

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-525680

(P2017-525680A)

(43) 公表日 平成29年9月7日(2017.9.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40	4 C O 7 6
C07K 1/14 (2006.01)	C O 7 K 1/14	4 C O 8 5
A61P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	4 H O 4 5
A61K 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 9/00	
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 V	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-502195 (P2017-502195)
 (86) (22) 出願日 平成27年7月13日 (2015.7.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年2月14日 (2017.2.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/040217
 (87) 国際公開番号 W02016/010927
 (87) 国際公開日 平成28年1月21日 (2016.1.21)
 (31) 優先権主張番号 62/024,393
 (32) 優先日 平成26年7月14日 (2014.7.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500203709
 アムジェン インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 913
 20, サウザンド オークス, ワン
 アムジェン センター ドライブ
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者
 カーラフ, ナーゼル
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01
 527, ミルベリー, ゴールド スト
 リート 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結晶性抗体製剤

(57) 【要約】

抗 P C S K 9 抗体結晶、このような抗体結晶及び抗体結晶を含む製剤を作製する方法が、本明細書に記載される。本明細書に記載される結晶または製剤では、抗 P C S K 9 I g G は、抗体、すなわち 2 1 B 1 2 の重鎖及び軽鎖相補性決定領域 (C D R) を含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 9 における C D R L 1 配列の軽鎖相補性領域 (C D R)、配列番号 9 における C D R L 2 配列の C D R L 2、及び配列番号 9 における C D R L 3 配列の C D R L 3、ならびに配列番号 5 における C D R H 1 配列の重鎖相補性決定領域 (C D R)、配列番号 5 における C D R H 2 配列の C D R H 2、及び配列番号 5 における C D R H 3 配列の C D R H 3 を含む I g G である。

【選択図】 図 1 A

FIG. 1A
SEQ ID NO:1

QEDDGDGYEELVIALRSEEDGLAEAPERHGTATFHRCAKDPWRLPCTYVVVLKEE
 THLSQSERTARRLQAQARRGYLTSLHVEHGLLPGLVLMGSGDLSLALKLPHV
 DYIEEDSSVFAQSIPWNLERITFPRIYADBYQPPDGGSLVEVILLDTISQSDHRE
 IEGRVMTDFENVPEEDGIRFHRQASKDSHGLAGVVSGRDAGVANGASMRSL
 RVLNCQGGKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGLVLLPLAGGYRVLNAACQRLA
 RAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPVITVGATNAQDQPVTLGLTGNFGRCDV
 LFAPGEDIIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAHVAGIAAMMLSAEPELT LAELRQL
 IHFSAKDVINEAWFPEDQRVLT FNLVAAALPFPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRM
 ATATARCAPDEBLSCSSFSRSCKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAPGGEGVYAIAR
 CCLLPQANCSTVHTAPPASMGTRVRCHQQGHVLTGCSSHWEVE DLGTHKPPVLR
 PRGQFNQCVGHREASIHASCCHAPGLECRVKEHGT PAPQGGVTVACEEGWTLTGC
 SALPCTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEEAVTAVAI CCRSRHLAQAQSR
 LQ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 9 における C D R L 1 配列の軽鎖相補性領域 (C D R)、配列番号 9 における C D R L 2 配列の C D R L 2、及び配列番号 9 における C D R L 3 配列の C D R L 3、ならびに配列番号 5 における C D R H 1 配列の重鎖相補性決定領域 (C D R)、配列番号 5 における C D R H 2 配列の C D R H 2、及び配列番号 5 における C D R H 3 配列の C D R H 3 を含む、抗 P C S K 9 I g G 抗体の結晶。

【請求項 2】

前記抗 P C S K 9 I g G 抗体が、配列番号 9 または配列番号 11 の軽鎖可変領域と少なくとも 90 % 同一である軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 の重鎖可変領域と少なくとも 90 % 同一である重鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の結晶。

10

【請求項 3】

前記抗 P C S K 9 I g G 抗体が、配列番号 9 または配列番号 11 に示される前記アミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 に示される前記アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 2 に記載の結晶。

【請求項 4】

前記結晶が、約 5 μ M ~ 約 50 μ M の長さを有する、請求項 1 ~ 4 に記載の結晶。

【請求項 5】

前記結晶が、棒及び針から成る群から選択される形状を有する、請求項 1 ~ 4 に記載の結晶。

20

【請求項 6】

前記結晶が、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二カリウム、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、酒石酸ナトリウムカリウム四水和物、クエン酸ナトリウム二水和物、酢酸ナトリウム三水和物、リン酸水素二アンモニウム、酒石酸ナトリウムカリウム、酢酸カルシウム、カコジル酸塩、C H E S、C A P S、T r i s、硫酸リチウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、硫酸ナトリウムから成る群から選択される塩を含む、先行請求項のいずれかに記載の結晶。

【請求項 7】

抗体 21B12 の結晶の作製方法であって、抗体 21B12 の溶液と、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二カリウム、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、酒石酸ナトリウムカリウム四水和物、クエン酸ナトリウム二水和物、酢酸ナトリウム三水和物、リン酸水素二アンモニウム、酒石酸ナトリウムカリウム、酢酸カルシウム、カコジル酸塩、C H E S、C A P S、T r i s、硫酸リチウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、硫酸ナトリウムから成る群から選択される塩を含む結晶化試薬とを組み合わせることを含む、前記方法。

30

【請求項 8】

前記結晶化緩衝液中の塩の濃度が、約 0.1 M ~ 約 1.0 M である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

結晶が形成した後に前記結晶化緩衝液の少なくとも一部を除去することをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 10】

結晶化緩衝液の前記部分が、遠心分離により除去される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記結晶が、有機添加剤を含有する溶液中に置かれる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記溶液への賦形剤の添加をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

形成した結晶を乾燥させることをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 14】

50

前記結晶が、空気への曝露により、または真空への曝露により、または窒素ガスへの曝露により乾燥される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

請求項 7 に記載の方法により製造される 21B12 抗体結晶。

【請求項 16】

抗体 21B12 の結晶製剤。

【請求項 17】

哺乳動物対象における血清 LDL コレステロールの低下方法または血清 LDL コレステロールのレベル増加と関連する障害の処置方法であって、先行請求項のいずれかに記載の結晶または結晶製剤を、投薬前の血清 LDL コレステロールレベルと比較した場合に、前記対象における血清 LDL コレステロールレベルを低下させるのに効果的な量で投与することを含む、前記方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014 年 7 月 14 日出願の米国特許仮出願第 62 / 024 , 393 号の利益を主張し、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

電子的に提出された資料の参照による援用

本出願は、開示の別個の一部として、その全体が参照によって組み込まれるコンピュータ可読形式の配列表（ファイル名称：Seq List 10 - 07 - 13 __ST25 .txt、2014 年 6 月 26 日に作成されたもので、サイズは 42 KB である）を含有する。

20

【背景技術】

【0002】

モノクローナル抗体は、生物学的治療薬として幅広く使用され、送達のために 100 mg / ml を超える高濃度を満たすことがますます要求されている。このことは、好ましい皮下投与限度が 1.2 ml であるため、皮下経路による溶解度が制限されたタンパク質についての課題を提示する（Yang, M. X., Shenoy, B., Disttler, M., Patel, R., McGrath, M., Pechenov, S., Margolin, A. L. (2003) Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery, PNAS 100, 6934 - 6939）。高濃度製剤の開発には、製剤化、分析、安定性、製造及び薬物送達の観点から多くの課題を伴う（Shire, S. J., Zahra, S., Liu, J. (2004) Challenges in the development of high concentration formulations, J. Pharm. Sci. 93, 1390 - 1402）。今のところ、高濃度製剤の要求は、安定性を増加し、凝集及び粘度を減少させるアミノ酸、糖及び塩のような賦形剤の添加により満たされている（上記 Shire 及び Jenkins, T. W. (1998) Three solutions of the protein solubility problem, Protein Science 7: 376 - 382）。

30

40

【0003】

タンパク質結晶は、多くの場合タンパク質構造体への中間体にすぎないと見なされるが、それらはまた製剤化の面で重要な役割を有する。結晶形のタンパク質分子は最も低いエントロピーを有し、したがって液体状態よりも、それらをさらに 3 ~ 6 kcal / ml 安定にさせる（Dreuth, J., Haas, C. (1992) Protein crystals and their stability, J. Crystal Growth 122, 107 - 109）。結晶製剤の主な利点としては、高タンパク質濃度、より低い粘度、安定性、高濃度による頻繁な投与の排除及び制御放出特性が挙げられる（上記 Yang 及び Basu, S. K., Govardhan, C. P., Jung, C. W

50

., Margolin, A. L. (2004) Protein crystals for the delivery of biopharmaceuticals, Expert Opin. Biol. Thera. 4, 301 - 317)。

【0004】

結晶化条件は、所望の制御放出特性のために異なる形態を達成するように操作され得る (Pechenov, S., Shenoy, B., Yang, M. X., Basu, S., Margolin, A. L. (2004) Injectable controlled release formulations incorporating protein crystals, Journal of Controlled Release 96, 149 - 158)。インスリン結晶製剤は1920年代に初めて報告され、今日では、FDAにより承認された最初の組換えタンパク質治療薬であるだけでなく、初めて承認された結晶性タンパク質治療薬でもある (Hagedorn H. C.; Jensen, B. N.; Krarup, N. B.; Wodstrup, I. Protamine insulinate, (1936) J. Am. Med. Assn. 106, 177 - 180; Johnson, I. S. (2003) The trials and tribulations of producing the first genetically engineered drug. Nat. Rev. Drug. Discovery 2, 747 - 751; 及び Basu, S. K., Govardhan, C. P., Jung, C. W., Margolin, A. L. (2004) Protein crystals for the delivery of biopharmaceuticals, Expert Opin. Biol. Thera. 4, 301 - 317)。高分子はそれらの固有の柔軟性により結晶化が難しいが、一旦結晶化すると、多くの場合に製剤化及び調節の面で課題を伴う (上記 Basu 及び Jen, A., Merkle, H. P. (2001) Diamonds in the rough: Protein crystals from a formulation perspective, Pharm. Res. 18, 1483 - 1488.)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Yang, M. X., Shenoy, B., Disttler, M., Patel, R., McGrath, M., Pechenov, S., Margolin, A. L. (2003) Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery, PNAS 100, 6934 - 6939

【非特許文献2】Shire, S. J., Zahra, S., Liu, J. (2004) Challenges in the development of high concentration formulations, J. Pharm. Sci. 93, 1390 - 1402

【非特許文献3】Jenkins, T. W. (1998) Three solutions of the protein solubility problem, Protein Science 7: 376 - 382

【非特許文献4】Dreuth, J., Haas, C. (1992) Protein crystals and their stability, J. Crystal Growth 122, 107 - 109

【非特許文献5】Basu, S. K., Govardhan, C. P., Jung, C. W., Margolin, A. L. (2004) Protein crystals for the delivery of biopharmaceuticals, Expert Opin. Biol. Thera. 4, 301 - 317

【非特許文献6】Pechenov, S., Shenoy, B., Yang, M. X., Basu, S., Margolin, A. L. (2004) Injectable co

10

20

30

40

50

ntrolled release formulations incorporating protein crystals, Journal of Controlled Release 96, 149 - 158

【非特許文献7】Hagedorn H. C. ; Jensen, B. N. ; Krarup, N. B. ; Wodstrup, I. Protamine insulinate, (1936) J. Am. Med. Assn. 106, 177 - 180

【非特許文献8】Johnson, I. S. (2003) The trials and tribulations of producing the first genetically engineered drug. Nat. Rev. Drug. Discovery 2, 747 - 751

10

【非特許文献9】Jen, A. , Merkle, H. P. (2001) Diamonds in the rough: Protein crystals from a formulation perspective, Pharm. Res. 18, 1483 - 1488

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、非経口投与用の結晶製剤での使用に好適な抗PCSK9免疫グロブリンG型(IgG)抗体(より具体的には、抗体21B12)の結晶；このような結晶を製造するための溶液、塩及び方法；医薬として使用するための結晶製剤を調製するために、このよう

20

な結晶を使用する方法、ならびに哺乳動物、特にヒトを処置するために、このような結晶製剤を使用する方法に関する。

【0007】

本明細書に記載される結晶または製剤では、抗PCSK9 IgGは、抗体、すなわち21B12の重鎖及び軽鎖相補性決定領域(CDR)を含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号9におけるCDRL1配列の軽鎖相補性領域(CDR)、配列番号9におけるCDRL2配列のCDRL2、及び配列番号9におけるCDRL3配列のCDRL3、ならびに配列番号5におけるCDRH1配列の重鎖相補性決定領域(CDR)、配列番号5におけるCDRH2配列のCDRH2、及び配列番号5におけるCDRH3配列のCDRH3を含むIgGである。いくつかのその他の実施形態では、抗体は、配列番号11におけるCDRL1配列の軽鎖相補性領域(CDR)、配列番号11におけるCDRL2配列のCDRL2、及び配列番号11におけるCDRL3配列のCDRL3、ならびに配列番号7におけるCDRH1配列の重鎖相補性決定領域(CDR)、配列番号7におけるCDRH2配列のCDRH2、及び配列番号7におけるCDRH3配列のCDRH3を含むIgGである。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号20または配列番号21(21B12 CDRH1)、及び配列番号22(21B12 CDRH2)、及び配列番号23(21B12 CDRH3)、ならびに配列番号24(21B12 CDRL1)、及び配列番号25(21B12 CDRL2)、及び配列番号26(21B12 CDRL3)のアミノ酸配列を含むIgGである。

30

【0008】

本明細書に記載される結晶または製剤では、抗PCSK9 IgG抗体は、抗体21B12と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する抗体の重鎖及び軽鎖可変領域を含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号5または配列番号7のアミノ酸配列と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むIgGである。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号5または配列番号7のアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むIgGである。いくつかの実施形態では、抗体は

40

50

、配列番号 9 または配列番号 11 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む I g G である。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 9 または配列番号 11 のアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む I g G である。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 9 または配列番号 11 のアミノ酸配列と少なくとも 98 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 98 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む I g G である。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 9 または配列番号 11 のアミノ酸配列と少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む I g G である。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 9 または配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む I g G である。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

10

20

30

40

50

【0009】

本明細書に記載される結晶または製剤では、抗 P C S K 9 I g G 抗体は、各々好適な定常領域に融合される上記の重鎖及び軽鎖可変領域を含み得る。いくつかの実施形態では、抗体は、抗体 21B12 の成熟重鎖及び軽鎖（配列番号 16 または 17 の 21B12 成熟軽鎖及び配列番号 18 または 19 の 21B12 成熟重鎖）を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 16 及び配列番号 18 を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 17 及び配列番号 19 を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、哺乳動物宿主細胞において、本明細書に記載されるような抗体 21B12 の重鎖及び／もしくは軽鎖、またはあるいは各々好適な定常領域に融合される重鎖及び／もしくは軽鎖可変領域をコードする c D N A を発現することにより得ることができるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、 10^{-7} 以下の K D 結合親和性（より小さい数値が、より高い結合親和性を意味する）で、配列番号 1 の P C S K 9 に結合する。

【0010】

本明細書に記載される抗体結晶は、例えばサイズ、形状、形態、塩含有量、結晶充填、及びその他の特性により特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、結晶の長さは、約 $5 \mu M$ ~ 約 $50 \mu M$ の範囲であり、場合により針状、六角形の棒状、板状、フットボール状（アーモンド状）の形態、またはこれらの混合物を有する。場合により、結晶はクラスターである。結晶はまた、X 線回折により特徴付けられる。例えば、抗体 21B12 結晶は、針形状、六角形の棒形状、板形状、フットボール形状（アーモンド形状）、もしくはこれらの混合物、またはその他の形状を示してよい。いくつかの実施形態では、抗体 21B12 結晶は、六角形の棒形状を示した。

【0011】

いくつかのまたは任意の実施形態では、本明細書に記載される抗体結晶は、塩の種類により特徴付けられる。抗体 21B12 結晶の製造に好適な塩としては、以下のうち 1 種以上が挙げられるが、これらに限定されない：リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二カリウム、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、酒石酸ナトリウムカリウム四水和物、クエン酸ナトリウム二水和物、酢酸ナトリウム三水和物、リン酸水素二アンモニウム、酒石酸ナトリウムカリウム、酢酸カルシウム、カコジル酸塩、C H E S、C A P S、T r i s、硫酸リチウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、硫酸ナトリウム。例えば、抗体 21B12 結晶の製造のためのその他の塩（水和物を含む）としては、例えば、一価カチオン（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム）または二価カチオン（例えば、亜鉛、マグネシウム、カルシウムを含むがこれらに限定されない）との、その他のリン酸二水素塩

、リン酸水素塩、リン酸塩、塩化物塩、硫酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、カコジ
ル酸塩を挙げることができる。いくつかのまたは任意の実施形態では、抗体 2 1 B 1 2 結
晶は、リン酸二水素塩、リン酸水素塩及び / または酒石酸塩を用いて製造される。

【 0 0 1 2 】

いくつかのまたは任意の実施形態では、抗体結晶は、結晶成長及び / または形状に影響
を与え得る結晶化添加剤により特徴付けられる。好適な結晶化添加剤としては、沈殿剤、
例えば約 4 0 0 k D ~ 約 2 0 , 0 0 0 k D、または約 1 0 0 0 k D ~ 約 5 0 0 0 k D の分
子量を有する P E G (例えば、P E G 3 3 5 0) などが挙げられるが、これらに限定され
ない。いくつかのまたは任意の実施形態では、結晶はまた、残留不純物を含む、結晶が製
造されるプロセスにより特徴付けられる。いくつかの実施形態では、添加剤 (例えば、P
E G、グリセロール) は、0 . 1 % ~ 約 7 5 % w / v もしくは v / v、または約 0 . 1 ~
5 0 %、または約 0 . 1 ~ 1 0 %、または約 1 0 % ~ 約 5 0 %、または約 2 0 % ~ 5 0 %
、または少なくとも 1 0 %、または少なくとも 2 0 % である。本発明の別の態様は、本明
細書に記載される結晶を作製する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、抗
体 2 1 B 1 2 の溶液と、前述した塩のいずれかを含む適切な塩を含む結晶化試薬、及び /
または前述した添加剤のいずれかを含む結晶化添加剤とを組み合わせることを含む。本明
細書に記載される実施形態のいずれにおいても、結晶化試薬中の塩は、約 0 . 1 M ~ 約 3
0 M、場合により 0 . 1 M ~ 約 1 0 M、または約 0 . 1 ~ 約 2 M、または約 1 M ~ 約 1 0
M の濃度で存在する。本明細書に記載される実施形態のいずれにおいても、添加剤 (例え
ば、P E G、グリセロール) は、約 0 . 1 % ~ 約 7 5 % w / v もしくは v / v、または約
0 . 1 % ~ 約 5 0 %、または約 0 . 1 % ~ 約 1 0 %、または約 1 0 % ~ 約 5 0 %、または
約 2 0 % ~ 5 0 %、または少なくとも 1 0 %、または少なくとも 2 0 % の濃度で存在する
。

10

20

【 0 0 1 3 】

抗体結晶を作製する方法は、場合により結晶が形成された後に結晶化緩衝液の少なくと
も一部を (例えば、遠心分離により) 除去することをさらに含む。

【 0 0 1 4 】

抗体結晶を作製する方法は、場合により形成した結晶を (例えば、結晶を空気乾燥する
こと、または結晶を真空もしくは窒素ガスに曝露することにより) 乾燥させるステップを
さらに含む。

30

【 0 0 1 5 】

本明細書に記載される抗体結晶を製造する例示的な方法としては、蒸気拡散及びバッチ
結晶化が挙げられ、これらは当該技術分野において既知である。

【 0 0 1 6 】

本明細書に記載される別の態様は、結晶製剤 (例えば、粉末結晶製剤及び液体結晶製剤
)、及びヒトを含む哺乳動物の治療のための、結晶製剤などの医薬を調製するために、本
明細書に記載される抗体結晶を使用する方法である。場合により本明細書に記載される投
薬及びタイミングレジメンのいずれかを使用する、本明細書に記載されるいずれかの状態
の治療が企図される。結晶製剤は、本明細書に記載される特性 (例えば、サイズ、長さ、
形状、塩含有量、添加剤含有量、結晶充填またはその他の特性) のうち 1 つ以上を有する
抗体結晶、例えば抗体 2 1 B 1 2 を含む。

40

【 0 0 1 7 】

結晶製剤は非経口投与に好適であり、例えば無菌であって、非経口投与に許容されるエン
ドトキシンレベル、例えば < 0 . 2 5 E U / m L または 0 . 0 0 8 E U / m g を有し、
薬学的に許容される賦形剤を含む。結晶製剤はまた、好ましくは高タンパク質濃度のもの
、例えば、少なくとも 1 0 0 m g / m l、1 2 0 m g / m l、1 4 0 m g / m L、1 5 0
m g / m L、1 6 0 m g / m L、1 7 0 m g / m L、1 8 0 m g / m L、1 9 0 m g / m
L、2 0 0 m g / m L、2 1 0 m g / m L、2 2 0 m g / m L、2 3 0 m g / m L、2 4
0 m g / m L、2 5 0 m g / m L、2 6 0 m g / m L、2 7 0 m g / m L、2 8 0 m g /
m L、2 9 0 m g / m L、3 0 0 m g / m L、3 1 0 m g / m L、3 2 0 m g / m L、3

50

30 mg / mL、340 mg / mL、350 mg / mL、360 mg / mL、370 mg / mL、380 mg / mL、390 mg / mL、400 mg / mL、410 mg / mL、420 mg / mL、430 mg / mL、440 mg / mL、450 mg / mL、460 mg / mL、480 mg / mL、500 mg / mL またはそれを超えるものである。

【0018】

いくつかのまたは任意の実施形態では、結晶製剤は、アミノ酸、スクロース、トレハロース及びソルビトール、またはその他の糖もしくはポリオールを含むがこれらに限定されない賦形剤を含む。

【0019】

いくつかのまたは任意の実施形態では、結晶製剤は、約2～約12、または約6～約9、または約6～8.5、または約7～約7.5の範囲のpH及び約180～約420 mOsm / kg、または約200～約400 mOsm / kg、または約250～約350 mOsm / kgの範囲のオスモル濃度を有する。等張(250～350 mOsm / kg)及び生理学的pH(約7～7.5)が好ましいが、製剤は、結晶が生理学的関連条件で製剤化される限り、これらの範囲外で調製されてよい。

【0020】

場合により、非経口投与(例えば、皮下または筋肉内)に好適な結晶製剤は、容器内、例えば単回用量バイアル、複数回用量バイアル、シリンジ、プレフィルドシリンジまたは注射デバイス内などにある。いくつかのまたは任意の実施形態では、容器は、単回用量の抗PCSK9抗体(例えば、約100 mg～約500 mgの抗PCSK9抗体)を含む。例示的な一実施形態では、容器は抗PCSK9抗体の結晶製剤を、約100 mgまたは110 mgまたは120 mg 130 mgまたは140 mgまたは150 mg 160 mgまたは170 mgまたは180 mgまたは190 mgまたは200 mgまたは210 mgまたは220 mg 230 mgまたは240 mgまたは250 mg 260 mgまたは270 mgまたは280 mgまたは290 mgまたは300 mg 含有してよく、約2、3、4、5または6～最大約16 mg / kg体重の単回用量を投与するのに好適であろう。その他の実施形態では、容器は抗PCSK9抗体の結晶製剤を、約150 mg、もしくは約160 mg、もしくは約170 mg、もしくは約180 mg、もしくは約190 mg、もしくは約200 mg、もしくは約210 mgもしくは約220 mgもしくは約230 mg ;もしくは約240 mg、もしくは約250 mg ;または約250～450 mg ;もしくは約280 mg、もしくは約290 mgもしくは約300 mg、もしくは約350 mgもしくは約360 mg ;もしくは約420 mgもしくは約430 mgもしくは約440 mgもしくは約450 mg ;または約500 mg～約1200 mg ;もしくは約550 mg、もしくは約600 mg、もしくは約700 mg、もしくは約800 mg、もしくは約900 mg、もしくは約1000 mg、もしくは約1100 mg、もしくは約1200 mg 含有してよい。このような実施形態のいずれにおいても、容器は、約2、3、4、5または6～最大約16 mg / kg体重の単回用量を投与するのに好適であってよい。これらの実施形態のいずれにおいても、容器は、本明細書に記載されるものなどの高タンパク質濃度で抗体を含んでよい。これらの実施形態のいずれにおいても、容器は粉末製剤を含んでよく、約0.5～2 mLの体積での再構成用であってよい。

【0021】

上記粉末製剤のいずれかを再構成する方法であって、本明細書に記載されるものなどの高タンパク質構成を達成するために、滅菌希釈剤を添加することを含む方法もまた開示される。

【0022】

このような容器、及び約100 mg～約1200 mgの抗PCSK9抗体、または約2～16 mg / kg患者体重の用量を達成するのに必要な、適切な体積または量の結晶製剤を使用するための説明書を含むラベルを含むキットもまた、本明細書で開示される。

