

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5419709号
(P5419709)

(45) 発行日 平成26年2月19日(2014.2.19)

(24) 登録日 平成25年11月29日(2013.11.29)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395	Z N A U
A 61 K 9/08	(2006.01)	A 61 K 9/08	
A 61 K 47/18	(2006.01)	A 61 K 47/18	
A 61 K 47/22	(2006.01)	A 61 K 47/22	
A 61 K 47/26	(2006.01)	A 61 K 47/26	

請求項の数 10 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-545652 (P2009-545652)
(86) (22) 出願日	平成20年1月9日(2008.1.9)
(65) 公表番号	特表2010-515742 (P2010-515742A)
(43) 公表日	平成22年5月13日(2010.5.13)
(86) 國際出願番号	PCT/US2008/050582
(87) 國際公開番号	W02008/086395
(87) 國際公開日	平成20年7月17日(2008.7.17)
審査請求日	平成23年1月7日(2011.1.7)
(31) 優先権主張番号	60/879,500
(32) 優先日	平成19年1月9日(2007.1.9)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	309040701 ワイス・エルエルシー アメリカ合衆国 ニュージャージー州O 7940. マジソン, ファイブ ジラルダ フームズ
(74) 代理人	100131934 弁理士 ▲高▼橋 宏次
(74) 代理人	100137040 弁理士 宮澤 純子
(74) 代理人	100133927 弁理士 四本 能尚
(74) 代理人	100147186 弁理士 佐藤 真紀
(74) 代理人	100174447 弁理士 龍田 美幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗IL-13抗体製剤およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- (a) 100mg/mlの抗IL-13抗体IMA-638；
- (b) 10mMのヒスチジン；
- (c) 5%のスクロース；
- (d) 0.01%のTween-80；および
- (e) 0.1%から2%のアルギニン

を含み、pHが6.0である液体製剤。

【請求項2】

前記製剤が、さらに、1%～10%のソルビトール、0.1%～2%のグリシン、5mM～150mMのメチオニン、および5mM～100mMの塩化ナトリウムの少なくとも1つを含む請求項1に記載の製剤。 10

【請求項3】

前記製剤が、さらに、第2抗体または該抗体の抗原結合性フラグメントを含み、前記第2抗体は、前記製剤の前記IL-13抗体とは異なるエピトープ特異性を有する抗IL-13抗体、抗IgE抗体、抗C5抗体、抗IL-4抗体、抗TNF-α抗体、および抗IL-9抗体からなる群から選択される請求項1に記載の製剤。

【請求項4】

前記製剤が、さらに、抗ヒスタミン薬、抗炎症剤、長時間作用型気管支拡張薬(LABA)、吸入コルチコステロイド薬(ICS)、およびロイコトリエン阻害剤からなる群か 20

ら選択された炎症性疾患を処置する場合に有効である第2の治療上または薬理学的に活性な薬剤を含む請求項1に記載の製剤。

【請求項5】

注入可能なシリンジであって、請求項1に記載の前記製剤の充填ずみ溶液を含むシリンジ。

【請求項6】

経鼻投与する装置であって、請求項1に記載の前記製剤および薬学的に容認できる分散剤を含む装置。

【請求項7】

経皮貼布であって、請求項1に記載の前記製剤を含み、薬学的に容認できる担体を任意に含む経皮貼布。

【請求項8】

静注バッグであって、請求項1に記載の前記製剤および任意に生理食塩水または5%デキストロースを含む静注バッグ。

【請求項9】

キットであって、請求項1に記載の前記製剤を含む少なくとも1つの容器および取扱い説明書を含むキット。

【請求項10】

前記容器がガラスバイアルまたは注入可能なシリンジである請求項9に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2007年1月9日に出願された米国仮特許出願第60/879,500号の利益を主張する。米国仮特許出願第60/879,500号の内容は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

本出願は、抗体の分野、特に抗体の貯蔵に関する。

【背景技術】

【0003】

抗体および抗体から導かれたたんぱく質には多くの用途がある。この種の用途における抗体の使用は、製剤中の抗体の貯蔵により促進され、該製剤は比較的単純な製剤を用いた多様な状態における抗体の安定性を助長する。製剤が治療に使われるならば、該製剤は、活性成分の活性を、容認できないほど喪失することなく貯蔵を可能にし、不活性凝集物などの望ましくない生成物の蓄積を最小限に抑制し、活性成分の適切な濃度に適応し、治療への応用に適合しない成分を含まないことが重要である。下流処理で使われるたんぱく質、例えば、1つの治療薬を作る別々の実体に結合される予定のたんぱく質を貯蔵している製剤は、この製造プロセスを妨げるであろう。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、抗IL-13抗体を貯蔵する製剤に関する。これらの製剤は、例えば、医薬品として有効である。したがって、1つの態様では、本発明は、(a)抗IL-13抗体、(b)抗凍結剤、および(c)該製剤のpHが約5.5~6.5になるような緩衝液を含む抗IL-13抗体製剤に関する。一部の実施形態では、該製剤は液状製剤、凍結乾燥製剤、再構成凍結乾燥製剤またはエアロゾル製剤である。特定の実施形態では、該製剤中の抗IL-13の濃度は、約0.5mg/ml~約250mg/ml、約0.5mg/ml~約45mg/ml、約0.5mg/ml~約100mg/ml、約100mg/ml~約200mg/ml、または約50mg/ml~約250mg/mlの範囲にある。該製剤の一部の実施態様では、抗IL-13抗体はヒト化抗体(例えば、部分ヒト化抗体または完全ヒト化抗体)である。場合によっては、この抗体はカッパ軽鎖構築抗体である。

10

20

30

40

50

一部の実施態様では、この抗体は、IgG1抗体、IgG2抗体、またはIgG4抗体である。特定の実施態様では、該製剤中の抗IL-13抗体はモノクローナル抗体である。場合によっては、該製剤中の抗IL-13抗体は、米国特許出願第11/149,309号（米国特許出願公開第20060073148号）、米国特許出願第11/155,843号（米国特許出願公開第20060063228号）、または国際公開第2006/085938号に記載されている。具体的な実施態様では、抗IL-13抗体はIMA-638（図34を参照のこと）またはIMA-026（図35を参照のこと）である。

【0005】

該製剤の抗凍結剤は、例えば、約2.5%～約10%（重量／容量）のスクロースまたはトレハロースでよい。場合によっては、該製剤の抗凍結剤はヒスチジンではない。一部の実施態様では、該製剤の緩衝液は、約4mM～約60mMのヒスチジン緩衝液、約5mM～約25mMのコハク酸塩緩衝液、または約5mM～約25mMの酢酸塩緩衝液である。該製剤の緩衝液のpHは、一般に、約5.0と7.0との間にある。一部の具体的な実施態様では、該製剤の緩衝液のpHは、5.0、5.5、6.0または6.5である。本発明の製剤は、抗凍結剤および緩衝液以外に他の賦形剤を含んでもよい。一部の実施態様では、該製剤は、約0%～0.2%の濃度の界面活性剤を含む。場合によっては、該製剤は、0%から約0.2%までのポリソルベート-20、ポリソルベート-40、ポリソルベート-60、ポリソルベート-65、ポリソルベート-80またはポリソルベート-85を含む。具体的な実施態様では、該製剤は、0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.11%、0.12%、0.13%、0.14%、0.15%、0.16%、0.17%、0.18%、0.19%または0.2%のポリソルベート-80を含む。該製剤は、約0.01%～約5%のアルギニンも含むことができる。具体的な実施態様では、該製剤は、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.11%、0.12%、0.13%、0.14%、0.15%または0.16%、0.17%、0.18%、0.19%または0.2%、0.3%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2%、2.5%、3%、3.5%、4.0%、4.5%または5%のアルギニンを含む。一部の実施態様では、該製剤は、約0.001%～約0.05%のTween20またはTween80も含む。具体的な実施態様では、該製剤は、0.005%、0.008%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、または0.05%のTween20またはTween80も含む。特定の実施態様では、本発明の製剤は、界面活性剤およびアルギニン、アルギニンおよびTween、またはアルギニン、Tween、およびTween以外の界面活性剤を含むことができる。他の実施態様では、該製剤は、約1%～約10%のソルビトール、約0.1%～約2%のグリシン、約5mM～約150mMのメチオニン、約5mM～約100mMの塩化ナトリウムの1つ以上を含んでもよい。

【0006】

該製剤は、第2抗体または該抗体の抗原結合性フラグメントも含むことができる。例えば、第2抗体は、抗IL-13抗体または該抗体のIL-13結合性フラグメントでよく、該第2IL-13抗体は、該製剤の第1のIL-13抗体とは異なるエピトープ特異性を有する。抗IL-13抗体と同時処方することができる抗体の限定されない他の例には、抗IgE抗体または該抗体のIgE結合性フラグメント、抗IL-4抗体または抗IL-4抗体のIL-4結合性フラグメント、抗TNF-抗体または抗TNF-抗体のTNF-結合性フラグメント、抗C5抗体または抗C5抗体の相補体結合性フラグメント、および抗IL-9抗体または抗IL-9抗体のIL-9結合性フラグメントがある。該製剤は、炎症性疾患を処置するのに有効な第2の治療上または薬理学的に活性な薬剤も含むことができる。

10

20

30

40

50

【0007】

該製剤の特定の実施態様では、(a)該抗体はヒト化マウス抗IL-13抗体であり、(b)抗凍結剤は約0.02%～約10%（重量／容量）のスクロースまたはトレハロースであり、および(c)緩衝液は約4 mM～約60 mMのヒスチジン緩衝液である。場合によっては、この製剤は、約0.01%～約5%のアルギニンも含む。特定の場合には、この製剤は、約0.001%～約0.05%のTweenも含む。他の場合には、この製剤は、約0.01%～約5%のアルギニンおよび約0.001%～約0.05%のTweenを含む。一部の実施態様では、該製剤は、さらに、約1%～約10%のソルビトール、約0.1%～約2%のグリシン、約5 mM～約150 mMのメチオニン、約5 mM～約100 mMの塩化ナトリウム、の1つ以上を含む。場合によっては、この製剤は、0%から約0.2%までの界面活性剤（例えば、ポリソルベート-20、-40、-45、-60、-65、-80、-85）も含む。10

【0008】

該製剤の特定の実施態様では、(a)抗体はIMA-638またはIMA-028であり、(b)抗凍結剤は約0.02%～約10%（重量／容量）のスクロースまたはトレハロースであり、および(c)緩衝液は約10 mMのコハク酸塩緩衝液で、pH 6.0である。該製剤の他の実施態様では、(a)抗体はIMA638またはIMA-028抗体であり、(b)抗凍結剤は約0.02%～約10%（重量／容量）のスクロースまたはトレハロースであり、および(c)緩衝液は約10 mMの酢酸塩緩衝液で、pH 6.0である。20

【0009】

別の態様では、(a)抗IL-13抗体、(b)約5%～約10%（重量／容量）のスクロースまたはトレハロース、および(c)約5.5～6.5のpHを有する緩衝液を含むエアロゾル製剤が提供される。場合によっては、この製剤は約0.01%～約5%のアルギニンも含む。特定のケースでは、この製剤は約0.001%～約0.05%のTweenも含む。他のケースでは、この製剤は、約0.01%～約5%のアルギニンおよび約0.001%～約0.05%のTweenを含む。一部の実施態様では、該製剤は、約1%～約10%のソルビトール、約0.1%～約2%のグリシン、約5 mM～約150 mMのメチオニン、約5 mM～約100 mMの塩化ナトリウムの1つ以上を含む。場合によっては、この製剤は、0%から約0.2%までの界面活性剤（例えば、ポリソルベート-20、-40、-60、-65、-80、-85）を含む。場合によっては、エアロゾル製剤は、ぜんそくまたは慢性閉塞性肺疾患の処置において有効な薬剤も含む。30

【0010】

別の態様では、(a)抗IL-13抗体、(b)約5%～約10%（重量／容量）のスクロースまたはトレハロース、および(c)約5.5～6.5のpHを有する緩衝液を含む乾燥凍結製剤が提供される。場合によっては、この製剤は、約0.01%～約5%のアルギニンも含む。特定のケースでは、この製剤は、約0.001%～約0.05%のTweenも含む。他のケースでは、この製剤は、約0.01%～約5%のアルギニンおよび約0.001%～約0.05%のTweenを含む。一部の実施態様では、該製剤は、さらに、約1%～約10%のソルビトール、約0.1%～約2%のグリシン、約5 mM～約150 mMのメチオニン、および約5 mM～約100 mMの塩化ナトリウム、の1つ以上を含む。場合によっては、この製剤は、0%から約0.2%までの界面活性剤（例えば、ポリソルベート-20、-40、-60、-65、-80、-85）を含む。場合によっては、エアロゾル製剤は、ぜんそくまたは慢性閉塞性肺疾患の処置において有効な薬剤も含む。40

【0011】

特定の実施態様では、該抗体の品位は、-80で少なくとも18ヶ月間、-80で少なくとも24ヶ月間、-20で少なくとも18ヶ月間、-20で少なくとも24ヶ月間、2～8で少なくとも18ヶ月間、2～8で少なくとも24ヶ月間、25で少なくとも18ヶ月間、または25で少なくとも24ヶ月間貯蔵後該製剤中に保持さ50

れる。場合によっては、該製剤は、-80で少なくとも18ヶ月後、-80で少なくとも24ヶ月後、-20で少なくとも18ヶ月後、-20で少なくとも24ヶ月後、2~8で少なくとも18ヶ月後、2~8で少なくとも24ヶ月後、25で少なくとも18ヶ月後、25で少なくとも24ヶ月後、該製剤は、10%未満の高分子量(HMW)種を含む。本発明は、サイズ排除高速液体クロマトグラフィ(SEC-HPLC)を用いてHMW種がアッセイされる実施態様を含む。本発明は、該製剤が、-80で少なくとも18ヶ月後、-80で少なくとも24ヶ月後、-20で少なくとも18ヶ月後、-20で少なくとも24ヶ月後、2~8で少なくとも18ヶ月後、2~8で少なくとも24ヶ月後、25で少なくとも18ヶ月後、25で少なくとも24ヶ月後、10%未満の低分子量(LMW)種を含む実施態様も含む。特定のケースでは、LMW種は、SEC-HPLCを用いてアッセイされる。該製剤の一部の実施形態では、凍結乾燥された抗体製剤を再構成すると、凍結乾燥前の該製剤に比べて、少なくとも90%の抗体構造を保持する。抗体構造は、例えば、結合アッセイ、表面電荷アッセイ、バイオアッセイ、またはHMW種とLMW種との比により決められる。
10

【0012】

別の態様では、本発明は、IL-13関連疾患の処置のための医薬組成物に関する。該医薬組成物は、本明細書で説明した抗IL-13抗体製剤、例えば、ヒト化抗体、および本明細書で説明した他の特徴を含む製剤を含む。

【0013】

さらに別の態様では、本発明は、医薬組成物の製造に関し、該組成物は、(a)抗IL-13抗体、(b)抗凍結剤、および(c)該製剤のpHが約5.5~6.5になるような緩衝液を含む抗体製剤を含む。場合によっては、該医薬組成物の抗IL-13抗体は、米国特許出願第11/149,309号(米国特許出願公開第20060073148号)、米国特許出願第11/155,843号(米国特許出願公開第20060063228号)、または国際公開第2006/085938号に記載されている抗体である。具体的な実施態様では、抗IL-13抗体はIMA-638またはIMA-026である。場合によっては、該医薬組成物は約0.01%~約5%のアルギニンも含む。特定のケースでは、該医薬組成物は約0.001%~約0.05%のTweenも含む。他のケースでは、該医薬組成物は約0.01%~約5%のアルギニンおよび約0.001%~約0.05%のTweenを含む。一部の実施形態では、該医薬組成物は、約1%~約10%のソルビトール、約0.1%~約2%のグリシン、約5mM~約150mMのメチオニン、約5mM~約100mMの塩化ナトリウムの1つ以上を含む。場合によっては、この製剤は、0%から約0.2%までの界面活性剤(例えば、ポリソルベート-20、-40、-60、-65、-80、-85)を含む。
20
30

