C に記述された方法により、表 5 4 の組成物が調製された。表 5 4 の組成物は 5 °C、2 5 °C、または 4 0 °C において 2 6 時間貯蔵され、次いで実施例 3 - C に記述された S E C 法により分析された。

30

【0 6 0 4】

【表 7 1】

表54

組成物 ID (識別番号)	緩衝剤、 mM	pH	mAb 7. 16. 6, mg/mL	トリアオ-ス、 2H ₂ O, mg/mL	Na ₂ EDTA, 2H ₂ O, mg/mL	PS80, mg/mL	5°Cに おける %凝集	25°Cに おける %凝集	40°Cに おける %凝集
25-C	His, 10	5. 5	47	90	0. 05	0. 2	0. 3	0. 6	2. 7
26-C	His, 10	5. 5	75	90	0. 05	0. 2	0. 4	0. 7	3. 6
27-C	His, 10	5. 5	99	90	0. 05	0. 2	0. 5	0. 8	4. 4
28-C	His, 10	5. 5	145	90	0. 05	0. 2	0. 7	1. 2	6. 0
29-C	His, 10	5. 5	183	90	0. 05	0. 2	0. 6	1. 3	7. 5

40

【0 6 0 5】

表 5 4 に示されたように、凝集する傾向は抗体濃度の増加とともに増加する。しかしながら、2 6 週間の貯蔵の後、表 5 4 に示された組成物の安定化効果は、促進された条件のデータ（2 5 °C および 4 0 °C での貯蔵）によって実証されており、高い濃度の組成物を用いて相対的に低いレベルの凝集を示す。

50

【0606】

実施例 8-C

研究は、種々のレベルの EDTA を用いた組成物における、抗 MAdCAM 抗体 7.16.6 抗体の凝集傾向を評価するべく行われた。組成物は、最終的な抗体濃度が $80 \pm 10 \text{ mg/mL}$ に調整（された）ことを除いて、上記の実施例 5-C において記述されたように調製された。表 55 の組成物は、 5°C または 26°C において 26 週間貯蔵され、次いで SEC により上記のように分析された。

【0607】

【表 72】

10

表55

組成物 ID	緩衝剤、mM	pH	トリス、 $2\text{H}_2\text{O}$, mg/mL	Na_2EDTA , $2\text{H}_2\text{O}$, mg/mL	PS80, mg/mL	5°C における %凝集	25°C における %凝集
30-C	His, 10	5.5	90	0.02	0.2	0.6	0.9
26-C	His, 10	5.5	90	0.05	0.2	0.4	0.7
31-C	His, 10	5.5	90	0.10	0.2	0.5	0.8

【0608】

示されたように、 0.02 mg/mL の EDTA に比較して、 0.05 mg/mL および 0.10 mg/mL においては改善があり、かつ各々の場合に、EDTA の存在下での凝集は、 5°C で 26 週間の貯蔵後では低い。

【0609】

実施例 9-C

研究は、様々なレベルのポリソルベート 80 を用いた抗 MAdCAM 抗体 7.16.6 の組成物の安定性を評価するべく行われた。組成物は、最終的な抗体濃度が $80 \pm \text{mg/mL}$ に調整されたことを除いて、上記のように調製された。表 56 の組成物は、 25°C または 40°C において 26 週間貯蔵され、次いで SEC により上記のように分析された。

【0610】

【表 73】

20

30

表56

組成物 ID	緩衝剤、mM	pH	トリス、 $2\text{H}_2\text{O}$, mg/mL	Na_2EDTA , $2\text{H}_2\text{O}$, mg/mL	PS80, mg/mL	25°C における %凝集	40°C における %凝集
26-C	His, 10	5.5	90	0.05	0.2	0.7	3.6
32-C	His, 10	5.5	90	0.05	0.4	0.8	4.2
33-C	His, 10	5.5	90	0.05	1.0	1.0	4.8

40

【0611】

表 57 の組成物は、 300 rpm での軌道振盪による振盪ストレスに、周囲温度において 24 時間さらされた。組成物は、最終的な抗体濃度が $85 \pm \text{mg/mL}$ に調整されたことを除いて、上記のように調製された。

【0612】

【表 7 4】

表57

組成物 ID	緩衝剤、 mM	pH	トリアロ-λ. 2H ₂ O, mg/mL	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, mg/mL	PS80, mg/mL	外観
34-C	His, 10	5.5	90	0.10	0.2	わずかな微粒子の存在
35-C	His, 10	5.5	90	0.10	0.4	微粒子なし
36-C	His, 10	5.5	90	0.10	1.0	微粒子なし

10

【0613】

上記の貯蔵安定性の研究、ポリソルベート80のレベルを増加することで、可溶性の凝集レベルにわずかな増加を示しているが、振盪ストレス研究は、0.4mg/mLのポリソルベート80が振盪ストレスからの適切な防御を提供することを示している。

【0614】

実施例10-C

研究は、様々な緩衝剤を用いた組成物中の、抗MAdCAM抗体7.16.6の凝集傾向を評価するべく行われた。組成物は上記のように調製され、抗体の終濃度は80±10mg/mLに調整された。表58の組成物は、25℃または40℃において26週間貯蔵された。

20

【0615】

【表 7 5】

表58

組成物 ID	緩衝剤、 mM	pH	トリアロ-λ. 2H ₂ O, mg/mL	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, mg/mL	PS80, mg/mL	25℃における %凝集	40℃における %凝集
26-C	His, 10	5.5	90	0.05	0.2	0.7	3.6
37-C	クイン酸塩、5	5.5	90	0.05	0.2	1.7	6.0
38-C	コハク酸塩、5	5.5	90	0.05	0.2	1.0	4.9

30

【0616】

凝集のレベルは、ヒスチジン緩衝剤を用いた組成物において最も低かった。

【0617】

実施例11-C

研究は、種々の糖およびポリオールを用いた組成物中の、抗MAdCAM抗体7.16.6の凝集傾向を評価するべく行われた。組成物は上記のように調製され、抗体の終濃度は80±10mg/mLに調整された。表59の組成物は、40℃で26週間貯蔵された。

40

【0618】

【表 7 6】

表59

組成物 ID	緩衝剤、 mM	pH	糖/ホ°リオール、 mg/mL	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O、 mg/mL	PS80、 mg/mL	40℃における %凝集
26-C	His, 10	5.5	トレハロース. 2H ₂ O, 90	0.05	0.2	3.6
39-C	His, 10	5.5	スクロース, 85	0.05	0.2	4.8
40-C	His, 10	5.5	ソルビトール, 45	0.05	0.2	4.8
41-C	His, 10	5.5	キシリトール, 35	0.05	0.2	4.6

10

【0619】

凝集のレベルは、トレハロースを含有する組成物では、より低かった。

【0620】

実施例 12-C

研究は、種々の界面活性剤およびPEGを用いた組成物中の、抗MAdCAM抗体7.16.6の凝集傾向を評価するべく行われた。組成物は上記のように調製され、抗体の終濃度は80±10mg/mlに調整された。抗体組成物中の界面活性剤（または）PEGの終濃度は、界面活性剤またはPEGの濃縮ストック溶液からの適当な量の添加により達成された。表60の組成物は、40℃において26週間貯蔵された。

20

【0621】

【表 7 7】

表60

組成物 ID	緩衝剤、 mM	pH	トレハロース. 2H ₂ O, mg/mL	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, mg/mL	界面活性剤または PEG, mg/mL	40℃における %凝集
26-C	His, 10	5.5	90	0.05	PS80, 0.2	3.6
42-C	His, 10	5.5	90	0.05	PEG ₃₃₅₀ , 10	3.9
43-C	His, 10	5.5	90	0.05	NOF PS80, 0.2	3.9
44-C	His, 10	5.5	90	0.05	ホ°ロキサマー-407, 1.0	3.4
45-C	His, 10	5.5	90	0.05	ホ°ロキサマー-188, 1.0	4.1