【0023】

室温で少なくとも1か月、3か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11

10

20

30

40

50

か月、1年、18か月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年またはそれを超えて安定である結晶製剤（例えば、粉末結晶製剤及び／または液体結晶製剤）もまた、本明細書で開示される。いくつかの実施形態では、結晶製剤は抗体21B12結晶を含み、製剤は室温で少なくとも1か月、3か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、1年、18か月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年またはそれを超えて安定である。

【0024】

コレステロール関連障害を処置及び／または予防するために本明細書に記載される製剤を使用する方法もまた、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、「コレステロール関連障害」（「血清コレステロール関連障害」を含む）としては、以下：家族性高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、高脂血症、心疾患、メタボリックシンドローム、糖尿病、冠動脈性心疾患、脳卒中、心血管疾患、アルツハイマー病及び一般的な脂質異常症のうちいずれか1つ以上が挙げられ、これらは例えば、血清総コレステロールの上昇、LDLの上昇、トリグリセリドの上昇、VLDLの上昇、及び／または低HDLによって示され得る。本明細書に記載する製剤を、単独でまたは1種以上のその他の薬剤と組み合わせたいずれかで使用して処置され得る、原発性及び続発性脂質異常症のいくつかの非限定的例としては、メタボリックシンドローム、真性糖尿病、家族性複合型高脂血症、家族性高トリグリセリド血症、ヘテロ接合型高コレステロール血症、ホモ接合型高コレステロール血症、家族性欠陥アポブリポタンパク質（*apoplipoprotein*）B-100；多遺伝子性高コレステロール血症を含む、家族性高コレステロール血症；レムナント除去病、肝性リパーゼ欠損症；以下：食傷、甲状腺機能低下症、エストロゲン及びプロゲスチン療法を含む薬物、ベータ遮断薬、及びチアジド利尿薬のうちいずれかに続発する脂質異常症；ネフローゼ症候群、慢性腎不全、クッシング症候群、原発性胆汁性肝硬変、糖原病、ヘパトーマ、胆汁鬱滞、先端巨大症、インスリノーマ、成長ホルモン単独欠損症、ならびにアルコール誘発性高トリグリセリド血症が挙げられる。本明細書に記載される製剤は、アテローム性動脈硬化疾患、例えば、心血管死亡、非心血管死亡または全死因死亡、冠動脈性心疾患、冠動脈疾患、末梢動脈疾患、脳卒中（虚血性及び出血性）、狭心症、または脳血管疾患及び急性冠症候群、心筋梗塞ならびに不安定狭心症などの予防または処置にも有用であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される製剤は、致死性及び非致死性心臓発作、致死性及び非致死性脳卒中、ある特定の種類の心臓手術、心不全のための入院、心疾患に罹患している患者の胸痛、ならびに／または既存の心疾患、例えば以前の心臓発作、以前の心臓手術などによる心血管イベント、ならびに／または閉塞動脈の徴候を有する胸痛ならびに／または移植関連血管疾患のリスクを減少させるのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される製剤は、CRPまたはhsCRPの上昇による心血管リスクを予防する、または減少させるのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される製剤は、再発性心血管イベントのリスクを減少させるために使用され得る。コレステロール関連障害を処置または予防するための抗PCSK9抗体の例示的な用量は、約100mg～約1200mg、もしくは約220mg～約450mg、もしくは約280mg～約450mgの抗PCSK9抗体または1mg/kg～約16mg/kg、もしくは約3mg/kg～10mg/kg、もしくは約5～7mg/kg体重の抗PCSK9抗体の範囲である。

【0025】

当業者には理解されるように、スタチンの使用により一般に対処可能な（処置可能または予防可能ないずれかの）疾患または障害は、本明細書に記載される製剤の適用からも恩恵を受け得る。加えて、いくつかの実施形態では、コレステロール合成の予防またはLDLR発現の増加から恩恵を受け得る障害または疾患も、本明細書に記載される製剤により処置され得る。加えて、当業者には理解されるように、本明細書に記載される製剤の使用は、糖尿病の処置に特に有用であり得る。糖尿病は、冠動脈性心疾患のリスク因子であるだけでなく、インスリンがPCSK9の発現を増加させる。すなわち、糖尿病に罹患している人々は、（高PCSK9レベルに関連し得る）上昇した血漿脂質レベルを有し、これ

10

20

30

40

50

らのレベルの低下から恩恵を受け得る。これは一般に、Costetら(「Hepatic PCSK9 Expression is Regulated by Nutritional Status via Insulin and Sterol Regulatory Element-binding Protein 1C」, J. Biol. Chem., 281: 6211-6218, 2006)でより詳細に述べられ、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0026】

別の態様では、哺乳動物対象における血清LDLコレステロールレベルを低下させる方法であって、本明細書に記載される結晶製剤を、投薬前の血清LDLコレステロールレベルと比較した場合に血清LDLコレステロールレベルを低下させるのに効果的な量で哺乳動物対象に投与することを含む方法が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、哺乳動物対象における血清LDLコレステロールレベルは、投薬前の血清LDLコレステロールレベルと比較した場合に少なくとも約15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%またはそれを超えて減少する。いくつかの実施形態では、血清LDLコレステロールレベルが減少し、この減少は、少なくとも約7日間、2週間、3週間、4週間、1か月、5週間、6週間、7週間、8週間、2か月、3か月またはそれを超える期間持続する。

10

【0027】

別の態様では、哺乳動物対象におけるPCSK9値を低下させる方法であって、本明細書に記載される結晶製剤を、投薬前のPCSK9値と比較した場合にPCSK9値を低下させるのに効果的な量で哺乳動物対象に投与することを含む方法が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、哺乳動物対象におけるPCSK9値は、投薬前のPCSK9値と比較した場合に少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%またはそれを超えて減少する。いくつかの実施形態では、PCSK9値が減少し、この減少は、少なくとも約7日間、2週間、3週間、4週間、1か月、5週間、6週間、7週間、8週間、2か月、3か月またはそれを超える期間持続する。

20

【0028】

別の態様では、哺乳動物対象における総コレステロールレベルを低下させる方法であって、本明細書に記載される結晶製剤を、投薬前の総コレステロールレベルと比較した場合に総コレステロールレベルを低下させるのに効果的な量で哺乳動物対象に投与することを含む方法が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、哺乳動物対象における総コレステロールレベルは、投薬前の総コレステロールレベルと比較した場合に少なくとも約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%またはそれを超えて減少する。いくつかの実施形態では、総コレステロールレベルが減少し、この減少は、少なくとも約7日間、2週間、3週間、4週間、1か月、5週間、6週間、7週間、8週間、2か月、3か月またはそれを超える期間持続する。

30

【0029】

別の態様では、哺乳動物対象における非HDLコレステロールレベルを低下させる方法であって、本明細書に記載される結晶製剤を、投薬前の非HDLコレステロールレベルと比較した場合に非HDLコレステロールレベルを低下させるのに効果的な量で哺乳動物対象に投与することを含む方法が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、哺乳動物対象における総コレステロールレベルは、投薬前の非HDLコレステロールレベルと比較した場合に少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%またはそれを超えて減少する。いくつかの実施形態では、非HDLコレステロールレベルが減少し、この減少は、少なくとも約7日間、2週間、3週間、4週間、1か月、5週間、6週間、7週間、8週間、2か月、3か月またはそれを超える期間持続する。

40

【0030】

別の態様では、哺乳動物対象におけるApoBレベルを低下させる方法であって、本明

50

細書に記載される結晶製剤を、投薬前の A p o B レベルと比較した場合に A p o B レベルを低下させるのに効果的な量で哺乳動物対象に投与することを含む方法が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、哺乳動物対象における A p o B レベルは、投薬前の A p o B レベルと比較した場合に少なくとも約 20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、またはそれを超えて減少する。いくつかの実施形態では、A p o B レベルが減少し、この減少は、少なくとも約 7 日間、2 週間、3 週間、4 週間、1 か月、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、2 か月、3 か月またはそれを超える期間持続する。

【0031】

別の態様では、哺乳動物対象におけるリボタンパク質 A (「L p (a)」) レベルを低下させる方法であって、本明細書に記載される結晶製剤を、投薬前の L p (a) レベルと比較した場合に L p (a) レベルを低下させるのに効果的な量で哺乳動物対象に投与することを含む方法が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、哺乳動物対象における L p (a) レベルは、投薬前の L p (a) レベルと比較した場合に少なくとも約 20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、またはそれを超えて減少する。いくつかの実施形態では、L p (a) レベルが減少し、この減少は、少なくとも約 7 日間、2 週間、3 週間、4 週間、1 か月、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、2 か月、3 か月またはそれを超える期間持続する。

【0032】

本明細書における様々な実施形態は、「を含む」という言語を使用して提示されるが、様々な状況下において、関連実施形態はまた「から成る」または「から本質的に成る」という言語を使用して記載されてよいと、理解されるべきである。「a」または「an」という用語は 1 つ以上を指し、例えば「an immunoglobulin molecule」は、1 つ以上の免疫グロブリン分子を表すと理解されることに留意すべきである。したがって、「a」(または「an」)、「1 つ以上の (one or more)」及び「少なくとも 1 つの (at least one)」という用語は、本明細書において同じ意味で使用され得る。

【0033】

値の範囲を記載する場合、記載されている特徴は、その範囲内に見出される個々の値であり得ることもまた理解されるべきである。例えば、「約 pH 4 ~ 約 pH 6 の pH」は、pH 4、4.2、4.6、5.1、5.5 など、及びこのような値の間における任意の値であり得るが、これらに限定されない。さらに、「約 pH 4 ~ 約 pH 6 の pH」は、問題となっている製剤の pH が、保存中に pH 4 ~ pH 6 の範囲で 2 pH 単位変動することを意味すると解釈されるべきではなく、むしろ値は溶液の pH のその範囲内で選択されてよく、pH はほぼその pH で緩衝を維持する。いくつかの実施形態において、「約 (about)」という用語が使用される場合、これは列挙された数字のプラスマイナス 5 %、10 %、15 % またはそれを超えるその列挙された数字を意味する。意図される実際の変動は、文脈から決定できる。

【0034】

本明細書に記載される範囲のいずれにおいても、範囲の端点はその範囲に含まれる。しかしながら、本記載は、下限及び/または上限の端点が除外される同じ範囲も企図する。本発明の追加の特性及び変化形態は、図面及び詳細な説明を含む、本出願の全体から当業者には明らかであり、このような特性は全て、本発明の態様として意図される。同様に、本明細書に記載される本発明の特性は、特性の組み合わせが本発明の態様または実施形態として上で具体的に言及されているか否かに関係なく、本発明の態様としても意図される追加の実施形態に再び組み合わせられ得る。また、本発明にとって重要であると本明細書に記載されるこのような限定のみが、そのようなものとして見なされるべきであり；重要であると本明細書に記載されていない限定を欠く本発明の変化形態は、本発明の態様として意図される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 5 】

【図 1 A】下線が引かれたプロドメインを有する P C S K 9 の成熟型のアミノ酸配列を図示する。

【図 1 B - 1】図 1 B₁ ~ 図 1 B₄ は、下線が引かれたプロドメイン及び太字のシグナル配列を有する P C S K 9 のアミノ酸配列及び核酸配列を図示する。

【図 1 B - 2】図 1 B₁ ~ 図 1 B₄ は、下線が引かれたプロドメイン及び太字のシグナル配列を有する P C S K 9 のアミノ酸配列及び核酸配列を図示する。

【図 1 B - 3】図 1 B₁ ~ 図 1 B₄ は、下線が引かれたプロドメイン及び太字のシグナル配列を有する P C S K 9 のアミノ酸配列及び核酸配列を図示する。

【図 1 B - 4】図 1 B₁ ~ 図 1 B₄ は、下線が引かれたプロドメイン及び太字のシグナル配列を有する P C S K 9 のアミノ酸配列及び核酸配列を図示する。

【図 2 A】図 2 A 及び図 2 B は、抗体 2 1 B 1 2 の可変ドメインのアミノ酸配列及び核酸配列を図示し、C D R は下線が引かれている、及び / または四角く囲まれている。

【図 2 B】図 2 A 及び図 2 B は、抗体 2 1 B 1 2 の可変ドメインのアミノ酸配列及び核酸配列を図示し、C D R は下線が引かれている、及び / または四角く囲まれている。

【図 3】様々な定常ドメインのアミノ酸配列を図示する。

【図 4 A】図 4 A 及び図 4 B は、抗体 2 1 B 1 2 の成熟重鎖及び成熟軽鎖のアミノ酸配列を図示する。

【図 4 B】図 4 A 及び図 4 B は、抗体 2 1 B 1 2 の成熟重鎖及び成熟軽鎖のアミノ酸配列を図示する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 6 】

抗 P C S K 9 免疫グロブリン G 型 (I g G) 抗体の結晶が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、抗 P C S K 9 免疫グロブリン G 型 (I g G) 抗体の結晶は、非経口投与用の結晶製剤での使用に好適である。いくつかの実施形態では、抗 P C S K 9 免疫グロブリン G 型 (I g G) 抗体の結晶は、精製及び原薬保存に好適である。医薬として使用するための結晶製剤を調製するために、このような抗 P C S K 9 免疫グロブリン G 型 (I g G) 抗体の結晶を使用する方法；高濃度の結晶性抗 P C S K 9 抗体を含む製剤、これらの製剤を処置に使用する方法、これらの製剤を、例えば皮下または筋肉内に投与する方法、及びこれらの製剤を含む容器またはキットもまた、本明細書に記載される。

【 0 0 3 7 】

I . 製剤中の抗体

いくつかの実施形態では、製剤中の抗 P C S K 9 抗体は、少なくとも約 1 0 0 m g / m l、約 1 0 1 m g / m l、約 1 0 2 m g / m l、約 1 0 3 m g / m l、約 1 0 4 m g / m l、約 1 0 5 m g / m l、約 1 0 6 m g / m l、約 1 0 7 m g / m l、約 1 0 8 m g / m l、約 1 0 9 m g / m l、約 1 1 0 m g / m l、約 1 1 1 m g / m l、約 1 1 2 m g / m l、約 1 1 3 m g / m l、約 1 1 4 m g / m l、約 1 1 5 m g / m l、約 1 1 6 m g / m l、約 1 1 7 m g / m l、約 1 1 8 m g / m l、約 1 1 9 m g / m l、約 1 2 0 m g / m l、約 1 2 1 m g / m l、約 1 2 2 m g / m l、約 1 2 3 m g / m l、約 1 2 4 m g / m l、約 1 2 5 m g / m l、約 1 2 6 m g / m l、約 1 2 7 m g / m l、約 1 2 8 m g / m l、約 1 2 9 m g / m l、約 1 3 0 m g / m l、約 1 3 1 m g / m l、約 1 3 2 m g / m l、約 1 3 3 m g / m l、約 1 3 4 m g / m l、約 1 3 5 m g / m l、約 1 3 6 m g / m l、約 1 3 7 m g / m l、約 1 3 8 m g / m l、約 1 3 9 m g / m l、約 1 4 0 m g / m l、約 1 4 1 m g / m l、約 1 4 2 m g / m l、約 1 4 3 m g / m l、約 1 4 4 m g / m l、約 1 4 5 m g / m l、約 1 4 6 m g / m l、約 1 4 7 m g / m l、約 1 4 8 m g / m l、約 1 4 9 m g / m l、約 1 5 0 m g / m l、約 1 5 1 m g / m l、約 1 5 2 m g / m l、約 1 5 3 m g / m l、約 1 5 4 m g / m l、約 1 5 5 m g / m l、約 1 5 6 m g / m l、約 1 5 7 m g / m l、約 1 5 8 m g / m l、約 1 5 9 m g / m l、約 1 6 0 m g / m l、約 1 6 1 m g / m l、約 1 6 2 m g / m l、約 1 6 3 m g / m l、約 1 6 4 m g / m l、約 1 6 5 m g / m l、約 1 6 6 m g / m l、約 1 6 7 m g / m

1、約168mg/ml、約169mg/ml、約170mg/ml、約171mg/ml、
 1、約172mg/ml、約173mg/ml、約174mg/ml、約175mg/ml、
 1、約176mg/ml、約177mg/ml、約178mg/ml、約179mg/ml、
 1、約180mg/ml、約181mg/ml、約182mg/ml、約183mg/ml、
 1、約184mg/ml、約185mg/ml、約186mg/ml、約187mg/ml、
 1、約188mg/ml、約189mg/ml、約190mg/ml、約191mg/ml、
 1、約192mg/ml、約193mg/ml、約194mg/ml、約195mg/ml、
 1、約196mg/ml、約197mg/ml、約198mg/ml、約199mg/ml、
 1、約200mg/ml、約201mg/ml、約202mg/ml、約203mg/ml、
 1、約204mg/ml、約205mg/ml、約206mg/ml、約207mg/ml、
 1、約208mg/ml、約209mg/ml、約210mg/ml、約211mg/ml、
 1、約212mg/ml、約213mg/ml、約214mg/ml、約215mg/ml、
 1、約216mg/ml、約217mg/ml、約218mg/ml、約219mg/ml、
 1、約220mg/ml、約221mg/ml、約222mg/ml、約223mg/ml、
 1、約224mg/ml、約225mg/ml、約226mg/ml、約227mg/ml、
 1、約228mg/ml、約229mg/ml、約230mg/ml、約231mg/ml、
 1、約232mg/ml、約232mg/ml、約233mg/ml、約234mg/ml、
 1、約235mg/ml、約236mg/ml、約237mg/ml、約238mg/ml、
 1、約239mg/ml、約240mg/ml、約241mg/ml、約242mg/ml、
 1、約243mg/ml、約244mg/ml、約245mg/ml、約246mg/ml、
 1、約247mg/ml、約248mg/ml、約249mg/ml、約250mg/ml、
 1の濃度(「高タンパク質濃度」)で存在し、最大で、例えば約450mg/ml、約4
 40mg/ml、430mg/ml、420mg/ml、410mg/ml、400mg
 /ml、約390mg/ml、約380mg/ml、約370mg/ml、約360mg
 /ml、約350mg/ml、約340mg/ml、約330mg/ml、約320mg
 /ml、約310mg/ml、約300mg/ml、約290mg/ml、約280mg
 /ml、約270mg/ml、または約260mg/mlの範囲であってよい。上記端点
 の組み合わせを特徴とする任意の範囲が企図され、約70mg/ml～約250mg/ml、
 約100mg/ml～約250mg/ml、約150mg/ml～約250mg/ml、
 約150mg/ml～約300mg/ml、約150mg/ml～約320mg/ml、
 約150mg/ml～約350mg/mlを含むが、これらに限定されない。

【0038】

いくつかの実施形態では、抗PCSK9抗体は、抗体21B12である。抗体21B12は、米国特許第US8,030,457号に前述されていて、配列表を含むその開示全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0039】

本明細書に記載される抗PCSK9抗体は、 10^{-6} 以下、または 10^{-7} 以下、または 10^{-8} 以下、または 10^{-9} 以下のKD(より小さい数値が、より高い結合親和性を意味する)で、配列番号1のPCSK9に結合する。親和性は、Biacore技術によるものを含む、当該技術分野において既知の任意の手段により決定され得る。

【0040】

「21B12抗体」という用語は、本明細書で使用する場合、2本の軽鎖及び2本の重鎖で構成されるIgG免疫グロブリンを指し、軽鎖は、配列番号9におけるCDRL1配列の軽鎖相補性領域(CDR)、配列番号9におけるCDRL2配列のCDRL2、及び配列番号9におけるCDRL3配列のCDRL3を含み、重鎖は、配列番号5におけるCDRH1配列の重鎖相補性決定領域(CDR)、配列番号5におけるCDRH2配列のCDRH2、及び配列番号5におけるCDRH3配列のCDRH3を含む。いくつかのその他の実施形態では、抗体は、配列番号11におけるCDRL1配列の軽鎖相補性領域(CDR)、配列番号11におけるCDRL2配列のCDRL2、及び配列番号11におけるCDRL3配列のCDRL3、ならびに配列番号7におけるCDRH1配列の重鎖相補性

決定領域 (C D R)、配列番号 7 における C D R H 2 配列の C D R H 2、及び配列番号 7 における C D R H 3 配列の C D R H 3 を含む I g G である。いくつかの実施形態では、2 1 B 1 2 抗体は、配列番号 2 4 (2 1 B 1 2 C D R L 1)、及び配列番号 2 5 (2 1 B 1 2 C D R L 2)、及び配列番号 2 6 (2 1 B 1 2 C D R L 3) ならびに配列番号 2 0 または配列番号 2 1 (2 1 B 1 2 C D R H 1)、及び配列番号 2 2 (2 1 B 1 2 C D R H 2)、及び配列番号 2 3 (2 1 B 1 2 C D R H 3) のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態では、抗 P C S K 9 I g G 抗体は、抗体 2 1 B 1 2 と少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する、抗体の重鎖及び軽鎖可変領域を含む。したがって、いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 9 または配列番号 1 1 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む I g G である。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 9 または配列番号 1 1 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む I g G である。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 9 または配列番号 1 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む I g G である。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 9 または配列番号 1 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む I g G である。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 9 または配列番号 1 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 8 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 8 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む I g G である。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 9 または配列番号 1 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号 5 または配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む I g G である。

【 0 0 4 2 】

いくつかの実施形態では、2 1 B 1 2 抗体の軽鎖は、配列番号 9 または配列番号 1 1 (2 1 B 1 2 軽鎖可変領域) のアミノ酸配列を含み、2 1 B 1 2 抗体の重鎖は、配列番号 5 または配列番号 7 (2 1 B 1 2 重鎖可変ドメイン) のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、2 1 B 1 2 抗体の軽鎖は、配列番号 9 (2 1 B 1 2 軽鎖可変領域) のアミノ酸配列を含み、2 1 B 1 2 抗体の重鎖は、配列番号 5 (2 1 B 1 2 重鎖可変領域) のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、2 1 B 1 2 抗体の軽鎖は、配列番号 1 1 (2 1 B 1 2 軽鎖可変領域) のアミノ酸配列を含み、2 1 B 1 2 抗体の重鎖は、配列番号 7 (2 1 B 1 2 重鎖可変領域) のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は軽鎖定常領域に融合され、重鎖可変領域は I g G 定常領域に融合される。いくつかの実施形態では、2 1 B 1 2 抗体は、抗体 2 1 B 1 2 の重鎖及び / または軽鎖可変領域、すなわちアイソタイプ I g G 1、2、3 もしくは 4 のヒト重鎖定常領域に融合される配列番号 5 (2 1 B 1 2 重鎖可変領域) (例えば、天然、コンセンサスまたは修飾されていて、結合に影響しないことが知られている多数の修飾が当該技術分野において既知である)、及び / もしくはヒト軽鎖定常領域に融合される配列番号 9 (2 1 B 1 2 軽鎖可変領域) (例えば、天然、コンセンサスまたは修飾されていて、結合に影響しないことが知られている多数の修飾が当該技術分野において既知である)、またはアイソタイプ I g G 1、2、3 もしくは 4 のヒト重鎖定常領域に融合される配列番号 7 (2 1 B 1 2 重鎖可変領域)、及び / もしくはヒト軽鎖定常領域に融合される配列番号 1 1 (2 1 B 1 2 軽鎖可変領域) を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、抗体 2 1 B 1 2 の成熟重鎖及び軽鎖 (配列番

号 16 または 17 の 21B12 成熟軽鎖及び配列番号 18 または 19 の 21B12 成熟重鎖)を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 16 及び配列番号 18 を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 17 及び配列番号 19 を含む。

【0043】

いくつかの実施形態では、抗体は、哺乳動物宿主細胞において、抗体 21B12 の重鎖及び/もしくは軽鎖、またはあるいは重鎖及び/もしくは軽鎖可変領域をコードする cDNA を発現することにより得ることができるアミノ酸配列を含む。「抗体」という用語は、インタクトな免疫グロブリン、例えば IgG の場合、2 本の重鎖及び 2 本の軽鎖で構成される四量体免疫グロブリン(例えば、好ましくは全長重鎖及び/または軽鎖を有し、場合により抗 PCSK9 結合特性を保持するフレームワークまたは定常領域内に変異を有する、キメラ、ヒト化、またはヒト型)を指す。

10

【0044】

「単離」抗体は、その用語が本明細書で定義される場合、その自然環境の成分から同定及び分離された抗体を指す。その自然環境の汚染成分は、抗体の診断または治療的使用に干渉するであろう材料であり、酵素、ホルモン、及びその他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含む場合がある。ある種の実施形態では、抗体は、(1) 95 重量% 超の抗体、最も好ましくは 99 重量% 超まで、(2) N 末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも 15 残基を得るのに十分な程度まで、または(3) クーマシーブルー、もしくは好ましくは銀染色を使用した還元もしくは非還元条件下での SDS-PAGE による均一性まで精製されるだろう。単離した天然に存在する抗体は、組換え細胞内で *in situ* の抗体を含み、これは抗体の自然環境の少なくとも 1 種の成分が存在しないだろうからである。しかしながら、通常、単離抗体は少なくとも 1 つの精製ステップにより調製されるだろう。