【0014】

別の態様では、本発明は、医学的に有効量のIL-13抗体製剤を投与することを含む、IL-13関連疾患を処置する方法に関する。該製剤は、(a)抗IL-13抗体、(b)抗凍結剤、および(c)該製剤のpHが約5.5~6.5になるような緩衝液を含む。場合によっては、該製剤の抗IL-13抗体は、米国特許出願第11/149,309号(米国特許出願公開第20060073148号)、米国特許出願第11/155,843号(米国特許出願公開第20060063228号)、または国際公開第2006/085938号に記載されている抗体である。具体的な実施態様では、抗IL-13抗体はIMA-638またはIMA-026である。場合によっては、該製剤は約0.01%~約5%のアルギニンも含む。特定のケースでは、該製剤は約0.001%~約0.05%のTweenも含む。他のケースでは、該製剤は、約0.01%~約5%のアルギニンおよび約0.001%~約0.05%のTweenを含む。一部の実施形態では、該製剤は、約1%~約10%のソルビトール、約0.1%~約2%のグリシン、約5mM~約150mMのメチオニン、および約5mM~約100mMの塩化ナトリウムの1つ以上を含む。場合によっては、この製剤は、0%から約0.2%までの界面活性剤(例えば、ポリソルベート-20、-40、-60、-65、-80、-85)を含む。一部の実施形態
40
50

では、本発明の方法は併用療法を含む。併用療法は、予め投与された治療化合物が体内でまだ有効な間に、第2の化合物が投与されるような2つ以上の治療化合物を併用投与する方法を意味している（例えば、2つの化合物が患者の体内で同時に有効であり、これには2つの化合物の相乗効果を含めてよい）。併用療法は、1つ以上の追加の治療薬と同時投与および／または同時処方された抗IL-13抗体を含むことができる。なお、上記追加の治療薬には、例えば、1つ以上のサイトカインおよび成長因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤（例えば、全身性抗炎症剤、）、代謝阻害剤、酵素阻害剤、および／または細胞傷害性薬物または細胞分裂阻害剤がある。IL-13結合剤および他の治療薬も別々に投与することもできる。

【0015】

10

本発明の方法の特定の実施態様では、IL-13関連疾患は炎症性疾患である。一部の実施態様では、炎症性疾患は、関節炎、ぜんそく、炎症性腸疾患、炎症性皮膚疾患、多発性硬化症、骨粗しょう症、腱炎、アレルギー性疾患、宿主の傷害に反応した炎症、敗血症、リウマチ性関節炎、変形性関節炎、過敏性腸疾患、潰瘍性大腸炎、乾癬、系統的エリテマトーデス、および他の自己免疫性疾患からなる群から選択される。この方法の特定の実施態様では、IL-13関連疾患は、アレルギー性ぜんそく、非アレルギー性ぜんそく、アレルギー性および非アレルギー性ぜんそくの混合型、運動誘発性ぜんそく、薬剤誘発性ぜんそく、職業性ぜんそく、後期ぜんそく、B細胞慢性リンパ性白血病（B細胞CLL）、ホジキン病、住血吸虫病における組織の線維化、自己免疫リューマチ性疾患、炎症性腸疾患、リューマチ性関節炎、気道炎症を含む状態、好酸球増加症、線維症および過剰粘液産生（例えば、のう胞性線維症および肺線維症）、アトピー性疾患（例えば、アレルギー性鼻炎）、皮膚の炎症および自己免疫状態（例えば、アトピー性皮膚炎）、消化器官の炎症および／または自己免疫状態（例えば、炎症性腸疾患（IBD））、肝臓の炎症および／または自己免疫状態（例えば、肝硬変）、ウイルス性感染、強皮症および肝臓線維症など他の臓器の線維症、アレルギー性結膜炎、湿疹、じんましん、食物アレルギー、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、潰瘍性大腸炎、ラウス肉腫ウイルス感染、ぶどう膜炎、強皮症、または骨粗しょう症である。この方法の一部の実施態様では、該抗体製剤は、吸入、噴霧、または注射により投与される。

【0016】

20

一部の実施態様では、本明細書で説明した製剤を予め満たした溶液を含むシリンジを用意する。具体的な実施態様では、薬液充填済みシリンジは、100mg/ml抗IL-13抗体（例えば、IMA-026、IMA-638）、10mMのヒスチジン、5%のスクロース、0.01%のTween-80、40mMのNaClを含み、pHは6.0である。別の具体的な実施態様では、薬液充填済みシリンジ中の該製剤は、さらに、約0.1%～約2%のアルギニンを含む。場合によっては、該シリンジは自動注入装置を備えている。他の実施態様では、本明細書で説明した製剤を鼻から投与する装置が用意されている。場合によっては、本明細書で説明した製剤を投与する経皮貼布が用意されている。さらに他の場合には、本明細書で説明した製剤を投与する静注用バッグが用意されている。具体的な実施態様では、静注用バッグには生理食塩水または5%デキストロースが入れられている。

40

【0017】

他の実施態様では、本明細書で説明した製剤の容器を含むキットが用意されている。該キットは、随意に使用説明書を含む。場合によっては、キット内の容器はプラスチックまたはガラスのバイアル、あるいは注入可能なシリンジである。

【0018】

50

特に明記しない限り、本明細書で使われるすべての技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が普通に理解する意味と同じ意味を有する。方法および物質は、本明細書で説明した方法および物質と類似しているか、同等であるものが、本発明の実施またはテストにおいて使用することができるが、適切な方法および物質は以下で説明する。本明細書で言及したすべての刊行物、特許出願、特許、および他の文献は、引用により全

体が本明細書に組み込まれている。さらに、物質、方法、および実施例は、説明のみのためのものであり、範囲を限定する意図はない。

【0019】

本発明の他の特徴および利点は、詳細な説明、図面、および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

抗IL-13抗体製剤であって、

(a) 抗IL-13抗体と、

(b) 抗凍結剤と、

(c) 前記製剤のpHが約5.5～約6.5の範囲にある緩衝液と、

を含む製剤。

(項目2)

前記製剤が液体製剤、凍結乾燥製剤、液体として再構成される凍結乾燥製剤、またはエアロゾル製剤である項目1に記載の製剤。

(項目3)

前記製剤中の前記抗IL-13抗体が、約0.5mg/ml～約250mg/ml、約0.5mg/ml～約45mg/ml、約0.5mg/ml～約100mg/ml、約100mg/ml～約200mg/ml、または約50mg/ml～約250mg/mlの濃度にある項目1に記載の製剤。

(項目4)

前記抗IL-13抗体がヒト化抗体である項目1に記載の製剤。

(項目5)

前記抗体がカッパ軽鎖構築抗体である項目4に記載の製剤。

(項目6)

前記抗体が、IgG1抗体、およびIgG2抗体、およびIgG4抗体からなる群から選択される項目4に記載の製剤。

(項目7)

前記抗IL-13抗体がモノクローナル抗体である項目1に記載の製剤。

(項目8)

前記抗IL-13抗体がIMA-638またはIMA-026である項目1に記載の製剤。

(項目9)

前記抗凍結剤が約2.5%～約10%（重量／容量）のスクロースまたはトレハロースである項目1に記載の製剤。

(項目10)

前記緩衝液が、約4mM～約60mMのヒスチジン緩衝液、約5mM～約25mMのコハク酸塩緩衝液、または約5mM～約25mMの酢酸塩緩衝液である項目1に記載の製剤。

(項目11)

前記製剤が、さらに、約0%～約0.2%の濃度の界面活性剤を含む項目1に記載の製剤。

(項目12)

前記界面活性剤が、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-65、ポリソルベート-80、ポリソルベート-85、およびこれらの中から選択される項目4に記載の製剤。

(項目13)

前記製剤が、さらに、約0.01%～約5%のアルギニンを含む項目1に記載の製剤。

(項目14)

前記製剤が、さらに、約0.001%～約0.05%のTweenを含む項目1に記載

10

20

30

40

50

の製剤。

(項目15)

前記製剤が、さらに、約1%～約10%のソルビトール、約0.1%～約2%のグリシン、約5mM～約150mMのメチオニン、および約5mM～約100mMの塩化ナトリウムの少なくとも1つを含む項目1に記載の製剤。

(項目16)

前記製剤が、さらに、第2抗体または該抗体の抗原結合性フラグメントを含み、前記第2抗体は、前記製剤の前記IL-13抗体とは異なるエピトープ特異性を有する抗IL-13抗体、抗IgE抗体、抗C5抗体、抗IL-4抗体、抗TNF-抗体、および抗IL-9抗体からなる群から選択される項目1に記載の製剤。

10

(項目17)

前記製剤が、さらに、抗ヒスタミン薬、抗炎症剤、長時間作用型気管支拡張薬(LABA)、吸入コルチコステロイド薬(ICS)、およびロイコトリエン阻害剤からなる群から選択された炎症性疾患を処置する場合に有効である第2の治療上または薬理学的に活性な薬剤を含む項目1に記載の製剤。

(項目18)

(a) 前記抗体がヒト化マウス抗IL-13抗体であり、
 (b) 前記抗凍結剤が約0.02%～約10%(重量/容量)のスクロースまたはトレハロースであり、
 (c) 前記緩衝液が約4mM～約60mMのヒスチジン緩衝液であり、pH6.0である、

20

項目1に記載の製剤。

(項目19)

前記製剤が、さらに、約0.01%～約5%のアルギニンを含む項目18に記載の製剤。

(項目20)

前記製剤が、さらに、約0.001%～約0.05%のTweenを含む項目18に記載の製剤。

(項目21)

前記製剤が、さらに、約1%～約10%のソルビトール、約0.1%～約2%のグリシン、約5mM～約150mMのメチオニン、および約5mM～約100mMの塩化ナトリウムの少なくとも1つを含む項目18に記載の製剤。

30

(項目22)

さらに、0%より多く約0.2%までのポリソルベート80を含む項目18に記載の製剤。

(項目23)

(a) 前記抗体がIMA-638またはIMA-026であり、
 (b) 前記抗凍結剤が約0.02%～約10%(重量/容量)のスクロースまたはトレハロースであり、
 (c) 前記緩衝液が10mMのコハク酸塩緩衝液であり、pH6.0である、

40

項目1に記載の製剤。

(項目24)

(a) 前記抗体がIMA-638またはIMA-026であり、
 (b) 前記抗凍結剤が約0.02%～約10%(重量/容量)のスクロースまたはトレハロースであり、
 (c) 前記緩衝液が10mMの酢酸塩緩衝液であり、pH6.0である、

項目1に記載の製剤。

(項目25)

抗IL-13抗体のエアロゾル製剤であって、
 (a) 抗IL-13抗体と、

50

(b) 約 5 % ~ 約 10 % (重量 / 容量) のスクロースまたはトレハロースと、
 (c) 約 5 . 5 ~ 6 . 5 の pH を有する緩衝液と、
 を含む製剤。

(項目 26)

前記製剤が、さらに、約 0 . 0 1 % ~ 約 5 % のアルギニンを含む項目 1 に記載の製剤。

(項目 27)

前記製剤が、さらに、約 0 . 0 0 1 % ~ 約 0 . 0 5 % の Tween を含む項目 1 に記載の製剤。

(項目 28)

前記製剤が、さらに、約 1 % ~ 約 10 % のソルビトール、約 0 . 1 % ~ 約 2 % のグリシン、約 5 mM ~ 約 150 mM のメチオニン、および約 5 mM ~ 約 100 mM の塩化ナトリウムの少なくとも 1 つを含む項目 1 に記載の製剤。

(項目 29)

ぜんそくまたは慢性閉塞性肺疾患を処置する場合に有効である治療薬をさらに含む項目 25 に記載のエアロゾル製剤。

(項目 30)

抗 IL - 13 抗体の凍結乾燥製剤であって、

(a) 抗 IL - 13 抗体と、

(b) 約 5 % ~ 約 10 % (重量 / 容量) のスクロースまたはトレハロースと、

(c) 約 5 . 5 ~ 6 . 5 の pH を有する緩衝液と、
 を含む製剤。

(項目 31)

元の製剤に比べて高分子量 (HMW) 種および低分子量 (LMW) 種のパーセントの増加が、- 80 で少なくとも 18 ヶ月、- 80 で少なくとも 24 ヶ月、- 20 で少なくとも 18 ヶ月、- 20 で少なくとも 24 ヶ月、2 ~ 8 で少なくとも 18 ヶ月、2 ~ 8 で少なくとも 24 ヶ月、25 で少なくとも 18 ヶ月、25 で少なくとも 24 ヶ月後 5 % 未満である項目 1 に記載の製剤。

(項目 32)

HMW および LMW の種が、サイズ排除高速液体クロマトグラフィ (SEC - HPLC) を用いてアッセイされる項目 31 に記載の製剤。

(項目 33)

前記 IL - 13 抗体の少なくとも 90 % が、2 ~ 8 で少なくとも 18 ヶ月、または 2 ~ 8 で少なくとも 24 ヶ月、前記抗体を貯蔵した後、モノマー性抗体である項目 1 に記載の製剤。

(項目 34)

前記抗体のモノマー性が、結合アッセイ、表面電荷アッセイ、バイオアッセイ、または HMW 種と LMW 種の比により測定される項目 33 に記載の製剤。

(項目 35)

IL - 13 関連疾患を処置するための医薬組成物であって、前記医薬組成物が項目 1 に記載の抗 IL - 13 抗体製剤を含む医薬組成物。

(項目 36)

前記組成物が、さらに、約 0 . 0 1 % ~ 約 5 % のアルギニンを含む項目 35 に記載の医薬組成物。

(項目 37)

前記組成物が、さらに、約 0 . 0 0 1 % ~ 約 0 . 0 5 % の Tween を含む項目 35 に記載の医薬組成物。

(項目 38)

前記組成物が、さらに、約 1 % ~ 約 10 % のソルビトール、約 0 . 1 % ~ 約 2 % のグリシン、約 5 mM ~ 約 150 mM のメチオニン、約 5 mM ~ 約 100 mM の塩化ナトリウム、および 0 % より多く約 0 . 2 % までの界面活性剤の少なくとも 1 つを含む項目 35 に記

10

20

30

40

50

載の医薬組成物。

(項目 39)

前記組成物がヒト化 I L - 13 抗体を含む項目 35 に記載の医薬組成物。

(項目 40)

医薬組成物の製品であって、前記組成物が、

(a) 抗 I L - 13 抗体と、

(b) 抗凍結剤と、

(c) 前記製剤の pH が約 5.5 ~ 6.5 の範囲にある緩衝液と、

を含む抗体製剤を含む製品。

(項目 41)

10

I L - 13 関連疾患を処置する方法であって、前記方法が、

(a) 抗 I L - 13 抗体と、

(b) 抗凍結剤と、

(c) 前記製剤の pH が約 5.5 ~ 6.5 の範囲にある緩衝液と、

を含む薬学的に有効量の抗体製剤を投与することを含む方法。

(項目 42)

前記 I L - 13 関連疾患が、アレルギー性ぜんそく、非アレルギー性ぜんそく、アレルギー性および非アレルギー性ぜんそくの混合型、運動誘発性ぜんそく、薬剤誘発性ぜんそく、職業性ぜんそく、後期ぜんそく、慢性閉塞性肺疾患、関節炎、炎症性腸疾患、炎症性皮膚疾患、多発性硬化症、骨粗しょう症、腱炎、アレルギー性疾患、宿主の傷害に反応した炎症、敗血症、リューマチ性関節炎、変形性関節炎、過敏性腸疾患、潰瘍性大腸炎、乾癬、系統的エリテマトーデス、自己免疫疾患、B 細胞慢性リンパ性白血病 (B 細胞 CLL)、ホジキン病、住血吸虫病における組織の線維化からなる群から選択される項目 41 に記載の方法。