30

【0622】

PS80およびポリオキサマー（Poloxamer）407を含有する組成物は、他の界面活性剤および両親媒性物質よりもわずかに良好に働いた。

【0623】

実施例 13-C

研究は、トレハロースまたはスクロースを用いた組成物中の、Met256酸化を評価するべく行われた。組成物は上記のように調製され、抗体の終濃度は80±10mg/mlに調整された。表61の組成物は5℃または40℃で26週間貯蔵された。メチオニン酸化は、リシルエンドプロテアーゼを用いてタンパク質を酵素的に消化することにより測定され、結果として得られたペプチドフラグメントは、逆相HPLCにより214nmの吸光度測定を用いて分離された。メチオニンまたはその酸化型を含有するペプチドフラグメントはモニターされた。ペプチド酸化は、元のメチオニンのものに比較した、酸化メチのピーク面積によって計算された。

40

【0624】

【表 7 8】

表61

組成物 ID	緩衝剤、 mM	pH	糖、 mg/mL	Na ₂ EDTA、 2H ₂ O, mg/mL	PS80, mg/mL	5℃における Met256の %酸化	40℃における Met256の %酸化
26-C	His, 10	5.5	トレハロ-ス、 2H ₂ O, 90	0.05	0.2	3.3	7.2
32-C	His, 10	5.5	トレハロ-ス、 2H ₂ O, 90	0.05	0.4	3.2	7.3
39-C	His, 10	5.5	スクロ-ス、 85	0.05	0.2	3.2	9.0

10

【0625】

トレハロースを含有する組成物は、スクロースを含有するものに比較して、低いメチオン酸化の傾向を示す。

【0626】

実施例 14-C

研究は、抗体濃度の高い組成物の、化学的安定性能を評価するべく行われた。表62および63の組成物は上記のように調製され、最終的な抗体濃度は80±10mg/mlに調整された。表62の組成物は5℃で26週間貯蔵された。化学的安定性はiCEにより測定された。測定は、pIマーカー、メチルセルロース、およびファルマライトを用いてタンパク質混合物を調製し、最終的なタンパク質濃度を約0.22μg/μLとすることにより行われた。電気泳動の作業は、3000ボルトにおける6分間のフォーカシング時間、および280nmの吸光プローブを用いて行われた。様々な荷電化学種の相対的なパーセントは、それらの各々のピーク下の面積によって測定された。

20

【0627】

【表 7 9】

30

表62

組成物 ID	緩衝剤、 mM	pH	トレハロ-ス、 2H ₂ O, mg/mL	Na ₂ EDTA、 2H ₂ O, mg/mL	PS80, mg/mL	iCEによる %主要バンド (初期)	iCEによる %主要バンド (26週)
26-C	His, 10	5.5	90	0.05	0.2	66.5	67.9
32-C	His, 10	5.5	90	0.05	0.4	66.6	67.3
31-C	His, 10	5.5	90	0.10	0.2	65.7	65.5

40

【0628】

表62の組成物は、主要な化学種ならびに、全酸性種または全塩基性種において有意な変化がないことから、良好な化学的安定性を示している。

【0629】

表63の組成物は、5℃で26週間貯蔵され、純度を測定するべく還元SDS-PAGEにより分析された。SDS-PAGEはNuPAGE4~12%Bis-Trisゲル、およびコロイダルブルー（クーマシー（Coomassie）ブルー）染色を用いて作業された。還元ゲル用には、還元はNu-PAGE還元剤により達成された。還元ゲル中のパーセント純度は、デンストメトリーにより：

%純度 = (%重鎖 + %軽鎖)

50

によって測定された。

【0630】

【表80】

表63

組成物 ID	緩衝剤、 mM	pH	トリアタ-ス 2H ₂ O, mg/mL	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O, mg/mL	PS80, mg/mL	還元SDS-PAGE による%純度 (初期)	還元SDS-PAGE による%純度 (26週)
26-C	His, 10	5.5	90	0.05	0.2	99.7	98.8
32-C	His, 10	5.5	90	0.05	0.4	99.7	98.8
31-C	His, 10	5.5	90	0.10	0.2	99.7	98.8

10

【0631】

表63の組成物は、5℃で26週間の貯蔵後に有意な純度の変化を示さず、良好な化学的安定性を示している。

【0632】

実施例15-C

20

研究は、凍結－融解のストレスに対する高濃度組成物の性能を評価するべく行われた。

【0633】

表64の組成物は上記のように調製され、最終的な抗体濃度は50±10mg/mLに調整された。表64の組成物は、-70℃/5℃か、または-20℃/5℃における3回の凍結－融解サイクルを受けた。研究は、2mLのガラスバイアルに1mLを入れて行われた。SE-HPLC測定は、0.2Mリン酸ナトリウム、pH7の移動相、TSKゲルG3000SWXLカラム、0.7mL/分の流速で、214nmのプローブを用いて行われた。凝集物の量は、抗体モノマーに先立って流出される抗体関連のピークを合計することによって測定された。

【0634】

30

【表 8 1】

表64

組成物 ID	組成物の説明	凍結-融解 サイクル	3サイクルの凍結-融解 後の外観	3サイクルの凍結-融解 後の%可溶性凝集 における変化
46-C	50mg/mL mAb 7.16.6, 10mM ヒスチジン、pH5.5, 90mg/mL トレハロース2水和物、 0.05mg/mL EDTA2ナトリウム2 水和物、 0.2mg/mL ホリスルベート80	-70C/5C	透明; 微粒子なし	0.0
47-C	50mg/mL mAb 7.16.6, 10mM ヒスチジン、pH5.5, 90mg/mL トレハロース2水和物、 0.05mg/mL EDTA2ナトリウム2 水和物、 0.2mg/mL ホリスルベート80	-20C/5C	透明; 微粒子なし	0.0

10

20

【0635】

表64の組成物は、 $-70^{\circ}\text{C}/5^{\circ}\text{C}$ か、または $-20^{\circ}\text{C}/5^{\circ}\text{C}$ における3回の凍結-融解サイクルの後、何ら凝集の増加を示さない。

【0636】

表65の組成物は上記のように調製され、最終的な抗体濃度は $75 \pm 15 \text{ mg/ml}$ に調整された。表65の組成物は、 $-20^{\circ}\text{C}/5^{\circ}\text{C}$ における4回の凍結-融解サイクルを受けた。これらの凍結-融解の研究は、10mlのガラスバイアルに10mlを入れて行われた。SEC測定は、本実施例において前文に示されたように行われた。

【0637】

30

【表 8 2】

表65

組成物 ID	組成物の説明	凍結-融解 サイクル	4サイクルの凍結-融解 後の外観	4サイクルの凍結-融解 後の%可溶性凝集 における変化
48-C	75mg/mL mAb 7.16.6, 10mM ヒスチジン、pH5.5, 90mg/mL トレハロース2水和物、 0.05mg/mL EDTA2ナトリウム2水和物、 0.4mg/mL ホリスルベート80	-20C/5C	透明; 微粒子なし	0.0
49-C	75mg/mL mAb 7.16.6, 10mM ヒスチジン、pH5.5, 90mg/mL トレハロース2水和物、 0.05mg/mL EDTA2ナトリウム2水和物、 0.2mg/mL ホリスルベート80	-20C/5C	透明; 微粒子なし	0.0
50-C	75mg/mL mAb 7.16.6, 10mM ヒスチジン、pH5.5, 85mg/mL スクロース、 0.05mg/mL EDTA2ナトリウム2水和物、 0.4mg/mL ホリスルベート80	-20C/5C	透明; 微粒子なし	0.0

10

20

【0638】

表65の組成物は、-20℃/5℃における4回の凍結-融解サイクルの後に、何ら凝集の増加を示さない。

30

【0639】

実施例16-C

研究は、凍結貯蔵の間の、高濃度組成物の安定性を評価するべく行われた。表66の組成物は上記のように調製され、最終的な抗体濃度は約75mg/mLに調整された。表21の組成物は-20℃において13週間貯蔵され、凝集は実施例15-Cに記述されたように評価された。

【0640】

【表83】

40

表66

組成物 ID	緩衝剤、 mM	pH	トレハロース、 2H ₂ O, mg/mL	Na ₂ EDTA、 2H ₂ O, mg/mL	PS80、 mg/mL	20℃における 凝集の%増加
51-C	His, 10	5.5	90	0.05	0.2	0.0