20

【0045】

「モノクローナル」抗体は、多様なエピトープと結合する多様な配列の抗体の混合集団を指す「ポリクローナル」抗体と比較して、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、少量で存在する場合もある天然に存在し得る変異を除いては集団に含まれる個々の抗体が同一である。「ヒト化抗体」という語句は、配列をよりヒト様にする修飾を含む非ヒト抗体、典型的にはげっ歯類モノクローナル抗体の配列に由来する抗体を指す。あるいは、ヒト化抗体はキメラ抗体に由来してよい。「ヒト」抗体という語句は、例えば、ファージディスプレイなどの既知の技術によりヒト抗体遺伝子のライブラリーをスクリーニングすることによってヒト配列に由来する抗体、または内因性免疫グロブリン産生を全く有さず、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含有するように操作されたトランスジェニック動物を使用して産生される抗体を指す。

30

【0046】

「免疫グロブリン G」または「天然 IgG 抗体」は、四量体糖タンパク質である。天然に存在する免疫グロブリンでは、各四量体は 2 つの同一のポリペプチド鎖対で構成され、各対は 1 本の「軽」鎖(約 25 kDa)及び 1 本の「重」鎖(約 50 ~ 70 kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主として抗原認識に關与する約 100 ~ 110 以上のアミノ酸の「可変」(「V」)領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主としてエフェクター機能に關与する定常領域を定義する。免疫グロブリンは、それらの重鎖の定常ドメインにおけるアミノ酸配列に応じて異なるクラスに割り当てられ得る。重鎖は、ミュー(μ)、デルタ(δ)、ガンマ(γ)、アルファ(α)、及びイプシロン(ε)に分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれ IgM、IgD、IgG、IgA、及び IgE と定義する。これらのいくつかは、さらにサブクラスまたはアイソタイプ、例えば IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及び IgA2 に分けられてよい。異なるアイソタイプは異なるエフェクター機能を有し;例えば、IgG1 及び IgG3 アイソタイプは、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を有する。ヒト軽鎖は、カッパ(κ)及びラムダ(λ)軽鎖に分類される。軽鎖及び重鎖内において、可変領域及び定常領域は、約 12 以上のアミノ酸の「J」領域により連結され、重鎖はさらに約 10 のアミノ酸の「D」領域も含

40

50

む。一般に、Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))を参照のこと。

【0047】

「超可変」領域という用語は、相補性決定領域すなわちCDRからのアミノ酸残基（すなわち、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)により記載されているような、軽鎖可変ドメインにおける残基24～34(L1)、50～56(L2)及び89～97(L3)ならびに重鎖可変ドメインにおける31～35(H1)、50～65(H2)及び95～102(H3))を指す。「フレームワーク」すなわちFR残基は、超可変領域残基以外のそれらの可変領域残基である。

10

【0048】

「バリエーション」という用語は、抗体に関連して使用される場合、可変領域または可変領域と同等の部分に少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失、または挿入を含有する、抗体のポリペプチド配列を指すが、ただし、バリエーションが所望の結合親和性または生物活性を保持することを条件とする。加えて、本明細書に記載されるような抗体は、半減期もしくはクリアランス、ADCC及び/またはCDC活性を含む、抗体のエフェクター機能を修飾するアミノ酸修飾を定常領域に有してよい。このような修飾は、例えば、薬物動態を増強する、または癌の処置における抗体の有効性を増強し得る。Shields et al., J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604(2001)(その全体が参照によって本明細書に組み込まれる)を参照のこと。IgG1の場合、定常領域、特にヒンジまたはCH2領域に対する修飾は、ADCC及び/またはCDC活性を含むエフェクター機能を増加または低減させる場合がある。その他の実施形態では、IgG2定常領域は、抗体-抗原凝集体形成を低減させるように修飾される。IgG4の場合、定常領域、特にヒンジ領域に対する修飾は、半抗体の形成を減少させる場合がある。

20

【0049】

「修飾」という用語は、本明細書に記載される抗体またはポリペプチドに関連して使用される場合、1つ以上のアミノ酸変化(置換、挿入または欠失を含む);PCSK9結合活性に干渉しない化学修飾;治療剤または診断剤への複合化;標識化(例えば、放射性核種または様々な酵素による);PEG化(ポリエチレングリコールによる誘導体化)などの共有ポリマー結合及び非天然アミノ酸の化学合成による挿入または置換による共有結合修飾を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明の修飾ポリペプチド(抗体を含む)は、本発明の非修飾分子の結合特性を保持するだろう。

30

【0050】

「誘導体」という用語は、本発明の抗体またはポリペプチドに関連して使用される場合、治療剤または診断剤への複合化、標識化(例えば、放射性核種または様々な酵素による)、PEG化(ポリエチレングリコールによる誘導体化)などの共有ポリマー結合及び非天然アミノ酸の化学合成による挿入または置換によって共有結合修飾された抗体またはポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、本発明の誘導体は、本発明の非誘導体分子の結合特性を保持するだろう。

40

【0051】

タンパク質及び非タンパク質薬剤は、当該技術分野において既知の方法によって抗体に複合化されてよい。複合化方法としては、直接連結、共有結合したリンカーによる連結、及び特異的結合対要素(例えば、アビジン-ビオチン)が挙げられる。このような方法としては、例えば、ドキシソルピシンの複合化については、Greenfield et al., Cancer Research 50, 6600-6607(1990)により記載されているもの、ならびに白金化合物の複合化については、Arnnon et al., Adv. Exp. Med. Biol. 303, 79-90(1991)により、及び

50

Kiseleva et al., Mol. Biol. (USSR) 25, 508-514 (1991) により記載されているものが挙げられる。

【0052】

II. 結晶、結晶製剤及び組成物の製造

ポリペプチド結晶は、水溶液から、または有機溶媒もしくは添加剤を含有する水溶液からの制御されたポリペプチド結晶化により成長する。制御されてよい溶液条件としては、例えば、溶媒、有機溶媒または添加剤の蒸発速度、適切な共溶質及び緩衝剤の存在、pH、ならびに温度が挙げられる。タンパク質の結晶化に影響する様々な要因の包括的な概説は、McPherson (1985, Methods Enzymol 114:112-120) により公開されている。加えて、McPherson 及び Gilliland (1988, J. Crystall. Growth, 90:51-59) は、結晶化したポリペプチド、ならびにそれらが結晶化した条件の包括的な一覧表を編集した。結晶及び結晶化手法の概要、ならびに解析済みのタンパク質構造の座標に関するリポジトリは、ブルックヘブン国立研究所の Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb/; Bernstein et al., 1977, J. Mol. Biol. 112:535-542) により維持されている。しかしながら、上に引用した参考文献の多くで報告されている条件は、ほとんどの場合、いくつかの大きな回折品質の結晶を生じるように最適化されていることに留意すべきである。したがって、これらの条件はタンパク質ごとに変動し、任意の所与のポリペプチド結晶を大規模製造するための高収率プロセスを提供する訳ではないことが、当業者には理解されるだろう。

10

20

【0053】

一般に結晶は、結晶化されるポリペプチド（すなわち、抗体）と、適切な水性溶媒または適切な結晶化剤、例えば塩もしくは有機溶媒もしくは添加剤などを含有する水性溶媒（総じて「結晶化試薬」）とを組み合わせることにより製造される。溶媒はポリペプチドと組み合わせられ、結晶化の誘導に適切であって、ポリペプチド活性及び安定性の維持に許容されるように実験的に決定される温度で攪拌を行ってよい。結晶化の実験室規模での方法としては、ハンギングドロップ蒸気拡散、シッティングドロップ蒸気拡散、微量透析、マイクロバッチ、オイル下、ゲル中及びサンドイッチドロップ法が挙げられる。溶媒は、場合により共結晶化添加剤、例えば沈殿剤、脂肪酸、還元剤、グリセロール、スルホベタイン、界面活性剤、ポリオール、二価カチオン、補因子、またはカオトロップ、及びアミノ酸など、ならびに pH を制御するための緩衝剤種を含み得る。

30

【0054】

「共結晶化添加剤」は、ポリペプチドの結晶化を促進する化合物及び/またはタンパク質を安定させて変性から保護する化合物を含む。共溶質の例としては、酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、フッ化アンモニウム、ギ酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、塩化カドミウム、硫酸カドミウム、酢酸カルシウム、塩化カルシウム、塩化セシウム、塩化コバルト、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Br}^-$ (CTAB)、クエン酸二アンモニウム、リン酸水素二アンモニウム、リン酸二アンモニウム、酒石酸二アンモニウム、リン酸二カリウム、リン酸二ナトリウム、酒石酸二ナトリウム、DL-リンゴ酸、塩化第二鉄、L-プロリン、酢酸リチウム、塩化リチウム、硝酸リチウム、硫酸リチウム、酢酸マグネシウム、塩化マグネシウム、ギ酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ニッケル、酢酸カリウム、臭化カリウム、塩化カリウム、クエン酸カリウム、フッ化カリウム、ギ酸カリウム、硝酸カリウム、リン酸カリウム、酒石酸ナトリウムカリウム、硫酸カリウム、チオシアン酸カリウム、酢酸ナトリウム、臭化ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、フッ化ナトリウム、ギ酸ナトリウム、マロン酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、チオシアン酸ナトリウム、コハク酸、タクシメート、クエン酸三アンモニウム、クエン酸三リチウム、トリメチルアミン N-オキシド、クエン酸三カリウム、クエン酸三ナトリウム、酢酸亜鉛、硫酸亜鉛、及び共溶質を供給するように機能するその他の化合物が挙げられる。「結晶化」は、ポリペプチドの結晶化を促進するために、溶液の pH

40

50

を所望の範囲に維持する化合物を含む。例としては、ACES (N - (2 - アセトアミド) - 2 - アミノエタンスルホン酸)、BES (N, N - ビス(2 - ヒドロキシエチル) - 2 - アミノエタンスルホン酸)、ピシン (N, N - ビス(2 - ヒドロキシエチル)グリシン)、BIS - TRIS (2, 2 - ビス - (ヒドロキシメチル) - 2, 2', 2' - ニトリロトリエタノール)、ホウ酸、CAPS (3 - [シクロヘキシルアミノ] - 1 - プロパンスルホン酸)、クエン酸、EPPS (HEPPS、4 - (2 - ヒドロキシエチル)ピペラジン - 1 - プロパンスルホン酸)、Gly - Gly (NH₂CH₂CONHCH₂COOH、グリシル - グリシン)、HEPES (4 - (2 - ヒドロキシエチル)ピペラジン - 1 - エタンスルホン酸)、イミダゾール、MES (2 - モルホリノエタンスルホン酸)、MOPS (3 - (N - モルホリノ) - プロパンスルホン酸)、PIPEP (ピペラジン - 1, 4 - ビス(2 - エタンスルホン酸))、塩化カリウム、酢酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、一塩基性リン酸ナトリウム (リン酸二水素ナトリウム)、二塩基性リン酸ナトリウム、TAPS (N - [トリス - (ヒドロキシメチル)メチル] - 3 - アミノプロパンスルホン酸)、TAPSO (N - [トリス(ヒドロキシメチル)メチル] - 3 - アミノ - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸)、TES (N - [トリス(ヒドロキシメチル)メチル] - 2 - アミノエタンスルホン酸)、トリシン (N - [トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン)、Tris - HCl、TRIZMA (2 - アミノ - 2 - (ヒドロキシメチル) - 1, 3 - プロパンジオール)、及び溶液を特定の pH にまたはその近傍に維持するように機能するその他の化合物が挙げられる。

10

20

【0055】

沈殿剤の選択は、結晶化に影響する1つの要因である。例として、例えば分子量200 ~ 20,000 kDのPEG生成物が使用され得る。PEG3350は、体積排除効果により作用する長鎖ポリマー沈殿剤または脱水剤である。硫酸アンモニウムなどのリオトロピック塩は、カプリル酸などの短鎖脂肪酸と同様に、沈殿プロセスを促進する。ポリイオン種もまた、有用な沈殿剤である。

【0056】

例えば、皮下注射用製剤で使用するための抗体は、好ましくは生理学的pH範囲で、及び等張オスモル濃度を提供する結晶化試薬中で沈殿する。

【0057】

添加剤、共溶質、緩衝剤などの必要性、及びそれらの濃度は、結晶化を促進するように実験的に決定される。ポリペプチドの好適な結晶化条件のいくつかの例は、以下の実施例に記載されている。

30

【0058】

抗体21B12は、様々な条件下で結晶化される。様々な形態の抗体21B12結晶は、液体製剤中の抗体が、ある体積の既知の結晶化試薬に添加されて密閉容器内で保存されることにより、スケールアップ条件下で成長し得る。抗体21B12結晶は、室温でこれらの条件下において24時間未満で成長し得、約30% ~ 約99%の収率をもたらすことが示されている。

【0059】

工業規模プロセスでは、結晶化をもたらす制御された沈殿は、ポリペプチド、沈殿剤、共溶質及び場合により緩衝剤の単純な組み合わせにより、バッチプロセスで最適に実施され得る。別の選択肢としては、ポリペプチドは、出発材料としてポリペプチド沈殿物を使用すること(「播種」)により結晶化されてよい。この場合、ポリペプチド沈殿物は、結晶化溶液に添加され、結晶が形成されるまでインキュベートされる。代替の実験室結晶化方法、例えば透析または蒸気拡散などもまた採用され得る。上記のMcPherson及び上記のGillilandには、結晶化文献のそれらの概説において、好適な条件の包括的な一覧表を含む。時として、結晶化ポリペプチドが架橋される場合、意図される架橋剤と結晶化媒体との間の不適合により、結晶をより好適な溶媒系に交換することが必要となる場合がある。

40

【0060】

50

いくつかの実施形態によれば、ポリペプチド結晶、結晶製剤及び組成物は、以下のプロセスにより調製される：最初に、ポリペプチドを結晶化する。次に、本明細書に記載されるような賦形剤または成分を、直接母液に添加する。あるいは、母液を除去した後、最短で1時間～最長で24時間、結晶を賦形剤またはその他の製剤成分の溶液中に懸濁する。賦形剤濃度は、典型的には約0.01～30% w/wであり、これは、それぞれ99.99～70% w/wのポリペプチド結晶濃度に相当する。一実施形態では、賦形剤濃度は約0.1～10%であり、これは、それぞれ99.9～90% w/wの結晶濃度に相当する。母液は、濾過、緩衝液交換により、または遠心分離のいずれかにより、結晶スラリーから除去できる。その後、結晶は、任意の注射用等張ビヒクルを、これらのビヒクルが結晶を溶解しない限りこれらを用いて、場合により50～100%の1種以上の有機溶媒または添加剤、例えばエタノール、メタノール、イソプロパノールもしくは酢酸エチル、またはポリエチレングリコール(PEG)などの溶液を用いて、室温または-20～25のいずれかの温度で洗浄する。加えて、水を使用して結晶を洗浄することができる。結晶は、結晶の上に窒素気流、空気流、または不活性ガス流のいずれかを通過させることにより乾燥させる。最後に、必要であれば結晶の微粉化を実施することができる。ポリペプチド結晶の乾燥は、N₂、空気、もしくは不活性ガスによる乾燥；真空オープン乾燥；凍結乾燥；揮発性有機溶媒による洗浄もしくは添加剤による洗浄に続く溶媒の蒸発；またはヒュームフード内での蒸発を含む手段による、水、有機溶媒もしくは添加剤、または液体ポリマーの除去である。典型的には、乾燥は、結晶が自由流動性粉末となる時に達成される。乾燥は、湿潤結晶の上にガス流を通過させることにより実施してよい。ガスは、窒素、アルゴン、ヘリウム、二酸化炭素、空気またはこれらの組み合わせから成る群から選択されてよい。達成される粒子の直径は、0.1～100マイクロメートルの範囲内、または0.2～10マイクロメートルの範囲内、または10～50マイクロメートルの範囲内、または0.5～2マイクロメートルの範囲内であり得る。吸入によって投与される製剤について、一実施形態では、ポリペプチド結晶から形成される粒子は、0.5～1マイクロメートルの範囲内である。

10

20

30

40

50

【0061】

いくつかの実施形態によれば、タンパク質結晶、タンパク質結晶製剤または組成物を調製する場合、結晶化の間に界面活性剤などの促進剤は添加されない。いくつかのその他の実施形態によれば、タンパク質結晶、タンパク質結晶製剤または組成物を調製する場合、結晶化の間に界面活性剤などの促進剤が添加される。賦形剤または成分は、約1～10% w/wの濃度で、あるいは約0.1～25% w/wの濃度で、あるいは約0.1～50% w/wの濃度で結晶化後に母液に添加される。これらの濃度は、それぞれ99～90% w/w、99.9～75% w/w及び99.9～50% w/wの結晶濃度に相当する。賦形剤または成分は、母液中で結晶と共に約0.1～3時間インキュベートされ、あるいはインキュベーションは、0.1～12時間実施され、あるいはインキュベーションは、0.1～24時間実施される。

【0062】

いくつかのまたは任意の実施形態では、成分または賦形剤は母液以外の溶液に溶解され、タンパク質結晶が母液から取り出されて、賦形剤または成分の溶液中に懸濁される。いくつかの実施形態では、賦形剤または成分の溶液（または再懸濁ビヒクル）は、等張かつ注射用の、賦形剤または成分または界面活性剤の混合物である。いくつかの実施形態では、賦形剤または成分の溶液（または再懸濁ビヒクル）は、等張かつ注射用の、賦形剤または成分または界面活性剤の混合物ではない。成分または賦形剤濃度及びインキュベーション時間は、上記のものと同一である。

【0063】

ポリペプチド結晶

本明細書で使用する場合、「結晶」または「結晶性」は、物質の固体状態の一形態を指し、第2の形態、すなわち非晶質固体状態とは異なる。結晶は、格子構造、特徴的な形状、ならびに光学特性、例えば屈折率及び複屈折などを含む、特徴的な特性を示す。結晶は

、3次元で周期的に繰り返すパターンで配置された原子から成る (C. S. Barrett, Structure of Metals, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1952, p. 1)。対照的に、非晶質材料は、物質の非結晶性固体形態であって、非晶質沈殿物と称されることもある。このような沈殿物は、結晶性固体状態に特徴的な分子格子構造を全く有さず、物質の結晶形に典型的な複屈折またはその他の分光学的特徴を示さない。

【0064】

ポリペプチド結晶は、結晶格子に配置されたポリペプチド分子である。ポリペプチド結晶は、3次元で周期的に繰り返される特定のポリペプチド-ポリペプチド相互作用のパターンを含有する。本発明のポリペプチド結晶は、ポリペプチドの非晶質固体形態または沈殿物、例えばポリペプチド溶液を凍結乾燥することにより得られるものなどとは区別されるべきである。

【0065】

ポリペプチド結晶では、ポリペプチド分子は、共に配置されて対称単位を形成する非対称単位を形成する。ポリペプチド結晶の対称単位の幾何学的構造は、例えば、立方晶系、六方晶系、単斜晶系、斜方晶系、正方晶系、三斜晶系、または三方晶系であり得る。それら全ての結晶の全体構造は、例えば、両錐体、立方体、針、板、角柱、菱形、棒、もしくは球体、またはこれらの組み合わせの形態であり得る。その他の観察される形態としては、ブロック状、UFO状、フットボール状、葉状、小麦状、シングレット状、羽毛状、ストロー状、菊状、球状またはこれらの混合物が挙げられる。いくつかの実施形態では、結晶は、クラスターで観察される。「立方」構造クラスの結晶は、より具体的には十八面体または十二面体結晶形を有し得る。結晶の直径は、マーチン径として定義される。これは、無作為に配向した結晶を2つの等しい投影面積に分ける、視覚スケールに平行な線の長さとして測定される。針または棒などの形態の結晶はまた、本明細書において結晶の長さとして称される最大寸法を有するだろう。結晶はまた、X線回折により特徴付けられる。

【0066】

結晶性ポリペプチドの特性試験

ポリペプチド結晶が形成された後、それらのポリペプチド含有量を確認し、さらにそれらの物理構造を検査するために、その結晶で様々な分析を行うことができる。例えば、必要であれば個々の結晶を結晶化溶液から取り出して、水性もしくは有機溶媒または添加剤で洗浄し、次いで(例えば、空気乾燥により、結晶の上に不活性ガス流を通過させることにより、凍結乾燥により、または真空により)乾燥させることができる。結晶を単離し、結晶成長液滴から取り出して、次いでX線回折のために搭載することができる。

【0067】

結晶はまた、当該技術分野で記載されている様々な手段により特徴付けられ得る。例えば、タンパク質結晶製造及び製剤化手順、ならびに結晶及びそれらの成分タンパク質を特徴付けるための分析ツールの開示に関して、Basuet al., Expert Opin. Biol. Thera. 4, 301-317 (2004) (その全体が参照によって本明細書に組み込まれる)を参照のこと。粉末X線回折は、一般的に結晶性材料を同定するために使用されるが、これは非常に大きく完全なタンパク質結晶を必要とし、結晶製剤で典型的に使用されるタンパク質微結晶には一般的に適用されない。電子線回折及び固体核磁気共鳴(ssNMR)が、結晶を特徴付けるために適用され得る。結晶サイズ、形状及び形態(例えば、表面形態)は、例えば、光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡、走査型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡、及び/または光散乱(例えば、光子相関分光法またはDLS、低角度レーザー光散乱またはLALLS)により検査され得る。結晶の全表面積及び空隙率もまた特徴付けられ得る。質量分析、マイクロ減衰全反射フーリエ変換赤外分光(FTIR)及び/または示差走査熱量測定(DSC)は、タンパク質の一次及び二次構造についての情報を提供し得る。

【0068】

別の例としては、ポリペプチド結晶を結晶化溶液から取り出して洗浄もしくはすすぐこ

とができる、または結晶化溶液の大部分を結晶から除去して、異なる溶液と置き換えることができる。このように、結晶化手順で使用した特定の塩を、結晶格子内で異なる塩と置き換えることができる。本発明の一実施形態では、結晶化した抗体 2 1 B 1 2 を結晶化緩衝液から分離して、ナトリウム、カリウム、またはマグネシウムの塩（例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸カリウム、または硫酸マグネシウム）を含有する溶液中に置く。X 線回折のために、置換溶液は、結晶化ポリペプチドの原子座標の決定に有用な重原子を含有し得る。

【 0 0 6 9 】

さらなる一実施例では、ポリペプチド結晶を結晶化溶液から取り出して、さらなる試験のために適切な緩衝液、例えばゲル電気泳動による、結晶化されたポリペプチドの分析用の SDS 含有緩衝液中などに可溶化することができる。ゲル電気泳動によるタンパク質の分析方法は周知であって、この方法は銀またはクーマシーブルー色素によるゲルの染色、及び結晶化されたポリペプチドの電気泳動と、既知分子量のポリペプチドマーカの泳動との比較を含む。別の方法では、ポリペプチドは、ポリペプチドに特異的に結合する標識化抗体の使用によってゲル内で可視化する。結晶化されたポリペプチドはまた、エドマン分解によるアミノ酸配列決定のために、質量分析のために、その他の分光学的散乱、屈折、回折、もしくは吸収研究のために、または標識分子とポリペプチドとの結合によるポリペプチドの標識化のために適切な緩衝液中に可溶化することができる。

【 0 0 7 0 】

III . 治療的投与のための製剤

本明細書で使用する場合、「組成物」という用語は、本明細書で使用する場合、少なくとも 2 種の成分を含む混合物を意味する。特に、結晶性抗 P C S K 9 抗体を含む組成物、または結晶性抗 P C S K 9 抗体を使用して調製される組成物が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、結晶性抗 P C S K 9 抗体を含む、またはそれを使用して調製される組成物または製剤は、それを必要とする患者への注射及び/または投与に好適であるように調製される。薬学的目的で患者に投与される組成物は、実質的に無菌であり、レシピエントにとって過度に毒性または感染性のある薬剤を一切含有しない。

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態では、結晶性抗 P C S K 9 抗体、例えば結晶性抗体 2 1 B 1 2 などは、以下：生理学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤のうち 1 種以上を用いて製剤化される結晶性抗 P C S K 9 抗体を含む、生理学的に許容される組成物（本明細書においては、医薬組成物または医薬製剤とも称される）の形態で投与される。このような担体、賦形剤、または希釈剤は、用いられる投与量及び濃度でレシピエントにとって非毒性である。通常、このような組成物の調製は、結晶性抗 P C S K 9 抗体を、以下：緩衝剤、酸化防止剤、例えばアスコルビン酸など、低分子量ポリペプチド（10 未満のアミノ酸を有するものなど）、タンパク質、アミノ酸、例えばロイシン、プロリン、アラニン、バリン、グリシン、セリン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、イソロイシン、トレオニン、システイン、チロシン、ヒスチジン、リジン及びアルギニンなど、炭水化物、例えばグルコース、スクロースまたはデキストリンなど、キレート剤、例えば EDTA など、グルタチオンならびにその他の安定剤及び賦形剤のうち 1 種以上と組み合わせることを必要とする。液体製剤では、中性緩衝生理食塩水または非特異的血清アルブミンと混合した生理食塩水は、適切な例示的希釈剤である。適切な業界標準に従って、ベンジルアルコールなどの防腐剤もまた添加されてよい。医薬製剤に用いられてよい成分のさらなる例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980, ならびに American Pharmaceutical Association 及び Pharmaceutical Society of Great Britain によって共同出版された Handbook of Pharmaceutical Exci

ents に提示されている。

【0072】

一実施形態では、本明細書に記載される製剤はバルク製剤として調製され、したがって医薬組成物の成分は、投与に必要とされるであろう成分よりも多くなるように調節され、投与前に適切に希釈されることが企図される。