20

(項目 43)

前記抗体製剤が、経口、経鼻、デポー、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、のう内、軟骨内、腔内、腹部内、小脳内、脳室内、結腸内、頸部内、胃内、肝臓内、心筋内、眼球内、骨内、骨盤内、心膜内、腹膜内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液のう内、胸腔内、子宮内、膀胱内、病巣内、急速投与、腔、直腸、ほぼ側、舌下、経皮的（局所的）、経粘膜の各投与または徐放投与からなる群から選択される方法により投与される項目 41 に記載の方法。

30

(項目 44)

注入可能なシリンジであって、項目 1 に記載の前記製剤充填ずみ溶液を含むシリンジ。

(項目 45)

経鼻投与する装置であって、項目 1 に記載の前記製剤および薬学的に容認できる分散剤を含む装置。

(項目 46)

経皮貼布であって、項目 1 に記載の前記製剤を含み、薬学的に容認できる担体を任意に含む経皮貼布。

(項目 47)

40

静注バッグであって、項目 1 に記載の前記製剤および任意に生理食塩水または 5 % デキストロースを含む静注バッグ。

(項目 48)

キットであって、項目 1 に記載の前記製剤を含む少なくとも 1 つの容器および取扱い説明書を含むキット。

(項目 49)

前記容器がガラスバイアルまたは注入可能なシリンジである項目 48 に記載のキット。

(項目 50)

充填済みの注入可能なシリンジであって、製剤：

(a) 100 mg / ml の抗 I L - 13 抗体と、

50

- (b) 10 mMのヒスチジンと、
(c) 5 %のスクロースと、
(d) 0.01 %のTween-80と、
(e) 40 mMのNaClと、
- を含み、前記製剤のpHは6.0であるシリソ。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】適切な時点で再構成した、乾燥凍結し、貯蔵した抗IL-13抗体製剤中のHMW種のパーセンテージを、サイズ排除クロマトグラフィー・高速液体クロマトグラフィー（SEC-HPLC）を用いて測定した実験結果を示すグラフである。パーセンテージHMW = HMW種中の総たんぱく質のパーセンテージ。試料は、再構成前最長24ヶ月間、4、25、および40で貯蔵した。
10

【図2】適切な時点で再構成した、凍結乾燥し、貯蔵した抗IL-13抗体製剤の生物活性を、抗IL-13抗体スタンダードのパーセンテージとして測定した実験結果を示すグラフである。データは、たんぱく質のミリグラムあたりの単位比活性として表している。試料は、再構成前最長24ヶ月間、4、25、および40で貯蔵した。

【図3】100mg/mlの液体抗IL-13抗体製剤中のHMW種のパーセンテージを、最長24ヶ月間、4、15、25、および40で貯蔵後、SEC-HPLCを用いて測定した実験結果を示すグラフである。

【図4】100mg/mlの液体抗IL-13抗体製剤中のLMW種のパーセンテージを、最長24ヶ月間、4、15、25、および40で貯蔵後、SEC-HPLCを用いて測定した実験結果を示すグラフである。
20

【図5】液体製剤中の抗IL-13抗体のパーセント結合活性を最長6ヶ月間、4、15、25、および40で貯蔵後、アッセイした実験結果を示すグラフである。結合活性は、スタンダードに対するパーセンテージとして表している。

【図6】100mg/mlの抗IL-13抗体製剤の生物活性を、抗IL-13抗体スタンダードのパーセンテージとして測定した実験結果を示すグラフである。データは、たんぱく質ミリグラムあたりの単位比活性として表している。試料は、最長24ヶ月間、4、15、25、および40で貯蔵した。

【図7】最長24ヶ月間、4、15、25、および40で貯蔵した液体製剤中のたんぱく質濃度をアッセイしている実験結果を示すグラフである。
30

【図8】冷凍濃縮したアモルファス相のガラス転移温度を測定するために行った準環境変調示差走査熱量測定（MDSC）のグラフである。

【図9A】抗IL-13抗体の-25における冷凍乾燥顕微鏡画像の複写である。

【図9B】-25から-15に上げた抗IL-13抗体の冷凍乾燥顕微鏡画像の複写である。

【図9C】-15から-18に下げた抗IL-13抗体の冷凍乾燥顕微鏡画像の複写である。

【図9D】-18から-8に上げた抗IL-13抗体の冷凍乾燥顕微鏡画像の複写である。
40

【図9E】-8から-4に上げた抗IL-13抗体の冷凍乾燥顕微鏡画像の複写である。

【図9F】-4から-16に下げた抗IL-13抗体の冷凍乾燥顕微鏡画像の複写である。

【図10】積極的凍結乾燥サイクルのサイクル・トレースを示すグラフである。2つの異なる抗体組成物（MYO-029およびIMA-638と指定された）について貯蔵棚（棚）、および露点の温度が示されている。静電容量圧力計およびピラニ真空計を用いてアッセイされた圧力が示されている。

【図11】対照凍結乾燥サイクルのサイクル・トレースを示すグラフである。温度および圧力測定の試料は、図10の試料である。
50

【図12】アニーリング凍結乾燥サイクルのサイクル・トレースを示すグラフである。温度および圧力測定の試料は、図10の試料である。

【図13】積極的な凍結乾燥サイクル、対照凍結乾燥、およびアニーリング凍結乾燥サイクルの、それぞれ、図10 - 12に対応する一次乾燥の間の生成物温度を示すグラフである。

【図14】対照試料の変調示差走査熱量測定サーモグラムを示すグラフである。2つのガラス転移温度（逆進熱流について測定された）が観測され、1つは51.3、他は74.5で開始する。

【図15】アミドI領域における3つの試料（対照、積極的、およびアニーリング）のフーリエ変換赤外分光の結果を示すグラフである。
10

【図16】試料の再構成時間を貯蔵時間の関数として示すグラフである。試料は、対照、積極的、およびアニーリングの3つであり、5または50で貯蔵した。

【図17】UV-可視光分光(A_{280})を用いてアッセイしたたんぱく質濃度を示すグラフである。試料は図16の試料と同じである。

【図18】UV-可視光分光(A_{420})によりアッセイした溶液光散乱を示すグラフである。試料は図16の試料と同じである。

【図19】SEC-HPLCを用いたHMW種のアッセイの結果を示している。試料は図16の試料と同じである。
20

【図20】テストした抗体の結合親和性を貯蔵時間の関数として示すグラフである。試料は図16の試料と同じである。

【図21】バイアルおよびシリンジ中で行われたIMA-638賦形剤の選別における回収率(%)を示す棒グラフであり、IMA-638抗体濃度は、UV/可視により測定した。
20

【図22】バイアルおよびシリンジ中で、40で $t = 0 \sim 6$ 週間行われたIMA-638賦形剤の選別におけるHMW種のパーセント変化を示す棒グラフである。

【図23】バイアルおよびシリンジ中で、40で $t = 0 \sim 6$ 週間行われたIMA-638賦形剤の選別におけるLMW種のパーセント変化を示す棒グラフである。

【図24】約200rpmにおいて24時間ゲル・シェーカー上で室温において振とう後、Tween有無の両方の場合の製剤中のIMA-638の濃度を示す棒グラフである。
30

【図25】約200rpmにおいて24時間ゲル・シェーカー上で室温において振とう後、Tween有無の両方の場合の製剤中のIMA-638のHMW種のパーセントを示す棒グラフである。

【図26】1(FT1)、3(FT3)、および5(FT5)冷凍-解凍サイクル(-80における冷凍サイクル；37における解凍サイクル)の後、Tween有無の両方について製剤中のIMA-638の濃度を示す棒グラフである。

【図27】1(FT1)、3(FT3)、および5(FT5)冷凍-解凍サイクル(-80における冷凍サイクル；37における解凍サイクル)の後、Tween有無の両方について製剤中のIMA-638のHMW種のパーセントを示す棒グラフである。

【図28】4で最長7ヶ月間シリンジ内に貯蔵したIMA-638液体製剤中のHMW種のパーセントを示すグラフである。
40

【図29】25で最長7ヶ月間シリンジ内に貯蔵したIMA-638液体製剤中のHMW種のパーセントを示すグラフである。

【図30】40で最長7ヶ月間シリンジ内に貯蔵したIMA-638液体製剤中のHMW種のパーセントを示すグラフである。

【図31】40で最長28週間シリンジ内に貯蔵した0.01%のTweenおよび0%～2%のアルギニンを含むIMA-638液体製剤中のHMW種のパーセントを示すグラフである。

【図32】凍結乾燥し後最長12ヶ月間4、25、および40で貯蔵した、再構成したIL-13抗体、IMA-026のHMW種のパーセントを示すグラフである。

【図33】凍結乾燥し、最長12ヶ月間4、25、および40で貯蔵後再構成した
50

IMA - 026 抗体の生物活性を示すグラフである。

【図34】IMA - 638 抗体の重鎖（配列番号：1）および軽鎖（配列番号：2）からなるアミノ酸配列を提示している。重鎖DNA配列によりコード化された最後のアミノ酸残基、LyS₄₄₈は、ごく少量の、成熟した分泌型のIMA - 638において認められ、おそらく、チャイニーズ・ハムスター卵巣（CHO）細胞プロテアーゼによる細胞内処理の間にモノクローナル抗体のバルクから除去される。したがって、IMA - 638重鎖のカルボキシ末端はGly₄₄₇である。カルボキシ末端リジン処理は、組み換えおよび血漿由来抗体において認められ、これらの機能に対して影響はないように思われる。

【図35A】IMA - 026 抗体の重鎖（配列番号：3）および軽鎖（配列番号：4）からなるアミノ酸配列を提示している。10

【図35B】IMA - 026 抗体の重鎖（配列番号：3）および軽鎖（配列番号：4）からなるアミノ酸配列を提示している。

【発明を実施するための形態】

【0021】

抗IL - 13 抗体を含む製剤は、抗IL - 13 抗体（「製剤」）の貯蔵に適していることが確認された。該製剤中の抗体の品位は、一般に、液体としてまたは種々の条件下で凍結乾燥製品として長期の貯蔵後でも維持されている。例えば、該抗体の品位は、広範囲の貯蔵温度（例えば、-80 ~ 40）、剪断応力（例えば、振とう）および界面応力（冷凍 - 解凍サイクル）にさらした後でも十分維持される。さらに、凍結乾燥物質では、再構成の処理の間も、抗体の品位は十分維持される。さらに、抗体の品位は、LMW種およびHMW種の蓄積が比較的低いこと、in vitroの生物活性、in vitroの結合活性および噴霧後の安定性により実証されているように、薬剤として使用するのに十分な品位が維持されている。20

製剤

本明細書で説明した抗IL - 13 抗体製剤は、抗凍結剤、および緩衝液として役立ちうる化合物である、抗IL - 13 抗体を含む。該製剤のpHは、一般に、pH 5.5 ~ 6.5である。一部の実施態様では、製剤は液体として貯蔵される。他の実施態様では、製剤は、液体として調製され、次いで、貯蔵する前に、例えば、凍結乾燥またはスプレー乾燥により乾燥される。乾燥製剤は、乾燥化合物として、例えば、エアロゾルまたは粉末とし使用、あるいは例えば水、緩衝液、または適切な液体を用いて、その元のまたは別の濃度に再構成することができる。該抗体精製プロセスは、冷凍液体として長期の貯蔵、次いで、冷凍 - 乾燥（例えば、ヒスチジン / スクロース製剤を用いて）に適した製剤中に該抗体を移動させることができるようにデザインされる。該製剤は、特定の濃度のたんぱく質と共に凍結乾燥される。凍結乾燥された製剤は、次いで、必要により適切な希釈剤（例えば、水）を用いて製剤の元の成分を望ましい濃度（一般に、凍結乾燥する前の濃度に比べて同じか高い濃度）で再構成することができる。凍結乾燥製剤は、最初に冷凍乾燥した液体の容積に比べて凍結乾燥物に加えた水または希釈剤の量により元の濃度（すなわち、凍結乾燥する前）と異なる濃度を有する製剤を作るために再構成してよい（例えば、実施例6、後出）。

【0022】

適切な抗IL - 13 抗体製剤は、抗体品位の1つ以上のパラメータをアッセイすることにより確認することができる。アッセイされたパラメータは、一般に、HMW種のパーセンテージまたはLMW種のパーセンテージである。HMW種またはLMW種のパーセンテージは、製剤中のHMWの製剤中の総たんぱく質含有量のパーセンテージとしてまたは時間（すなわち、貯蔵中）によるパーセンテージ増加の変化として測定される。許容できる製剤のHMW種の総パーセンテージは、少なくとも1年間2 ~ 40（例えば、2 ~ 25、2 ~ 15、2 ~ 8において、約2において、または約25において）において凍結乾燥物または液体として貯蔵後、HMW種は10% HMW種未満であるか、あるいは、少なくとも1年間2 ~ 40で凍結乾燥物または液体として貯蔵後は、約10% LMW種未満である。「約」は、言及された数値の±20%を意味している。した4050

がって、「約 20」は、16 ~ 24 を意味している。通常、安定性の特徴は、冷凍製品では 2 ~ 8 において、および室温製品では 25 において、H MW / L MW が 10 % 未満である。H MW 種または L MW 種は、凍結乾燥物が再構成された後凍結乾燥物として貯蔵された製剤においてアッセイされる。40 は、例えば、出荷中に製品を移送する間に起こりうる非貯蔵条件に短期間さらされた間の安定性を測定し、安定性をテストする場合に一般に使われる加速条件である。

【0023】

アッセイされたパーセンテージは、H MW 種または L MW 種におけるパーセンテージの変化であり、貯蔵後の両種の総たんぱく質のパーセントは、貯蔵前（例えば、該製剤の調製時に）の 1 種または両種の総たんぱく質のパーセントに比較される。パーセンテージのこの差は測定される。一般に、液体製剤中の H MW 種または L MW 種中のたんぱく質のパーセンテージ変化は、約 18 ~ 24 ヶ月間 2 ~ 8 または 25 において貯蔵後、10 % 未満、例えば、約 8 % 未満、約 7 % 未満、約 6 % 未満、約 5 % 未満、約 4 % 未満、または約 3 % 未満である。「約」は、言及された数値の ± 20 % を意味している。したがって、約 10 % は、8 % ~ 12 % を意味している。凍結乾燥製品として貯蔵した製剤は、一般に、約 18 ~ 24 ヶ月間 2 ~ 8 （例えば、4）にて貯蔵し、次いで、再構成後、約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、または約 2 % 未満の H MW 種あるいは約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、または約 2 % 未満の L MW 種を有する。

【0024】

製剤は、凍結乾燥物として、例えば、少なくとも 2 年、少なくとも 3 年、少なくとも 4 年、または少なくとも 5 年貯蔵することができる。1つの例では、抗 I L - 13 抗体製剤は、100 mg / ml の抗 I L - 13 抗体、10 mM のヒスチジン、5 % のスクロースを含み、6.0 の pH を有する。別の実施例では、該製剤は、100 mg / ml の抗 I L - 13 抗体、10 mM のヒスチジン、5 % のスクロース、0.01 % の Tween 80、2 % のアルギニンを含み、6.0 の pH を有する。別の例では、該製剤は、0.5 mg / ml の抗 I L - 13 抗体、10 mM のヒスチジン、5 % のスクロースを含み、6.0 の pH を有する。さらに別の例では、該製剤は、0.5 mg / ml の抗 I L - 13 抗体、10 mM のヒスチジン、5 % のスクロース、0.01 % の Tween 80、2 % のアルギニンを含み、6.0 の pH を有する。