【0641】

高濃度(75mg/mL抗体)の組成物は、-20℃における13週間の貯蔵の後、何ら凝集の増加を示さない。

【0642】

50

実施例 17-C

研究は、高濃度組成物の粘性を評価するべく行われた。表 67 の組成物は上記のように調製され、最終的な抗体濃度は約 75 mg/mL に調整された。粘性測定は、レオメーターのプレート上に置かれた組成物に対し、300^{B-1}の平均剪断速度を適用することによって行われた。

【0643】

【表 84】

表67

組成物52-C:	mAb 7.16.6, mg/mL	5℃における粘性 cP
10mM ヒスチジン、pH5.5, 90mg/mL トレハロース2水和物、 0.10mg/mL EDTA2ナトリウム 2水和物、 0.4mg/mL ホリスルベート80	75	5.7

10

【0644】

組成物は、皮下投与に適した粘性を示している。

20

【0645】

本明細書において引用された全ての参考文献は、制限なく全ての論文、出版物、特許、特許出願、プレゼンテーション、テキスト、レポート、原稿、パンフレット、本、インターネットポスティング、雑誌記事、定期刊行物などを含め、その全てが参考として本明細書に含まれる。本文における参考文献についての議論は、それらの筆者によって作られた主張を要約することを意図したものに過ぎず、任意の参考文献が先行技術を構成することは認められていない。出願人は、引用された参考文献の正確さおよび適切さに対し、チャレンジする権利を保有する。

【0646】

上記の方法および組成物においては、本発明の範囲から離れることなく、多様な変更が行われることが可能であることから、上記の記述に含まれる全ての物質は、制限する意味においてではなく例証として解釈されよう。さらに、種々の態様についての観点は、全体又は部分の双方において相互に交換されてよいことが理解されるべきである。

30

【0647】

【化 4】

SEQUENCES

SEQ ID NO: 1

atggagttggggctgtgctgggtttcctgtgtctattttagaagggtgccagtgtaggtgcagctggaggagctgtggggaggcttggtac
 agcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagtttagtatgacctgggtccgccaggctccaggaaa
 ggggctggagtggtttcatacattagtagtagaagtagtaccatacctacgcagactctgtgaaggccgattcaccatctccagaga
 caatgccaaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagacgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagatcctctctag
 cgggagctaccttcttgactactggggccagggaacctgggtcacctgtcctcagcctccaccaaggggccatcggtcttccccctgg
 cgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcgccctgggtgcttgggtcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctgt
 ggaactcaggcgctctgaccagcggtgcacaccttccagctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcggtggtgacc
 gtgccctccagcaacttcggcaccacagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagacagttg
 agcgcaaatgtgtgtcagtgctgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagttctcttcccccaaaacccaagga
 caccctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgctgtggtgggtgagcgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtac
 gtggacggcggtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtctcac
 cgtgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggctccaacaaaggcctccagccccatcgagaaaacc
 atctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccggggaggagatgaccaagaaccagggtc
 agcctgacctgctgtgcaaaggcttclacccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagacaactaca
 agaccacacctcccatgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcagggga
 acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

10

20

SEQ ID NO: 2

MELGLCWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMTWVRQAPGK
 GLEWVSYISSRSSTISYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDPLLAGATFF
 DYWGQGTTLVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVRKCCVECPPCPAPP
 VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
 STFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

【 0 6 4 8 】

【化 5】

SEQ ID NO: 3

atggaaaccccagcgagcttcttctcctgctactctggctcccagataccaccggagaatttgtgtgacgcagctctccaggcaccc
tgtcttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagcagttacttagcctggtagcagcagaaa
cctggccaggctcccaggctcctcatctatggatccagcagggccactggcatcccagacaggttcagtggcagtggtctggga
cagacttcactctcaccatcagcagactggagcctgaagatttgcagtgattactgtcagcagtatggtagctcacctctcacttccggc
ggagggaccaagggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttccgccatctgatgagcagttgaaatctggaact
gcctctgttgtgtgcctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaatcgggttaactcc
caggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtg

10

SEQ ID NO: 4

METPAQLLFLLLLWLPD TTGEFVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQA
PRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

【 0 6 4 9 】

【化 6】

Ticilimumab (11.2.1) Heavy Chain DNA (SEQ ID NO: 21)

atggagtttg	ggctgagctg	ggtttttctc	gttgcctctt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggagggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcgt	ctggattcac	cttcagtagc	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagttata	tggtatgatg	gaagtaataa	atactatgca	240
gactccgtga	agggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgctgag	agatccgagg	360
ggagctaccc	tttactacta	ctactacggt	atggacgtct	ggggccaagg	gaccacgggc	420
accgtctcct	cagcctccac	caagggccca	tcggtcttcc	ccctggcgcc	ctgctccagg	480
agcacctccg	agagcacagc	ggccctgggc	tgctgtgtca	aggactactt	ccccgaaccg	540
gtgacgggtg	cgtggaactc	aggegtctctg	accagcggcg	tgacacacct	cccagctgtc	600
ctacagtcct	caggactcta	ctccctcagc	agcgtggtga	ccgtgccctc	cagcaacttc	660
ggcaccacaga	cctacacctg	caacgtagat	cacaagccca	gcaacaccaa	ggtggacaag	720
acagttgagc	gcaaatgttg	tgtcgagtgc	ccaccgtgcc	cagcaccacc	tgtggcagga	780
ccgtcagtcct	tctcttctcc	cccaaaaacc	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggacccct	840
gaggtcacgt	gcgtgggtgg	ggacgtgagc	cacgaagacc	ccgaggtcca	gttcaactgg	900
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cacgggagga	gcagttcaac	960
agcacgttcc	gtgtgggtcag	cgtcctcacc	gttgtgcacc	aggactggct	gaacggcaag	1020
gagtacaagt	gcaagggtctc	caacaaaggc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	1080
aaaaccaaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccatc	ccgggaggag	1140
atgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctgggtcaaag	gcttctaccc	cagcgacatc	1200
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	acctcccatg	1260
ctggactccg	acggctcctt	cttcctctac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	1320
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1380
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa	tga			1413

10

20

Ticilimumab (11.2.1) Heavy Chain Protein (SEQ ID NO: 22)

[QVQLVESGGG	VVQPGRSLRL	SCAASGFTFS	SYGMHWVRQA	PGKGLEWVAV	IWYDGSNKYY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDP	RGATLYYYYY	GMDVWGQGT	120
VTSS]ASTKG	PSVFPLAPCS	RSTSESTAAL	GCLVKDYFPE	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA	180
VLQSSGLYSL	SSVVTVPSSN	FGTQTYTCNV	DHKPSNTKVD	KTVRKCCVE	CPPCPAPPVA	240
GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVQFN	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQF	300
NSTFRVSVL	TVVHQDWLNG	KEYKCKVSNK	GLPAPIEKTI	SKTKGQPREP	QVYTLPPSRE	360
EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTPP	MLDSDGSFFL	YSKLTVDKSR	420
WQQGNVFSCS	VMHEALHNHY	TQKSLSLSPG	K			451

30

【0650】

可変領域（配列番号25）は、〔括弧の間〕に描かれており、CDRには下線が付されている。CDR1は配列番号27により、CDR2は配列番号28により、CDR3は配列番号29によって示されている。

【0651】

【化 7】

Ticilimumab (11.2.1) Light Chain DNA (SEQ ID NO: 23)

```

atggacatga gggtecccgcc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagagc attaacagct atttagattg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagcccctaa actcctgata tatgctgcat ccagtttgca aagtgggggc 240
ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtctg 300
caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagtatt acagtactcc attcactttc 360
ggccctggga ccaaagtgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
cagggcctga gctcgcccg tcaaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta gtga 714

```

10

Ticilimumab (11.2.1) Light Chain Protein (SEQ ID NO: 24)

```

【DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIK]RTV AAPSVFIFPP 120
SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT 180
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEQ 214