【0073】

本明細書に記載される抗体結晶は、保存及び取り扱いに好適な形態で、ならびに吸入または経肺投与に好適な形態で、例えばエアロゾル製剤の調製用粉末の形態で固体結晶製剤または粉末製剤として製剤化され得る。さらなる一実施形態では、抗体結晶は、このような結晶の溶液で、またはこのような結晶のスラリーで製剤化され得る。別の実施形態では、抗体結晶は、治療的投与のための水性製剤などの液体製剤を調製するために使用される。

10

【0074】

A．固体結晶製剤

抗体結晶の固体製剤は、溶液から実質的に単離されていて、または乾燥されていて、例えば粉末形態中の自由結晶として、または粒子として存在する結晶を含む。これに関連して、「粉末」という表現は、本質的に乾燥粒子、すなわち含水率が約10重量%未満、または6重量%未満、または4重量%未満である粒子の群を指す。ポリペプチド結晶または粉末は、場合により担体または界面活性剤と組み合わせられ得る。好適な担体剤としては、1)炭水化物、例えば単糖類、例えばフルクトース、ガラクトース、グルコース、ソルボースなど；2)二糖類、例えばラクトース、トレハロースなど；3)多糖類、例えばラフモース(raffinose)、マルトデキストリン、デキストランなど；4)アルジトール、例えばマンニトール、キシリトールなど；5)無機塩、例えば塩化ナトリウムなど；及び6)有機塩、例えばクエン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウムなどが挙げられる。ある種の実施形態では、担体は、トレハロース、ラフィノース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、イノシトール、スクロース、塩化ナトリウム、及びクエン酸ナトリウムから成る群から選択される。界面活性剤は、脂肪酸の塩、胆汁塩、リン脂質またはポリソルベートから成る群から選択され得る。脂肪酸塩としては、 $C_{10} - C_{14}$ 脂肪酸の塩、例えばカプリン酸ナトリウム、ラウリン酸ナトリウム、及びミリスチン酸ナトリウムなどが挙げられる。胆汁塩としては、ウルソデオキシコール酸塩、タウロコール酸塩、グリココール酸塩、及びタウロジヒドロフシド酸塩の塩が挙げられる。ポリソルベートとしては、ポリソルベート20及びポリソルベート80が挙げられる。一実施形態では、界面活性剤は、タウロコール酸塩の塩、例えばタウロコール酸ナトリウムなどである。界面活性剤として使用され得るリン脂質としては、リゾホスファチジルコリンが挙げられる。一実施形態では、界面活性剤はポリソルベート20であり、別の実施形態では、界面活性剤はポリソルベート80である。

20

30

【0075】

B．溶液またはスラリー中の結晶

ポリペプチド結晶を、懸濁液中での保存に好適とする方法であって、結晶化緩衝液(母液)を非水性溶媒と置き換えることを含む方法もまた、本明細書に記載される。さらに別の実施形態では、結晶スラリーは、第1溶媒を回転除去し、第2有機溶媒または添加剤を使用して残存する結晶性固体を洗浄して水を除去し、続いて非水性溶媒を蒸発させることにより固体にされ得る。結晶性治療用タンパク質の非水性スラリーは、皮下送達に特に有用である。

40

【0076】

このような一実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチド結晶は、ポリペプチド結晶を安定化させることを目的として液体有機添加剤と組み合わせられる。このような混合物は、n%の有機添加剤(ここで、nは1~99である)及びm%の水溶液(ここで、mは100-nである)を含む、水性-有機混合物として特徴付けられ得る。有機添加剤の例としては、フェノール化合物、例えばm-クレゾールもしくはフェノールもしくはこれ

50

らの混合物など、及びアセトン、メチルアルコール、メチルイソブチルケトン、クロロホルム、1-プロパノール、イソプロパノール、2-プロパノール、アセトニトリル、1-ブタノール、2-ブタノール、エチルアルコール、シクロヘキサン、ジオキサン、酢酸エチル、ジメチルホルムアミド、ジクロロエタン、ヘキサン、イソオクタン、塩化メチレン、tert-ブチルアルコール、トルエン、四塩化炭素、またはこれらの組み合わせが挙げられる。

【0077】

C. 液体製剤

本明細書で提供される別の実施形態は、医薬組成物の安定した長期保存を可能にする水性製剤であり、結晶性抗PCSK9抗体は、医薬組成物の調製に使用される活性成分である。この製剤が有用である理由の1つは、この製剤が再水和などの任意の追加ステップを必要としないことから、患者への使用により便利であるからである。本明細書で使用する場合、「溶液」または「液体製剤」は、好適な溶媒または相互に混和性の溶媒の混合物に溶解される1種以上の化学物質を含有する液体調製物を意味することを意図する。再構成は、適切な緩衝液または医薬製剤中におけるポリペプチド結晶または結晶製剤または組成物の溶解である。

10

【0078】

D. 医薬製剤の成分

本医薬組成物は、上記のような結晶性抗PCSK9抗体に加えて、その多くまたは全てが市販業者から入手可能である、以下の段落に列挙された以下の種類の成分または賦形剤のうち1種以上を組み合わせることにより調製される。組成物に含まれる様々な成分の組み合わせは、任意の適切な順序で行われ得、すなわち、緩衝剤が最初に、途中でまたは最後に添加され得、張度調節剤もまた最初に、途中でまたは最後に添加され得ることが、当業者には理解されるだろう。これらの化学物質のいくつかは、ある種の組み合わせにおいて不適合であり得、したがって類似した特性を有するが関連混合物に適合する異なる化学物質と容易に置換されることもまた、当業者には理解されるべきである。例えば、医薬組成物の保存に使用される容器及び/または治療的投与に使用されるデバイス内に存在する賦形剤及びその他の成分または材料の様々な組み合わせの適合性に関する知識が、当該技術分野に存在する（例えば、Akers, 2002, J Pharm Sci 91: 2283-2300を参照のこと）。

20

30

【0079】

本明細書に記載される製剤中に含まれ得る追加の薬剤の非限定的例としては、酸性化剤（酢酸、氷酢酸、クエン酸、フマル酸、塩酸、希塩酸、リンゴ酸、硝酸、リン酸、希リン酸、硫酸、酒石酸、及びその他の好適な酸を含むが、これらに限定されない）；活性成分（適切な投与量の、注射部位の不快感を減少させる追加の活性成分、及び非ステロイド性抗炎症薬、例えばトロメタミンなどを含むが、これらに限定されない）；エアロゾル噴射剤（ブタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、イソブタン、プロパン及びトリクロロモノフルオロメタンを含むが、これらに限定されない）；アルコール変性剤（安息香酸デナトニウム、メチルイソブチルケトン、オクタ酢酸スクロースを含むが、これらに限定されない）；アルカリ化剤（強アンモニア溶液、炭酸アンモニウム、ジエタノールアミン、ジイソプロパノールアミン、水酸化カリウム、重炭酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、トロラミンを含むが、これらに限定されない）；固化防止剤（ケイ酸カルシウム、ケイ酸マグネシウム、コロイド状二酸化ケイ素及びタルクを含むが、これらに限定されない）；消泡剤（ジメチコン及びシメチコンを含むが、これらに限定されない）；キレート剤（金属イオン封鎖剤とも呼ばれる）（エデト酸二ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸及び塩ならびにエデト酸を含むが、これらに限定されない）；コーティング剤（カルボキシメチルセルロースナトリウム、酢酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、エチルセルロース、ゼラチン、医薬用糊薬、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メタクリル酸コポリマー、メチルセルロース、ポリエチレ

40

50

ングリコール、ポリ酢酸フタル酸ビニル、シェラック、スクロース、二酸化チタン、カル
 ナバワックス、微結晶ワックス及びゼインを含むが、これらに限定されない）；着色料（
 カラメル、エリトロシン（FD&C Red No. 3）；FD&C Red No. 4
 0；FD&C Yellow No. 5；FD&C Yellow No. 6；FD&C
 Blue No. 1；赤、黄色、黒、青またはブレンド及び酸化第二鉄を含むが、これ
 らに限定されない）；錯化剤（エチレンジアミン四酢酸（EDTA）及びその塩、エデト
 酸、ゲンチシン酸エタノールメイド（ethanolmaide）ならびに硫酸オキシキ
 ノリンを含むが、これらに限定されない）；乾燥剤（塩化カルシウム、硫酸カルシウム及
 び二酸化ケイ素を含むが、これらに限定されない）；濾過助剤（粉末セルロース及び精製
 ケイ質土を含むが、これらに限定されない）；香味料及び香料（アネトール、アニス油、
 ベンズアルデヒド、桂皮油、ココア、エチルバニリン、メントール、サリチル酸メチル、
 グルタミン酸モノナトリウム、オレンジ花油、オレンジ油、ペパーミント、ペパーミント
 油、ペパーミント精、ローズ油、強ローズ水、チモール、トルバルサムチンキ、バニラ
 、バニラチンキ及びバニリンを含むが、これらに限定されない）；保湿剤（グリセリン、
 ヘキシレングリコール、プロピレングリコール及びソルビトールを含むが、これらに限定
 されない）；軟膏基剤（ラノリン、無水ラノリン、親水軟膏、白色軟膏、黄色軟膏、ポリ
 エチレングリコール軟膏、ワセリン、親水ワセリン、白色ワセリン、ローズ水軟膏及びス
 クアランを含むが、これらに限定されない）；可塑剤（ヒマシ油、ジアセチル化モノグリ
 セリド、フタル酸ジエチル、グリセリン、モノ及びジアセチル化モノグリセリド、ポリエ
 チレングリコール、プロピレングリコール、トリアセチンならびにクエン酸トリエチルを
 含むが、これらに限定されない）；ポリマー膜（酢酸セルロースを含むが、これに限定さ
 れない）；溶媒（アセトン、アルコール、希アルコール、アミレン水和物、安息香酸ベン
 ジル、ブチルアルコール、四塩化炭素、クロロホルム、コーン油、綿実油、酢酸エチル、
 グリセリン、ヘキシレングリコール、イソプロピルアルコール、メチルアルコール、塩化
 メチレン、メチルイソブチルケトン、鉱油、ピーナッツ油、ポリエチレングリコール、炭
 酸プロピレン、プロピレングリコール、ゴマ油、注射用水、注射用滅菌水、灌注用滅菌水
 及び精製水を含むが、これらに限定されない）；吸着剤（粉末セルロース、木炭、精製ケ
 イ質土；ならびに二酸化炭素吸着剤：水酸化バリウム石灰及びソーダ石灰を含むが、これ
 らに限定されない）；硬化剤（硬化ヒマシ油、セトステアリルアルコール、セチルアルコ
 ール、セチルエステルワックス、硬質脂肪、パラフィン、ポリエチレン賦形剤、ステアリ
 ルアルコール、乳化ワックス、白色ワックス及び黄色ワックスを含むが、これらに限定さ
 れない）；坐剤基剤（ココアバター、硬質脂肪及びポリエチレングリコールを含むが、こ
 れらに限定されない）；懸濁化剤及び／または増粘剤（アカシア、寒天、アルギン酸、モ
 ノステアリン酸アルミニウム、ベントナイト、精製ベントナイト、マグマベントナイト、
 カルボマー 934 p、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロ
 ースナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム 12、カラギーナン、微結晶及
 びカルボキシメチルセルロースナトリウムセルロース、デキストリン、ゼラチン、グアー
 ガム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピ
 ルメチルセルロース、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、メチルセルロース、ペクチン、
 ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポビドン、アルギン酸プロピレングリコ
 ール、二酸化ケイ素、コロイド状二酸化ケイ素、アルギン酸ナトリウム、トラガカントな
 らびにキサンタンガムを含むが、これらに限定されない）；甘味剤（アスパルテム、デ
 キストレート、デキストロース、賦形剤デキストロース、フルクトース、マンニトール、
 サッカリン、サッカリンカルシウム、サッカリンナトリウム、ソルビトール、溶液ソルビ
 トール、スクロース、圧縮糖、粉砂糖及びシロップを含むが、これらに限定されない）；
 錠剤結合剤（アカシア、アルギン酸、カルボキシメチルセルロースナトリウム、微結晶セ
 ルロース、デキストリン、エチルセルロース、ゼラチン、液体グルコース、グアーガム、
 ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、ポリエチレンオキシド、ポビ
 ドン、アルファ化デンプン及びシロップを含むが、これらに限定されない）；錠剤及び／
 またはカプセル希釈剤（炭酸カルシウム、二塩基性リン酸カルシウム、三塩基性リン酸カ

10

20

30

40

50

ルシウム、硫酸カルシウム、微結晶セルロース、粉末セルロース、デキストレート、デキストリン、デキストロース賦形剤、フルクトース、カオリン、ラクトース、マンニトール、ソルビトール、デンプン、アルファ化デンプン、スクロース、圧縮糖及び粉砂糖を含むが、これらに限定されない)；錠剤崩壊剤(アルギン酸、微結晶セルロース、クロスカルメロースナトリウム、コースポビドン(corspovidone)、ボラクリリンカリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、デンプン及びアルファ化デンプンを含むが、これらに限定されない)；錠剤及び/またはカプセル潤滑剤(ステアリン酸カルシウム、ベヘン酸グリセリル、ステアリン酸マグネシウム、軽質鉱油、ポリエチレングリコール、フマル酸ステアリルナトリウム、ステアリン酸、精製ステアリン酸、タルク、硬化植物油及びステアリン酸亜鉛を含むが、これらに限定されない)；ビヒクル(香味及び/または甘味付けされたもの(芳香エリキシル剤、複合ベンズアルデヒドエリキシル剤、イソアルコールエリキシル剤、ペパーミント水、ソルビトール溶液、シロップ、トルーバルサムシロップ)を含むが、これらに限定されない)；油性(アーモンド油、コーン油、綿実油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、鉱油、軽質鉱油、ミリスチルアルコール、オクチルドデカノール、オリーブ油、ピーナッツ油、パーシックス油、ゴマ油、大豆油、スクアラン)；固体担体、例えば糖球など；ならびに滅菌ビヒクル(注射用静菌水、静菌性塩化ナトリウム注射液)；ならびに防水剤(シクロメチコン、ジメチコン及びシメチコンを含むが、これらに限定されない)が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0080】

不適切または不必要な三元または四元複合体に会合するポリペプチドの傾向を減少させる凝集阻害剤もまた、本明細書に記載される製剤中に含まれ得る。好適な凝集阻害剤としては、アミノ酸L-アルギニン及び/またはL-システインが挙げられ、これらは長期間、例えば2年以上にわたりFcドメインを含有するポリペプチドの凝集を減少させるように作用し得る。製剤中の凝集阻害剤の濃度は、約1mM~1M、または約10mM~約200mM、または約10mM~約100mM、または約15mM~約75mM、または約150mM~約250mM、または約25mMであり得る。

【0081】

酸化防止剤もまた、本明細書に記載される製剤中に含まれてよい。製剤の調製における使用に企図される酸化防止剤としては、アミノ酸、例えばグリシン及びリジンなど、キレート剤、例えばEDTA及びDTPAなど、ならびにフリーラジカルスカベンジャー、例えばソルビトール及びマンニトールなどが挙げられる。追加の酸化防止剤としては、アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、次亜リン酸、モノチオグリセロール、没食子酸プロピル、重亜硫酸ナトリウム、ホルムアルデヒドスルホキシル酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、二酸化硫黄、トコフェロール、及びトコフェロール賦形剤が挙げられる。窒素または二酸化炭素オーバーレイもまた、酸化の阻害における使用に企図される。窒素または二酸化炭素オーバーレイは、充填プロセス中にバイアルまたはプレフィルドシリンジのヘッドスペースに導入され得る。

【0082】

医薬製剤のpHを所望の範囲内に維持する緩衝剤もまた、本明細書に記載される製剤中に含まれ得る。医薬組成物のpHが生理学的レベルにまたはその近傍に設定される場合、投与時における患者の快適さが最大化される。特に、ある種の実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.0~8.4のpH範囲内、または約5.0~8.0のpH範囲内、または約5.8~7.4、もしくは約6.2~7.0のpH範囲内である。pHは必要に応じて、特定の製剤中においてポリペプチドの安定性及び溶解度を最大化するように調節され得、したがって、生理学的範囲外であるが患者にとって許容可能なpHが、本発明の範囲内であると理解されるべきである。本発明の医薬組成物での使用に好適な種々の緩衝剤としては、ヒスチジン、アルカリ塩(リン酸ナトリウムもしくはリン酸カリウムまたはそれらの水素塩もしくは二水素塩)、クエン酸ナトリウム/クエン酸、酢酸ナトリウム/酢酸、クエン酸カリウム、マレイン酸、酢酸アンモニウム、トリス-(ヒドロキシメチル)-

アミノメタン(トリス)、様々な形態の酢酸塩及びジエタノールアミン、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、ホウ酸、乳酸、リン酸、メタリン酸カリウム、一塩基性リン酸カリウム、乳酸ナトリウム溶液、ならびに当該技術分野において既知の、任意のその他の薬学的に許容されるpH緩衝剤が挙げられる。pH調整剤、例えば塩酸、水酸化ナトリウム、またはそれらの塩などもまた、所望のpHを得るために含まれてよい。1つの好適な緩衝剤は、医薬組成物をpH6.2にまたはその近傍に維持するためのリン酸ナトリウムである。別の例では、酢酸塩はpH6よりもpH5においてより効率的な緩衝剤であるため、pH6の場合よりも少ない酢酸塩がpH5の溶液において使用されてよい。製剤中の緩衝剤の濃度は、約1mM~約1M、または約10mM~約300mMであり得る。

【0083】

ポリマー担体もまた、本明細書に記載される製剤中に含まれ得る。ポリマー担体は、生物学的送達を含むポリペプチドの送達のための、ポリペプチド結晶のカプセル化に使用されるポリマーである。このようなポリマーは、生体適合性及び生分解性ポリマーを含む。ポリマー担体は単一ポリマー型であってよい、またはこの担体は、ポリマー型の混合物で構成されてよい。ポリマー担体として有用なポリマーとしては、例えば、ポリ(アクリル酸)、ポリ(シアノアクリレート)、ポリ(アミノ酸)、ポリ(無水物)、ポリ(デブシペプチド)、ポリ(エステル)、例えばポリ(乳酸)すなわちPLA、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)すなわちPLGA、ポリ(B-ヒドロキシブトリエート(hydroxybutyrate))、ポリ(カプロラクトン)及びポリ(ジオキサノン)など；ポリ(エチレングリコール)、ポリ((ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、ポリ[(オルガノ)ホスファゼン]、ポリ(オルトエステル)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、無水マレイン酸-アルキルビニルエーテルコポリマー、ブルロニックポリオール、アルブミン、天然及び合成ポリペプチド、アルギン酸塩、セルロース及びセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリカミノグリカン(glycaminoglycan)、硫酸化多糖類、またはポリペプチド結晶をカプセル化するであろう任意の従来の材料が挙げられる。

【0084】

防腐剤、例えば抗菌防腐剤などもまた、本明細書に記載される製剤での使用に企図される。好適な防腐剤としては、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンザルコニウム溶液、塩化ベンゼルトニウム、安息香酸、ベンジルアルコール、ブチルパラベン、塩化セチルピリジニウム、クロロブタノール、クロロクレゾール、クレゾール、デヒドロ酢酸、エチルパラベン、メチルパラベン、メチルパラベンナトリウム、フェノール、フェニルエチルアルコール、酢酸フェニル水銀、硝酸フェニル水銀、安息香酸カリウム、ソルビン酸カリウム、プロピルパラベン、プロピルパラベンナトリウム、安息香酸ナトリウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、ソルビン酸、チメロサル、及びチモールが挙げられるが、これらに限定されない。含まれる防腐剤の量は、0%~2%(w/v)の範囲内または約1%(w/v)であろう。

【0085】

ポリペプチドの溶解度を増加させる、及び/または溶液中で(または乾燥もしくは凍結形態で)ポリペプチドを安定させる可溶化剤及び安定剤(乳化剤、共溶質、または共溶媒とも称される)もまた、医薬組成物に添加され得る。可溶化剤及び安定化剤の例としては、糖/ポリオール、例えばスクロース、ラクトース、グリセロール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルトース、イノシトール、トレハロース、グルコースなど；ポリマー、例えば血清アルブミン(ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒトSA(HSA)、または組換えHA)、デキストラン、PVA、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ポリエチレンイミン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン(PVP)、ヒドロキシエチルセルロース(HEC)など；非水性溶媒、例えば多価アルコール(例えば、PEG、エチレングリコール及びグリセロール)、ジメチルスルホキシド(dimethylsulfoxide)(DMSO)、及びジメチルホルムアミド(DMF)など；アミノ酸、例えばプロリン、L-メチオニン、L-セリン、グルタミン酸ナトリウム、アラニン、

10

20

30

40

50

グリシン、リジン塩酸塩、サルコシン、及びガンマ - アミノ酪酸など；界面活性剤、例えば Tween - 80、Tween - 20、SDS、ポリソルベート、ポリオキシエチレンコポリマーなど；ならびに多岐にわたる安定化賦形剤、例えばリン酸カリウム、酢酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、トリメチルアミン N - オキシド、ベタイン、金属イオン（例えば、亜鉛、銅、カルシウム、マンガン、及びマグネシウム）、CHAPS、モノラウレート、2 - O - ベータ - マンノグリセレートなど；もしくは以下：アカシア、コレステロール、ジエタノールアミン（補助剤）、モノステアリン酸グリセリル、ラノリンアルコール、レシチン、モノ及びジグリセリド、モノエタノールアミン（補助剤）、オレイン酸（補助剤）、オレイルアルコール（安定剤）、ポロキサマー、ポリオキシエチレン 50 ステアレート、ポリオキシシル 35 ヒマシ油、ポリオキシシル 40 硬化ヒマシ油、ポリオキシシル 10 オレイルエーテル、ポリオキシシル 20 セトステアリルエーテル、ポリオキシシル 40 ステアレート、ポリソルベート 20、ポリソルベート 40、ポリソルベート 60、ポリソルベート 80、ポリソルベート 100、Triton X - 100、プロピレングリコールジアセテート、モノステアリン酸プロピレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノオレート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート、ステアリン酸、トロラミン、乳化ワックスのいずれか；湿潤剤及び／もしくは可溶化剤、例えば塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム、ドキュセートナトリウム、ノノキシノール 9、ノノキシノール 10、オクトキシノール 9、ポリオキシシル 50 ステアレート、チロキサポールなど；または上記の任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。製剤中の可溶化剤／安定剤の濃度は、約 0.001 ~ 5 重量%、または約 0.1 ~ 2 重量%であり得る。一実施形態では、安定剤は、ソルビタンモノ - 9 - オクタデセノエートポリ（オキシ - 1, 2 - エタンジール）誘導体から選択され、これはポリソルベート 80 またはポリソルベート 20 を含むが、これらに限定されない。本実施形態で使用されるポリソルベート 20 または 80 の量は、単回使用において、または複数回用量製剤において、0.001% ~ 1.0% (w/v) の範囲内、例えば 0.005% (w/v) などである。別の実施形態では、0.05 mM ~ 50 mM の範囲内の遊離 L - メチオニンが製剤中に含まれ、遊離 L - メチオニンの量は、単回使用製剤については 0.05 mM ~ 5 mM、及び複数回用量製剤については 1 mM ~ 10 mM である。

10

20

30

40

50

【0086】

張度調節剤もまた、本明細書に記載される製剤中に含まれ得る。張度調節剤は、溶液のオスモル濃度に寄与する分子であると理解されている。医薬組成物のオスモル濃度は、活性成分の安定性を最大化し、さらに投与時の患者の不快感を最小限に抑えるために、好ましくは制御される。血清は、1 キログラム当たりおよそ 300 + / - 50 ミリオスモルである。一般に、医薬組成物が血清と等張である、すなわち同じまたは類似のオスモル濃度を有することが好ましく、これは張度調節剤の添加により達成され、したがって、オスモル濃度は約 180 ~ 約 420 ミリオスモルであろうことが企図されるが、オスモル濃度は、特定の条件に必要な場合により高いまたはより低い濃度のいずれかであり得ることが理解されるべきである。オスモル濃度の調節に好適な張度調節剤の例としては、アミノ酸（例えば、アルギニン、システイン、ヒスチジン及びグリシン）、塩（例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム及びクエン酸ナトリウム）及び／または糖類（例えば、スクロース、グルコース、デキストロース、グリセリン、及びマンニトール）が挙げられるが、これらに限定されない。製剤中の張度調節剤の濃度は、約 1 mM ~ 1 M、または約 10 mM ~ 約 200 mM であり得る。一実施形態では、張度調節剤は、0 mM ~ 200 mM の濃度範囲内の塩化ナトリウムである。別の実施形態では、張度調節剤はソルビトールまたはトレハロースであり、塩化ナトリウムは全く存在しない。