【0025】

製剤の成分および製剤中の抗 I L - 13 抗体の品位をアッセイする方法については、後に詳細に説明する。

抗体

抗 I L - 13 抗体は、本明細書で説明した製剤の 1 つの成分である。本明細書で使われる用語「抗体」は、特に明記しない限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、生体分子特異的抗体、ダイアボディ、抗体の一部を形成する単一鎖分子、完全にまたは部分的にヒト化された抗体などのハイブリッド抗体、F ab フラグメント、F(ab')₂ フラグメント、および Fv フラグメントなどの抗原結合抗体フラグメント、および前述の抗体などの変態（例えば、ペグ化された抗体または抗体フラグメント）を含む。該製剤中で使われる抗 I L - 13 抗体分子は、有効なヒト、ヒト化、相補性決定領域（CDR）で接合された、キメラ、変異した、親和性により成熟した、脱免疫された、合成、または別に in vitro で產生された各たんぱく質であってよい。1つの実施態様では、該 I L - 13 抗体はヒト化抗体である。1つの実施態様では、該 I L - 13 抗体はヒトではなく、ヒト抗マウス抗体（HAM A）反応を生じない。

【0026】

抗 I L - 13 抗体分子は、少なくとも 1 つの I L - 13 関連活性を in vivo で調節する（例えば、抑制する）のに使用することができる。該 I L - 13 抗体は、I L - 13 関連疾患を処置または予防し、またはこれらの疾患の少なくとも 1 つの症状を改善するのに使用することができる。典型的な I L - 13 関連疾患には、炎症性疾患（例えば、肺

10

20

30

40

50

炎)、呼吸器系疾患(例えば、アレルギー性および非アレルギー性ぜんそくを含むぜんそく、慢性閉塞性肺疾患(COPD))、並びに気道炎症を含む状態、好酸球増加症、線維性疾患(例えば、のう胞性線維症、肝線維症および肺線維症)、強皮症、過剰粘液産生、アトピー性疾患(例えば、アトピー性皮膚炎、じんましん、湿疹、アレルギー性鼻炎、アレルギー性胃腸炎)、IL-13関連癌(例えば、白血病、グリア芽腫、またはリンパ腫、例えば、ホジキンのリンパ腫)、消化器官系疾患(例えば、炎症性腸疾患)、肝臓疾患(例えば、肝硬変)、およびウイルス性感染がある。

【0027】

製剤中の抗体濃度は、一般に、約0.1mg/mlと約250mg/mlとの間、例えば、約0.5mg/mlと約100mg/mlとの間、約0.5mg/mlと約1.0mg/mlとの間、約0.5mg/mlと約45mg/mlとの間、約1mg/mlと約10mg/mlとの間、約10mg/mlと約40mg/mlとの間、約10mg/mlと約400mg/mlとの間、約10mg/mlと約500mg/mlとの間、約50mg/mlと約100mg/mlとの間、約100mg/mlと約1000mg/mlとの間、約100mg/mlと約200mg/mlとの間、約200mg/mlと約250mg/ml抗IL-13との間にある。範囲との関連で、「約」は、下限値の20%低い数値と上限値の20%高い数値との間の範囲を意味している。範囲との関連で、例えば、約10mg/ml～約100mg/mlは、8mg/mlと120mg/mlとの間を意味している。場合によつては、製剤中の抗体濃度は、例えば、0.1mg/mlと200mg/mlとの間、例えば、0.5mg/mlと100mg/mlとの間、0.5mg/mlと1.0mg/mlとの間、0.5mg/mlと45mg/mlとの間、1mg/mlと10mg/mlとの間、10mg/mlと40mg/mlとの間、10mg/mlと50mg/mlとの間、50mg/mlと100mg/mlとの間、100mg/mlと200mg/ml抗IL-13との間にあり得る。この種の抗体製剤は、治療薬として使用することができる。したがつて、製剤中の抗体の濃度は、処置を受ける対象が許容し、投与方法に適している製剤の容量においてこのような用量を与えるのに十分である。限定されない実施例の1つにおいて、皮下に高用量を注入するために、容量制限は小さく(例えば、注射につき約1ml～1.2ml)、抗体の濃度は、一般に、100mg/ml以上、例えば、100mg/ml～500mg/ml、100mg/ml～250mg/ml、または100mg/ml～150mg/mlである。このような高濃度は、例えば、適切な容量の希釈剤(例えば、注射用滅菌水、緩衝食塩水)において凍結乾燥した製剤を再構成することにより達成することができる。場合によつては、該再構成製剤は、約100mg/mlと500mg/mlとの間の濃度(例えば、100mg/ml、125mg/ml、150mg/ml、175mg/ml、200mg/ml、250mg/ml、275mg/ml、300mg/ml、350mg/ml、375mg/ml、400mg/ml、425mg/ml、450mg/ml、475mg/mlおよび500mg/ml)を有する。吸入により送達する場合、該製剤は、一般に、吸気のエアロゾルの限定された容量における十分な用量を与えられるように、幾分濃縮(例えば、約100mg/mlと500mg/mlとの間の)されている。場合によつては、低濃度(例えば、約0.05mg/mlと1mg/mlとの間の)が使われる。送達された用量を、送達の方法、例えば、ジェット噴霧器またはメーターで測定したエアロゾルに適合させる方法は、当該技術分野において周知である。

【0028】

抗IL-13抗体製剤において使用することができる抗体には、例えば、マウスおよびヒト化マウスの抗IL-13抗体がある。これらの抗体類は、カッパ軽鎖抗体であつてよい。これらの抗体類は、上で説明した自然操作または遺伝子操作したIgG、IgE、IgA、IgM抗体またはIL-13結合性フラグメントであつてよい。場合によつては、これらの抗体は、IgG1、IgG2、またはIgG4抗体である。本発明において使用する抗IL-13抗体の例は、米国特許出願第11/155,843号、米国特許出願第11/149,309号、および国際公開第2006/085938号に記載されており、これらの内容は引用により本明細書に組み込まれている。本発明で使用することができ

10

20

30

40

50

る抗 I L - 1 3 抗体の限定されない例には、 I M A - 6 3 8 (図 3 4) および I M A - 0 2 6 (図 3 5) がある。一部の実施態様では、抗 I L - 1 3 抗体重鎖は、配列番号： 1 に対して約 8 0 % 、約 8 5 % 、約 9 0 % 、約 9 1 % 、約 9 2 % 、約 9 3 % 、約 9 4 % 、約 9 5 % 、約 9 6 % 、約 9 7 % 、約 9 8 % 、または約 9 9 % の配列相同性を有し、該軽鎖は、配列番号： 2 に対して約 8 0 % 、約 8 5 % 、約 9 0 % 、約 9 1 % 、約 9 2 % 、約 9 3 % 、約 9 4 % 、約 9 5 % 、約 9 6 % 、約 9 7 % 、約 9 8 % 、または約 9 9 % の配列相同性を有し、該抗体は I L - 1 3 に結合する。一部の実施態様では、抗 I L - 1 3 抗体重鎖は、配列番号： 3 に対して約 8 0 % 、約 8 5 % 、約 9 0 % 、約 9 1 % 、約 9 2 % 、約 9 3 % 、約 9 4 % 、約 9 5 % 、約 9 6 % 、約 9 7 % 、約 9 8 % 、または約 9 9 % の配列相同性を有し、該軽鎖は、配列番号： 4 に対して約 8 0 % 、約 8 5 % 、約 9 0 % 、約 9 1 % 、約 9 2 % 、約 9 3 % 、約 9 4 % 、約 9 5 % 、約 9 6 % 、約 9 7 % 、約 9 8 % 、または約 9 9 % の配列相同性を有し、該抗体は I L - 1 3 に結合する。特定の実施態様では、抗 I L - 1 3 抗体は、 5×10^{-7} M 、 1×10^{-7} M 、 5×10^{-8} M 、 1×10^{-8} M 、 5×10^{-9} M 、 1×10^{-9} M 未満の、より典型的には 5×10^{-10} M 、 1×10^{-10} M 、 5×10^{-11} M 、 1×10^{-11} M 未満の、またはよりよい K_D に対応する親和力により I L - 1 3 に結合する。たんぱく質に置換基を導入する方法は、当該技術分野では周知である。1つの実施態様では、該 I L - 1 3 抗体は、 $10^3 \sim 10^8$ M⁻¹ s⁻¹ の範囲、典型的には $10^4 \sim 10^7$ M⁻¹ s⁻¹ の範囲の反応速度で I L - 1 3 と結びつけることができる。さらに別の実施態様では、該 I L - 1 3 結合剤は、 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ s⁻¹ の範囲、典型的には $10^{-2} \sim 10^{-5}$ s⁻¹ の範囲の解離速度を有する。1つの実施態様では、該 I L - 1 3 結合剤は、親和力および / またはモノクローナル抗体 M J 2 - 7 または C 6 5 (米国特許出願公開第 2 0 0 6 0 0 7 3 1 4 8 号を参照のこと) またはこれらの変態形、例えば、キメラ形またはこれらのヒト化形 (例えば、本明細書で説明したヒト化形) に類似した反応速度により I L - 1 3 、例えば、ヒト I L - 1 3 に結合する。 I L - 1 3 結合剤の親和力および結合反応速度は、例えば、バイオセンサ技術 (B I A C O R E (商標)) を用いてテストすることができる。

緩衝液および抗凍結剤

本明細書で説明した製剤の pH は、一般に、約 pH 5 . 0 ~ 約 7 . 0 の間にあり、例えば、約 pH 5 . 5 ~ 約 6 . 5 、約 pH 5 . 5 ~ 約 6 . 0 、約 pH 6 . 0 ~ 約 6 . 5 、 pH 5 . 5 、 pH 6 . 0 、または pH 6 . 5 である。一般に、溶液を pH 5 . 5 ~ 6 . 5 に維持できる緩衝液、例えば、約 6 . 0 の p K A を有する緩衝液が製剤の調製に使われる。適切な緩衝液は、限定されないが、ヒスチジン緩衝液、2 - モルホリノエタンスルホン酸 (M E S) 、カコジル酸塩、リン酸塩、酢酸塩、コハク酸塩、およびクエン酸塩である。緩衝液の濃度は、約 4 mM と約 6 0 mM との間にあり、例えば、約 5 mM ~ 約 2 5 mM であり、例えば、ヒスチジンは一般に最高 6 0 mM の濃度で使われる。場合によっては、ヒスチジン緩衝液は、約 5 mM または約 1 0 mM の濃度で使われる。別のケースでは、酢酸塩またはコハク酸塩緩衝液が、約 5 mM または約 1 0 mM の濃度で使われる。

【 0 0 2 9 】

抗 I L - 1 3 抗体製剤は、抗凍結剤を含む。抗凍結剤は、当該技術分野で周知であり、例えば、スクロース、トレハロース、およびグリセロールを含む。生物系においては、低毒性を示す抗凍結剤が一般に使われる。該抗凍結剤は、約 0 . 5 % ~ 1 5 % 、約 0 . 5 % ~ 2 % 、約 2 % ~ 5 % 、約 5 % ~ 1 0 % 、約 1 0 % ~ 1 5 % 、および約 5 % (重量 / 容量) の濃度にて該製剤に含まれる。

【 0 0 3 0 】

抗 I L - 1 3 抗体製剤において緩衝液として使用することができるヒスチジン緩衝液は、抗凍結剤特性を有する。本発明の一部の実施態様では、ヒスチジン緩衝液は、砂糖、例えば、スクロースなどの抗凍結剤と併用される。本発明の製剤は、かなりの量のヒスチジンの使用を特に排除することができ、例えば、該製剤の緩衝液の成分も抗凍結剤の成分もヒスチジンではない。

【 0 0 3 1 】

10

20

30

40

50

一般に、製剤の粘度は、該製剤の投与ルートに適合する、1である。一部の実施態様では、該製剤の粘度は、1 cPと2 cPとの間にあるか、または水(約1 cP)に似ている。他の実施態様では、該製剤の粘度は、約5 cPと約40 cPとの間にある。具体的な実施態様では、該製剤の粘度は、1 cP、2 cP、3 cP、4 cP、5 cP、10 cP、15 cP、20 cP、25 cP、30 cP、35 cP、または40 cPである。

界面活性剤

特定の実施態様では、該製剤には界面活性剤が含まれている。界面活性剤の例は、限定されないが、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート(例えば、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-65、ポリソルベート-80、またはポリソルベート-85)、ポロキサマー(例えば、ポロキサマー188)、Triton(商標)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、ラウレル硫酸ナトリウム、オクチルグリコシド・ナトリウム、ラウリル-スルホベタイン、ミリストル-スルホベタイン、リノレイル-スルホベタイン、ステアリル-スルホベタイン、ラウリル-サルコシン、ミリストル-サルコシン、リノレイル-サルコシン、ステアリル-サルコシン、リノレイル-ベタイン、ミリストル-ベタイン、セチル-ベタイン、ラウロアミドプロピル-ベタイン、コカミドプロピル-ベタイン、リノレアミドプロピル-ベタイン、ミリストミドプロピル-ベタイン、パルミドプロピル-ベタイン、イソステアラミドプロピル-ベタイン(例えば、ラウロアミドプロピル)、ミリストルニドプロピル-、パルミドプロピル-、またはイソステアラミドプロピル-ジメチルアミン、メチルココイルタウレート・ナトリウム、またはメチルオレフィルタウレート・ナトリウム、およびMonaquat(商標)シリーズ(ニュージャージー州Paterson, Mona Industries, Inc.)、ポリエチルグリコール、ポリプロピルグリコール、およびエチレンとプロピレングリコールとのコポリマー(例えば、pluronics, P F 68)がある。

【0032】

添加した界面活性剤の量は、例えば、SEC-HPLCを用いてH MW種またはL MW種をアッセイした時に再構成たんぱく質の凝集物を界面活性剤が容認できるレベルに低減し、抗IL-13抗体製剤の凍結乾燥物の再構成後微粒子の形成を最小限にするような量である。界面活性剤を添加すると、抗IL-13抗体の凍結乾燥製剤の再構成時間を低減し、溶液の脱ガスを助長することも示した。例えば、製剤(液体または凍結乾燥する前の)中に約0.001%~0.5%、例えば、約0.005%~0.05%、約0.005%~約0.2%および約0.01%~0.2%の量にて存在することができる。

抗IL-13製剤への添加

製剤は、無菌溶液または無菌の凍結乾燥物として貯蔵される。製剤中の微生物の作用の予防は、製剤中に少なくとも1つの抗菌剤および/または抗真菌薬、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどを含むことによっても達成することができる。場合によっては、凍結乾燥物は静菌性の水(例えば、0.9%のベンジルアルコールを含む水)を用いて再構成される。製剤に防腐剤を含めることは、特定の製剤と適合する防腐剤を確認する方法および送達方法として当該技術分野において周知である(例えば、Gupta, et al. (2003), AAPS Pharm. Sci. 5: article 8, p. 1-9を参照のこと)。

【0033】

場合によっては、該製剤は等張性である。一般に、溶液のオスモル濃度/浸透圧に寄与することが、当該技術分野で周知の成分を製剤に添加することができる(例えば、塩類、糖類、ポリアルコールまたはこれらの併用)。等張性は、等張性濃度の塩基性製剤(スクロースなどの)の1つの成分を用いるか、または砂糖、マニトールまたはソルビトールなどの多価アルコール、または塩化ナトリウムなどの塩を添加することにより達成される。

【0034】

場合によっては、例えば、等張性を達成するためにまたは該製剤の抗IL-13抗体の品位を上げるために、抗IL-13抗体製剤において塩が使われる。使用するのに適した

10

20

30

40

50

塩類は、上で、論じている。塩の濃度は、0 mM～約300 mMであってよい。

【0035】

特定の場合には、該製剤は、界面劣化を低減するために、Tween (例えば、Tween (登録商標) 20、Tween (登録商標) 80) を用いて調製する。該Tween濃度は、約0.001%～約0.05%であってよい。1つの例では、製剤中0.01%の濃度でTween 80が使われる。