```

20

【0652】

可変領域（配列番号26）は、〔括弧の間〕に描かれており、C D Rには下線が付されている。C D R 1は配列番号30により、C D R 2は配列番号31により、C D R 3は配列番号32によって示されている。

【0653】

【化 8】

SEQ ID NO. 41

7.16.6 Heavy Chain Nucleotide Sequence

1 atggactgga cctggagcat cttttcttg gtggcagcag caacaggtgc
 51 ccactccCAG GTTCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
 101 GGGCCTCAGT GAAGGTCTCC TGCAAGGCTT CTGGTTACAC CTTTACCAGC
 151 TATGGTATCA ACTGGGTGCG ACAGGCCCTT GGACAAGGGC TTGAGTGGAT
 201 GGGATGGATC AGCGTTTACA GTGGTAACAC AAATATGCA CAGAAGGTCC
 251 AGGGCAGAGT CACCATGACC GCAGACACAT CCACGAGCAC AGCCTACATG
 301 GACCTGAGGA GCCTGAGATC TGACGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG
 351 AGAGGGTAGC AGCTCGTCCG GAGACTACTA TTACGGTATG GACGTCTGGG
 401 GCCAAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG
 451 GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGC
 501 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT
 551 GGAATCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCCTA
 601 CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
 651 CAACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
 701 ACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCA
 751 CCGTGCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC
 801 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCG
 851 TGGTGGTGGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC
 901 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCA
 951 GTTCAACAGC ACGTTCCTGT TGGTCAGCGT CCTCACCCTT GTGCACCAGG
 1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC
 1051 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGA
 1101 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC
 1151 AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
 1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACC
 1251 TCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACC
 1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
 1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
 1401 GGGTAAATGA

10

20

SEQ ID NO. 42

7.16.6 Predicted Heavy Chain Protein Sequence

1 mdwtwsilfl vaaatgahsQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTS
 51 YGINWVRQAP GQGLEWMGWI SVYSGNTNYA QKVQGRVTMT ADTSTSTAYM
 101 DLRLSRDDT AVYYCAREGS SSSGDYYYGM DWVGQGTIVT VSSASTKGPS
 151 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
 201 QSSGLYSLSS VVTPSSNFG TQTYTCNVDH KPSNTKVDKT VERKCCVECP
 251 PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLNISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY
 301 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVSLTV VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
 351 PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
 401 VEWESNGQPE NNYKTTTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
 451 HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

30

40

【 0 6 5 4 】

SEQ ID NO. 43

10

20

【化 1 0】

SEQ ID NO. 44
7.16.6 Kappa Light Chain Protein Sequence

30

SEQ ID NO: 45
MAdCAM-IgG₁ Fc Fusion Protein:

40

【 0 6 5 6 】

【図 2】 40℃に6週間保存した抗-M-CSF抗体8.10.3F組成物による、IE

50

Fゲル中でのパーセントメジャー（等電点焦点）I E Fバンドを示す線グラフを示す。

【図3】40℃に6週間保存した抗-M-C S F抗体8. 10. 3 F組成物による、S E-H P L Cデータから決定されるパーセント凝集を示す線グラフを示す。

【図4】40℃に26週間保存した抗-M-C S F抗体8. 10. 3 F組成物による、S E-H P L Cデータから決定されるパーセント凝集を示す線グラフを示す。

【図5】40℃に26週までの間保存した抗-M-C S F抗体8. 10. 3 F組成物による、有機S E-H P L Cデータから決定されるパーセント・フラグメンテーション（約11 k D）を示す線グラフを示す。

【図6】40℃に26週間保存した抗-M-C S F抗体8. 10. 3 F組成物による、S D S-P A G E還元ゲルからのパーセント・フラグメンテーションを示す線グラフを示す 10

。【図7】40℃に26週間保存した抗-M-C S F抗体8. 10. 3 F組成物による、S D S-P A G E非還元ゲルからの残存する抗体モノマーのパーセントを示す線グラフを示す。

【図8】40℃に26週間保存した抗-M-C S F抗体8. 10. 3 F組成物11および9の有機S E-H P L Cクロマトグラム（y軸に拡大して示す）を示す。

【図9】40℃に6週間保存した抗-M-C S F抗体8. 10. 3 F組成物のS D S-P A G E還元ゲルの写真を示す。

【図10】40℃に6週間保存した組成物1（最上段）における抗-M-C S F抗体8. 10. 3 Fの有機S E-H P L Cクロマトグラムを対照サンプル（最下段）と比較して示す。 20

【図11】40℃に26週間組成物11中に保存した抗-M-C S F抗体8. 10. 3 FのS E-H P L Cクロマトグラム示す。

【図12-1】図12A～12Dからなり、抗-M-C S F抗体8. 11. 3 Fの核酸およびアミノ酸配列を示す。図12Aは8. 11. 3 F重鎖（配列番号1）の全長核酸配列を示す。図12Bは8. 11. 3 F重鎖（配列番号2）の全長アミノ酸配列を示し、8. 11. 3 F重鎖可変領域のアミノ酸配列は大文字で、かつ括弧内“ [] ”に指定する（配列番号5）。各8. 11. 3 F重鎖C D Rのアミノ酸配列には下線を引き、小文字とする。重鎖C D Rアミノ酸配列は以下のとおりである：C D R 1：G F T F S S F S M T（配列番号7）；C D R 2：Y I S S R S S T I S Y A D S V K G（配列番号8）；および 30 C D R 3：D P L L A G A T F F D Y（配列番号9）。

【図12-2】図12Cは全長8. 11. 3 F軽鎖（配列番号3）の核酸配列を示す。図12Dは全長8. 11. 3 F軽鎖（配列番号4）のアミノ酸配列を示し、8. 11. 3 F軽鎖可変領域は大文字で、かつ括弧内“ [] ”に指定する（配列番号6）。各軽鎖C D Rアミノ酸配列は以下に示すとおりである：C D R 1：R A S Q S V S S S Y L A（配列番号10）；C D R 2：G A S S R A T（配列番号11）；およびC D R 3：Q Q Y G S S P L T（配列番号12）。

【図13】40℃で7週まで保存した後の種々試験組成物におけるサイズ排除クロマトグラフィー（S E C）によるパーセント凝集を示す棒グラフである。

【図14】40℃で7週まで保存した後の種々試験組成物における還元型S D S P A G E 40（r S D S P A G E）によるパーセント総加水分解（フラグメンテーション）不純物形成を示す棒グラフである。

【図15】40℃で24週までの加速条件下の保存に対する種々試験組成物におけるS E Cによるパーセント凝集を示す線グラフである。

【図16】40℃で24週までの加速条件下の保存に対する種々試験組成物におけるr S D S P A G Eによるパーセント総加水分解性（フラグメンテーション）不純物形成を示す線グラフである。

【図17】40℃で24週までの加速条件下の保存に対する種々試験組成物におけるS E Cによるパーセント凝集を示す線グラフである。

【図18】40℃で24週までの加速条件下の保存に対する種々試験組成物におけるr S 50

D S P A G Eによるパーセント総加水分解（フラグメンテーション）不純物形成を示す線グラフである。

【図 1 9】4 0℃で2 4週までの加速条件下の保存に対する種々試験組成物におけるパーセント凝集を、S E CによるE D T Aレベルの関数として示す棒グラフである。

【図 2 0】4 0℃で2 4週までの加速条件下の保存に対する種々試験組成物におけるパーセント総加水分解（フラグメンテーション）不純物形成を、r S D S P A G EによるE D T Aレベルの関数として示す棒グラフである。

【図 2 1】4 0℃で1 3週までの加速条件下の保存に対する種々試験組成物におけるパーセント凝集をS E Cにより示す線グラフである。

【図 2 2】4 0℃で1 3週までの加速条件下の保存に対する種々試験組成物におけるパーセント総加水分解（フラグメンテーション）不純物形成をr S D S P A G Eにより示す線グラフである。 10