【0087】

ある種の実施形態では、製剤は、以下から選択される化合物、またはこれらの任意の組み合わせを含む：1) アミノ酸、例えばグリシン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アスパラギン、グルタミン、プロリンなどの塩；2) 炭水化物、例えば

単糖類、例えばグルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、アラビノース、キシロース、リボースなど； 3) 二糖類、例えばラクトース、トレハロース、マルトース、スクロースなど； 4) 多糖類、例えばマルトデキストリン、デキストラン、デンプン、グリコーゲンなど； 5) アルジトール、例えばマンニトール、キシリトール、ラクチトール、ソルビトールなど； 6) グルクロン酸、ガラクトン酸； 7) シクロデキストリン、例えばメチルシクロデキストリン、ヒドロキシプロピル - ベータ - シクロデキストリンなど； 8) 無機塩、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、ナトリウム及びカリウムのリン酸塩、ホウ酸、炭酸アンモニウム及びリン酸アンモニウムなど； 9) 有機塩、例えば酢酸塩、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、乳酸塩など； 10) 乳化剤または可溶化剤、例えばアカシア、ジエタノールアミン、モノステアリン酸グリセリル、レシチン、モノエタノールアミン、オレイン酸、オレイルアルコール、ポロキサマー、ポリソルベート、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノステアレート、及びその他のソルビタン誘導体、ポリオキシシル誘導体、ワックス、ポリオキシエチレン誘導体、ソルビタン誘導体など； 11) 増粘試薬、例えば寒天、アルギン酸及びその塩、グアーガム、ペクチン、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキシド、セルロース及びその誘導体、炭酸プロピレン、ポリエチレングリコール、ヘキシレングリコール、チロキサポールなど； ならびに 12) 特定の成分、例えばスクロース、トレハロース、ラクトース、ソルビトール、ラクチトール、イノシトール、ナトリウム及びカリウムの塩、例えば酢酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、ホウ酸塩など、グリシン、アルギニン、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ヘキシレングリコール、メトキシポリエチレングリコール、ゼラチン、ヒドロキシプロピル - シクロデキストリンなど。

10

20

【 0 0 8 8 】

E . 徐放性形態

いくつかの実施形態では、結晶性抗 P C S K 9 抗体の徐放性形態（「制御放出」形態とも呼ばれる）が使用され、これは結晶性抗体 2 1 B 1 2 の徐放性形態；結晶性抗体 2 1 B 1 2、及び結晶性抗体 2 1 B 1 2 の物理的放出または生物学的利用能を、所望の期間にわたって延長するための物質を含む徐放性または制御放出形態を含む。

【 0 0 8 9 】

開示される方法での使用に好適な徐放性形態としては、徐放性手段、例えば低速溶解生体適合性ポリマー（例えば、本明細書に記載されるポリマー担体、米国特許第 6 , 0 3 6 , 9 7 8 号に記載されているアルギン酸塩マイクロ粒子、または米国特許第 6 , 0 8 3 , 5 3 4 号に記載されているポリエチレン - 酢酸ビニル及びポリ（乳酸 - グルコール酸（ g l u c o l i c a c i d ））組成物）などにカプセル化される、このようなポリマーと混合される（局所適用ヒドロゲルを含む）、及び / または生体適合性半透過性インプラント内に封入される結晶性抗体 2 1 B 1 2 が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のさらなる実施形態としては、追加の徐放性形態、例えばポリマーマイクロ粒子であって、活性成分と徐放性手段、例えばポリマー（例えば、 P L G A ）などとの混合物が連続相内に分散され、得られた分散物が直接凍結乾燥されて水及び有機溶媒または添加剤を除去し、前記マイクロ粒子を形成する（米国特許第 6 , 0 2 0 , 0 0 4 号（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる））；生分解性アニオン性多糖類、例えばアルギン酸エステルなど、ポリペプチド、及び少なくとも 1 つの結合した多価金属イオンを含む、注射用ゲル組成物（米国特許第 6 , 4 3 2 , 4 4 9 号（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる））；逆熱ゲル化特性及び場合により p H 応答性ゲル化 / 脱ゲル化特性を有する、注射用生分解性ポリマーマトリックス（米国特許第 6 , 5 4 1 , 0 3 3 号及び第 6 , 4 5 1 , 3 4 6 号（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる））；生体適合性ポリオール：油懸濁液、例えば懸濁液が約 1 5 重量 % ~ 約 3 0 重量 % の範囲内でポリオールを含むものなど（米国特許第 6 , 2 4 5 , 7 4 0 号（その全体が参照によって組み込まれる））などが挙げられる。このような徐放性形態は、デポー剤の形態での投与によるポリペプチドの持続送達に好適であり、デポー剤はインプラントであり得る、または注射用マイクロスフ

30

40

50

エア、ナノスフェア、もしくはゲルの形態であり得る。上に列挙された米国特許（米国特許第6,036,978号；第6,083,534号；第6,020,004号；第6,432,449号；第6,541,033号；第6,451,346号、及び第6,245,740号）は、それら全体が参照によって本明細書に組み込まれる。加えて、本発明の結晶性ポリペプチドの徐放性または制御放出形態は、Kim, C., 2000, "Controlled Release Dosage Form Design", Technomic Publishing Co., Lancaster Pa.に記載されているものなどの徐放性手段の種類を含み、これらとしては以下のものが挙げられる：天然ポリマー（ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、キサンタンガム、アラビアガム、またはキトサン）、半合成ポリマーまたはセルロース誘導体（メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、酢酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸プロピオン酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、またはフタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、及び合成ポリマー（イオン交換樹脂（メタクリル酸、スルホン化ポリスチレン/ジビニルベンゼン）、ポリアクリル酸（Carbopol）、ポリ（MMA/MAA）、ポリ（MMA/DEAMA）、ポリ（MMA/EA）、ポリ（酢酸フタル酸ビニル）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸/グリコール酸）、ポリエチレングリコール、ポリエチレンオキシド、ポリ（ジメチルシリコーン）、ポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（エチレン/酢酸ビニル）、ポリ（エチレン/ビニルアルコール）、ポリブタジエン、ポリ（無水物）、ポリ（オルトエステル）、及びポリ（グルタミン酸））。

10

20

30

40

50

【0090】

本明細書に開示されるさらなる実施形態は、米国特許第6,541,606号（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されているように、少なくとも1種のポリマー担体内にカプセル化される抗体21B12結晶であって、ポリマー担体のマトリックス内へのカプセル化によりミクロスフェアを形成し、それらの天然及び生物学的に活性な三次構造を維持する結晶を含む。カプセル化される抗体21B12結晶またはその製剤は、有機溶媒または添加剤に溶解したPLGAなどのポリマー担体中に懸濁される。このようなカプセル化抗体21B12結晶は、同等の条件下で保存された場合、溶液中の抗体21B12よりも長期間、抗体21B12の生物活性を維持する。

【0091】

IV. キット

追加の態様として、本明細書に記載される1種以上の製剤を含むキットであって、対象への投与のためにその使用を容易にする方法でパッケージ化されたキットが、本明細書に記載される。一実施形態では、このようなキットは、本明細書に記載される製剤（例えば、本明細書に記載される抗体のいずれかを含む組成物）を含み、製剤は容器、例えば密閉ボトル、槽、単回使用もしくは複数回使用バイアル、プレフィルドシリンジ、またはプレフィルド注射デバイスなどの中にパッケージ化されて、場合により方法の実施における化合物または組成物の使用について記載し、容器に貼り付けられる、またはパッケージ内に含まれるラベルを有する。一態様では、化合物または組成物は、単位剤形内にパッケージ化される。キットは、特定の投与経路による組成物の投与に好適なデバイスをさらに含んでよい。好ましくはキットは、本明細書に記載される抗体または本明細書に記載される製剤の使用について記載するラベルを含有する。

【0092】

V. 投与量

本明細書に記載される状態を処置する方法に関与する投与レジメンは、薬物の作用を調節する様々な要因、例えば、患者の年齢、状態、体重、性別及び食事、任意の感染の重症度、投与時期ならびにその他の臨床的要因を考慮して、主治医により決定されるだろう。様々な態様では、投与量は、体重1キログラム当たり0.1~50mgの抗体調製物の範

囲内である（化学修飾を含まない、タンパク質単独での質量を計算する）。いくつかの実施形態では、投与量は、約 0.5 mg/kg ~ 20 mg/kg、または約 0.5 ~ 10 mg/kg である。いくつかの実施形態では、投与量は、約 120 mg ~ 約 1200 mg、または約 280 ~ 約 450 mg である。

【0093】

様々な態様では、抗 PCSK9 抗体、例えば抗体 21B12 の投与量は、抗 PCSK9 抗体、例えば抗体 21B12 の少なくとも約 100 mg ~ 約 1400 mg；または約 120 mg ~ 約 1200 mg；または約 120 mg ~ 約 1000 mg；または約 120 mg ~ 約 800 mg；または約 120 mg ~ 約 700 mg；または約 120 mg ~ 約 480 mg；または約 120 mg ~ 最大約 480 mg；または約 100 mg ~ 最大約 480 mg；または約 1200 mg ~ 約 480 mg；または約 140 mg ~ 約 480 mg；または約 145 mg ~ 約 480 mg；または約 150 mg ~ 約 480 mg；または約 160 mg ~ 約 480 mg；または約 170 mg ~ 約 480 mg；または約 180 mg ~ 約 480 mg または約 190 mg ~ 約 480 mg または約 200 mg ~ 約 480 mg；または約 210 mg ~ 約 480 mg；または約 220 mg ~ 約 480 mg；または約 230 mg ~ 約 480 mg；または約 240 mg ~ 約 480 mg；または約 250 mg ~ 約 480 mg；または約 260 mg ~ 約 480 mg；または約 270 mg ~ 約 480 mg；または約 280 mg ~ 約 480 mg；または約 290 mg ~ 約 480 mg；または約 300 mg ~ 約 480 mg；または約 310 mg ~ 約 480 mg；または約 320 mg ~ 約 480 mg；または約 330 mg ~ 約 480 mg；または約 340 mg ~ 約 480 mg；または約 350 mg ~ 約 480 mg；または約 360 mg ~ 約 480 mg；または約 370 mg ~ 約 480 mg；または約 380 mg ~ 約 480 mg；または約 390 mg ~ 約 480 mg；または約 400 mg ~ 約 480 mg；または約 410 mg ~ 約 480 mg；または約 420 mg ~ 約 480 mg；または約 430 mg ~ 約 480 mg；または約 440 mg ~ 約 480 mg；または約 450 mg ~ 約 480 mg；または約 460 mg ~ 約 480 mg；または約 470 mg ~ 約 480 mg の範囲であり得る。

【0094】

ある種の実施形態では、投薬頻度は、使用される製剤中の抗 PCSK9 抗体及び/または任意の追加治療剤の薬物動態パラメータを考慮に入れるだろう。ある種の実施形態では、臨床医は、所望の効果を達成する投与量に到達するまで製剤を投与するだろう。したがって、ある種の実施形態では、製剤は単回用量として、または経時的に 2 回、3 回、4 回またはそれを超える用量（同じ量の所望の分子を含有しても、または含有しなくてもよい）として、または埋め込みデバイスもしくはカテーテルによる持続注入として投与され得る。製剤はまた、標準的な針及びシリンジで皮下または静脈内に送達され得る。加えて、皮下送達に関して、ペン型送達デバイス、ならびに自動注射器送達デバイスは、本発明の医薬製剤の送達に適用性を有する。適切な投与量のさらなる改良は、当業者により日常的に行われ、当業者により日常的に実施される業務の範囲内である。ある種の実施形態では、適切な投与量は、適切な用量反応データの使用により確認され得る。いくつかの実施形態では、投与量及び投与頻度は、得られるべき所望の（血清及び/または総）コレステロールレベルならびに対象の現在のコレステロールレベル、LDL レベル、及び/または LDL R レベルを考慮に入れることができ、これらの全ては当業者に周知の方法によって得られ得る。

【0095】

いくつかの実施形態では、抗 PCSK9 抗体、例えば抗体 21B12 の少なくとも約 100 mg；または最大約 110 mg；または最大約 115 mg、または最大約 120 mg；または最大約 140 mg；または最大約 160 mg；または最大約 200 mg；または最大約 250 mg；または最大 280 mg；または最大 300 mg；または最大 350 mg；または最大 400 mg；または最大 420 mg の投与量が、それを必要とする患者に 1 週間おきに 1 回（または 2 週間ごとに）（Q2W）投与される。

【0096】

ある種のその他の実施形態では、抗PCSK9抗体、例えば抗体21B12の少なくとも約250mg；または最大約280mg；または最大約300mg；または最大約350mg；または最大約400mg；または最大約420mg；または最大約450mg；または最大480mgの投与量が、それを必要とする患者に4週間に1回（または月に1回）投与される。

【0097】

製剤は一般に、非経口的に、例えば静脈内、皮下、筋肉内、エアロゾル（肺内または吸入投与）により、または長期放出のためのデポ剤により投与される。いくつかの実施形態では、製剤は、医薬品の治療循環レベルを維持するために最初のボースに続いて持続注入により静脈内投与される。その他の実施形態では、製剤は1回用量として投与される。当業者は、適切な医療行為及び個々の患者の臨床状態により決定されるように、有効投与量及び投与レジメンを容易に最適化するだろう。投薬頻度は、薬剤の薬物動態パラメータ及び投与経路に依存するだろう。最適な医薬製剤は、投与経路及び所望の投与量に応じて当業者により決定されるだろう。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) 1435-1712頁を参照（その開示は参照によって本明細書に組み込まれる）のこと。このような製剤は、投与される薬剤の物理的状态、安定性、インビボ放出の速度、及びインビボクリアランスの速度に影響を与える場合がある。投与経路に応じて、好適な用量は、体重、体表面積または臓器サイズにより計算されてよい。上述した製剤の各々に関与する処置のための適切な投与量を決定するのに必要な計算のさらなる精密化は、特に本明細書に開示される投与量情報及びアッセイ、ならびに上述したヒト臨床試験で観察される薬物動態データに照らして、過度な実験をすることなく当業者により日常的に行われる。適切な投与量は、適切な用量反応データと組み合わせて血中レベル投与量を決定するための確立されたアッセイの使用により確認されてよい。最終的な投与レジメンは、薬物の作用を調節する様々な要因、例えば、薬物の比活性、損傷の重症度及び患者の応答性、患者の年齢、状態、体重、性別及び食事、任意の感染の重症度、投与時期ならびにその他の臨床的要因を考慮して、主治医により決定されるだろう。研究が実施されるにつれて、適切な投与量レベルならびに様々な疾患及び状態の処置期間に関するさらなる情報が現れるだろう。

【0098】

VI. 製剤の治療的使用

当業者には理解されるように、多様なコレステロール、LDL、LDLR、PCSK9、VLDL-C、アポタンパク質B（「ApoB」）、リポタンパク質A（「Lp(a）」）、トリグリセリド、HDL-C、非HDL-C、及び総コレステロールレベルに関連し、それらに関与し、またはそれらによって影響され得る障害は、本発明の医薬製剤によって対処され得る。一態様では、抗PCSK9抗体製剤は、血清コレステロールレベルの上昇に関連する、または血清コレステロールレベルの上昇が関連する障害を処置及び／もしくは予防する、ならびに／またはその障害のリスクを減少させる方法に使用され得る。一態様では、抗PCSK9抗体製剤は、PCSK9値の上昇に関連する、またはPCSK9値の上昇が関連する障害を処置及び／もしくは予防する、ならびに／またはその障害のリスクを減少させる方法に使用され得る。一態様では、抗PCSK9抗体製剤は、総コレステロールレベルの上昇に関連する、または総コレステロールレベルの上昇が関連する障害を処置及び／もしくは予防する、ならびに／またはその障害のリスクを減少させる方法に使用され得る。一態様では、抗PCSK9抗体製剤は、非HDLコレステロールレベルの上昇に関連する、または非HDLコレステロールレベルの上昇が関連する障害を処置及び／もしくは予防する、ならびに／またはその障害のリスクを減少させる方法に使用され得る。一態様では、抗PCSK9抗体製剤は、ApoBレベルの上昇に関連する、またはApoBレベルの上昇が関連する障害を処置及び／もしくは予防する、ならびに／またはその障害のリスクを減少させる方法に使用され得る。一態様では、抗PCSK9抗体製剤は、Lp(a)レベルの上昇に関連する、またはLp(a)レベルの上昇が関連する障害を処置及び／

もしくは予防する、ならびに／またはその障害のリスクを減少させる方法に使用され得る。一態様では、抗PCSK9抗体製剤は、トリグリセリドレベルの上昇に関連する、またはトリグリセリドレベルの上昇が関連する障害を処置及び／もしくは予防する、ならびに／またはその障害のリスクを減少させる方法に使用され得る。一態様では、抗PCSK9抗体製剤は、VLDL-Cレベルの上昇に関連する、またはVLDL-Cレベルの上昇が関連する障害を処置及び／もしくは予防する、ならびに／またはその障害のリスクを減少させる方法に使用され得る。

【0099】

当業者には理解されるように、本発明の抗PCSK9抗体製剤は、コレステロール関連障害を処置及び／または予防するのに治療的に有用であり得る。本発明の医薬製剤の投与により処置または予防され得る、例示的で非限定的な疾患及び障害としては、家族性高コレステロール血症、非家族性高コレステロール血症、高脂血症、心疾患、メタボリックシンドローム、糖尿病、冠動脈性心疾患、脳卒中、心血管疾患、アルツハイマー病及び一般的な脂質異常症が挙げられ、これらは例えば、血清総コレステロールの上昇、LDLの上昇、トリグリセリドの上昇、VLDLの上昇、及び／または低HDLによって示され得る。本明細書に記載される製剤を、単独でまたは1種以上のその他の薬剤と組み合わせたいずれかで使用して処置され得る、原発性及び続発性脂質異常症のいくつかの非限定的例としては、メタボリックシンドローム、真性糖尿病、家族性複合型高脂血症、家族性高トリグリセリド血症、ヘテロ接合型高コレステロール血症、ホモ接合型高コレステロール血症、家族性欠陥アポリポタンパク質 (apoplipoprotein) B-100；多遺伝子性高コレステロール血症を含む、家族性高コレステロール血症；レムナント除去病、肝性リパーゼ欠損症；以下：食傷、甲状腺機能低下症、エストロゲン及びプロゲステン療法を含む薬物、ベータ遮断薬、及びチアジド利尿薬のうちいずれかに続発する脂質異常症；ネフローゼ症候群、慢性腎不全、クッシング症候群、原発性胆汁性肝硬変、糖原病、ヘパトーマ、胆汁鬱滞、先端巨大症、インスリノーマ、成長ホルモン単独欠損症、ならびにアルコール誘発性高トリグリセリド血症が挙げられる。本発明の製剤は、アテローム性動脈硬化疾患、例えば、心血管死亡、非心血管死亡または全死因死亡、冠動脈性心疾患、冠動脈疾患、末梢動脈疾患、脳卒中（虚血性及び出血性）、狭心症、または脳血管疾患及び急性冠症候群、心筋梗塞ならびに不安定狭心症などの予防または処置にも有用であり得る。いくつかの実施形態では、製剤は、致死性及び非致死性心臓発作、致死性及び非致死性脳卒中、ある特定の種類の心臓手術、心不全のための入院、心疾患に罹患している患者の胸痛、ならびに／または既存の心疾患、例えば以前の心臓発作、以前の心臓手術などによる心血管イベント、ならびに／または閉塞動脈の徴候を有する胸痛ならびに／または移植関連血管疾患のリスクを減少させるのに有用である。いくつかの実施形態では、製剤は、CRPまたはhsCRPの上昇による心血管リスクを予防する、または減少させるのに有用である。いくつかの実施形態では、製剤及び方法は、再発性心血管イベントのリスクを減少させるために使用され得る。

【0100】

当業者には理解されるように、スタチンの使用により一般に対処可能な（処置可能または予防可能ないずれかの）疾患または障害は、本発明の製剤の適用からも恩恵を受け得る。加えて、当業者には理解されるように、本発明の製剤の使用は、糖尿病の処置に特に有用であり得る。

【0101】

いくつかの実施形態では、本発明の製剤は、真性糖尿病、腹部大動脈瘤、アテローム性動脈硬化症及び／または末梢血管疾患を有する患者に、その患者の血清コレステロールレベルをより安全な範囲まで低減させるために投与される。いくつかの実施形態では、本発明の製剤は、本明細書に記載される障害のいずれかを発症するリスクがある患者に投与される。いくつかの実施形態では、本発明の製剤は、喫煙している、または以前に喫煙していた（すなわち、喫煙経験者）、高血圧である、または若年心臓発作の家族歴を有する対象に投与される。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 2 】

製剤は、障害を持つ対象を治癒する必要はない。製剤は、全体的もしくは部分的にコレステロール関連障害もしくはその症状を改善するために、または全体的もしくは部分的にコレステロール関連障害もしくはその症状のさらなる進行から保護するために治療的に使用されてよい。実際に、本発明の材料及び方法は、血清LDLコレステロールの低下及びある期間にわたる血清LDLコレステロールの減少の維持に特に有用である。

【 0 1 0 3 】

本明細書に記載される製剤の1回以上の投与は、例えば約2週間～約12か月（例えば、約1か月、約2か月、約3か月、約4か月、約5か月、約6か月、約7か月、約8か月、約9か月、約10か月、または約11か月）の治療期間にわたって実施されてよい。いくつかの実施形態では、対象は、血清LDLコレステロールを低下させるために製剤の1回以上の用量を投与される。「血清LDLコレステロールの減少を維持する」という用語は、本明細書で使用する場合、製剤の初期用量から得られる血清LDLコレステロールの減少が、約2週間、約1か月、約2か月、約3か月、約6か月、約9か月、約1年、約18か月、約2年にわたって、または患者の生涯にわたって）約1%～約5%を超えて降下しないことを意味する。

【 0 1 0 4 】

加えて、特定の対象のために選択された治療レジメンに応じて、複数回用量の製剤を投与すること、または用量の投与間隔を空けることが有利である場合がある。製剤は、1年以下の期間（例えば、9か月以下、6か月以下、または3か月以下）にわたって周期的に投与され得る。この点に関して、製剤は、約7日、または2週間、または3週間、または1か月、または5週間、または6週間、または7週間、または2か月、または9週間、または10週間、または11週間、または3か月、または13週間、または14週間、または15週間、または4か月、または17週間、または18週間、または19週間、または5か月、または21週間、または22週間、または23週間、または6か月、または12か月に1回ヒトに投与され得る。

【 0 1 0 5 】

V I I . 併用療法

同じ病原体または生化学的経路を標的とする2種以上の薬剤を組み合わせることによる病状の処置は、各薬剤単独の治療に関連する用量の使用と比較して、より高い有効性及び副作用の減少をもたらすことがある。いくつかの場合には、混合薬の有効性は相加的（混合の有効性が各薬剤単独での効果の和にほぼ等しい）であるが、その他の場合には、効果は相乗的（混合の有効性が所与の各薬剤単独での効果の和よりも高い）であり得る。本明細書で使用する場合、「併用療法」という用語は、2種類の化合物が同時に、例えば並行して送達され得る、または化合物のうちの1種が最初に投与されて、続いて第2薬剤が投与されるような、例えば連続して送達され得ることを意味する。望ましい結果は、投与のレシピエントにおける1つ以上の症状の主観的な軽減または客観的に特定可能な改善のいずれかであり得る。

【 0 1 0 6 】

いくつかの実施形態では、製剤は、低減した骨ミネラル密度の処置のための標準治療の前に、それと同時に、またはその後に投与される。本明細書で使用する場合、「標準治療」という用語は、ある種の病気と診断されたある種類の患者に対する、臨床医によって一般に認められている処置を指す。いくつかの実施形態では、標準治療薬は、少なくとも1種のその他のコレステロール低下（血清及び/または全身コレステロール）剤である。例示的な薬剤としては、スタチン（アトルバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、メバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、シンバスタチン）、ニコチン酸（ナイアシン）（N I A C O R、N I A S P A N（徐放性ナイアシン）、S L O - N I A C I N（徐放性ナイアシン）、C O R D A P T I V E（ラロピプラント）、フィブリン酸（L O P I D（ゲムフィプロジル）、T R I C O R（フェノフィブラート）、胆汁酸捕捉剤（Q U E S T R A N（コレステラミン）、コレセベラ