【0036】

他の特定の場合には、該製剤は、アルギニンを用いて調製する。該製剤中のアルギニン濃度は、約0.01%～約5%でよい。1つの例では、該製剤中2%の濃度でアルギニンが使われる。場合によっては、本明細書で説明した該IL-13製剤に、Tweenとアルギニンの両方が添加される。10

【0037】

さらに、他の場合には、該製剤は、ソルビトール、グリシン、メチオニン、または塩化ナトリウムの少なくとも1つを用いて調製することができる。ソルビトールが該製剤に含まれる場合は、ソルビトールは、濃度が約1%と約10%との間になるように添加することができる。1つの例では、ソルビトールは、製剤中5%の濃度で存在する。該製剤にグリシンが含まれる場合は、グリシンは、約0.1%～約2%の範囲の濃度になるように添加することができる。1つの例では、該製剤中のグリシン濃度は1%である。該製剤にメチオニンが含まれる場合は、メチオニンは、約5 mMと約150 mMとの間の濃度になるように添加することができる。1つの例では、メチオニンは該製剤中の濃度が100 mMになるように添加される。別の例では、メチオニンは該製剤中の濃度が70 mMになるように添加される。該製剤に塩化ナトリウムが含まれる場合は、塩化ナトリウムは、約5 mMと約100 mMとの間の濃度になるように添加することができる。1つの例では、塩化ナトリウムは該製剤中の濃度が55 mMになるように添加される。20

貯蔵および調製方法

冷凍

場合によっては、抗体を含む製剤は貯蔵するために冷凍する。したがって、該製剤は、冷凍・解凍のサイクルを含むような条件下で比較的安定であることが望ましい。製剤の適合性を測定する1つの方法は、製剤試料を冷凍（例えば、-20または-80において）および解凍（例えば、37水浴における速い解凍または2～8における遅い解凍）の少なくとも2回、例えば、3回、4回、5回、8回、10回、またはそれ以上の回数のサイクルを受けさせ、冷凍・解凍サイクル後に蓄積しているLMW種および/またはHMW種の量を測定し、冷凍・解凍操作の前の試料中に存在するLMW種またはHMW種の量と比較する方法である。LMW種またはHMW種の増加は安定性の低下を示している。30

凍結乾燥

製剤は凍結乾燥後に貯蔵することができる。したがって、凍結乾燥後の該製剤のたんぱく質成分の安定性について製剤をテストすることは、製剤の適合性を決めるために有効である。この方法では、試料製剤は冷凍する代わりに凍結乾燥され、その元の容量に再構成し、LMW種および/またはHMW種の存在をテストすることを除いて、上で説明した冷凍する場合の方法に似ている。凍結乾燥製剤試料は、凍結乾燥されなかった対応している製剤試料と比較される。対応している試料と比較して凍結乾燥試料中のLMW種またはHMW種の増加は、凍結乾燥試料の安定性が低下したことを示している。凍結乾燥手順をテストする適切な方法の例は、下の実施例5にも提示している。40

【0038】

一般に、凍結乾燥手順には、凍結乾燥器への試料の装填、予備冷却期間、冷凍、真空開始、一次乾燥温度への昇温、一次乾燥、二次乾燥温度への昇温、二次乾燥、および試料の密封がある。凍結乾燥手順について選択可能な追加のパラメータは、真空（例えば、ミクロン単位で）およびコンデンサ温度がある。適切な温度の上昇速度は、約0.1 /分～2 /分の間、例えば、0.1 /分～1.0 /分、0.1 /分～0.5 /分、0

.2 /分～0.5 /分、0.1 /分、0.2 /分、0.3 /分、0.4 /分、0.5 /分、0.6 /分、0.7 /分、0.8 /分、0.9 /分、および1.0 /分である。凍結乾燥サイクルの冷凍の間の適切な棚温度は、一般に、約 -55 ~ -5 、 -25 ~ -5 、 -20 ~ -5 、 -15 ~ -5 、 -10 ~ -5 、 -10 、 -11 、 -12 、 -13 、 -14 、 -15 、 -16 、 -17 、 -18 、 -19 、 -20 、 -21 、 -22 、 -23 、 -24 、または -25 である。棚温度は、一次乾燥と二次乾燥とで異なってよく、例えば、一次乾燥は二次乾燥より比較的低い温度で行ってよい。限定されない例において、一次乾燥は0で、二次乾燥は25で行うことができる。

【0039】

10

場合によっては、冷凍および真空開始の前にアニーリング手順が使われる。このような場合、アニーリング時間は選択する必要があり、温度は、一般に、該組成物のガラス転移温度より高い。一般に、アニーリング時間は、約2～15時間、約3～12時間、約2～10時間、約3～5時間、約3～4時間、約2時間、約3時間、約5時間、約8時間、約10時間、約12時間、または15約時間である。アニーリング温度は、一般に、約 -35 ~ 約 -5 、例えば、約 -25 ~ 約 -8 、約 -20 ~ 約 -10 、約 -25 、約 -20 、約 -15 、約 0 、または約 -5 である。場合によっては、アニーリング温度は、一般に、 -35 ~ 5 、例えば、 25 ~ -8 、 -20 ~ -10 、 -25 、 -20 、 -15 、約 0 、または約 5 である。

【0040】

20

1つの例では、本明細書で説明した製剤中の抗IL-13抗体は、ガラス転移温度(T_g')より上の予備真空熱処理(アニーリング)ステップの有無、-25～30の範囲の一次乾燥棚温度、および25～30において2時間～9時間の二次乾燥期間を含む種々の凍結乾燥パラメータに対して頑強であることが実証された。

【0041】

限定されない例の1つで、50mg/mLのIL-13のたんぱく質濃度において、10mMのヒスチジン、5%のスクロース、pH 6.0の製剤を、バルクで処方し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、該製品は充填容量の約半分を用いて再構成し、100mg/mlにてたんぱく質を送達した。IL-13抗体は、製品温度の極限に対して凍結乾燥は頑強であることが実証された(下記実施例および図10-12を参照のこと)。50で4週間貯蔵した場合の安定性プロファイルは、多種多様な冷凍・乾燥サイクル(例えば、図16-20を参照のこと)を用いて調製された物質では同一であった。該サイクルの一部は、一次乾燥の間に製品温度の差異がほぼ10であった(例えば、図13)。一般に、凍結乾燥サイクルは、10時間～100時間、例えば、20時間～80時間、30時間～60時間、40時間～60時間、45時間～50時間、50時間～65時間にすることができる。

30

【0042】

抗体製剤を貯蔵する温度範囲の限定されない例は、約 -20 ~ 約 50 、例えば、約 -15 ~ 約 30 、約 -15 ~ 約 20 、約 5 ~ 約 25 、約 5 ~ 約 20 、約 5 ~ 約 15 、約 2 ~ 約 12 、約 2 ~ 約 10 、約 2 ~ 約 8 、約 2 ~ 約 6 、2、3、4、5、6、7、8、10、15または25である。ある場合には、貯蔵温度にも関わらず、試料は、貯蔵中に一時的に起きる可能性がある温度変化の下で安定であり、この種の組成物について予期することができる輸送条件下で安定である。

40

噴霧乾燥

場合によっては、製剤は噴霧乾燥し、次いで、貯蔵する。噴霧乾燥は、当該技術分野で周知の方法を用いて行われ、変更して液体または冷凍噴霧乾燥を使用することができる(例えば、Niro Inc. (ウィスコンシン州Madison)、Upperton Particle Technologies (英国ノッtingham)またはBuchi (ニューヨーク州Westbury, Brinkman Instruments Inc

50

.) または米国特許出願公開第 20030072718 および 20030082276 号からの噴霧乾燥などの方法を用いて)。

抗体品位の測定

L MW 種および HMW 種の蓄積は、抗体安定性の有効な尺度になる。製剤における LMW か HMW いずれかの蓄積が、製剤の一部として貯蔵されたたんぱく質の不安定性の指標である。LMW および HMW 種の存在を決めるために HPLC を備えたサイズ排除クロマトグラフィを使用することができる。この種の測定用の適切なシステム、例えば、HPLC システム (マサチューセッツ州 Milford の Waters) が当該技術分野で周知である。当該技術分野で周知の他のシステムは、製剤中の抗体の品位を評価するために使用することができ、これらのシステムには、例えば、SDS-PAGE (HMW および LMW 種をモニタリングする)、抗体活性のバイオアッセイ、酵素免疫測定吸着法、精製 IL-13 たんぱく質を結合する能力、およびカチオン交換 HPLC (変異体を検出し、表面電荷を観測する CEX-HPLC) がある。1つの例では、バイオアッセイは、細胞に基づいたアッセイであり、生物活性、すなわち、細胞からの IL-13 を結合し、隔離する能力を実証するために処方された種々の濃度の抗体の存在下で、IL-13 依存性細胞増殖の抑制が調べられる。

製造品

本出願は、本明細書で説明した製剤を含む製造品および該製剤を使用するための取扱い説明書を提供する。該製造品は、該製剤を収納するのに適した容器を含むことができる。適切な容器は、無制限にあり、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、試験管、噴霧器 (例えば、超音波または振動メッシュ噴霧器)、静注溶液バッグ、または吸入器 (例えば、定量吸入器 (MDI) または乾燥粉末吸入器 (DPI)) がある。該容器は、ガラス、金属などの適切な材料、あるいはポリカーボネート、ポリスチレン、またはポリプロピレンなどのプラスチックから形成することができる。一般に、該容器は、該製剤からたんぱく質をあまり吸収せず、該製剤の成分と反応しない材料から作られている。一部の実施態様では、該容器は、West 4432/50 1319シリコン処理した灰色の栓または West Durafluor 栓をつけた透明なガラスのバイアルである。一部の実施態様では、該容器はシリンジである。具体的な実施態様では、該製剤は、100mg/ml の抗 IL-13 抗体 (例えば、IMA-026, IMA-638)、10mM のヒスチジン、5% のスクロース、0.01% の Tween-80、40mM の NaCl を含み、充填済みのシリンジ内の溶液の pH は 6.0 である。特定の実施態様では、シリンジは自動注射装置と共に使用するのに適している。

【0043】

噴霧器の例は限定されるものではないが、例えば、ジェット噴霧器、超音波噴霧器、および振動メッシュ噴霧器がある。これらの種のものは、液体からエアロゾルを作るために種々の方法を用いる。一般に、これらの製剤中のたんぱく質の品位を維持することができるエアロゾル発生装置は、本明細書で説明した製剤の送達に適している。

【0044】

薬剤として対象に投与する場合に使用する製剤は、無菌である必要がある。これは、当該技術分野で周知の方法を用いて、例えば、液体の処方または凍結乾燥および再構成の前または後に無菌のろ過膜を通してろ過することにより達成される。あるいは、それが製剤の構造、成分にダメージを与えるおそれがない場合は、該製剤の成分は、加圧滅菌器により滅菌し、次いで、フィルターまたは放射線で滅菌した成分と合わせて該製剤を製造することができる。

処置方法

抗 IL-13 抗体製剤は、IL-13 の活性または望ましくない発現に関連した疾患を処置する場合に有効である。この種の疾患には、関節炎、ぜんそく、炎症性腸疾患、炎症性皮膚疾患、多発性硬化症、骨粗しょう症、腱炎、アレルギー性疾患、宿主の傷害に反応した炎症、敗血症、リウマチ性関節炎、変形性関節炎、過敏性腸疾患、潰瘍性大腸炎、乾癬、系統的エリテマトーデス、および他の自己免疫性疾患などの炎症性疾患がある。この

10

20

30

30

40

50

方法の特定の実施態様では、IL-13関連疾患は、アレルギー性ぜんそく、非アレルギー性ぜんそく、B細胞慢性リンパ性白血病（B細胞CLL）、ホジキン病、住血吸虫病における組織の線維化、自己免疫リューマチ性疾患、炎症性腸疾患、リューマチ性関節炎、気道炎症を含む状態、好酸球増加症、線維症および過剰粘液産生（例えば、のう胞性線維症および肺線維症）、アトピー性疾患（例えば、アレルギー性鼻炎）、皮膚の炎症および自己免疫状態（例えば、アトピー性皮膚炎）、消化器官の炎症および／または自己免疫状態（例えば、炎症性腸疾患（IBD））、肝臓の炎症および／または自己免疫状態（例えば、肝硬変）、ウイルス性感染、強皮症および肝臓線維症などの他の臓器の線維症、アレルギー性結膜炎、湿疹、じんましん、食物アレルギー、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、潰瘍性大腸炎、ラウス肉腫ウイルス感染、ぶどう膜炎、強皮症、または骨粗しょう症である。そこで、抗IL-13抗体製剤は、医薬組成物として使用することができる。

【0045】

本発明は、疾患のリスクのある（または感受性が高い）対象または異常なまたは不需要なIL-13の発現または活性に関連した疾患の合併症または疾患有する対象を処置する予防方法と治療薬方法との両方を提供する。本明細書で使われている用語「処置」は対象に治療薬を適用または投与、あるいは対象から摘出した組織または株細胞に治療薬を適用または投与することであると定義されている。該対象は、疾患、疾患の症状、または該疾患、該疾患の症状または疾患に対する素因、すなわち、治療、治癒、緩和、軽減、変質、治療、緩解、改善、または発症するために、疾患に対する素因を有する。

【0046】

抗IL-13抗体製剤は、経口、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、のう内、軟骨内、腔内、腹部内、小脳内、脳室内、結腸内、頸部内、胃内、肝臓内、心筋内、眼球内、骨内、骨盤内、心膜内、腹膜内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液のう内、胸腔内、子宮内、膀胱内、病巣内、急速投与、腫、直腸、ほほ側、舌下、鼻腔内、経皮的（局所的）、または経粘膜投与を含む当該技術分野で周知の方法を用いて処置する必要がある対象に投与することができる。吸入による投与では、これらの化合物は、加圧容器または適切な噴霧剤、例えば、二酸化炭素などのガスを含むディスペンサーまたは噴霧器からエアロゾル・スプレーの形で送達される。特定の実施態様では、該製剤は、除放、持続放出（extended-release）、持続放出（timed-release）、制御放出、または連続的放出製剤として投与される。一部の実施態様では、該抗体の投与をする対象に該抗体を投与するために、デポー製剤が使われる。

【0047】

経口または非経口組成物では、製剤は、均一で容易に投与できる単位剤形として調製することができる。本明細書で使われる「単位剤形」は、処置を受ける対象に対して単位製剤として適した物理的に分離した単位を意味しており、各単位は、選択された医薬担体と連携して所望の治療効果を生じるように計算された活性化合物を所定量含む。定量吸入器などの吸入方法の場合には、装置は、適切な量の製剤を送達するように設計される。

【0048】

製剤の毒性および治療効果は、例えば、LD₅₀（集団の50%に対して致死的な用量）およびED₅₀（集団の50%に対して治療効果のある用量）を測定する場合に、例えば、細胞培養または実験動物を用いる当該技術分野において周知の薬学操作により決めることができる。毒性効果と治療効果との間の用量比が治療指數であり、この指數は、比LD₅₀/ED₅₀として表すことができる。

【0049】

細胞培養アッセイと動物試験から得られたデータは、ヒトで使用する場合の用量の範囲を定式化するのに使用することができる。この種の製剤の用量は、一般に、毒性が小さいか、無毒の場合のED₅₀を含む血中濃度の範囲内にある。該用量は、用いた剤形および投与ルートによりこの範囲内で変動する。本発明の方法で使われる製剤では、治療効果のある用量は、細胞培養アッセイからまず推算することができる。細胞培養で測定したIC₅₀（すなわち、症状の最大半量抑制を達成するテスト化合物の濃度）を含む循環血漿濃