【図 2 3－1】図 2 3 A～2 3 Dを含み、現在チシリムマブ（ticilimumab）と言われる抗－C T L A 4抗体1 1．2．1のヌクレオチド配列とアミノ酸配列を示す。図 1 1 Aは1 1．2．1重鎖（配列番号2 1）の全長ヌクレオチド配列を示す。図 1 1 Bは1 1．2．1重鎖（配列番号2 2）の全長アミノ酸配列を示し、該1 1．2．1重鎖可変領域のアミノ酸配列は括弧“ [] ”で示す（配列番号2 5）。各1 1．2．1重鎖C D Rのアミノ酸配列には下線を付す。C D R配列は以下のとおりである：C D R 1：G F T F S S Y G M H（配列番号2 7）；C D R 2：V I W Y D G S N K Y Y A D S V（配列番号2 8）；およびC D R 3：D P R G A T L Y Y Y Y Y G M D V（配列番号2 9）。 20

【図 2 3－2】図 2 3 Cは1 1．2．1軽鎖（配列番号2 3）のヌクレオチド配列を示す。図 2 3 Dは全長1 1．2．1軽鎖（配列番号2 4）のアミノ酸配列を示し、該1 1．2．1軽鎖可変領域は括弧“ [] ”で示す（配列番号2 6）。各C D Rのアミノ酸配列は以下のとおりである：C D R 1：R A S Q S I N S Y L D（配列番号3 0）；C D R 2：A A S S L Q S（配列番号3 1）；およびC D R 3：Q Q Y Y S T P F T（配列番号3 2）。 30

【図 2 4】4 0℃で2 6週まで保存後の、モノクローナル抗体濃度の異なる種々試験組成物におけるS E Cによるパーセント凝集を説明するグラフを示す。

【図 2 5】4 0℃で2 6週まで保存後のE D T A濃度の異なる種々試験組成物におけるS E Cによるパーセント凝集を説明するグラフを示す。 30

【図 2 6】4 0℃で2 6週まで保存後のポリソルベート8 0濃度の異なる種々試験組成物におけるS E Cによるパーセント凝集を説明するグラフを示す。

【図 2 7】4 0℃で2 6週まで保存後のバッファ種々の異なる種々試験組成物におけるS E Cによるパーセント凝集を説明するグラフを示す。

【図 2 8】4 0℃で2 6週まで保存後の安定剤／等調化剤種の異なる種々試験組成物におけるS E Cによるパーセント凝集を説明するグラフを示す。

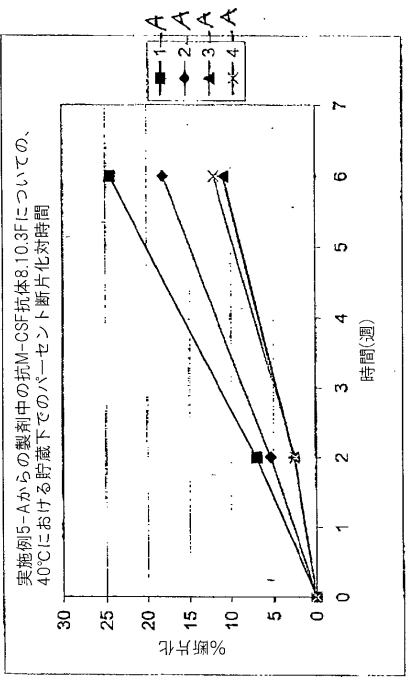
【図 2 9】4 0℃で2 6週まで保存後の界面活性剤種の異なる種々試験組成物におけるS E Cによるパーセント凝集を説明するグラフを示す。

【図 3 0－1】図 3 0 A～3 0 Eからなり、抗－M A d C A M抗体7．1 6．6のヌクレオチド配列とアミノ酸配列を示す。図 3 0 Aは7．1 6．6重鎖（配列番号4 1）のヌクレオチド配列を示す。図 3 0 Bは7．1 6．6重鎖（配列番号4 2）のアミノ酸配列を示す。 40

【図 3 0－2】図 3 0 Cは7．1 6．6軽鎖（配列番号4 3）のヌクレオチド配列を示す。図 3 0 Dは全長7．1 6．6軽鎖（配列番号4 4）のアミノ酸配列を示す。図 3 0 EはM A d C A M－I g G₁F c融合タンパク質（配列番号4 5）のアミノ酸配列を示す。