ム(WELCHOL)、COLESTID(コレスチボール)、コレステロール吸収阻害剤(ZETIA(エゼチミブ))、ニコチン酸とスタチンとの組み合わせ(ADVICOR(LOVASTATIN及びNIASPAN)、スタチンと吸収阻害剤との組み合わせ(VYTORIN(ZOCOR及びZETIA)及び/または脂質修飾剤が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、製剤は、PPARガンマアゴニスト、PPARアルファ/ガンマアゴニスト、スクアレンシンターゼ阻害剤、CETP阻害剤、降圧剤、抗糖尿病剤(スルホニル尿素、インスリン、GLP-1類似体、DDPIV阻害剤、例えばメタホルミンなど)、ApoBモジュレーター、例えばミボメルサン(mipomersan)など、MTP阻害剤及び/または閉塞性動脈硬化症処置と組み合わせられる。いくつかの実施形態では、製剤は、対象においてLDLRタンパク質のレベルを増加させる薬剤、例えばスタチン、オンコスタチンMのようなある種のサイトカイン、エストロゲン、及び/またはベルベリンなどのある種の薬草成分などと組み合わせられる。いくつかの実施形態では、製剤は、対象において血清コレステロールレベルを増加させる薬剤(ある種の抗精神病剤、ある種のHIVプロテアーゼ阻害剤、食事要因、例えば高フルクトース、スクロース、コレステロールまたはある種の脂肪酸など、ならびにRXR、RAR、LXR、FXRに対するある種の核内受容体アゴニスト及びアンタゴニストなど)と組み合わせられる。いくつかの実施形態では、製剤は、対象においてPCSK9のレベルを増加させる薬剤、例えばスタチン及び/またはインスリンなどと組み合わせられる。2種の組み合わせは、その他の薬剤の望ましくない副作用が製剤によって軽減されることを可能にし得る。

10

20

【0107】

いくつかの実施形態では、製剤は、本明細書に記載される標準治療薬の処置が禁忌である場合に対象に投与される。

【実施例】

【0108】

実施例1 - 抗体21B12の結晶化

pH5.0の20mMの酢酸ナトリウム、220mMのプロリン、0.010%ポリソルベート80中における抗体21B12(配列番号17及び19、図4A及び図4B)(120mg/ml)を、Bio-Radの脱塩カラムを使用して、pH5.0の20mMの酢酸緩衝液中で脱塩した。抗体21B12を、様々な条件下で結晶化した。

30

【0109】

抗体21B12の結晶化は、「ハンギングドロップ」蒸気拡散として知られる高分子の結晶化方法を用いる、3つの異なる結晶化スクリーン(Emerald BioSystems)を使用して達成した。タンパク質と結晶化試薬(「結晶化緩衝液」または「母液」または「結晶成長溶液」または「リザーバー溶液」との混合物で構成される液滴を、シリコン処理したカバーガラスの下面に滴下し、次いでカバーガラス上の液滴を、封止のためにウェルの縁に油を塗布した後、典型的には24ウェルVDXトレイ(Hampton Research、アリゾビエホ、カリフォルニア州(HR3-140)上に置き、試薬の液体リザーバーとの蒸気平衡を生じさせる。平衡を達成するために、液滴とトレイのウェル内における500~600µLのリザーバー溶液との間で水蒸気が交換される。液滴から水がなくなるにつれて、タンパク質の相対濃度が増加し、これは最終的に過飽和をもたらす場合がある。結晶化が生じるのに必要なのは、タンパク質の過飽和である。典型的には液滴は、リザーバーよりも低い濃度の試薬を含有し、典型的には等体積の試料及び試薬を混合して液滴を形成したため、液滴はリザーバー内試薬の半分の濃度を含有した。

40

【0110】

これらの実験において、液滴中の初期タンパク質濃度は、およそ10mg/mlであった。結晶化スクリーンを、シーラント付きの24ウェルVDXトレイに設置した。VDXトレイにおける各位置は、500~600µLの試薬リザーバーを含有したが、数々の異なる結晶化緩衝液条件を確立するために、各ウェルにおける試薬リザーバーは、その他の

50

ウェルにおける試薬リザーバーとは組成が異なっていた。1～10 μ Lのタンパク質を1～10 μ Lのリザーバー溶液に添加して、液滴を形成した。トレイを周囲室温でインキュベートした。

【0111】

結晶化スクリーン：抗体21B12を、3つの異なる結晶化スクリーンを使用して、合計でおよそ144の条件でスクリーニングし、21の結晶ヒットをもたらした。

【0112】

抗体21B12を、Wizard I (Emerald Biosystems EBS-WIZ-1)、Wizard II (Emerald Biosystems EBS-WIZ-2) 及びCryo I (Emerald biosystems EBS-CRYO-1) でスクリーニングした。主なスクリーン変数は、pH4.5～pH10.5で広範囲な結晶化領域を網羅する緩衝液、塩である。合計で144の条件をスクリーニングし、抗体21B12は、以下の条件で結晶化した：Wizard I #5 (30% PEG400、pH10.5の0.1MのCAPS) では、14日後に針の結晶形態で；Wizard I #9 (1.0Mの(NH₄)₂HPO₄、pH4.5の0.1Mの酢酸塩) では、1日後に六角形の棒の結晶形態で；Wizard I #10 (20%のPEG 2K MME、pH7の0.1MのTris) では、1日後に微小な針の結晶形態で；Wizard I #13 (1.26Mの(NH₄)₂SO₄、pH6.5の0.1Mのカコジル酸塩) では、14日後に六角形の棒の結晶形態で；Wizard I #15 (10% PEG3000、pH8.0の0.1Mのイミダゾール、0.2MのLi₂SO₄) では、14日後に(アーモンド状の楕円形のような) 尖った楕円形の結晶形態で；Wizard I #20 (0.4M / 1.6MのNaH₂/K₂HPO₄、pH8.0の0.1Mのイミダゾール、0.2MのNaCl) では、1日後に六角形の棒の結晶形態で；Wizard I #27 (1.2M / 0.8MのNaH₂/K₂HPO₄、pH10.5の0.1MのCAPS、0.2MのLi₂SO₄) では、14日後に長い棒の結晶形態で；Wizard I #34 (1.0Mの(NH₄)₂HPO₄、pH8.0の0.1Mのイミダゾール) では、1日後に六角形の棒の結晶形態で；Wizard I #46 (10%のPEG 8K、pH8.0の0.1Mのイミダゾール、0.2Mの酢酸Ca) では、14日後に糸状針の結晶形態で；Wizard I #47 (1.26Mの(NH₄)₂SO₄、pH8.5の0.1MのTris、0.2MのLi₂SO₄) では、1日後に六角形の棒の結晶形態で；Wizard II #6 (10% IPA、pH4.2の0.1Mのリン酸クエン酸塩、0.2MのLi₂SO₄) では、22日後に六角形の棒の結晶形態で；Wizard II #10 (1.0Mの(NH₄)₂HPO₄、pH8.5の0.1MのTris) では、1日後に六角形の棒の結晶形態で；Wizard II #19 (1.6M / 0.4MのNaH₂PO₄ / K₂HPO₄、pH4.2の0.1Mのリン酸クエン酸塩) では、1日後に六角形の棒の結晶形態で；Wizard II #26 (30% PEG400、pH9.5の0.1MのCHES) では、22日後に細い針の結晶形態で；Wizard II #31 (1.0Mのクエン酸Na、pH7.0の0.1MのTris、0.2MのNaCl) では、22日後に六角形の棒の結晶形態で；Wizard II #33 (1.0Mの(NH₄)₂HPO₄、pH5.5の0.1Mのクエン酸塩、0.2MのNaCl) では、1日後に六角形の棒の結晶形態で；Wizard II #34 (10% PEG8000、pH8.0の0.1Mのイミダゾール) では、22日後に微小な針の結晶形態で；Wizard II #37 (1.0Mの酒石酸Na / K、pH7.0の0.1MのTris、0.2MのLi₂SO₄) では、1日後に六角形の棒の結晶形態で；Wizard II #39 (20% PEG8000、pH10.5の0.1MのCAPS、0.2MのNaCl) では、22日後に針の結晶形態で；Wizard II #46 (1.0Mの(NH₄)₂HPO₄、pH8.0の0.1Mのイミダゾール、0.2MのNaCl) では、1日後に六角形の棒の結晶形態で；及びWizard II #48 (1.0Mの酒石酸Na / K、pH6.0の0.1MのMES) では、1日後に六角形の棒の結晶形態で結晶化した。

【0113】

様々な形態の抗体21B12結晶は、液体製剤中の抗体が、ある体積の既知の結晶化試薬に添加されて密閉容器内で保存されることにより、スケールアップ条件下で成長し得る。抗体21B12結晶は、これらの条件下において24時間未満で成長し得る。

【0114】

本実施例は、抗体21B12が様々な結晶化条件下で結晶化可能であったが、結晶は試験した全ての条件下で形成した訳ではなかったことを実証している。およそ144の結晶化条件を、多数の異なる市販の（すなわち、Hampton Research、Emerald BioSystems）及び独自のスクリーンで試験した。

【0115】

10

実施例2 - 抗体21B12結晶ヒットのマイクロバッチ最適化

実施例1に記載されるように抗体21B12結晶の生成に成功することを証明した一定の条件を、以下の通りにマイクロバッチ最適化のために選択した。別段の注記がない限り、全ての条件で、Bio-Radの脱塩カラムを使用してpH5.0の20mMの酢酸緩衝液中で脱塩した、pH5.0の10mMの酢酸ナトリウム、220mMのプロリン、0.010%ポリソルベート80中における抗体21B12（120mg/ml）を使用した。2本の成熟重鎖（配列番号19）及び2本の成熟軽鎖（配列番号17）の各々をコードするDNAによって組換え産生された、これらの鎖から成る抗体21B12を、様々な条件下で結晶化した。

【0116】

20

7~10mg/mlでのWizard II #10（1.0Mの（NH₄）₂HPO₄、pH8.5の0.1MのTris）：

抗体21B12を、7~10mg/mlでWizard II #10（1.0Mの（NH₄）₂HPO₄、pH8.5の0.1MのTris）でスクリーニングし、以下の表2.1に記載されている条件を使用して最適化した。

【表 2 - 1 A】

表 2. 1

バッチ 番号	$(\text{NH}_4)_2$ HPO_4 [濃度]	緩衝液 [濃度]	抗体 2 1 B 1 2 mg / ml	結果
838-21 -16	0.65M	pH 8.5 の 0.05 M の Tris	6.8	いくつかの長い棒
838-21 -17	0.70M	pH 8.5 の 0.05 M の Tris	6.8	より多くの長い棒
838-21 -18	0.75M	pH 8.5 の 0.05 M の Tris	6.8	沈殿物と共により小さな棒
838-21 -19	0.80M	pH 8.5 の 0.05 M の Tris	6.8	沈殿物と共により小さな棒
838-21 -20	0.70M	pH 4.0 の 0.05 M の酢酸塩	7.1	若干の長い棒
838-21 -21	0.70M	pH 5.0 の 0.05 M の酢酸塩	7.1	より多くの長い棒
838-21 -22	0.70M	pH 6.0 の 0.05 M の酢酸塩	7.1	長い棒
838-21 -23	0.70M	pH 7 の 0.05 M の Tris	7.1	若干の長い棒
838-21 -24	0.70M	pH 8 の 0.05 M の Tris	7.1	若干の長い棒
838-21 -25	0.70M	pH 9 の 0.05 M の Tris	7.1	若干の長い棒
838-37 -1	0.65M	pH 8.5 の 0.05 M の Tris	10.0	1 つまたは 2 つの棒
838-37 -2	0.70M	pH 8.5 の 0.05 M の Tris	10.0	若干の棒

10

20

30

40

【表 2 - 1 B】

バッチ 番号	$(\text{NH}_4)_2$ HPO_4 [濃度]	緩衝液 [濃度]	抗体 2 1 B 1 2 mg / ml	結果
838-37 -3	0.75M	pH 8.5 の 0.05 M の Tris	10.0	より多くの太く短い棒
838-37 -4	0.80M	pH 8.5 の 0.05 M の Tris	10.0	より多くの太く短い微 小な棒
838-37 -5	0.65M	pH 5.0 の 0.05 M の酢酸塩	10.0	若干の平坦で大きな及 び微小な棒
838-37 -6	0.65M	pH 5.5 の 0.05 M の酢酸塩	10.0	若干の平坦で大きな及 び微小な棒
838-37 -7	0.65M	pH 6.0 の 0.05 M の酢酸塩	10.0	より多くの平坦で大き な及び微小な棒
838-37 -8	0.65M	pH 5.0 の 0.05 M のクエン 酸塩	10.0	より多くの棒
838-37 -9	0.65M	pH 5.5 の 0.05 M のクエン 酸塩	10.0	より多くの良好な棒
838-37 -10	0.65M	pH 6.0 の 0.05 M のクエン 酸塩	10.0	より多くの非常に良好 な棒

10

20

30

【0117】

抗体 2 1 B 1 2 結晶を、1 日後に pH 4 ~ 9 において、0.65 M ~ 0.8 M の塩濃度で観察した。結晶形態は、(条件に基づいて短い及び長い)棒であった。

【0118】

Wizard II #33 (1.0 M の $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 、pH 5.5 の 0.1 M のクエン酸塩、0.2 M の NaCl) :

40

この条件では、異なる $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 濃度、異なる NaCl 濃度、及び異なる抗体 2 1 B 1 2 濃度を試験した。最適条件は、0.6 M の $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 、pH 5.5 の 0.05 M のクエン酸塩、0.1 M の NaCl であった。結晶のサイズは不均一であって、 $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 塩は、より低い pH において NaCl なしで抗体 2 1 B 1 2 を結晶化した。Wizard II #33 の最適化条件は、以下の表 2.2 及び 2.3 に記載している。

【表 2 - 2 A】

表 2. 2

バッチ番号	(NH ₄) ₂ HPO ₄ [濃度]	緩衝液 [濃度]	NaCl [濃度]	抗体 21B 12 mg / ml	結果
838-14-5	0.6M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	0.1M	17.1	大きな結晶
838-14-6	0.8M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	0.1M	17.1	多量の相と共に小さな棒
838-14-7	1.0M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	0.1M	17.1	非常に若干の棒、変性タンパク質
838-14-8	1.2M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	0.1M	17.1	非常に若干の棒、変性タンパク質
838-36-22	0.6M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	0.1M	13.0	形成不良な若干の結晶
838-36-23	0.65M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	0.1M	13.0	形成不良な若干の結晶
838-36-24	0.70M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	0.1M	13.0	形成不良なより多くの結晶
838-36-25	0.65M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	0.0M	13.0	形成不良な若干の結晶
838-36-26	0.65M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	0.05M	13.0	形成不良な若干の結晶
838-36-27	0.65M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	0.15M	13.0	形成不良な若干の結晶
838-36-28	0.65M	pH 5.0 の 0.05 M の クエン酸塩	0.1M	13.0	形成不良な若干の結晶

10

20

30

40

【表 2 - 2 B】

838-36-29	0.65M	pH 6.0 の 0.05 M の クエン酸塩	0.1M	13.0	形成不良なより多くの結晶
-----------	-------	-------------------------	------	------	--------------

【表 2 - 3 A】

表 2. 3

バッチ 番号	$(\text{NH}_4)_2$ HPO_4 [濃度]	緩衝液 [濃度]	抗体 2 1 B 1 2 mg / ml	結果
838-50 -1	0.65M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	10.0	短い六角形の棒
838-50 -2	0.70M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	10.0	沈殿物と共に短い棒
838-50 -3	0.75M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	10.0	より若干の棒、より多くの沈殿物
838-50 -4	0.80M	pH 5.5 の 0.05 M の クエン酸塩	10.0	より若干の棒、より多くの沈殿物
838-50 -5	0.65M	pH 6.0 の 0.05 M の クエン酸塩	10.0	短い六角形の棒
838-50 -6	0.70M	pH 6.0 の 0.05 M の クエン酸塩	10.0	より若干の棒、より多くの沈殿物
838-50 -7	0.75M	pH 6.0 の 0.05 M の クエン酸塩	10.0	より若干の棒、より多くの沈殿物
838-50 -8	0.80M	pH 6.0 の 0.05 M の クエン酸塩	10.0	沈殿物
838-50 -9	0.65M	pH 6.0 の 0.05 M の クエン酸塩	05.1	長い棒
838-50 -10	0.65M	pH 6.0 の 0.05 M の クエン酸塩	07.4	短い棒
838-50 -11	0.65M	pH 6.0 の 0.05 M の クエン酸塩	12.5	沈殿物と共に短い棒

10

20

30

40

【表 2 - 3 B】

バッチ 番号	$(\text{NH}_4)_2$ HPO_4 [濃度]	緩衝液 [濃度]	抗体 2 1 B 1 2 mg / ml	結果
838-50 -12	0.65M	pH 6.0 の 0.05 M の クエン酸塩	15.1	沈殿物と共に短い棒

10

【 0 1 1 9 】

Wizard II # 48 (1.0 M の 酒石酸 Na / K、pH 6.0 の 0.1 M の MES) :

この条件では、異なる酒石酸 Na / K 濃度及び異なる抗体 2 1 B 1 2 濃度を試験した。また、異なる緩衝液を MES 緩衝液と置き換えて試験した。最適条件は、0.7 M の酒石酸 Na / K、pH 6.0 の 0.05 M の酢酸塩であった。最適化条件は、以下の表 2.4 に記載している。

【表 2 - 4 A】

表 2.4

20

バッチ 番号	酒石酸 Na / K [濃度]	緩衝液 [濃度]	抗体 2 1 B 1 2 mg / ml	結果
838-21-26	0.65M	pH 6.0 の 0.05 M の MES	12.8	棒
838-21-27	0.70M	pH 6.0 の 0.05 M の MES	12.8	良好な棒
838-21-28	0.75M	pH 6.0 の 0.05 M の MES	12.8	沈殿物と共に短い棒
838-21-29	0.80M	pH 6.0 の 0.05 M の MES	12.8	沈殿物
838-37-15	0.70M	pH 6.0 の 0.05 M の酢酸塩	12.8	良好で小さな棒
838-37-16	0.70M	pH 6.0 の 0.05 M の クエン	12.8	ほぼ尖りのない沈殿物
838-37-17	0.70M	pH 6.0 の 0.05 M の MES	15.7	より長く、より厚みのある良好な棒
838-37-18	0.70M	pH 6.0 の 0.05 M の MES	18.5	より長く、より厚みのある良好な棒
838-50-13	0.70M	pH 6.0 の 0.05 M の酢酸塩	13.1	沈殿物と共に短い棒
838-50-14	0.73M	pH 6.0 の 0.05 M の酢酸塩	13.1	より若干の短い棒、より多くの沈殿物

30

40

50

【表 2 - 4 B】

バッチ番号	酒石酸 Na/K [濃度]	緩衝液 [濃度]	抗体 21B12 mg/ml	結果
838-50-15	0.75M	pH 6.0 の 0.05 M の酢酸塩	13.1	より若干の短い棒、より多くの沈殿物
838-50-16	0.70M	pH 6.0 の 0.05 M の酢酸塩	07.4	沈殿物と共に短い棒
838-50-17	0.70M	pH 6.0 の 0.05 M の酢酸塩	10.0	沈殿物と共に短い棒
838-50-18	0.70M	pH 6.0 の 0.05 M の酢酸塩	15.1	沈殿物
838-50-19	0.70M	5.0 の 0.05 M の酢酸塩	13.1	棒
838-50-20	0.70M	5.5 の 0.05 M の酢酸塩	13.1	棒
838-50-21	0.70M	6.5 の 0.05 M の酢酸塩	13.1	沈殿物
838-50-22	0.70M	7.0 の 0.05 M の Tris	13.1	沈殿物と共に棒

10

20

【0120】

Wizard II #19 (1.6 M / 0.4 M の $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ 、pH 4.2 の 0.1 M のリン酸クエン酸塩)

この条件では、異なる $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液濃度 (リン酸塩濃度)、異なる pH 及び異なる抗体 21B12 濃度を試験した。脱塩した抗体 21B12 の最適条件は、pH 5.3 の 1.4 M のリン酸塩、13 mg/ml の抗体 21B12 であって、95% 超の結晶化収率をもたらした。pH 5.0 の 10 mM の酢酸塩、220 mM のプロリン、0.01% ポリソルベート 80 中における抗体 21B12 の最適条件は、pH 5.3 の 1.3 M のリン酸塩、64 mg/mL の抗体 21B12 であって、99% の収率であった。最適化条件は、表 2.5 及び 2.6 に記載している。

30

【表 2 - 5 A】

表 2.5

バッチ番号	緩衝液 [濃度]	抗体 21B12	結果
838-37-11	pH 5.3 の 0.5 OM のリン酸塩	10.0	若干の沈殿物
838-37-12	pH 5.3 の 0.6 OM のリン酸塩	10.0	若干の沈殿物
838-37-13	pH 5.3 の 0.7 OM のリン酸塩	10.0	より多くの、光沢のある沈殿物

40

50

【表 2 - 5 B】

838-37-14	p H 5 . 3 の 0 . 8 O M のリン酸塩	10.0	若干の長い棒
838-50-23	p H 5 . 3 の 0 . 9 M のリン酸塩	13.1	棒
838-50-24	p H 5 . 3 の 1 . 0 M のリン酸塩	13.1	沈殿物と共に棒
838-50-25	p H 5 . 3 の 1 . 1 M のリン酸塩	13.1	より多くの沈殿物と共に若干の棒
838-50-26	p H 5 . 3 の 1 . 2 M のリン酸塩	13.1	沈殿物
838-50-27	p H 5 . 3 の 1 . 3 M のリン酸塩	13.1	光沢のある集中した沈殿物
838-50-28	p H 5 . 3 の 1 . 4 M のリン酸塩	13.1	棒
838-61-11	p H 5 . 3 の 1 . 3 5 M のリン酸塩	13.1	小さく厚みのある短い棒
838-61-12	p H 5 . 3 の 1 . 4 O M のリン酸塩	13.1	相と共に小さく厚みのある短い棒
838-61-13	p H 5 . 3 の 1 . 4 5 M のリン酸塩	13.1	光沢のある相分離
838-67-1	p H 5 . 3 の 1 . 3 5 M のリン酸塩	13.1	小さな棒
838-67-2	p H 5 . 3 の 1 . 2 O M のリン酸塩	20.0	沈殿物
838-67-3	p H 5 . 3 の 1 . 3 O M のリン酸塩	20.0	良好で清浄な小さな棒
838-67-4	p H 5 . 3 の 1 . 4 O M のリン酸塩	20.0	少し大きな棒
838-67-5	p H 5 . 3 の 1 . 2 O M のリン酸塩	25.1	沈殿物
838-67-6	p H 5 . 3 の 1 . 3 O M のリン酸塩	25.1	小さな棒、清浄
838-67-7	p H 5 . 3 の 1 . 4 O M のリン酸塩	25.1	少し大きな棒
838-67-8	p H 5 . 3 の 1 . 2 O M のリン酸塩	29.9	沈殿物
838-67-9	p H 5 . 3 の 1 . 3 O M のリン酸塩	29.9	小さな棒
838-67-10	p H 5 . 3 の 1 . 4 O M のリン酸塩	29.9	沈殿物、黒膜と共に棒
838-67-11	p H 5 . 3 の 1 . 2 O M のリン酸塩	35.1	沈殿物
838-67-12	p H 5 . 3 の 1 . 3 O M のリン酸塩	35.1	非常に微小な棒

10

20

30

40

【表 2 - 5 C】

838-67-13	p H 5. 3 の 1. 4 0 M のリン酸塩	35. 1	棒
838-67-14	p H 5. 3 の 1. 3 M のリン酸塩	13. 1	清浄で微小な棒
838-67-15	p H 5. 3 の 1. 4 M のリン酸塩	13. 1	より大きな棒
838-67-16	p H 4. 5 の 1. 3 M のリン酸塩	13. 1	沈殿物
838-67-17	p H 4. 5 の 1. 4 M のリン酸塩	13. 1	非常に微小な棒または 沈殿物
838-67-18	p H 5. 0 の 1. 3 M のリン酸塩	13. 1	非常に微小な棒または 沈殿物
838-67-19	p H 5. 0 の 1. 4 M のリン酸塩	13. 1	小さな棒、清浄
838-67-20	p H 5. 5 の 1. 3 M のリン酸塩	13. 1	良好で清浄な小さな棒
838-67-21	p H 5. 5 の 1. 4 M のリン酸塩	13. 1	沈殿物、黒膜と共に棒
838-67-26	p H 5. 3 の 0. 4 M のリン酸塩	51. 3	透明
838-67-27	p H 5. 3 の 0. 8 M のリン酸塩	45. 6	沈殿物、膜と共に大きな 棒
838-67-28	p H 5. 3 の 1. 2 M のリン酸塩	39. 9	沈殿物
838-73-1	p H 5. 3 の 0. 8 M のリン酸塩	39. 9	若干の大きく平坦な棒 と共にゲル
838-73-2	p H 5. 3 の 0. 9 M のリン酸塩	39. 9	良好な六角形の棒
838-73-3	p H 5. 3 の 1. 0 M のリン酸塩	39. 9	ゲル及び沈殿物
838-73-4	p H 5. 3 の 1. 1 M のリン酸塩	39. 9	沈殿物