10

20

30

40

50

度範囲を達成するために、用量は動物モデルで定式化することができる。この種の情報を使用すると、ヒトの有効用量をより正確に決めることができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィまたは特異的な結合アッセイ（例えば、ELISA）により測定することができる。当該技術分野で周知の適切な動物モデルは、限定されないが、例えば、抗原チャレンジおよび抗原チャレンジ後の抗原感受性ヒツジ、およびモルモットに反応して有効性が実証されたヒト以外の靈長類がある。

【0050】

製剤は、一般に、用量が、体重kgあたり抗IL-13抗体が少なくとも約0.1mg（一般に、約1mg/kg～約10mg/kg）になるように送達される。該抗体が脳で作用するならば、50mg/kg～100mg/kgの用量が適切かもしれない。作用部位に直接送達された場合、例えば、吸入により肺組織に直接投与された場合は、用量は下げるよい（非経口投与に比べて）。本明細書で説明した製剤は、本明細書で説明したあらゆる処置方法で使用する薬物の調製に使用できる。10

併用療法

本発明の特定の態様では、本明細書で説明した製剤は修正して、他の薬剤との併用療法の一部として投与するようにすることができる。併用療法は、予め投与した治療化合物がまだ体内で有効な間に第2化合物が投与されるような2種類以上の治療化合物を併用投与する形を意味している（例えば、これら2つの化合物は患者体内で同時に有効であり、これら2つの化合物の相乗効果を含む）。例えば、種々の治療化合物が同じ製剤か別の製剤であり、あるいは同時にまたは逐次的に投与することもできる。したがって、この種の処置を受ける個体は、種々の治療薬の複合効果の恩恵を受けることができる。IL-13抗体と同時投与および/または同時処方することができる好ましい追加の治療薬の例には、吸入ステロイド、ベータ作動薬、例えば、短時間作用型または長時間作用型のベータ作動薬、ロイコトリエンまたはロイコトリエン受容体の拮抗薬、ADVPAIR（登録商標）などの複合薬、IgE阻害剤、例えば、抗IgE抗体（例えば、XOLAIR（登録商標））、ホスホジエステラーゼ阻害剤（例えば、PDE4阻害剤）、キサンチン、抗コリン薬、クロモリンなどの肥満細胞安定剤、IL-4阻害剤、IL-5阻害剤、エオタキシン/CCK3阻害剤、および抗ヒスタミン薬がある。この種の併用は、ぜんそくおよび他の呼吸器疾患を処置するために使用することができる。IL-13抗体と同時に投与および/または同時に処方することができる治療薬の例には、他に1つ以上のTNF拮抗薬（例えば、TNF受容体の可溶性フラグメント、例えば、p55またはp75ヒトTNF受容体またはこれらの誘導体、例えば、75kDTNFR-IgG（75kDTNF受容体-IgG融合体たんぱく質、ENBREL（商標）））、TNF酵素拮抗薬、例えば、TNF変換酵素（TACE）阻害剤、ムスカリーン受容体拮抗薬、TGF-拮抗薬、インターフェロンガンマ、ペルフェニドン、化学治療薬、例えば、メトトレキサート、レフルノミド、またはシロリマス（ラパマイシン）またはこれらの類似体、例えば、CICI-779、COX2およびcPLA2阻害剤、NSAID、免疫調節薬、とりわけ、p38阻害剤、TPL-2、MK-2およびNF-B阻害剤がある。20

【0051】

例えば、炎症状態の場合、本明細書で説明した抗IL-13抗体製剤は、炎症性疾患または炎症状態の処置において、1つ以上の有効な他の薬剤と併用して投与することもできる。これらの薬剤は、抗IL-13抗体と一緒に処方するか、または別の製剤とほぼ同時にまたは逐次的に投与してよい。場合によっては、該薬剤は、該製剤の抗IL-13抗体とは異なるエピトープを有するIL-13抗体であってよい。炎症性疾患または状態の処置において、有効な他の薬剤には、抗炎症性薬剤、または消炎剤があるが、これらに限定されない。消炎剤には、例えば、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニソロン、フルオルコルトロン、トリアムシノロン、メチルプレドニソロン、プレドニリデン、パラメタゾン、デキサメタゾン、ベータメタゾン、ベクロメタゾン、フルプレドニリデン、デソキシメタゾン、フルオシノロン、フルネタゾン、ジフルコルトロン、クロコルトロン、クロベタゾール、およびフルオコルチン・ブチルエステルなどのグルココルチ30

コイド；抗TNF剤（例えば、エタネルセプト、インフリキシマブ）およびIL-1阻害剤などの免疫抑制剤；ペニシラミン；抗炎症薬、鎮痛薬を含む非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）、およびサリチル酸、セレコキシブ、ジフェニosalなどの解熱薬、およびアルクロフェナク、イブテナク、イブプロフェン、クリンダナック、フェンクロラック、ケトプロフェン、フェノプロフェン、インドプロフェン、フェンクロフェナク、ジクロフェナク、フルルビプロフェン、ピプロフェン、ナプロキセン、ベノキサプロフェン、カルプロフェンおよびシクロプロフェンなどの置換フェニル酢酸塩または2-フェニルプロピオン酸塩から；ピロキシカンなどのオキシカン誘導体；メフェナム酸、フルフェナム酸、トルフェナム酸およびメクロフェナム酸などのアントラニル酸誘導体、ニフルミン酸フェナメート、クロニキシンおよびフルニキシンなどのアニリノ置換ニコチン酸誘導体；ヘテロアリールが、インドメタシン、オキサメタシン、イントラゾール、アセメタジン、シンメタシン、ゾメピラク、トルメチソ、コルピラクおよびチアプロフェン酸などの2-インドール-3-イルまたはピロール-2-イル基であるヘテロアリール酢酸；ベンザダックなどの鎮痛機能のあるヘテロアリールオキシ酢酸；フェニルブタゾン；エトドラ；ナブネトン；およびメトトレキサート、金塩、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン、シクロスポリン、アザチオプリン、およびレフルノミドなどの疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARD）がある。
10

【0052】

炎症性疾患または状態の処置に有効な他の治療薬には、抗酸化剤がある。抗酸化剤は、天然品でも合成品でもよい。抗酸化剤は、例えば、スーパー・オキサイド・ジスムターゼ（SOD）、21-アニノステロイド／アミノクロマン、ビタミンCまたはE、などである。他の多くの抗酸化剤は、当業者には周知である。
20

【0053】

本明細書で説明した抗IL-13抗体製剤は、炎症状態の治療計画の一部として役立つ可能性がある。該計画は、多種多様な抗炎症剤を併用することができる。例えば、本明細書で説明した抗IL-13抗体製剤は、IL-4阻害剤、IL-5阻害剤、IgE阻害剤、IL-9阻害剤、TNF拮抗薬、エオタキシン／CCR3拮抗薬、NSAID、DMARD、免疫抑制剤、ホスホジエステラーゼ阻害剤、または抗ヒスタミン薬の1つ以上と併用し投与してよい。本出願の1つの実施態様では、本明細書で説明した抗IL-13抗体製剤は、メトトレキサートと併用し投与することができる。別の実施態様では、本明細書で説明した抗IL-13抗体製剤は、TNF-阻害剤と併用し投与することができる。ぜんそくの場合、本明細書で説明した抗IL-13抗体製剤は、NSAID、コルチコステロイド、ロイコトリエン修飾因子、長時間作用型ベータアドレナリン作動薬、テオフィリン、抗ヒスタミン薬、およびクロモリンの1つ以上と併用して投与してよい。
30

【0054】

癌の場合、本明細書で説明した抗IL-13抗体製剤は、抗血管新生因子、化学療法剤の1つ以上、または放射線療法の免疫賦活剤として、併用し投与することもできる。さらに、本明細書で説明した抗IL-13抗体製剤の投与は、多種多様な癌の治療薬を併用してよい癌の処置方法の一部として役立つであろうと想定する。過敏性腸疾患（IBD）の場合、本明細書で説明した抗IL-13抗体製剤は、1つ以上の抗炎症薬と投与することもでき、さらに、改変食餌療法と併用してよい。
40

【実施例】

【0055】

以下の実施例により本発明についてさらに詳細に説明する。これらの実施例は、例示のみを目的として提示している。これらの実施例は、本発明の範囲または内容を限定するものと解釈すべきではない。

（実施例1）

凍結乾燥した抗IL-13製剤の安定性

例えば、治療への応用のために使用されるべき抗体を貯蔵する1つの方法は、凍結乾燥により調製された乾燥粉末である。したがって、凍結乾燥した抗IL-13製剤の長期安
50

定性を調べた。つまり、ヒト化抗IL-13抗体(50mg/ml)、10mMヒスチジン、5%スクロース(重量/容量)、pH6.0を含む製剤は、無菌ろ過により調製し、発熱物質を除いた5mlのチューブ状ガラスバイアル内で約3.2mlを調剤し、次いで、凍結乾燥した。該製剤は、4、25、または40で、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、および12ヶ月、並びに4および25で18ヶ月および24ヶ月貯蔵し、次いで、1.3mlの無菌水(USP)を用いて再構成し、製剤が100mg/ml抗IL-13抗体、20mMヒスチジン、および10%スクロース、pH6.0になるように再構成した製剤を約1.6mlにした。

【0056】

HMW種のパーセンテージは、SEC-HPLCを用いてアッセイした。凍結乾燥および再構成前の該製剤中のHMW種のパーセンテージは、該製剤中の総たんぱく質の1%~1.5%の間にあり、4および25で貯蔵したすべての試料において約1%~2%の間にあった(図1)。40で12ヶ月貯蔵後、該製剤のHMW種は約3.5%であった(図1)。したがって、5および25で24ヶ月貯蔵した試料中のHMW種のレベルの増加は実質的になかった。

【0057】

凍結乾燥した抗IL-13抗体製剤は、細胞に基づくアッセイを用いて生物活性についてもアッセイした。該アッセイでは、IL-13依存性細胞増殖の抑制は、生物活性、すなわち、IL-13が、細胞に結合し、細胞から隔離する能力を実証するために種々の濃度の処方された抗体の存在下で調べた。アッセイの結果は、貯蔵されなかった種々の抗IL-13抗体を用いた結果と比較する。図2は、この種の一組のバイオアッセイからのデータを示している。概して、あらゆる試料において24ヶ月の貯蔵後、生物活性の量には実質的な変化はなかった。したがって、該製剤は、生物活性により測定したように、少なくとも24ヶ月凍結乾燥した製剤の貯蔵に適している。

【0058】

これらのデータは、本明細書で説明した凍結乾燥した抗IL-13製剤は、少なくとも24ヶ月の貯蔵に適することを実証している。

(実施例2)

高濃度の液体製剤の安定性

場合によっては、抗IL-13抗体製剤は、液体フォーマットで貯蔵するのが望ましい。したがって、比較的高濃度の抗IL-13抗体を含む液体抗IL-13製剤の長期安定性について調べた。つまり、ヒト抗IL-13抗体(100mg/ml)、10mMのヒスチジン、5%のスクロース(重量/容量)を含み、pH6.0である製剤は、発熱物質を除いたガラスのバイアルに該製剤を無菌ろ過して調製し、貯蔵した。該製剤は、2~8、15または25において、約6週間、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、18ヶ月、および24ヶ月あるいは40において約6週間、3ヶ月、および6ヶ月貯蔵し、HMW種、LMW種の存在、生物活性、および各時間における濃度についてアッセイした。

【0059】

HMW種のパーセンテージは、SEC-HPLCを用いてアッセイした。貯蔵前の製剤中の高分子量種のパーセンテージは、製剤中の総たんぱく質の2%~3%の間にあり、最長9ヶ月2~8、15および25において貯蔵した試料では約2%~4%の間にあり(図3)、2~8および15で最長24ヶ月の場合は約2%~4%の間にあつた。40で9ヶ月貯蔵後、該製剤のHMW種含有量は9%未満であった(図3)。したがって、比較的低温条件で24ヶ月貯蔵した試料中のHMW種では、レベルの実質的な増加はなかった。

【0060】

抗IL-13抗体製剤中のLMW種のパーセンテージは、100mg/ml抗IL-13抗体製剤についてもアッセイした。貯蔵前の製剤中のLMW種のパーセンテージは、貯蔵前の製剤中の総たんぱく質の約1%~2%の間にあり、2~8、15、および2

10

20

30

40

50

5 で最長 9 ヶ月貯蔵した試料では約 1 % ~ 3 % の間にあり(図 4)、さらに、2 ~ 8 で最長 24 ヶ月の場合は約 1 % ~ 3 % の間であった。40 で 6 ヶ月貯蔵後、該製剤の LMW 種の濃度は、11 % 未満であった(図 4)。したがって、比較的低温条件で 24 ヶ月貯蔵した試料中の LMW 種では、レベルの実質的な増加はなかった。

【0061】

さらに、別の安定性パラメータは、100 mg / ml 抗 IL - 13 抗体製剤を用いて調べた結合活性の該パラメータであった。これらの実験では、該製剤の結合活性のパーセンテージは、2 ~ 8 、 15 、 25 および 40 において、約 1 ヶ月、 3 ヶ月、および 6 ヶ月、および 2 ~ 8 と 25 のみで 9 ヶ月貯蔵後測定し、対照と比較した。該アッセイは、標識付きの抗 IL - 13 サイトカイン試薬に対する抗 IL - 13 の結合親和性を明確に観測する。
10

【0062】

該製剤の初期結合活性は、標準試料の約 120 % であり、6 ヶ月のテスト期間ではいずれの試料でもほとんど変わらなかった(図 5)。測定した結合活性は、標準の最高約 200 % であり、これは、一般に、このアッセイでエラーと観察され、時間による試料の結合活性の変化は本質的にはないことを反映し、結合結果には温度に関連したトレンドはなかった。

【0063】

100 mg / ml の抗 IL - 13 抗体製剤の安定性パラメータとしてバイオアッセイも用いた。該アッセイは、上の実施例 1 で説明したように行った。試料は、2 ~ 8 、 15 または 25 において、約 6 週間、 3 ヶ月、 6 ヶ月、 9 ヶ月、 12 ヶ月、 18 ヶ月、および 24 ヶ月あるいは 40 において約 6 週間、 3 ヶ月、および 6 ヶ月貯蔵した。データは、mgあたりの結合ユニットとして表記した(図 6)。
20

【0064】

試料は、貯蔵前は約 4.5×10^7 U / mg であり、培養後は $4.5 \sim 7.5 \times 10^7$ U / mg であった。これは、本質的には、貯蔵中試料の生物活性に変化がないことを反映している。値の変動は、アッセイに内在する変動を反映している。試料内の生物活性の量は低下していないので、これらのデータは、抗 IL - 13 の貯蔵に関する該製剤の適合性をさらに支持している。

【0065】

2 ~ 8 、 15 または 25 において、約 6 週間、 3 ヶ月、 6 ヶ月、 9 ヶ月、 12 ヶ月、 18 ヶ月、および 24 ヶ月あるいは 40 において約 6 週間、 3 ヶ月、および 6 ヶ月貯蔵した 100 mg / ml の抗 IL - 13 抗体製剤の濃度は、 UV / 可視によってもアッセイした。研究したすべての温度における液体製剤の濃度は、ほぼ類似した濃度であった(図 7)。
30

(実施例 3)

低濃度液体製剤の貯蔵

本発明の製剤および抗 IL - 13 抗体の貯蔵への該製剤の適合性をさらに調べるために、比較的低濃度の抗 IL - 13 を含む製剤についてテストした。該製剤は、0.5 mg / ml のヒト化抗 IL - 13 抗体、 10 mM のヒスチジン、 5 % のスクロースを含み、 pH 6.0 の液体製剤であった。これらの試料は、5 で 6 ヶ月および 12 ヶ月貯蔵後にテストし、次いで、種々の安定性パラメータ、すなわち、 HMW 種および LMW 種、たんぱく質濃度、および結合活性についてテストした。HMW 種および LMW 種は、上で説明した方法を用いてアッセイした。たんぱく質濃度は 280 nm における光学密度を測定し、 320 nm における散乱を差し引くことにより UV - 可視分光法を用いてアッセイし、該たんぱく質のモル吸光係数を用いて計算した。結果は表 1 に要約している。
40