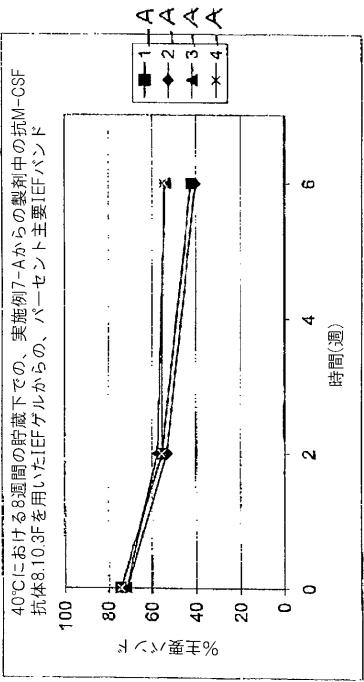
【図 1】

図1



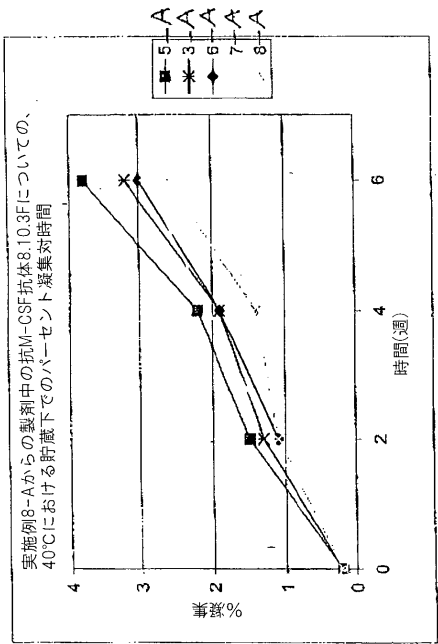
【図 2】

図2



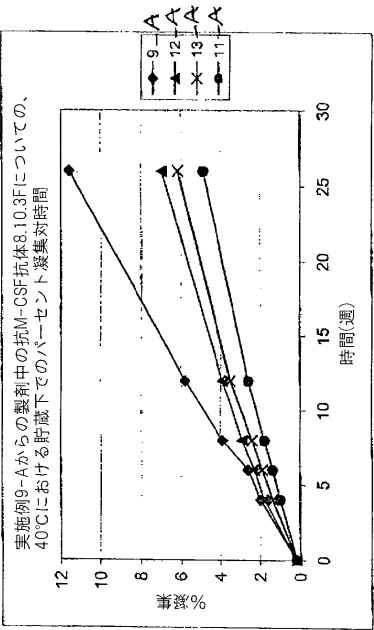
【図 3】

図3



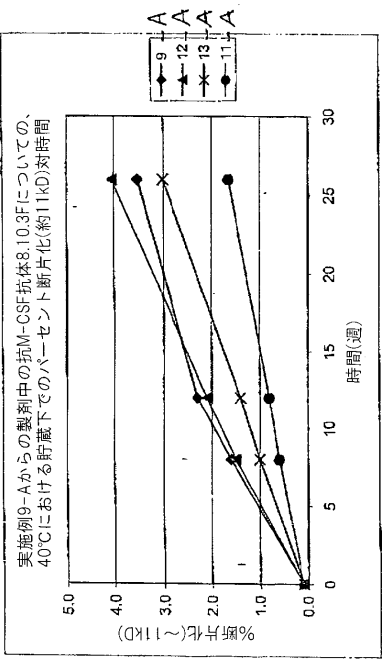
【図 4】

図4



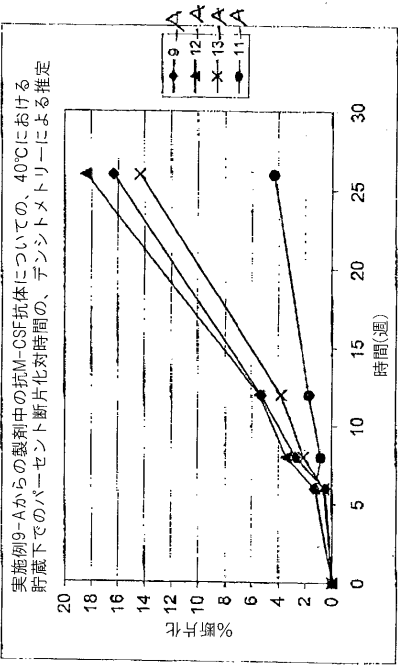
【図 5】

図5



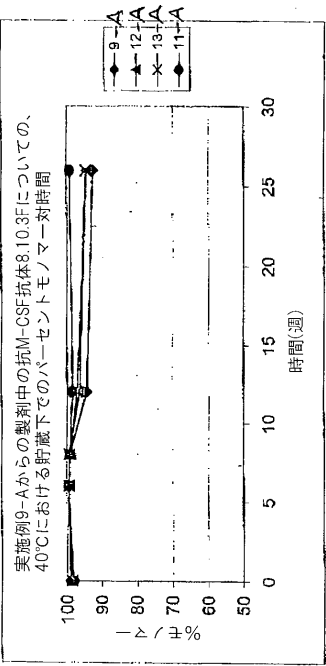
【図 6】

図6



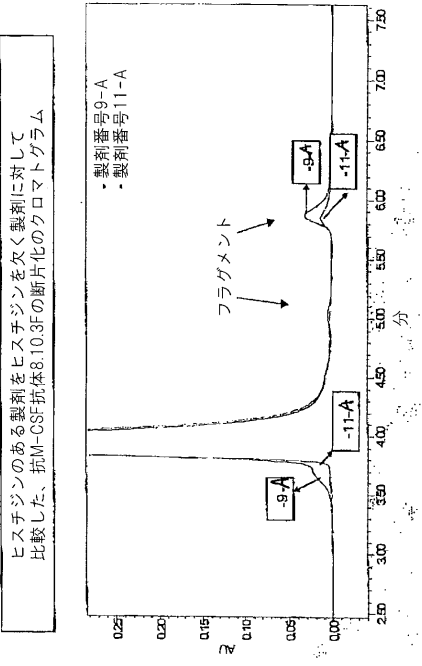
【図 7】

図7



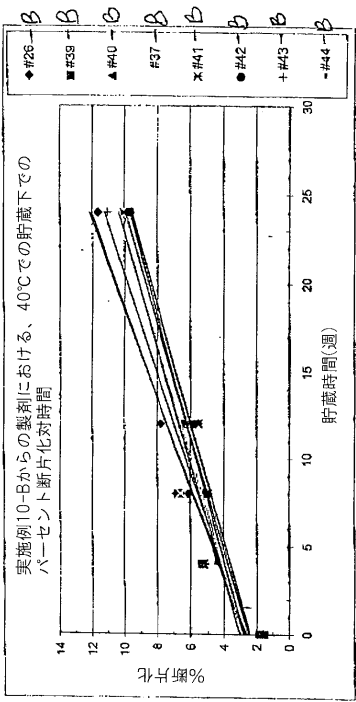
【図 8】

図8



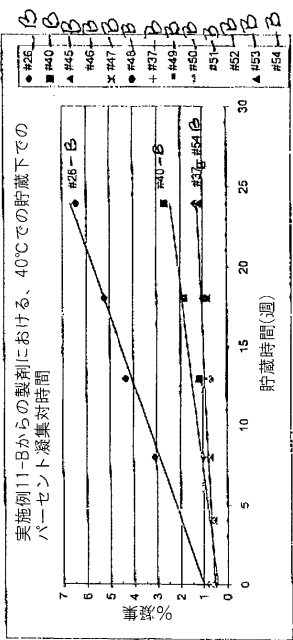
【図 16】

図16



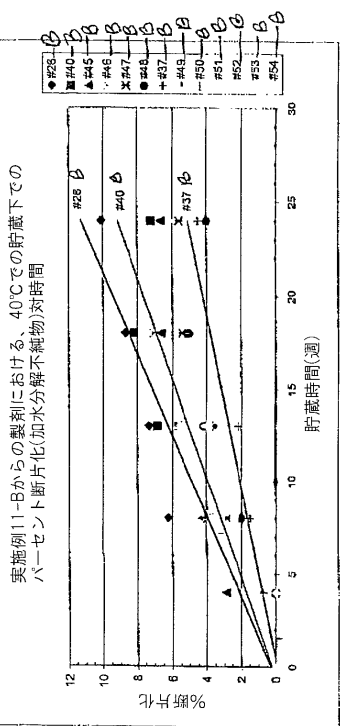
【図 17】

図17



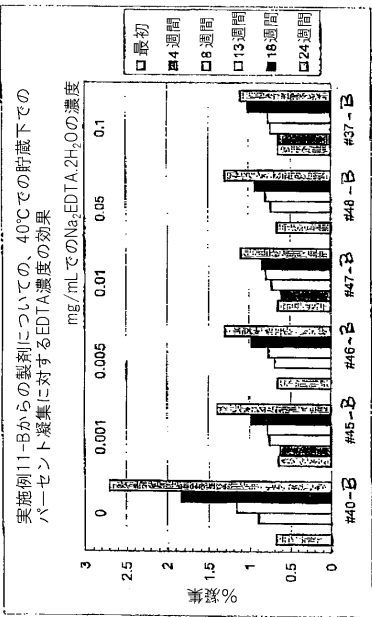
【図 18】

図18



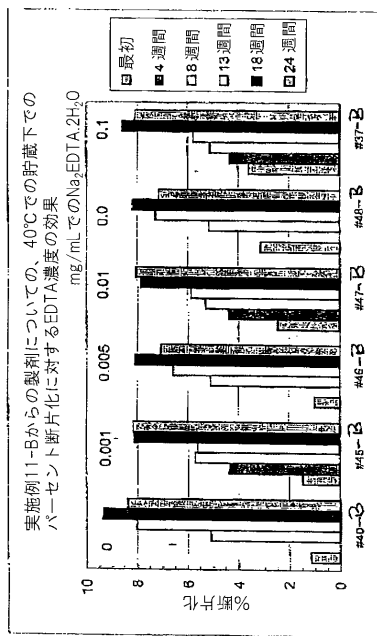
【図 19】

図19



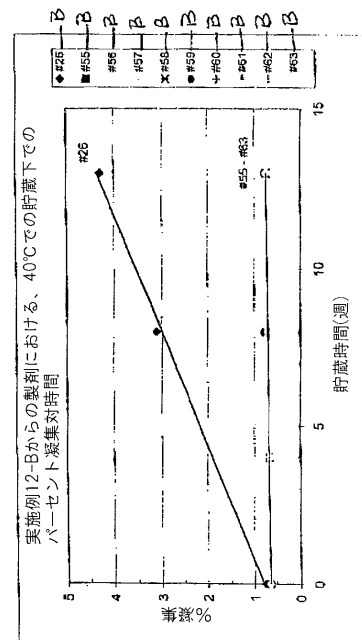
【図 20】

図20



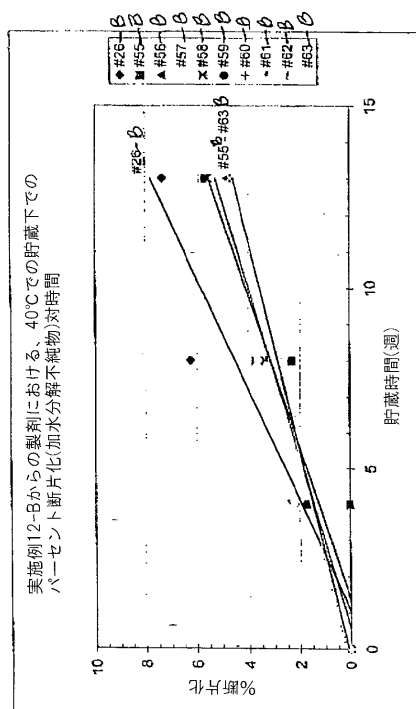
【図 21】

図21



【図 22】

図22



【図 23-1】

図23-1

Figure 23A Ticilimumab(11.2.1)重鎖DNA(配列番号21)

```

atggagcttg ggcagagctg ggtttctctc gtgtccttt taagaggtat ccaggtctca 60
ggagagcttg tggagctctg gggagagctg gtccagcttg gggagctctc gagagctctc 120
tgtgagagct ctgagctctc ctccagcttg atggagcttg atggagcttg ccaggtctca 180
ggcagagagc tggagctctg ggcagctctc tggagcttg ggcagctctc ccaggtctca 240
gagctctctg aggcagcttg ctccagcttg aggcagcttg aggcagcttg ccaggtctca 300
caatgagctg ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 360
ggcagctctc ctccagcttg ctccagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 420
agcagctctc ctccagcttg ctccagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 480
agcagctctc ctccagcttg ctccagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 540
gtgagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 600
ctccagcttg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 660
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 720
agcagctctc ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 780
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 840
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 900
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 960
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 1020
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 1080
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 1140
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 1200
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 1260
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 1320
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 1380
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 1440
ggcagctctg ggcagctctg ggcagcttg ggcagcttg ggcagcttg ccaggtctca 1500