10

20

30

【表 2 - 6 A】

表 2. 6

バッチ番号	緩衝液 [濃度]	抗体 2 1 B 1 2 m g / m l	結果
838-67-22	p H 5. 3 の 1. 3 5 M のリン酸塩	13. 7	沈殿物、黒膜と共に棒
838-67-23	p H 5. 3 の 1. 4 0 M のリン酸塩	13. 7	沈殿物、黒膜と共により若 干の棒
838-67-24	p H 5. 3 の 1. 4 5 M のリン酸塩	13. 7	沈殿物、黒膜と共により若 干の棒

40

50

【表 2 - 6 B】

バッチ番号	緩衝液 [濃度]	抗体 2 1 B 1 2 m g / m l	結果
838-67-25	p H 5 . 3 の 1 . 3 5 M のリン酸塩	27.4	沈殿物、黒膜と共に若干の棒
838-73-5	p H 5 . 3 の 0 . 6 M のリン酸塩	30.1	透明
838-73-6	p H 5 . 3 の 0 . 7 M のリン酸塩	30.1	若干の黒糸
838-73-7	p H 5 . 3 の 0 . 8 M のリン酸塩	30.1	相及び沈殿物
838-73-8	p H 5 . 3 の 0 . 9 M のリン酸塩	30.1	ゲル及び沈殿物と共に大きな結晶
838-73-9	p H 5 . 3 の 1 . 0 M のリン酸塩	30.1	形成不良な結晶
838-73-10	p H 5 . 3 の 0 . 6 M のリン酸塩	41.0	透明
838-73-11	p H 5 . 3 の 0 . 7 M のリン酸塩	41.0	相及び沈殿物
838-73-12	p H 5 . 3 の 0 . 8 M のリン酸塩	41.0	大きな及び小さな棒の結晶
838-73-13	p H 5 . 3 の 0 . 9 M のリン酸塩	41.0	大きな及び小さな棒の、より多くの結晶
838-73-14	p H 5 . 3 の 1 . 0 M のリン酸塩	41.0	形成不良な結晶
838-73-15	p H 5 . 3 の 0 . 8 M のリン酸塩	20.5	非常に若干の大きな結晶
838-73-16	p H 5 . 3 の 0 . 8 M のリン酸塩	27.4	相及び沈殿物
838-73-17	p H 5 . 3 の 0 . 8 M のリン酸塩	34.2	より多くの相及び沈殿物
838-73-18	p H 5 . 3 の 0 . 8 M のリン酸塩	47.9	光沢のある沈殿物または相
838-73-19	p H 5 . 3 の 0 . 8 M のリン酸塩	54.7	沈殿物、ゲルと共に大きな結晶
838-73-20	p H 5 . 3 の 0 . 8 M のリン酸塩	61.6	より多くのゲルと共に大きな結晶
838-73-21	p H 5 . 3 の 0 . 8 M のリン酸塩	91.2	相分離と共に結晶

10

20

30

40

【表 2 - 6 C】

バッチ番号	緩衝液 [濃度]	抗体 2 1 B 1 2 m g / m l	結果
838-73-22	p H 5 . 3 の 0 . 8 M の リン酸塩	68.4	相と共に平坦で大きな棒
838-73-23	p H 5 . 3 の 0 . 8 M の リン酸塩	75.2	相と共に平坦で大きな棒
838-73-24	p H 5 . 3 の 0 . 8 M の リン酸塩	82.1	相及び沈殿物
838-73-25	p H 5 . 3 の 0 . 8 M の リン酸塩	88.9	不良な、大きく及び小さく 平坦な結晶
838-73-26	p H 5 . 3 の 0 . 8 M の リン酸塩	95.8	不良な、大きく及び小さく 平坦な結晶
838-73-21A	p H 5 . 3 の 1 . 0 M の リン酸塩	85.5	相分離と共に結晶
838-73-21B	p H 5 . 3 の 1 . 0 M の リン酸塩	85.5	相分離と共に結晶
838-95-1	p H 5 . 3 の 1 . 2 4 M の リン酸塩	54.7	多量の相と共に結晶
838-95-2	p H 5 . 3 の 1 . 2 8 M の リン酸塩	54.7	いくつかの相と共により 多くの結晶
838-95-3	p H 5 . 3 の 1 . 3 2 M の リン酸塩	54.7	若干のゲルと共に結晶
838-95-4	p H 5 . 3 の 1 . 3 6 M の リン酸塩	54.7	若干のゲルと共により大 きな結晶
838-95-5	p H 5 . 3 の 1 . 3 0 M の リン酸塩	48.3	小さな棒の結晶
838-95-6	p H 5 . 3 の 1 . 3 0 M の リン酸塩	61.1	棒の結晶
838-95-7	p H 5 . 3 の 1 . 3 0 M の リン酸塩	67.6	より大きな棒の結晶
838-95-8	p H 5 . 3 の 1 . 3 0 M の リン酸塩	74.0	結晶
838-95-9	p H 5 . 0 の 1 . 3 M の リン酸塩	54.7	微小な棒
838-95-10	p H 5 . 5 の 1 . 3 M の リン酸塩	54.7	良好で清浄な棒

10

20

30

40

【 0 1 2 1 】

W i z a r d I I # 3 4 (1 0 % P E G 8 0 0 0 、 p H 8 . 0 の 0 . 1 M の イミダ
ゾール) :

この条件では、異なる P E G 及び抗体 2 1 B 1 2 濃度を、 p H 8 . 0 の T r i s 緩衝液

50

で試験した。より若干の毛様で細い針をバッチで観察した。最適化条件は、以下の表 2 . 7 及び 2 . 8 に記載している。

【表 2 - 7 A】

表 2 . 7

バッチ番号	PEG [濃度]	緩衝液 [濃度]	抗体 2 1 B 1 2 mg / ml	結果
838-37-19	5. 5 % PEG 8000	pH 8. 0 の 0. 05 M の Tris	18. 5	相、ゲル、黒い毛様の針
838-37-20	6. 0 % PEG 8000	pH 8. 0 の 0. 05 M の Tris	18. 5	相、ゲル、より多くの毛様の針
838-37-21	6. 5 % PEG 8000	pH 8. 0 の 0. 05 M の Tris	18. 5	相、ゲル、より多くの毛様の針
838-51-1	7. 0 % PEG 8000	pH 8. 0 の 0. 05 M の Tris	18. 5	細い針
838-51-2	8. 0 % PEG 8000	pH 8. 0 の 0. 05 M の Tris	18. 5	相分離及びゲル
838-51-3	9. 0 % PEG 8000	pH 8. 0 の 0. 05 M の Tris	18. 5	相、ゲル、若干の毛様の針
838-51-4	7. 0 % PEG 1000	pH 8. 0 の 0. 05 M の Tris	18. 5	少量の相
838-51-5	8. 0 % PEG 1000	pH 8. 0 の 0. 05 M の Tris	18. 5	少量の相
838-51-6	9. 0 % PEG 1000	pH 8. 0 の 0. 05 M の Tris	18. 5	少量の相
841-38-1	10. 0 % PEG 8000	pH 5. 5 の 0. 05 M の酢酸塩	71. 0	相分離、いくつかの結晶
841-38-2	10. 0 % PEG 8000	pH 5. 5 の 0. 05 M の酢酸塩	58. 1	相分離、より多くの結晶

10

20

30

40

【表 2 - 7 B】

バッチ番号	P E G [濃度]	緩衝液 [濃度]	抗体 2 1 B 1 2 m g / m l	結果
841-38-3	1 0 . 0 % P E G 8 0 0 0	p H 5 . 5 の 0 . 0 5 M の 酢 酸 塩	45.2	相分離、より大きな結晶

【表 2 - 8 A】

表 2. 8

バ ッ チ 番 号	P E G 8 0 0 0	p H 5. 5 の酢酸 塩	抗 体 2 1 B 1 2 m g ／ m l	結 果
841-43-1	1 0. 0 % P E G	p H 5. 5 の 0. 0 5 M の酢酸塩	58. 1	いくつかの結晶と 共に相の塊
841-43-2	1 0. 0 % P E G	p H 5. 5 の 0. 0 5 M の酢酸塩	64. 5	固相
841-43-3	1 0. 0 % P E G	p H 5. 5 の 0. 0 0 M の酢酸塩	58. 1	細くて黒い沈殿物
841-43-4	1 0. 0 % P E G	p H 5. 5 の 0. 0 2 M の酢酸塩	58. 1	相、大きく崩れた不 規則な結晶
841-43-5	1 0. 0 % P E G	p H 5. 5 の 0. 0 4 M の酢酸塩	58. 1	より多くの結晶と 共に相の塊
841-43-6	1 0. 0 % P E G	p H 5. 5 の 0. 0 6 M の酢酸塩	58. 1	より大きな結晶と 共に相の塊
841-43-7	1 0. 0 % P E G	p H 5. 5 の 0. 0 8 M の酢酸塩	58. 1	相の塊、より若干の より大きな結晶
841-43-8	1 0. 0 % P E G	p H 5. 5 の 0. 1 0 M の酢酸塩	58. 1	相の塊、より若干の より小さな結晶
841-43-9	0 5. 0 % P E G	p H 5. 5 の 0. 0 5 M の酢酸塩	58. 1	相の塊、より大きな 結晶
841-43-10	0 7. 5 % P E G	p H 5. 5 の 0. 0 5 M の酢酸塩	58. 1	固相
841-43-11	1 0. 0 % P E G	p H 5. 5 の 0. 0 5 M の酢酸塩	58. 1	膜と共に固相
841-43-12	0 5. 0 % P E G	p H 6. 0 の 0. 0 5 M の酢酸塩	58. 1	大きく崩れた結晶、 ゲルと共に相
841-43-13	0 7. 5 % P E G	p H 6. 0 の 0. 0 5 M の酢酸塩	58. 1	相の塊、大きな及び 小さな結晶
841-43-14	1 0. 0 % P E G	p H 6. 0 の 0. 0 5 M の酢酸塩	58. 1	膜と共に相

10

20

30

40

【表 2 - 8 B】

バッチ番号	PEG 8000	pH 5.5 の酢酸塩	抗体 21B12 mg / ml	結果
841-43-15	05.0% PEG	pH 7.0 の 0.05 M の Tris	58.1	崩れた結晶と共に相及びゲル
841-43-16	07.5% PEG	pH 7.0 の 0.05 M の Tris	58.1	大きな結晶と共に相及びゲル
841-43-17	10.0% PEG	pH 7.0 の 0.05 M の Tris	58.1	膜と共に固相
841-43-18	05.0% PEG	pH 8.0 の 0.05 M の Tris	58.1	相及びゲル、若干の糸状結晶
841-43-19	07.5% PEG	pH 8.0 の 0.05 M の Tris	58.1	ゲル、より多くの針状結晶
841-43-20	10.0% PEG	pH 8.0 の 0.05 M の Tris	58.1	膜と共に相

【0122】

実施例 3 - 1 ml のバッチ結晶化及び状態図

pH 5.0 の 20 mM の酢酸塩、220 mM のプロリン、0.01% ポリソルベート 80 中における抗体 21B12（配列番号 17 及び 19、図 4 A 及び図 4 B）を、1.5 ml の遠心管内において 1.0 ml の最終体積でバッチ結晶化した。抗体 21B12 の結晶化条件は、pH 5.3 の 1.3 M のリン酸塩、64 mg / mL の抗体 21B12 であって、99% の収率であった。pH 5.0 の 20 mM の酢酸塩中で脱塩した抗体 21B12 を、1.5 ml の遠心管内において 1 ml の最終体積で、1.4 M のリン酸塩（pH 5.3）の最終濃度で、13 mg / mL の抗体 21B12 を用いて 97% の収率でバッチ結晶化した。

【0123】

バッチを、1.5 mL の微量遠心管にリン酸塩及び抗体 21B12 を添加し、フィッシャー（fisher）のデジタルミキサー上で 3000 に設定し、急速にボルテックスして混合すること（混合物が均一に混合されたように見えるまで数秒）により作製した。より高濃度バッチは、より低濃度の抗体 21B12 バッチよりも、混合にさらに数秒を要した（より低濃度には約 5 秒、より高濃度には約 8 秒を要した）。この最初の混合後、バッチを室温で静止状態にして、一晚または 2 日間インキュベートした。

【0124】

状態図を、この結晶化条件について 1 ml スケールで決定し、結晶化パラメータ、例えばリン酸塩 pH、リン酸塩濃度、抗体 21B12 濃度及び温度などの変化の影響を調べた。

【0125】

リン酸塩 pH スクリーン：

結晶形成は、他の pH と比較して pH 4.2 で急激に速くなった。したがって、この pH を選択し、リン酸塩濃度を試験した。リン酸緩衝液のストック溶液を、3.5 M の濃度で 3.7 ~ 4.7 の pH 範囲において 0.2 pH 単位ずつ増加させて作製した。バッチを、最終抗体 21B12 濃度が 82.8 mg/mL で、最終リン酸塩濃度が 1.3 M のリン酸塩であるように、異なる試験 pH で作製した。リン酸塩を 3 回に分けて添加し、添加の間に 30 分間インキュベートした。最初に 0.9 M を一度に全て添加し、次いで総リン酸塩濃度を 1.3 M にするための残りの量を 0.2 M ずつ 2 回に分けて添加した。バッチを 2 mL の遠心管内において作製し、ボルテックスミキサー上でリン酸塩を添加するごとに 3000 rpm で約 10 ~ 15 秒間混合し、室温で静止状態にしてインキュベートした。収率及び結晶サイズを 3.0 ~ 3.5 時間で測定した。実験の概要を以下の表 3.1 に示す。

10

【表 3 - 1】

表 3. 1

バッチ番号	リン酸塩濃度 [M]	最終 m A b (mg/mL)	pH	温度	収率 (%)	結晶サイズ (μm)
RP1120-01	1.3	82.8	3.7	室温	97.9	結晶なし、 ゲル、相
RP1120-02	1.3	82.8	3.9	室温	95.8	非常に若干の 結晶、ゲル、相
RP1120-03	1.3	82.8	4.1	室温	96.3	約 10
RP1120-04	1.3	82.8	4.3	室温	97.8	約 5
RP1120-05	1.3	82.8	4.5	室温	98.4	約 5
RP1120-06	1.3	82.8	4.7	室温	96.8	約 7
RP1120-07	1.3	82.8	4.2	室温	97.9	約 7

20

【0126】

30

リン酸塩濃度スクリーン：

リン酸緩衝液のストック溶液を、3.5 M の濃度において pH 4.2 で作製した。0.5 M ~ 1.5 M のリン酸塩濃度を、0.2 M ずつ増加させて試験した。バッチを 2 mL の遠心管内において、最終抗体 21B12 濃度が 75 mg/mL で、最終リン酸塩濃度が 0.5 ~ 1.5 M であるように pH 4.2 で作製した。リン酸塩の最終濃度が 1.5 M に到達するリン酸塩量の増加に伴い、抗体 21B12 を 75 mg/mL まで希釈した。リン酸塩を、0.5 M ~ 1.5 M のバッチで一度に全て抗体 21B12 に添加し、最高速度設定で約 10 秒間ボルテックス混合し、室温で静止状態を維持した。収率及び結晶サイズを 3.0 ~ 3.5 時間で測定した。1.3 及び 1.5 M の最終リン酸塩濃度について一度での添加に加えて、1.3 M では 2 段階添加 (0.9 M + 0.4 M) ならびに 1.5 M のリン酸塩では 2 段階添加 (0.9 M + 0.6 M) 及び 3 段階添加 (0.9 + 0.3 M + 0.3 M) を、各添加について 30 分間隔で実施し、各添加におけるリン酸塩の耐性を確認する。実験の概要を表 3.2 に示す。1.1 ~ 1.5 M には一度でのリン酸塩添加に耐性がなく、ゲル形成をもたらした。したがって、以下の実験では結晶化収率を改善するために、リン酸塩の段階添加を選択した。

40

【表 3 - 2】

表 3. 2

バッチ番号	リン酸塩濃度 [M]	最終 m A b (m g / m L)	pH	温度	収率 (%)	結晶サイズ (μ m)
SM1114-4	0.5	75	4.2	室温	0	結晶なし、透明
SM1114-5	0.7	75	4.2	室温	40	>20 μ m
SM1114-6	0.9	75	4.2	室温	79	約 1 0 μ m
SM1114-7	1.1	75	4.2	室温	92	若干のゲルと共に <5 μ m
SM1114-8	1.3	75	4.2	室温	98	若干のゲルと共に <5 μ m
SM1114-9	1.5	75	4.2	室温	99	結晶なし、ゲル
SM1114-10	1.5	75	4.2	室温	99	約 1 0 μ m
SM1114-11	1.5	75	4.2	室温	99	約 1 0 μ m
SM1114-12	1.3	75	4.2	室	96	約 1 0 μ m

10

20

【 0 1 2 7 】

抗体 2 1 B 1 2 濃度スクリーン：

結晶化バッチを、6 0、7 0 及び 8 0 m g / m L の最終抗体 2 1 B 1 2 濃度において 1 m L スケールで作製した。バッチを、2 M L の遠心管内において p H 4 . 2 で 1 . 3 M のリン酸塩濃度で作製した。リン酸塩を 3 回に分けて添加し、添加の間に 3 0 分間インキュベートした。最初に 0 . 9 M を一度に全て添加し、次いで総リン酸塩濃度を 1 . 3 M にするための残りの量を 0 . 2 M ずつ 2 回に分けて添加した。バッチを、ボルテックスミキサー上でリン酸塩の添加ごとに最高速度設定で 1 0 ~ 1 5 秒間混合し、室温でインキュベートした。収率及び結晶サイズをおよそ 3 . 5 時間で試験した。実験の概要を表 3 . 3 に示す。6 0 m g / m l のタンパク質バッチに対して、8 0 m g / m l のタンパク質濃度では良好な品質の結晶及び良好な収率が得られたので、およそ 8 0 m g / m l のタンパク質をさらなる最適化実験において選択した。

30

【表 3 - 3】

表 3. 3

バッチ番号	リン酸塩濃度 [M]	最終 m A b (m g / m L)	pH	温度	収率 (%)	結晶サイズ (μ m)
SM1114-1	1.3	60	4.2	室温	97	約 5 ~ 1 0
SM1114-2	1.3	70	4.2	室温	98	約 5 ~ 1 0
SM1114-3	1.3	80	4.2	室温	98	約 1 0

40

【 0 1 2 8 】

温度スクリーン：

結晶化バッチを、1 5 ~ 2 5 の範囲で 2 ずつ増加させた異なる温度において 1 m L スケールで実施した。バッチを、p H 4 . 2 において 1 . 3 M のリン酸塩濃度で作製し、最終抗体 2 1 B 1 2 濃度が 8 2 . 8 m g / m L であった。バッチを、2 m L の遠心管内

50

において試験温度に平衡させた抗体 2 1 B 1 2 及び試薬を用いて作製した。リン酸塩を 3 回に分けて添加し、添加の間に 3 0 分間インキュベートした。最初に 0 . 9 M を一度に全て添加し、次いで総リン酸塩濃度を 1 . 3 M にするための残りの量を 0 . 2 M ずつ 2 回に分けて添加した。パッチを、ボルテックスミキサー上でリン酸塩の添加ごとに最高速度設定でおよそ 1 0 ~ 1 5 秒間混合し、温度制御水槽内でインキュベートした。収率及び結晶サイズをおよそ 3 . 5 時間で試験した。実験の概要を表 3 . 4 に示す。より高い 1 9 ~ 2 5 での結晶化は、温度の増加に伴い高品質な結晶をもたらした。

【表 3 - 4】

表 3 . 4

パッチ番号	リン酸塩濃度 [M]	最終 m A b (m g / m L)	pH	温度 (°C)	収率 (%)	結晶サイズ (μ m)
SM1120-2	1.3	82.9	4.2	15	97	<5
SM1121-1	1.3	82.8	4.2	17	98	<5
SM1122-1	1.3	82.9	4.2	19	98	約 5
SM1122-3	1.3	82.8	4.2	21	98	約 5
SM1125-1	1.3	82.8	4.2	23	98	約 5
SM1125-3	1.3	82.8	4.2	25	98	約 5

10

【0 1 2 9】

実施例 4 - 1 0 m l スケールでのパッチ最適化：

パッチを、実施例 3 におけるような 1 m L スケールで生成した状態図のさらなる確認のために 1 0 m L スケールで作製した。1 0 m L の実験では、データは連続混合を用いて生成したが、その理由とはこのパラメータを 1 m L スケールで調査できなかったからである。

20

【0 1 3 0】

1 0 m L スケールでの結晶化を丸底ガラス管において、サイズ A 5 1 1 の傾斜翼プロペラ及びデジタルスターラーを使用したオーバーヘッド連続混合で実施した。混合速度を、1 0 m L パッチでは 5 0 0 r p m に設定した。リン酸塩を、2 段階添加プロセスを使用し、蠕動ポンプを使用して制御した流速で抗体 2 1 B 1 2 溶液にポンプ注入した。最初に、2 . 1 8 m L の 3 . 5 M リン酸塩（総リン酸塩濃度を 0 . 9 M にする）を 0 . 4 m L / 分の流速で添加し、1 時間のインキュベーション後、残りのリン酸塩（1 . 5 6 m L ）を 0 . 2 m L / 分の流速で添加した（総リン酸塩濃度を 1 . 3 M にする）。結晶化を合計で 3 時間実施し、次いで結晶サイズ及び収率を測定した。連続混合条件下において、試薬 p H 、試薬濃度及び結晶化温度のようなパラメータを 1 0 m l スケールで再評価した。

30

【0 1 3 1】

リン酸塩 p H :

p H 4 . 1 ~ 4 . 7 のリン酸塩溶液を、0 . 2 p H 単位ずつ増加させてスクリーニングした。実験の概要を以下の表 4 . 1 に示す。パッチを作製し、室温で最終抗体 2 1 B 1 2 濃度がおよそ 8 0 m g / m L であり 1 . 3 M のリン酸塩であった。結果は表 4 . 1 にまとめた。次のパラメータ試験のために、結晶化 p H 範囲の中間である試薬 p H 4 . 4 を選択した。

40

【表 4 - 1】

表 4. 1

バッチ 番号	リン酸塩濃 度	最終抗体 2 1 B 1 2 m g / m L	p H	温度	収率	結 晶 サ イ ズ
1205-4. 1	1.3M	80.8mg/mL	4.1	22.4°C	96.86%	約 1 0 μ m
				23.6°C		
1205-4. 3	1.3M	80.8mg/mL	4.3	22.2°C	97.20%	約 5 μ m
				23.5°C		
1205-4. 5	1.3M	80.8mg/mL	4.5	23.5°C	97.30%	約 5 μ m
				23.8°C		
1205-4. 7	1.3M	80.8mg/mL	4.7	23.6°C	97.30%	約 1 0 μ m
				23.8°C		

10

【 0 1 3 2 】

リン酸塩濃度：

1.0 M、1.2 M、1.4 M 及び 1.5 M のリン酸塩濃度を、4.4 の pH で試験した。実験の概要を以下の表 4. 2 に示す。バッチを作製し、室温で最終抗体 2 1 B 1 2 濃度がおおよそ 8 0 m g / m L であり、1.0 M、1.2 M 及び 1.3 M のリン酸塩であった。1.4 M 及び 1.5 M のリン酸塩については、所望のリン酸塩濃度を達成するにはより多くのストック溶液が必要であったため、抗体 2 1 B 1 2 濃度をそれぞれおおよそ 7 7 m g / m L 及びおおよそ 7 3 m g / m L まで減少させた。結果は表 4. 2 にまとめた。1.5 M のリン酸塩濃度は、より低いリン酸塩濃度と比較して、肉眼での観測で結晶懸濁液の流動が比較的容易であった。したがって、1.5 M のリン酸塩を、次のパラメータを最適化するために pH 4.4 と共に選択した。

20

【表 4 - 2】

表 4. 2

バッチ 番号	リン酸塩濃 度	最終抗体 2 1 B 1 2 m g / m L	p H	温度	収率	結晶サイズ
1206-1. 0M	1.0M	80.8mg/mL	4.4	23.2°C	87.70%	約 5 μ m
				24.7°C		
1206-1. 2M	1.2M	80.8mg/mL	4.4	23.2°C	95.80%	約 5 μ m
				24.4°C		
1206-1. 4M	1.4M	77.4mg/mL	4.4	24.6°C	97.90%	約 1 0 μ m
				25.3°C		
1206-1. 5M	1.5M	73.8mg/mL	4.4	24.3°C	99.20%	約 1 0 μ m
				25.3°C		

30

40

【 0 1 3 3 】

温度：

21、23、25、27、30 及び 35 の温度を、4.4 の pH で 1.5 M のリン酸塩濃度において試験した。結果を含む、実験の概要を以下の表 4. 3 に示す。バッチを作製し、最終抗体 2 1 B 1 2 濃度がおおよそ 7 3 m g / m L であった。