【0066】

【表1】

表1

パラメータ	T=0	6ヶ月	12ヶ月
HMW種%	0.02%	0.03%	0.08%
(全体の%)			
LMW種%	0.12%	0.41%	0.79%
(全体の%)			
濃度	0.44 mg/ml	0.51 mg/ml	0.59 mg/ml
結合活性%	測定しなかった	126%	128%
(標準の%)			

これらのデータは、アッセイした安定性パラメータにはいずれも実質的な変化はなく、比較的低濃度の抗IL-13抗体を含む抗IL-13抗体製剤の適合性を支持していることを実証している。

(実施例4)

エアロゾル化した抗IL-13製剤の適合性

抗IL-13抗体製剤の1つの用途は、例えば、噴霧により肺全体に直接投与することである。製剤噴霧の適合性をテストするために、0.5 mg/mlのヒト化抗IL-13抗体、10 mMのヒスチジン、5%のスクロースを含み、pH 6.0である製剤を、市販の噴霧器を用いてエアロゾル化し、該エアロゾルを回収し、分解し(HMW種の形成)、SEC-HPLCを用いた回収、および結合活性をアッセイして品位をテストした。結果は表2に要約している。

【0067】

【表2】

表2

パラメータ(方法)	対照(噴霧前)	噴霧後
HMW種%	0.75	0.80
(SEC-HPLC)		
回収%	100%	99%
(SEC-HPLC)		
濃度 (UV-可視分光法)	20.7 mg/ml	21.3 mg/ml
結合活性%	189%	186%
(ELISA)		

これらのデータは、アッセイした安定性パラメータにはいずれも実質的な変化はなく、噴霧剤形として用いる抗IL-13抗体製剤の適合性を支持していることを実証している。

(実施例 5)

混合およびろ過

上で説明した製剤中の抗 I L - 1 3 抗体は、2つの普通の製造ユニット操作である混合とろ過とに対して頑強であることが実証された。つまり、抗 I L - 1 3 抗体は 5 0 m g / m l のたんぱく質濃度で、製造中に用いた条件に匹敵する上昇インペラーアー速度および時間にて混合した。集めた各試料は、出発物質に比べて濃度 (U V - 可視分光法を用いてアッセイした)、高分子量種 (S E C - H P L C を用いてアッセイした) および生物活性 (結合アッセイを用いてアッセイした) に変化を示さなかった。

【0068】

混合試験の後、抗 I L - 1 3 抗体は窒素加圧下で普通の 0 . 2 2 μ m の無菌フィルターに通した。一般に、窒素圧力は、約 3 0 p s i g 以下である。ろ過後、濃度 (U V - 可視分光法を用いてアッセイした)、H M W 種 (S E C - H P L C を用いてアッセイした) および生物活性 (結合アッセイを用いてアッセイした) は、出発物質に比べて変化を示さなかった。

(実施例 6)

凍結乾燥および再構成

抗体の凍結乾燥および再構成条件に関わる手順の限定されない実施例の1つで、製剤中 5 0 m g / m l の濃度の 3 . 2 m l の抗体、1 0 m M のヒスチジン、5 % (5 0 m g / m l) のスクロースを含み、p H 6 . 0 である製剤を、透明なガラス管バイアル (W e s t 4 4 3 2 / 5 0 1 3 1 9 シリコン処理した灰色の栓を付けた) 内で調剤し、冷凍乾燥する。冷凍乾燥すると、該バイアルの乾燥内容物は、抗体 1 6 0 m g 、ヒスチジン 3 . 2 × 1 0 - 5 モル、およびスクロース 1 6 0 m g である。冷凍乾燥から得られる固体ケーキは、固体の密度 (約 1 g / m l の密度において約 3 2 0 m g) に基づいて約 0 . 3 2 m l になる。該試料を再構成するために、該バイアルの内容物に 1 . 3 m l の水を加える。該バイアルの内容物は、希釈容量 (1 . 3 m l) 、並びに固体自身の容量 (0 . 3 m L) 、全部で約 1 . 6 m l に溶解し、該製剤の濃度は、抗体約 1 0 0 m g / m l 、ヒスチジン約 2 0 m M 、およびスクロース約 1 0 % で、p H 6 . 0 である。

(実施例 7)

試料の調製および凍結乾燥

抗 I L - 1 3 抗体試料の調製

2 0 m M のヒスチジン、1 0 % スクロース、p H 6 . 0 の約 8 5 m g / m l の濃度において、ヒト化抗 I L - 1 3 抗体の冷凍試料を 3 7 の水浴中で解凍した。解凍物質を等分した 1 2 5 m L を、分子量 6 k D ~ 8 k D の遮断スペクトル / ポル透析管を用いてヒスチジン 1 0 m M 、スクロース 5 % 、p H 6 . 0 に対して透析した。得られた溶液は、1 0 m M のヒスチジン、5 % のスクロースを用いて 5 0 m g / m l 、p H 6 . 0 を目標にして希釈した (薬剤として用いる抗 I L - 1 3 抗体製剤)。

凍結乾燥の実施

すべてのランにおいて、ドアの前にアルミニウム遮蔽板および高さ 6 3 m m の棚を用いて凍結乾燥器内の放射線を最小限に抑制した。すべてのランにおいて、凍結乾燥器に一貫した荷重をかけるために1つのトレイを完全に満たした。栓は、加圧熱処理し、たんぱく質のバイアルはすべて乾燥した。たんぱく質試料のすべてのバイアルは、脱イオン水ですすぎ、発熱物質を除去した。残りのトレイを満たすために使われたバイアルと栓とは、放置した。

【0069】

抗 I L - 1 3 抗体製剤を播種したバイアルは、1 6 0 m g / バイアルを目標にしてバイオセーフティー・キャビネット内で無菌で調製した。安定性試験用のバイアルは、各ランの前に実施例 6 で説明した 3 . 2 m l のフレッシュな製剤で満たした (予め凍結乾燥しなかった物質)。凍結乾燥の間に、追加のバイアルは、凍結乾燥器に対して一貫した荷重を維持するために目標の凍結乾燥サイクルと相性がいい適切な緩衝液を満たした。凍結乾燥は、プロテインアレイ内に熱電対を取り付けて観測した。

10

20

30

40

50

変調示差走査熱量測定 (m D S C)

m D S C 用のすべての試料は、0 . 5 の振幅および1 0 0 秒の時間で変調モードにて測定した。凍結乾燥後の粉末では、試料は2 / 分で1 5 0 まで加熱した。すべての粉末試料は、窒素バージしたグローブ・ボックスを用いて調製した。液体試料では、昇温はすべて0 . 5 / 分で行い、温度は凍結乾燥サイクルにおいて使用する温度に一致させた。最終昇温速度は、2 / 分で行い、ガラス転移を大きく見せるようにした。液体試料は、実験作業台で調製した。

冷凍乾燥顕微鏡撮影

冷凍乾燥顕微鏡撮影を行うために、凍結乾燥を模倣して、試料は0 . 5 / 分で - 4 0 まで冷却した。真空開始後、温度は徐々に上げて昇華中温度の関数として試料中の構造变化を観察した。凍結乾燥顕微鏡では、圧力調節ができないので、試料は完全真空下で乾燥した。
10

水分分析

凍結乾燥試料中の水分をアッセイするためにカールフィッシュヤー滴定を用いた。凍結乾燥試料は、3 m l のメタノールを用いて再構成した。5 0 0 μ L の注入を2 度または3 度行った。水分1 % の標準液を、適合性のチェックとして使用後に注入した。

フーリエ変換赤外分光法 (F T I R)

F T I R は、乾燥粉末状態の抗体の二次構造を測定した。約1 m g の処方、乾燥したたんぱく質を含むペレットを、3 0 0 m g のK B r 内に分散させ、押圧し、2 0 0 回走査した。データ収集後の分析には、スクロース・プラセボのスペクトルの差し引き、基準線補正、平滑化、二次導関数、およびエリアの正規化があった。
20

安定性

製剤中の凍結乾燥抗体の安定性は、貯蔵時間および温度の関数として評価した。凍結乾燥した抗I L - 1 3 抗体の試料は、凍結乾燥後、2 ~ 8 で4週間貯蔵後および5 0 で2週間と4週間貯蔵後アッセイした。冷蔵試料は、人が立って入れる大きさの冷蔵冷却室に貯蔵した。高温試料は、5 0 にセットしたL a b L i n e I m p e r i a l I n c u b a t o r で貯蔵した。適切な時点で、試料は貯蔵庫から取りだし、アッセイする前に室温まで加温または冷却した。

再構成および外観

凍結乾燥後の分析および貯蔵安定性分析の両方からの凍結乾燥製剤のバイアルは、注入用の1 . 2 m l の無菌水を用いて再構成する前、その間、およびその後に目視で調べた。バイアルは、ケーキ色、品位、水分、微粒子、および再構成する前の欠陥について、黒と白との両方の背景に対してライトボックス内で調べた。凍結乾燥ケーキを目視で調べた後、キャップとクリンプシールとはデクリンパーを用いてバイアルから外した。この栓は取り外し、注入する無菌水をピペットを用いてバイアル内に徐々に入れた。ケーキの十分な湿りを確実にするために渦運動を用いて、希釈液を分注した。希釈液を完全に分注したら、標準ラボタイマーを用いて再構成の開始を計時し、該バイアルに再び栓をした。最後の固体片が溶解した時に、再構成は完了した。両手の間でバイアルを回転させ再構成を促進した。凍結乾燥したケーキを再構成する過程で、透明性、泡立ち、発泡、などの溶解溶液の状態について観察し、記録した。一旦、再構成が完了したら再構成時間を記録し、バイアルを数時間台上に置き、得られた溶液を安定させると、再構成の間に形成された気泡は大部分消散した。再構成した溶液は、次いで、黒と白との両方の背景に対して、ライトボックスの中で色、透明性、および微粒子を検査した。
30

高速サイズ排除クロマトグラフィ (S E C - H P L C)

抗I L - 1 3 抗体製剤の2 μ L の純試料をガードカラム (T o s o H a a s P a r t N o . 0 8 5 4 1 およびN o . 0 8 5 4 3) を備えたG 3 0 0 0 s w × 1 カラムに注入した。移動相には、2 5 0 m M の塩化ナトリウムと共にりん酸塩緩衝食塩水 (P B S) を加えた。流速は、0 . 7 5 m l / 分、処理時間は3 0 分であった。紫外吸光度を、波長2 8 0 n m で観測した。主な抗I L - 1 3 抗体ピークをW a t e r s E m p o w e r (商標) ソフトウェアを用いて高低両分子量種から分離し、クロマトグラムを積分した。
40
50

濃度測定のための紫外 - 可視吸光度分光法 (A₂₈₀)

100 mg / ml の濃度において抗体を有する製剤の試料 10 μl を、それぞれ、 10 mM ヒスチジン、 5 % スクロース、 pH 6.0 からなる 1990 μl および 3990 μl に添加することにより、約 0.5 mg / ml および 0.25 mg / ml に希釈した。得られた溶液 200 μl を、 96 ウエルのマイクロプレートの個々のウエルに入れ、プランクとして緩衝液も入れた。このプレートは、紫外吸光度については、波長 320 nm および 280 nm で、 Spectramax (登録商標) Plus プレートリーダーで読みとった。280 nm の吸光度から 320 nm の吸光度を差し引き、吸光係数 (1.405 mL / mg - cm) により割り、経路長 (1 cm) を掛けて各ウエルの溶液のたんぱく質濃度を測定した。適切な希釈因子を適用し、平均たんぱく質濃度を決めた。

10

光散乱に関する紫外 - 可視吸光度分光法 (A₄₂₀)

分析対象の各抗 IL - 13 抗体試料の 200 μl を、 96 ウエルのマイクロプレート上の個々のウエルに入れた。緩衝液プランクは、対照として用いた。このプレートは、可視吸光度については波長 420 nm で、 Spectromax Plus プレートリーダーで読みとった。

電気化学発光 (ECL) 結合アッセイ

試料は、大腸菌 Flag 抗 IL - 13 抗体結合アッセイフォーマット (メリーランド州 Gaithersburg, BioVeris) を利用して結合分析を受けた。該アッセイは、 96 ウエルのプレートフォーマットに分配した試料について行った。

抗 IL - 13 抗体バイオアッセイ

20

試料は、 TF - 1 細胞増殖バイオアッセイを用いて生物活性についてテストした。抗 IL - 13 抗体は、アレルギー性疾患およびぜんそくの発症に関与した受容体を有する細胞の活性化を *in vivo* で予防する細胞表面受容体への IL - 13 サイトカインの結合を妨害する。この研究で用いた *in vitro* バイオアッセイ・モデルは、 IL - 13 受容体を発現し、 IL - 13 サイトカインの存在下で増殖する株細胞 (ヒト TF 1 赤白血病株細胞 ; ATCC CRL - 2003) からなる。

【 0070 】

IL - 13 抗体による TF 1 細胞の IL - 13 反応の抑制は、パラメータ 4 つのロジスティック方程式を用いて一致した。生物活性 (相対力) は、アッセイのスタンダードとして用いた標準物質の抑制曲線と IL - 13 抗体テスト試料の抑制曲線を比較することにより測定できる。

30

サイクル開発戦略

一連の逐次ステップ (下で説明する) を用いて、凍結乾燥サイクルを開発した。

臨界製品温度の確認

抗 IL - 13 抗体に関する臨界製品温度は、 2 つの直交法、すなわち、変調示差走査熱量計 (DSC) および冷凍乾燥顕微鏡により確認した。これら 2 つの方法は、冷凍製品のガラス転移温度 (DSC) および得られる崩壊の確認に使われる (冷凍乾燥顕微鏡) 。一次乾燥の間に製品をこの温度以下に維持する凍結乾燥サイクルは、無傷のケーキ構造を生じるはずである。最低温度適切温度は、 -25 であると推測され、したがって、この温度は、一般に、本明細書で説明した抗体の凍結乾燥方法および製剤を開発する時に、テスト条件および製剤をデザインした操作に含まれる。

40

凍結乾燥サイクルの実行

上で説明した試験結果に基づいて、貯蔵または他の操作に適した凍結乾燥製剤を調製するのに適した凍結乾燥操作を開発する場合に興味深い 3 つのパラメータを調べるために 3 種類の凍結乾燥サイクルがなされた。調べた第 1 のパラメータは、以前の安定性試験からのサイクルを反復する対照サイクルであった。事前の開発的安定性サイクルは、すべて、このサイクルを利用したので、第 1 のパラメータはこの分析の出発点として役立った。

【 0071 】

テストした第 2 のパラメータは、アニーリングの影響であった。上の対照サイクルを用いて凍結乾燥した抗 IL - 13 抗体製剤の再構成時間は、かなり長く、例えば、約 100

50

秒～500秒である(図16)。冷凍溶液のガラス転移温度より上で、冷凍熱処理の間の追加ステップとしてアニーリングを組み込むと、真空を開始する前に氷の結晶サイズを大きくするのに役立つ。このように、結晶サイズが大きくなると、凍結乾燥の最後に乾燥ケーキの気孔サイズが大きくなる。比較的大きな気孔は、凍結乾燥ケーキ内への水の浸透を改善し、再構成を改善することができる。

【0072】

テストした第3のパラメータは、積極的なサイクルであった。一次乾燥温度を対照サイクル設定点よりもかなり顕著に上げると、一次乾燥の間に抗IL-13抗体製剤製品の温度が顕著に上ることになる。この凍結乾燥サイクルは、凍結乾燥の間の製品温度に対する抗IL-13抗体製剤の感受性の評価として役立ち、公式の凍結乾燥口バスト性試験を行う前の早期臨床ロット間の製造の本筋からの逸脱の評価に使用することができる。
10