```

Figure 23B Ticilimumab(11.2.1)重鎖アミノ酸(配列番号22)

```

IQVIVESGGG VVQVPSRLSL SCAASGTFSS EYEMHWQA PCKGLWVAW IYVDSNGVY 60
ADGVKGFRTI SRDNRNTLY LQNSLRAD TAVYICARDP NGATLYVYXX RMDVWQDPT 120
TVYVSIASDG PVPFLAPCS RSTSEFAL GCYVVDYTP PTVYVNSRDA LPSGWHFFA 180
VLQSSGLYSI SVVTVVSSN PGTQYVTVN DHRFENTXVD KTVRKKCVCE CPDPAFPVA 240
GPVSLFPFPK SKDTIMISRT PRVTCVVVD SHEDFVQPN WYVQGVVHN AKTKPRSEGF 300
NSTRVIVSVL TVYVQDMLNG KYVCKVSNK GLPAPLEKTI SKIKGUPRF QYVLPVPSR 360
EMTKNVVSLT CLVGGFYPSD IAVEMESNGQ PENNYKTFPR NLDSGDSFPL YSKLTVDKSR 420
WQQGNVFCSS VMHSAIINHY TQKSLSLSPG K 480

```

可変領域(配列番号26)は[括弧の間]に描かれており、CDRは下線が付されている。CDR1は配列番号27により、CDR2は配列番号28により、CDR3は配列番号29によって示されている。

【図 2 3 - 2】

図23-2

Figure 23C Ticilimumab(11.2.1)軽鎖DNA(配列番号23)

```

atggacatga gggctccccc tcagctcttg gggctctctg tactcttggt ccagagtgcc 60
agatgtgaca tccagatgac ccagctctca tctctccctg ctgcatctgt agggagcaga 120
gtaccctcca ctgpcggggg agtccagagc atcaacagct attagatgtg gtaacagcag 180
aaacacagga aagccctctaa actctctgac tatctgtcat ccagtttgca aagtggggtc 240
ccatccaggt tccgtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaacat cagcagttctg 300
cacctgaag atttgagac tcatctctgt cgaagtttcc acgtactccc attcatcttc 360
ggcctctgga ccaagtgga aatcaacaga actgtggctg caccatctgt ctctatcttc 420
ccgcatctgt atgagcagtt gaattctega actgctctga ttgtgtgctt gctgaataac 480
ttcatctcca ggaagcaca agtacugtg aagtgagata acgctctcca atcgggttac 540
tccagagaga gtatcacaga cccagacagc aaggacagca ctacacgctt cagcagcacc 600
ctgagcttga gcaagcaga ctacagagaa cacaagctct acgctctgca agtcacccat 660
caggcctgga acctgcctgt cacaagagc ttcaacaggg gagagtttta gtga 724

```

Figure 23D Ticilimumab(11.2.1)軽鎖アミノ酸(配列番号24)

```

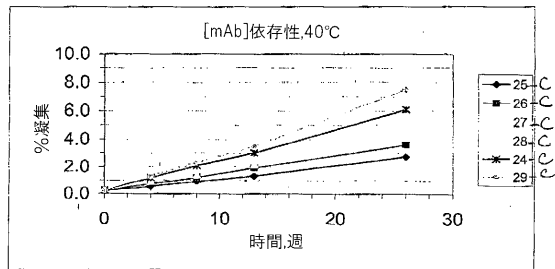
[DTQNTQSPSS LGAEVGDRTV TCRASSQSLN EYLIMVQOKP GNAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60
RFSQSGSGTD FTLTISSLOP EDFATYYCCQ YVYFETFCF GPKVETIK]RTV AAPSVFIFPP 120
SDEQLKSGTA SVVCLLNHY PRRAEVQMKV DNALQSGNSQ ESVTRQDSKD STYSLSETLT 180
LSKADYKSKK VIACEVTHQC LSSPVTKSFN NGEK 214

```

可変領域(配列番号26)は[括弧の間]に描かれており、CDR1は下線が付されている。CDR1は配列番号30により、CDR2は配列番号31により、CDR3は配列番号32によって示されている。