【表 4 - 3】

表 4. 3

バッチ 番号	リン酸塩濃 度	最終抗体 2 1 B 1 2 m g / m L	p H	温度	収率	結晶サイズ
1211-21 °C	1.5M	73.8mg/mL	4.4	21°C	99.38%	約 2 ~ 5 μ m
1211-23 °C	1.5M	73.8mg/mL	4.4	23°C	99.40%	約 2 ~ 5 μ m
1211-25	1.5M	73.8mg/mL	4.4	25°C	99.10%	約 10 μ m
1212-27	1.5M	73.8mg/mL	4.4	27°C	99.60%	約 10 μ m
1212-30	1.5M	73.8mg/mL	4.4	30°C	99.40%	約 10 μ m
1213-35	1.5M	73.8mg/mL	4.4	35°C	99.70%	約 13 μ m

10

【 0 1 3 4 】

実施例 5 - 20 mL のバッチ結晶化及び%収率

20

抗体 2 1 B 1 2 (配列番号 1 7 及び 1 9 、 図 4 A 及び 図 4 B) を、p H 4 . 4 で 1 . 5 M の最終リン酸塩濃度を有するリン酸緩衝液及び 7 3 . 8 m g / m L の最終 2 1 B 1 2 抗体濃度を使用して結晶化した。

【 0 1 3 5 】

混合速度の影響を 20 mL スケールで研究した。バッチを、500 rpm 混合及び 800 rpm 混合を並べて、両方の混合速度についてリン酸塩添加を同じ流速に維持しながら作製した。実験の第 1 セットでは、第 1 段階のリン酸塩添加を 1 . 0 、 2 . 0 及び 3 . 0 mL / 分で試験し、第 2 段階におけるリン酸塩添加の速度を 0 . 2 mL / 分に固定した。実験の第 2 セットでは、第 1 段階のリン酸塩添加の速度を 0 . 8 mL / 分に固定し、第 2 段階のリン酸塩添加の速度を 0 . 5 、 1 . 0 及び 2 . 0 mL / 分に変動させた。実験は、実施例 4 に記載されている 10 mL スケールバッチと同様の条件を使用して設定した。サイズ A 5 1 1 の傾斜翼プロペラを備え、オーバーヘッド攪拌を用いる丸底ガラス管を室温で設置した。結晶化により、およそ 73 mg / mL の最終抗体 2 1 B 1 2 濃度及び 4 . 4 の p H における 1 . 5 M のリン酸塩が得られた。結晶サイズ及び収率を 3 時間で測定した。結晶形態は、短い六角形の棒であった。収率及び結晶サイズは、およそ 5 ~ 10 μ m であって、実験の開始 3 . 0 時間後に測定した。結晶サイズを、image proソフトウェアを使用して顕微鏡で測定した。結果を含む、実験の概要を以下の表 5 . 1 及び 5 . 2 に示す。

30

【表 5 - 1】

表 5. 1

バッチ番号	第 1 添加速度	第 2 添加速度	混合速度	収率	結晶サイズ
1206-1.0mL-500	1.0 mL / 分	0.2 mL / 分	500rpm	99.49%	約 5 μ m
1206-1.0mL-800	1.0 mL / 分	0.2 mL / 分	800rpm	99.28%	約 10 μ m
1209-2.0mL-500	2.0 mL / 分	0.2 mL / 分	500rpm	99.34%	約 10 μ m
1209-2.0mL-800	2.0 mL / 分	0.2 mL / 分	800rpm	99.49%	約 10 μ m
1209-3.0mL-500	3.0 mL / 分	0.2 mL / 分	500rpm	98.20%	約 10 μ m
1209-3.0mL-800	3.0 mL / 分	0.2 mL / 分	800rpm	99.25%	約 10 μ m

10

【表 5 - 2】

表 5. 2

バッチ番号	第 1 添加速度	第 2 添加速度	混合速度	収率	結晶サイズ
1210-0.5mL-500	0.8 mL / 分	0.5 mL / 分	500rpm	99.20%	約 5 μ m
1210-0.5mL-800	0.8 mL / 分	0.5 mL / 分	800rpm	99.35%	約 5 μ m
1210-1.0mL-500	0.8 mL / 分	1.0 mL / 分	500rpm	98.96%	約 5 μ m
1210-1.0mL-800	0.8 mL / 分	1.0 mL / 分	800rpm	99.00%	約 5 μ m
1210-2.0mL-500	0.8 mL / 分	2.0 mL / 分	500rpm	99.30%	約 5 μ m
1210-2.0mL-800	0.8 mL / 分	2.0 mL / 分	800rpm	99.32%	約 5 ~ 10 μ m

20

30

40

【0136】

実施例 6 - 50 mL のバッチ結晶化及び % 収率

実施例 5 に記載されるように抗体 21B12 結晶の生成に成功することを証明した一定の条件を、以下の通りに最適化のために選択した：

【0137】

結晶化を、丸底ポリカーボネート管 (Nalgene の上部が切断された遠心ボトル、直径 5.8 cm) 及びサイズ A521 の傾斜翼プロペラにおいて設定した。2 つのバッチを作製し、1 つは 500 rpm 混合で、もう一方は 700 rpm 混合であった。リン酸塩添加速度は、総結晶化体積において 0.9 M のリン酸塩に到達するように、第 1 段階のリン酸塩添加については 3 mL / 分とした。1 時間のインキュベーション後、リン酸塩の第

50

2 添加を 1 . 5 M の最終リン酸塩濃度を得るように 1 . 0 m L / 分で行った。抗体 2 1 B 1 2 の最終濃度は、4 . 4 の pH でおよそ 7 3 m g / m L であった。結晶サイズはおよそ 5 μ m であり、形状は六角形の短い棒であった。実験の概要を以下の表 6 . 1 に示す。5 0 0 r p m の混合速度による結晶化は、実験の開始からおよそ 1 時間の試薬の第 1 添加後では均一に混合していなかったが、7 0 0 r p m による実験では、結晶化全体を通して懸濁液を均一に混合していた。第 2 添加後、5 0 0 r p m 及び 7 0 0 r p m での両方の結晶化実験では均一に混合し、同様の種類の結晶品質をもたらした。

【表 6 - 1】

表 6 . 1

バッチ番号	第 1 添加速度	第 2 添加速度	混合速度	収率	結晶サイズ
1211-50mL-1	3 . 0 m L / 分	1 . 0 m L / 分	500rpm	99.40%	約 5 μ m
1211-50mL-2	3 . 0 m L / 分	1 . 0 m L / 分	700rpm	99.60%	約 5 μ m

10

【0 1 3 8】

実施例 7 - 1 0 0 m l のバッチ結晶化及び % 収率

実施例 6 に記載されるように抗体 2 1 B 1 2 結晶の生成に成功することを証明した一定の条件を、以下の通りに最適化のために選択した：

20

【0 1 3 9】

1 0 0 m L バッチの結晶化を、室温に近い温度の 2 1 及び 2 5 で実施した。タンパク質溶液を、丸底ポリカーボネート管 (N a l g e n e の上部が切断された遠心ボトル、直径 5 . 8 c m) に入れ、サイズ A 5 2 1 のプロペラを用いて 8 0 0 r p m で混合した。リン酸塩添加速度は、総結晶化体積において 0 . 9 M のリン酸塩に到達するように、第 1 段階の添加において 3 m L / 分とした。1 時間のインキュベーション後、リン酸塩の第 2 添加を 1 . 5 M の最終リン酸塩濃度を得るように 1 . 0 m L / 分で行った。抗体 2 1 B 1 2 の最終濃度は、4 . 4 の pH でおよそ 7 3 m g / m L であった。結晶サイズ及び収率を、リン酸塩添加の開始から 1 5 、3 0 、6 0 、9 0 及び 1 8 0 分でモニターした。結晶サイズは、およそ 2 ~ 5 μ m で変動した。最初のうちは、より小さな結晶が多く、より大きく成長して経時的にサイズが均一になった。結晶形状は、六角形の短い棒であった。さらに収率も 7 4 % (1 5 分) ~ 9 9 . 5 % (9 0 分) と経時的に改善し、1 8 0 分でも同じままであった。

30

【0 1 4 0】

1 0 0 m L バッチについては、結晶化を、上記のようなリン酸塩添加及び混合速度に従って 3 5 で実施した。実験では結晶を製造することなく、ゲル形成による大きな塊の形成をもたらした。結果を含む、実験の概要を以下の表 7 . 1 に示す。

【表 7 - 1】

表 7 . 1

バッチ番号	第 1 添加速度	第 2 添加速度	混合速度	収率	結晶サイズ
1212-100mL-1	3 . 0 m L / 分	1 . 0 m L / 分	800rpm	99.55%	約 2 ~ 5 μ m
1213-100mL-1	3 . 0 m L / 分	1 . 0 m L / 分	800rpm	99.50%	約 2 ~ 5 μ m

40

【 図 1 B - 1 】

【圖 1 B-1】

配列番号 2
配列番号 3

```

      10      20      30      40      50
クエリー : atgggcacgcgtacgtccagcgcggtctggtggcgcgtccactgctgt
フレーム1 : M G T V T S R R S R S W W P L P L L L

      60      70      80      90      100
クエリー : ggtctgctgctgctctctctgggtccgcggggggcgccgtgcccaggaggagc
フレーム1 : L L L L L L L G P A G A R A Q E E D E

      110     120     130     140     150
クエリー : agagcgcgcactacgaggagctggctgtagcttgcgcctccgaggaggac
フレーム1 : D G C Y E E L L V L A L R S E E E D

      160     170     180     190     200
クエリー : ggctctgcgcgaagcaccgcagcagcgaacacagcagcactccacgcgtg
フレーム1 : G L A E A P E H G T T A T F H R C

      210     220     230     240     250
クエリー : gcgcaagatccggagggttgccttgcgcactacgtgcttgcctgcagagc
フレーム1 : A K D P F W R C Y L V V V V L K E

      260     270     280     290     300
クエリー : agagagacactctccgactcagagagcgaatgcgcgcgcctgcagggcc
フレーム1 : E T H L S Q S E R T A R S L Q A A

      310     320     330     340     350
クエリー : caggctgcgccgcggggatacctaccacagatcctgcactgtcttcagtg
フレーム1 : Q A A R R C Y L T K L L H V F H G

      360     370     380     390     400
クエリー : ccttctcctggtgtctctggtgaagatgagtgccactctggactctgc
フレーム1 : L L F G F L V K M S G O L S E L A

      410     420     430     440     450
クエリー : ccttgaaattgccccatgtgcactacacagaggaggactcctctgtttt
フレーム1 : L K L P H V D Y I E E D S S V F

      460     470     480     490     500
クエリー : gcccgagcactccgcgggaacctggagcgatctacctccggagatccgc
フレーム1 : A G C T F P W K L L E R I T F P F Y R

      510     520     530     540     550
クエリー : ggcgatgaataccagcccccagcaggagggcgctggtggaggtgcttct
フレーム1 : A D E Y Q P P D G S G S L V L V Y L

```

【 図 1 B - 3 】

【圖 1 B-3】

	190	1110	1120	1130	1140	1150
クエリー :	catcattgggtgctccacgacgacgtgcagacacctgtcttctgtccacagatg					
フレーム1:	T I G A A S S D C S T T C F V S Q G S G					
	150	1160	1170	1180	1190	1200
クエリー :	ggacatccacagctgtctgcgccacgttgctggcattgcagccatgatgctg					
フレーム1:	T S Q A A A H V A G I A A M M L					
	200	1210	1220	1230	1240	1250
クエリー :	tctgcgcagcgcgagatcacacctgcggcagattggacgacagatgatcatc					
フレーム1:	S A E P E L T L A E L R Q A G A T L I E					
	250	1260	1270	1280	1290	1300
クエリー :	ctctctctgccaaagatgtcatcaalggagcctgggtccctgaggaccacg					
フレーム1:	F S A E K D V I N E A K F P E D Q R					
	300	1310	1320	1330	1340	1350
クエリー :	gggtactgaccccccacctggtagcgccctgcgccccagcccatggg					
フレーム1:	V L T F N L V A A L P P S T H G					
	350	1360	1370	1380	1390	1400
クエリー :	gcaggttggcagctgttttgcaggaactgttgtgtcagcacactcggggcc					
フレーム1:	A G W Q L F C R T V W N S A H S C P					
	400	1410	1420	1430	1440	1450
クエリー :	tacacggatgggacacagccatgcgcctgcggccccaagatgagagctgc					
フレーム1:	T R M A T A I A R C A P D E E L L					
	450	1460	1470	1480	1490	1500
クエリー :	tgagctgtccagatttctccaggatgggaagacgcggggcgagcgcgt					
フレーム1:	S C S S F S R S G C K R R G E R M					
	500	1510	1520	1530	1540	1550
クエリー :	gaggcccaagggggccaagctgggtctgcggggcccaacaagcttttggggg					
フレーム1:	E A Q C G K L V C R A H N A F G G					
	550	1560	1570	1580	1590	1600
クエリー :	tgaagggtgtatagcgattgcaggctgtgcctgtcaccgccagccaact					
フレーム1:	E C V Y A I A R C C L L P Q A N C					
	600	1610	1620	1630	1640	1650
クエリー :	gcagcgtccacacagctcccacagctaggccagcatggggagcccgctgtc					
フレーム1:	S V H T A P P A E A S M G T R V					

【図 1 B - 4】

【図 1 B-4】

650 1660 1670 1680 1690 1700
-----|-----|-----|-----|-----|
クエリー : cactggcaccacacagggccacgtctctcacaggtgcagctccactggga
フレーム 1: H C H Q Q G H V L T G C S S H W E

700 1710 1720 1730 1740 1750
-----|-----|-----|-----|-----|
クエリー : ggtggaggaccttggcaccacacagggccgtgtgtgagggccacgaggtc
フレーム 1: V E D L G T H K P F V L R F R G Q

750 1760 1770 1780 1790 1800
-----|-----|-----|-----|-----|
クエリー : agcccaaccagtgcgtggggccacagggagggccacgcatccagcttctgc
フレーム 1: F N Q C V G H R E A S I H A S C

800 1810 1820 1830 1840 1850
-----|-----|-----|-----|-----|
クエリー : tggccatcccccaggtctgggaatgcaaaglcgaaggacatggaaatcccgcc
フレーム 1: C H A P G L E C K V K E H G I P A

850 1860 1870 1880 1890 1900
-----|-----|-----|-----|-----|
クエリー : cccctcagggcaggtgacctggcctggcaggaggcclgacctgactg
フレーム 1: P Q G Q V T V A C E E G W T L T G

900 1910 1920 1930 1940 1950
-----|-----|-----|-----|-----|
クエリー : gctgcagggccctccctgggacctccacgtctctgggggcctacgacctga
フレーム 1: C S A L P C T S H V L G A Y A V

950 1960 1970 1980 1990 2000
-----|-----|-----|-----|-----|
クエリー : gacaacacgtgltgtagtcaggagccgggacgtcagcactacagggcagcac
フレーム 1: D N T C V V R S R D V S T T C S T

2010 2020 2030 2040 2050
-----|-----|-----|-----|-----|
クエリー : cagcgaagagggccgtgacagccgttgccatctgctgcggagccgcgaac
フレーム 1: S E E A V T A V A I C C R S R H L

50 2060 2070 2080 2090 2100
-----|-----|-----|-----|-----|
クエリー : tggggcagggcctccacaggagctccag
フレーム 1: A Q A S Q E L Q

【図 2 B】

【図 2 B】

21B12 重鎖可変領域:

重鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGAC
AGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACACGACGAGTGCCTGGTGGT
TATAACTCTGTCTCCTGCTGGAACCAACAGCACCCAGGCAAGCCCCAA
ACTCATGATTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATC
GCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCT
GGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAATTCATATAC
AAGCACCAGCATGGTATTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCTA
3' (配列番号 8)

軽鎖可変領域のアミノ酸配列:

QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSDDVGGYNSVSWYQHPGKAPKLM**
IY**EYSNRPS**GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**NSYTSTSMV**
FGGGTKLTVL (配列番号 9)

重鎖可変領域の代替ヌクレオチド配列:

5'GAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGAC
AGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACACGACGAGTGCCTGGTGGT
TATAACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAGCCCCCAA
ACTCATGATTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATC
GCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCT
GGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAATTCATATAC
AAGCACCAGCATGGTATTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCTA
3' (配列番号 10)

軽鎖可変領域の代替アミノ酸配列:

ESALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSDDVGGYNSVSWYQHPGKAPKLM**
IY**EYSNRPS**GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**NSYTSTSMV**
FGGGTKLTVL (配列番号 11)

【図 2 A】

【図 2 A】

21B12 重鎖可変領域:

重鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5'CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG
GCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTAACCAG
CTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT
GGATGGGATGGGTGAGTTTTATAATGGTAACACAAACTATGCACAG
AAGCTCCAGGGCAGAGGCACCATGACCACAGACCCATCCACGAGCA
CAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGT
GTATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCT3' (配列番号 4)

重鎖可変領域のアミノ酸配列:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS**GYTLT****TSYGIS**WVRQAPGQGLEW
MG**WVSFYNGNTNYAOKLOGR**GMTTDPSTSTAYMELRSLRSDDTAVY
YCARG**YGM**DVWGQGTITVTVSS (配列番号 5)

重鎖可変領域の代替ヌクレオチド配列:

5'GAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG
GCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTAACCAG
CTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT
GGATGGGATGGGTGAGTTTTATAATGGTAACACAAACTATGCACAG
AAGCTCCAGGGCAGAGGCACCATGACCACAGACCCATCCACGAGCA
CAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGT
GTATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCT3' (配列番号 6)

重鎖可変領域の代替アミノ酸配列:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS**GYTLT****TSYGIS**WVRQAPGQGLEW
MG**WVSFYNGNTNYAOKLOGR**GMTTDPSTSTAYMELRSLRSDDTAVY
YCARG**YGM**DVWGQGTITVTVSS (配列番号 7)

【図 3】

【図 3】

定常ドメイン

ヒト IgG2:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQYTCNVDHKPSNTKVDKTV
ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 12)

ヒト IgG4:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPCCPSCPAPFEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号 13)

ヒトラムダ:

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
AGVETTTPSKQSNKRYAASSYLSTPEQWKSHRYSQVTHEGSTVEKT
VAPTECS (配列番号 14)

ヒトカッパ:

TVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
KSFNRGEC (配列番号 15)

【 図 4 A 】

【図 4 A】

2 1 B 1 2 軽鎖：

2 1 B 1 2 成熟軽鎖：

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMY
EVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCNSYTSTSMVFGG
GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA
DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST
VEKTVAPTECS (配列番号 1 6)

代替 2 1 B 1 2 成熟軽鎖：

ESALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMY
EVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCNSYTSTSMVFGG
GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA
DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST
VEKTVAPTECS (配列番号 1 7)

【 図 4 B 】

【図 4 B】

2 1 B 1 2 重鎖：

2 1 B 1 2 成熟重鎖：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WVSFYNGNTNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
GYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCN
VDHKPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMPLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1 8)

代替 2 1 B 1 2 成熟重鎖：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WVSFYNGNTNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
GYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCN
VDHKPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMPLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1 9)

【 配 列 表 】

2017525680000001 . app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/040217

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/40 A61K39/395 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/026558 A1 (AMGEN INC [US]; JACKSON SIMON MARK [US]; WALKER NIGEL PELHAM CLINTON []) 26 February 2009 (2009-02-26) cited in the application examples 6, 34	1-3, 6-8, 11, 15, 16
Y	WO 2013/166448 A1 (AMGEN INC [US]) 7 November 2013 (2013-11-07) example 22 sequences 23, 50	4, 5, 9, 10, 12-14, 17
Y	WO 02/072636 A2 (ALTUS BIOLOGICS INC [US]; SHENOY BHAMI [US]; GOVARDHAN CHANDRIKA P [US]) 19 September 2002 (2002-09-19) abstract examples 1-38	4, 5, 9, 10, 12-14, 17
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 September 2015		09/10/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Malamoussi, A

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/040217

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YANG M X ET AL: "Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 100, no. 12, 10 June 2003 (2003-06-10), pages 6934-6939, XP002307180, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.1131899100 abstract</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>BASU S K ET AL: "PROTEIN CRYSTALS FOR THE DELIVERY OF BIOPHARMACEUTICALS", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, INFORMA HEALTHCARE, ASHLEY, LONDON; GB, vol. 4, no. 3, 1 March 2004 (2004-03-01), pages 301-317, XP009040451, ISSN: 1471-2598, DOI: 10.1517/EOBT.4.3.301.27331 the whole document</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>LIANG H ET AL: "Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antagonism reduces low-density lipoprotein cholesterol in statin-treated hypercholesterolemic nonhuman primates", JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, US, vol. 340, no. 2, 1 February 2012 (2012-02-01), pages 228-236, XP009166142, ISSN: 0022-3565 abstract page 230, left-hand column, paragraph 8</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>YAN G NI ET AL: "A PCSK9-binding antibody that structurally mimics the EGF(A) domain of LDL-receptor reduces LDL cholesterol in vivo", JOURNAL OF LIPID RESEARCH, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US, vol. 52, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 78-86, XP002686538, ISSN: 0022-2275, DOI: 10.1194/JLR.M011445 [retrieved on 2010-10-19] abstract page 79, right-hand column, paragraph 5 - page 80, left-hand column, paragraph 1 figures 2, 4</p> <p>-----</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/040217

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 2009026558 A1	26-02-2009	AR 068011 A1	28-10-2009
		AU 2008288791 A1	26-02-2009
		BR PI0816117 A2	10-03-2015
		CA 2696252 A1	26-02-2009
		CN 101932607 A	29-12-2010
		CN 104311665 A	28-01-2015
		CN 104311666 A	28-01-2015
		CN 104311667 A	28-01-2015
		CO 6230997 A2	20-12-2010
		CR 11328 A	12-07-2010
		EA 201000356 A1	30-08-2010
		EP 2215124 A1	11-08-2010
		EP 2615114 A2	17-07-2013
		JP 5441905 B2	12-03-2014
		JP 5705288 B2	22-04-2015
		JP 2010536384 A	02-12-2010
		JP 2014043446 A	13-03-2014
		KR 20100057070 A	28-05-2010
		KR 20140064962 A	28-05-2014
		MA 31978 B1	03-01-2011
		NZ 584101 A	28-09-2012
		PE 00142014 A1	31-01-2014
		PE 02202014 A1	21-02-2014
		PE 02212014 A1	21-02-2014
		PE 02312014 A1	08-03-2014
		PE 10062009 A1	14-08-2009
		PE 14002013 A1	16-12-2013
		SG 184702 A1	30-10-2012
		TW 200916481 A	16-04-2009
		TW 201500374 A	01-01-2015
		TW 201500375 A	01-01-2015
		TW 201500376 A	01-01-2015
		US 2009142352 A1	04-06-2009
		US 2009326202 A1	31-12-2009
		US 2011027287 A1	03-02-2011
		US 2012020975 A1	26-01-2012
		US 2012020976 A1	26-01-2012
		US 2012027765 A1	02-02-2012
		US 2012093818 A1	19-04-2012
		US 2012213797 A1	23-08-2012
		US 2012251544 A1	04-10-2012
		US 2013052201 A1	28-02-2013
		US 2013058944 A1	07-03-2013
		US 2013079501 A1	28-03-2013
		US 2013079502 A1	28-03-2013
		US 2013085265 A1	04-04-2013
		US 2013245235 A1	19-09-2013
		US 2014228545 A1	14-08-2014
		US 2014228547 A1	14-08-2014
		US 2014228557 A1	14-08-2014
		US 2014235830 A1	21-08-2014
		US 2014235831 A1	21-08-2014
		US 2014357850 A1	04-12-2014
		US 2014357851 A1	04-12-2014
		US 2014357852 A1	04-12-2014
		US 2014357853 A1	04-12-2014
		US 2014357854 A1	04-12-2014
		US 2015031870 A1	29-01-2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/040217

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2015087819 A1	26-03-2015
		WO 2009026558 A1	26-02-2009
WO 2013166448 A1	07-11-2013	CN 104619340 A	13-05-2015
		EP 2844285 A1	11-03-2015
		US 2014030270 A1	30-01-2014
		WO 2013166448 A1	07-11-2013
WO 02072636 A2	19-09-2002	AU 2002256971 B2	03-04-2008
		CA 2433353 A1	19-09-2002
		EP 1345968 A2	24-09-2003
		EP 2325205 A2	25-05-2011
		JP 4731793 B2	27-07-2011
		JP 2005502589 A	27-01-2005
		KR 20030074693 A	19-09-2003
		KR 20080043858 A	19-05-2008
		KR 20100031769 A	24-03-2010
		NZ 526720 A	30-11-2007
		US 2002136719 A1	26-09-2002
		US 2009093617 A1	09-04-2009
		WO 02072636 A2	19-09-2002
		ZA 200305035 A	16-09-2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K	9/14		
A 6 1 K	9/10	(2006.01)	A 6 1 K	9/10		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A	

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

(72) 発明者 マンダパティ , サラスワティ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 6 , ブルックライン , アダムス ストリート
 1 5

(72) 発明者 パテル , リーナ ジェイ .
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 0 1 , ウォーバン , ペアヒル ロード 5

F ターム (参考) 4C076 AA22 AA29 AA99 CC21 FF68
 4C085 AA14 BB11 BB36 CC23 DD62 EE01
 4H045 AA11 DA76 EA27 FA74 GA40