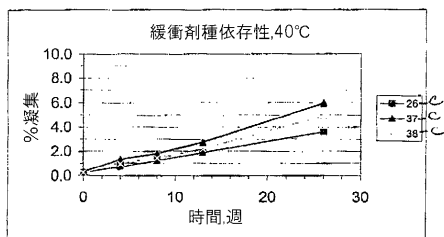
【図 2 4】

図24



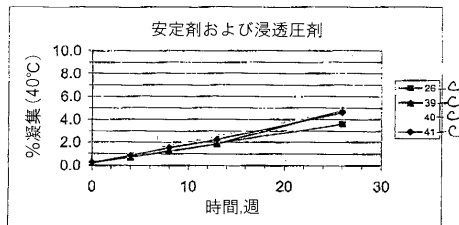
【図 2 7】

図27



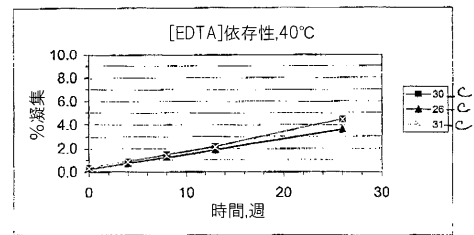
【図 2 8】

図28



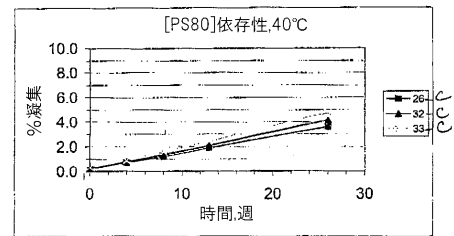
【図 2 5】

図25



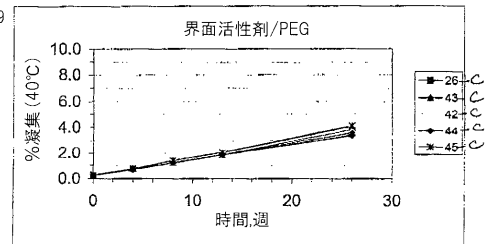
【図 2 6】

図26



【図 2 9】

図29



【図 30 - 1】

図30-1

Figure 30A 7.16.6重鎖ヌクレオチド配列(配列番号41)

```
1 atggactgaa cctggggcct cctttttctg atggcagcag caacagggtgc
51 ccaactccag gttagctgg tgcagctctgg acctgaggtg aagaaacctg
101 ggacctcact gaggctctcc tgcagacctt ctgcttagac ctttaccagc
151 ttatgtatca acttggctgc acagctccct gaaacaggcc ttgagtggat
201 gggatgattc agcgtttaca ctggttaacac aaactatgca cagaaggtcc
251 agggcagagt caccatgacc gcagacacat ccacgagcac agcctacatg
301 gacctgagga gctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtccag
351 aagaggtgac agctgtctgc ggaattctta ttacgtatg gactgtccgg
401 gccaggggac cagcgtcacc gttctctcag cctccaccaa ggcccactgc
451 gttctcccc ttggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagcgcc
501 cctggcctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt
551 ggaactcagg gcctctgacc agcggcctgc acacttccc agctgtccga
601 cagctctcag gactctactc cctcaggagc ctgttgagcc tgacctccag
651 caacttccgc acccagacct acacctgcga cgtagaatca agcccagca
701 acaccagggt ggacaagaca gttgagcgca aatgttgtgt cgaagtccca
751 ccgtgccccg caccacctgt gccagagcgc tcagcttccc tcttcccccc
801 aaacccuag gacacctca tgaattcccc gacccctgag gtacgtccg
851 tgggtgtgaa cgtgagccac gaagaccgcc aggttcaggt cactgtgac
901 gtgagcgccg tggaggtgca taatcccaag acaaagccac ggagagagca
951 gttcaacagc agcttccctg ttggtcagctt cctcaccgtt gtgcaccagg
1001 actggtgrra cggcaaggag tacaaagtga aggtctccaa caaaggcctc
1051 ccagacccca tgcagaaaac caactccaaa accaaaggcc agcctcagaa
1101 accacagctg taccactctc cctcaccctc ggagagatg accaaagacc
1151 aggtcagctt gacctgctgt gtcacagcgt tctacccacg gcacaccacc
1201 gtgagtgagg agagcaatgg ctgacggagc aacacatcac agaccacacc
1251 ttcacatgct gacttccgag cttccttctt cctctacagc aagctcaccg
1301 tgaacagagc cagctggcag cagggagacc tctctctatc cctcctgagc
1351 catgagctc tgcacaccca ctacacccag aagacctctc cctctctccc
1401 gggtaaatga
```

Figure 30B 7.16.6重鎖タンパク質配列(配列番号42)

```
1 mdwtwslfl vgaatqahsq volvqgaev krfgaevkvs ckasgytpts
51 yginyvraqp gqolewmghi svvsgntnya qrvqgrvmtz adtststzym
101 dlrlrsddt avyycaregs sssgdytygm dvwgqstvyt vssastkgs
151 vtflapssis tgsyaaalc lvwydfpfpv tvisrsgalt sgvntfpafl
201 qsslsylsfs vvtvfpfnfg tzytysnvdr kfsntkvdkt verkkcvzcp
251 fcpafpvagf svflfppkpk dtlmistrpe vtcvvvdvsh edpveqfnwy
301 vdgvevhnak tkpredefns tfrvvsvltv vhcwlanke ykckvsnkgl
351 pafiektsk tkqqrerqv ytlfprsedn trnqvslrcl vkgyfslia
401 vewesnqrf nnyvtpeml dsdgsfflyg kltyvksrhnq qgnvfscsvh
451 hralhnhytq kslslspgk
```

【図 30 - 2】

図30-2

Figure 30C 7.16.6軽鎖ヌクレオチド配列 配列番号43

```
1 atcaggctcc ctgtcaggtc cctggggctg ctatgctctc gbasagctgg
51 atccagtgga gattatttga tgaccagag tccactctct ctgtccctca
101 cccctcgaca gccgcctcc atctccttga agtctagta gagctccctg
151 catactgagc gaacgacctc ttctgatttg tactcgaga agccagccca
201 gcctccacag ctctgattct atgaagtgtc caaccggttc tctggagtcg
251 cagataggtt cagtggcacc gggtcagga cagatttcac actgaagatc
301 agcccgctgg agcgtgagga ttttgggatt ttattctcca tccaaatgat
351 acagcttccg tggagcttgc gccaaaggac caaggtgaaa atcaaacgaa
401 ctgtgctgac accactctgc ttcatcttcc ccccatctga tgagcagttg
451 aaactcgaaa ctgctctgtt tgtctgcttg ctgaatraa tctatccag
501 agagcccaa gtacagtgga agstgataa cgcctccaa tgggttaact
551 cccggagagc gttcacagac cagacacaca agkacagcac ctacagctc
601 agcacacacc tgacctgagc caaagcacac tacagaaac acaaatctta
651 cgccctcgaa gtacccatgc agggcctgag ctggccctgc acaagagctt
701 tcaacaggag agagtgttag tga
```

Figure 30D 7.16.6軽鎖タンパク質配列(配列番号44)

```
1 mrlpallol lnlwlpqssa diwhtctpls lsvtpqpas isckssqsls
51 htgcttydm ylkrgqpfq lllyvsnrv svvdpfsgs gsofddtlki
101 srveadvgi ycmqntqlp wtfggctkve ikrtvaapfv ftfppsdcol
151 ksutavvcl lnnfyreak vqkvdnalo sgnsqsvte qdskdstyls
201 sstltlskad yekhyvace vthqqlsspv tksfnroec
```

Figure 30E MadCAM-IgG₁Fc融合タンパク質：(配列番号45)

```
MDPGLALIALGLGLLIQSLSQVKPLQVEPPEPVVAVALGASRLTCRLACADRGASVQWR
GLDLSLGAVOSDTRSVLTVRNALSAAGTRVCVSGCGGRTFQHTVOLLYVAFPDQLTVSP
AALVPGDPEVACTAHKVPVDPNALSFSLVGGOLEGAQALGPEVQEEEEEPQGEDVLF
RVTERWRPLPLGTPVPPALYCAATMRPLGLELSHRQAIPVLHSPTSPEPPDITSPSPDTS
PESPDITSGEPPDITSGEPPDITSGEPPDITSGEPPDITSGEPPDITSGEPPDITSGEPPDIT
RPPHIGPKSDKTHITCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMSRTPVITCVVDVSHEDPE
VKFNWYVGDVEVHNAKTPREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKKEYKCKVSNKALPAPIE
KTSKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
```

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	11/04	(2006.01)	A 6 1 P	11/04	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	13/10	(2006.01)	A 6 1 P	13/10	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	9/14	(2006.01)	A 6 1 P	9/14	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	3/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/02	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	5/50	(2006.01)	A 6 1 P	3/02	1 0 4
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	1/02	(2006.01)	A 6 1 P	5/50	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/02	
A 6 1 P	41/00	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	41/00	
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/00	
A 6 1 P	1/14	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/14	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
C 0 7 K	16/24	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
			A 6 1 K	47/22	
			C 0 7 K	16/24	Z N A

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(72)発明者 タパン カンティ ダス

- アメリカ合衆国, ミズーリ 63017, チェスターフィールド, チェスターフィールド パーク
 ウェイ ウェスト 700, ファイザー グローバル リサーチ アンド ディベロップメント
 (72)発明者 ケビン キング
- アメリカ合衆国, ミズーリ 63017, チェスターフィールド, チェスターフィールド パーク
 ウェイ ウェスト 700, ファイザー グローバル リサーチ アンド ディベロップメント
 (72)発明者 サンディーブ ネマ
- アメリカ合衆国, ミズーリ 63017, チェスターフィールド, チェスターフィールド パーク
 ウェイ ウェスト 700, ファイザー グローバル リサーチ アンド ディベロップメント
 (72)発明者 サティシュ クマー シング
- アメリカ合衆国, ミズーリ 63017, チェスターフィールド, チェスターフィールド パーク
 ウェイ ウェスト 700, ファイザー グローバル リサーチ アンド ディベロップメント
 (72)発明者 デイビッド イーサン スタインマイヤー
- アメリカ合衆国, ミズーリ 63017, チェスターフィールド, チェスターフィールド パーク
 ウェイ ウェスト 700, ファイザー グローバル リサーチ アンド ディベロップメント
 (72)発明者 デイビッド リーゼン
- アメリカ合衆国, ミズーリ 63017, チェスターフィールド, チェスターフィールド パーク
 ウェイ ウェスト 700, ファイザー グローバル リサーチ アンド ディベロップメント
- F ターム(参考) 4C076 AA12 CC03 CC07 CC29 DD01 DD22 DD23 DD30 DD41 DD42
 DD43 DD51 DD60 EE23 FF15 FF16 FF36 FF43 FF61 FF63
 FF68 GG43 GG45 GG46
 4C085 AA14 BB36 CC22 DD22 EE05 EE07
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA75 DA76 EA20 EA50 FA71 FA72
 GA26 GA45

【外国語明細書】

2006249085000001.pdf