凍結乾燥サイクルの評価

抗IL-13抗体製剤に関する選択された凍結乾燥サイクルの評価は、2つの態様に分かれ、すなわち、凍結乾燥後に行われたテストに基づいた即時比較、および加速条件下で培養後生じた潜在的な長期の影響の2つである。

臨界製品温度の確認

抗IL-13抗体製剤製品は、ほぼ50%のたんぱく質を含んだ。そこで、該たんぱく質は、冷凍および凍結乾燥状態の物理特性を支配するものと予期された。凍結乾燥する前に、準環境変調示差走査熱量測定(MDSC)で、該製剤の冷凍濃縮アモルファス相ガラス転移温度を調べた。この実験では、抗IL-13抗体は、5%スクロース中50mg/mlの濃度、10mMヒスチジン、pH6.0であった。これらの条件下では、最低確認転移は-11であった(図8)。臨界温度は、冷凍乾燥顕微鏡温度進行をアッセイして確認した(図9A-9F)。これらの実験では、構造は、-25から-15へ加熱することにより失われ、-18へ冷却して再獲得した。構造は、さらに、-10から溶融開始温度である-4に加熱して失われた。該試料を-16に冷却して観察された類似の構造により示したように、すべての変化は可逆的であった。したがって、可逆転移は、約-15、および-10と-6との間の別の転移で観察された。温度を-16以下に下げるとき、最初の構造に匹敵する乾燥構造になる。この情報に基づいて、凍結乾燥間以下に留める臨界温度として-15の製品温度が選択された。この方法は、凍結乾燥の臨界温度を選択する方法を例示している。
20
30

【0073】

3つの凍結乾燥サイクルを連続して行った。サイクル・トレースは、図10-12に示している。すべてのサイクルは、一次および二次の乾燥の間チェンバーの圧力を100mTに維持した。昇温速度は、図11と図12の一次乾燥と二次乾燥との間を除いてすべて0.5/分であった。両図の場合は、これらのサイクルでは0.2/分であった。多様なパラメータは、表3に要約している。

【0074】

【表3】

表3. 凍結乾燥パラメータの比較
(棚温度に到達する最後の熱電対の一次乾燥時間)
40

ステップ	積極的	対照	アニール
アニーリング	-	-	8時間
一次乾燥	12時間	21時間	21時間
二次乾燥	3時間	4時間	4時間

凍結乾燥サイクルの評価：凍結乾燥後

3サイクルの各々(対照、積極的、およびアニーリング)の場合の一次乾燥の間の製品
50

(抗 I L - 1 3 抗体) 温度プロファイルは、図 1 3 に示している。アニーリングおよび対照製品の熱電対は類似していたが、積極的なサイクルの棚温度は上昇し、一次乾燥中にはほぼ 10 上がった。

【 0 0 7 5 】

凍結乾燥後、3つの凍結乾燥サイクルの各々からの抗 I L - 1 3 抗体製剤のバイアルは、2つは固体としておよび再構成した液体として、生化学的品位についてテストした。固体状態は、次の方法、すなわち、m D S C (ガラス転移温度を測定する)、B E T による表面積測定、カール・フィッシャー水分滴定、フーリエ変換赤外分光(たんぱく質の二次構造を測定する)、およびケーキの外観を用いて評価した。再構成液体は、再構成時間、外観、たんぱく質濃度に関わる 2 8 0 n m における紫外吸光度、光散乱に関わる 4 2 0 n m における可視部吸光度、高分子量部分の計量に関わる S E C - H P L C、表面電荷不均一性および I G E N 結合に関わる C E X - H P L C、および生物活性に関わる T F - 1 により評価した。

【 0 0 7 6 】

3つのサイクルは、すべて、微粒子または水分を含めて、見かけ上欠陥のない白い固体ケーキを生じた。対照サイクルのm D S C サーモグラムは、図 1 4 に示している。表 5 は、一次熱転移の各サイクルに関する結果を要約している。5 3 における転移は、大きくはないが、他の2つの凍結乾燥サイクルではなお検出可能であった。この転移は、5 0 における加速貯蔵では、たんぱく質の安定性には影響はないようであった。

【 0 0 7 7 】

凍結乾燥後の製剤の二次構造を比較すると、該たんぱく質の二次構造は3試料間では同等であることが判明した(表 4、図 1 5)。試料抗体のアミド I 領域において粉末フーリエ変換赤外分光(F T I R)の2次導関数を示す図 1 5 では、各走査の累積エリアは 1 に正規化した。表 4 に含まれている情報は、試料間の比較の根拠として - シート帯(1 6 2 4 ~ 1 6 5 7 c m ⁻¹)における総面積の割合を示している。乾燥状態の二次構造を液体状態の該製剤と比較すると、相対的な - シートエリアの差が目立った(液体として 0 . 3 7 に対して、凍結乾燥粉末として 0 . 2 5 ~ 0 . 2 7)。この差は、ほとんどは、凍結乾燥状態では水が存在しないこと、およびたんぱく質の立体配座の対応する変化によるものである。

【 0 0 7 8 】

【表 4】

表4. ガラス転移温度(T_g)、BET表面積、
残留水分および凍結乾燥後の二次構造
の測定結果

サイクル	T_g (°C)	BET 表面積 (m ² /g)	水分	β -シート 帯の深さ
積極的	86	0.48	0.45%	0.255
対照	84	0.64	0.73%	0.249
アニール	85	0.59	0.59%	0.270

各サイクルからの1つのバイアルは、1 . 2 m l の注入用の無菌水を用いて再構成した。再構成中の外見、再構成時間、および再構成 6 0 分後の外見は、各サイクルについて記録し、表 6 に要約している。3つのサイクルはすべて、ケーキを溶解するために物理的かくはん(両手の間の回転)を必要とする。積極的なサイクル(サイクル 1)および対照サイクル(サイクル 2)のケーキは、製造に使える期間内に壊れて、溶解し始めた。再構成

10

20

30

40

50

時間は、それぞれ、140秒と73秒であった。再構成時間は、多くが、比較的短く、より頑固なケーキ片の溶解に費やされた。アニーリング・サイクル（サイクル3）の試料は、再構成に最も長い時間がかかった。その結果は、アニーリング・ステップは、より多孔性のケーキが形成されるので、再構成時間が短くなるであろうという説に異議を唱えている。該ケーキは、再構成したときに無傷のままであり、373秒かけて徐々にとけるところは、Life saver（商標）の溶解に似ている。3つのサイクルはすべて、再構成の間に種々の量の泡を生じた。対照サイクルが泡の量が最も多く、次いで、420nmにおけるUV／可視により溶液散乱を観察すると、アニーリング・サイクル、積極的サイクルの順番であった（表5を参照のこと）。一旦再構成すると、試料は60分間安定させることができた。その時間で、泡の多くは消散し、3つの溶液はすべて、黒と白両方の背景に対してライトボックスを用いて調べた場合外観は似ていた。3つのサイクルはすべて、色合いは黄色で、わずかに乳白色に着色し、アニーリング試料がいく分強い乳白色であった。

【0079】

3つの試料はすべて、本明細書で説明したアッセイを用いて生化学的品位についてアッセイした。これらのデータにより、凍結乾燥サイクルの関数として、再構成後抗IL-13抗体製剤の品位には見かけ上の差はないことが実証された。該製剤中の抗体の濃度を測定することにより実証されたように、回収されたたんぱく質の量は、3つのすべてのサイクルで本質的には同等であった。サイズ排除クロマトグラフィにより測定した製剤中の高分子量化合物の量およびカチオン交換クロマトグラフィにより測定した表面電荷不均一性は、3つのすべてのサイクルで本質的には同等であった。凍結乾燥サイクルの関数として、IGEN結合アッセイおよびTF-1バイオアッセイにより測定した分子の機能性の変化は、確認されなかった。

【0080】

【表5】

表5. 再構成後のデータ

1. 2mLの再構成(ケーキを明らかにしている100mg/mlの目標)			
アッセイ	サイクル1 (積極的)	サイクル2 (対照)	サイクル3 (対照 w/8時間 アニール)
再構成中の外観	泡は迅速に消散する。大きな塊のケーキは再構成が困難。激しく振とうすると溶液になる。	極端な泡立ちは迅速に消散しにくい。大きな塊のケーキは再構成が困難。激しく振とうすると溶液になる。	極端な泡立ち、比較的大きな泡は、非常にゆっくり消散する。再構成が非常にゆっくり行われる間ケーキは形を維持する。激しく振とうすると溶液になる。
再構成後(60分)の外観	黄色の色合いがあり、わずかに乳白色。泡はまだ残っている。	黄色の色合いがあり、より乳白色に見える。泡はまだ残っている。	黄色の色合いがあり、わずかに乳白色。泡はまだ残っている。
再構成時間	140秒	73秒	373秒
A420	0.227	0.518	0.257
Δ280 (mg/mL)	103.6	100.5	104.1
SEC-HPLC % HMW	1.1	1.1	1.1
IGEN 結合%	153	153	164
比活性 (U/mg)	6.0E+07	5.8E+07	6.8E+07

安定性

本明細書で説明した製剤中の抗IL-13抗体の品位に対して、調べた凍結乾燥サイクルの関数として、凍結乾燥後直ぐに影響があるとは思われないが、貯蔵安定性が凍結乾燥サイクルの関数として変わるか否かを評価することは重要である。これをテストするために、上の「安定性」のセクションにおいて概要を述べたように短期の加速安定性試験を行

10

20

30

40

50

った。試料は、再構成時間の間、 280 nm におけるUV／可視によるたんぱく質濃度の変化、 420 nm におけるUV／可視による溶液光散乱の変化、SEC-HPLCによる高分子量凝集物における変化、およびIGEN結合アッセイによる結合活性の変化を観測した。

【0081】

図16は、再構成時間を貯蔵時間および貯蔵温度の関数として示すために、プロットしている。再構成時間の絶対数には変動があるが、積極的サイクルおよび5で貯蔵したアニーリング・サイクルの例外はあるが、トレンドは凍結乾燥後の分析で観察されたものと類似している。対照サイクルの試料は、再構成が最も迅速に行われ、次に速いのは積極的サイクルの試料である。アニーリング・サイクルの試料は再構成が最も遅い。時点による変動、5で貯蔵した積極的およびアニールした試料の凍結乾燥後のトレンドからの逸脱は、変数の1つ以上の調節がうまくいかないことによるものと考えられる。これらには、再構成中ケーキが湿る速度、注入用の水がバイアル内に分配される時にケーキがどれくらいおよびどの部分が湿るか、および再構成中バイアルがどのようにして激しく攪拌されるか、が含まれる。これらの変数は、すべて、主観的であり、オペレーター依存性であり、および再構成時間および光散乱に影響を与える可能性がある。

【0082】

図17に示したたんぱく質濃度は、貯蔵中(0～4週間)テストした3つのサイクルの間で、または温度(5および50)の関数として、大きな変動はなかった。最初の時点から2週間までの濃度の上昇は、1つの時点から次の時点までの再構成容量の測定の精度の違いによるものかもしれない。

【0083】

図18に示した溶液散乱は、貯蔵の途中で、または温度の関数として3つのサイクルの間で大きく変わることはなかった。対照サイクルの開始時点における結果の上昇は、サイクルの差の結果よりむしろ、試料取扱いによる泡同伴が追加されたためであった。

【0084】

試料は、貯蔵中存在するHMW種のパーセンテージについてもアッセイした。これらのアッセイは、SEC-HPLCを用いて行った。図19に示したように、データは、高分子量凝集物のパーセンテージは、3つの凍結乾燥サイクルの間で貯蔵中大きな変動はなかったことを実証している。

【0085】

これらの試料は、96ウエル・フォーマット(IGEN)におけるプレート・アッセイを用いて結合についてもアッセイした。図20は、該製剤中の抗IL-13抗体の結合は2～8かまたは50において4週間のコース中凍結乾燥サイクルの関数として大きく変動しなかったことを示している。

【0086】

これらのデータは、該製剤中の抗IL-13抗体が、調べた3つの凍結乾燥サイクルの関数として同等の安定性を有することを実証している。アニーリング・ステップの追加は、再構成を改善するよりむしろ再構成を悪化するように見える。積極的サイクルは、一次乾燥中製品温度をほぼ10上げることが認められたことによりロバスト性評価として作用するであろう。

結論

該製剤中の抗IL-13抗体は、凍結乾燥中の製品温度の極端な上昇に対して頑強であることが実証された。50で4週間貯蔵すると安定性は、一次乾燥中に製品温度にほぼ10の差がある物質とほぼ同等であった。

(実施例8)

IL-13抗体製剤

IL-13抗体液体製剤の使用可能な賦形剤を選別するために、短期加速安定性試験を、貯蔵温度40で6週間、West4432/50の栓を備えた13mmのWestガラス・バイアルか、またはBD Hypak(商標)である予め充填可能なシリンジに1

10

20

30

40

50

0.0 mg / ml の IMA - 638 抗体の 0.5 ml を用いて行った。該抗体の安定性は、次いで、280 nm における吸光度を用いた濃度測定および SEC - HPLC によりテストした。

【0087】

テストした製剤には、pH を 5.0 から 5.5 へ、さらに、6.0 へ変えたヒスチジン、コハク酸ナトリウム、および酢酸ナトリウムなどの種々の緩衝液、種々の濃度 (0%、2.5%、5.0%、および 10%) のスクロース、およびソルビトール、グリシン、アルギニン、およびメチオニンなどの他の添加剤が含まれていた。下の表 6 には、この選別でテストした製剤を提示している。

【0088】

【表 6 - 1】

表6. 液体製剤

No.	製剤
1.	10 mM ヒスチジン, 0% スクロース, pH 6.0
2.	10 mM ヒスチジン, 2.5% スクロース, pH 6.0
3.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, pH 6.0
4.	10 mM ヒスチジン, 10% スクロース, pH 6.0
5.	10 mM ヒスチジン, 0% スクロース, pH 5.5
6.	10 mM ヒスチジン, 2.5% スクロース, pH 5.5
7.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, pH 5.5
8.	10 mM ヒスチジン, 10% スクロース, pH 5.5
9.	10 mM ヒスチジン, 5% ソルビトール, pH 6.0
10.	10 mM ヒスチジン, 1% グリシン, pH 6.0

【0089】

【表 6 - 2】

11.	10 mM コハク酸塩, 5% スクロース, pH 6.0
12.	10 mM 酢酸塩, 5% スクロース, pH 5.0
13.	10 mM 酢酸塩, 5% スクロース, pH 5.5
14.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, 2% アルギニン, pH 6.0
15.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, 100 mM メチオニン, pH 6.0

40 で 6 週間貯蔵した場合の回収率 (%) は、UV / 可視により抗体の濃度を測定して評価し、図 21 に示している。回収率は製剤間ではほぼ類似していたが、最高回収率は製剤 4 と 8 とで得られた。

【0090】

40 で 6 週間貯蔵している間の高分子量種のパーセントの増加は、図 22 に示している。薬液充填済みシリンジは、バイアルに比べて高分子量凝集物の含有量が少なかった（図 22、製剤 4 を参照のこと）。製剤 6、8、14 および 15 は、高分子量種の増加が最小であった（0.5% と 1.25% との間）。

【0091】

40 で 6 週間貯蔵している間の低分子量種のパーセントの増加は、図 23 に示している。H MW とは対照的に、薬液充填済みのシリンジは、ガラスバイアルに比べて L MW 種

10

20

30

40

50

の増加が少なかった。製剤 1 - 13 の % L M W の変化は約 3 % ~ 4 % であった。

【0092】

結論として、大抵の製剤は、許容できる安定性を示し、最適 pH は 5 ~ 6 . 5 であることを確認し、種々の適切な賦形剤の添加が可能であり、すなわち、賦形剤がないことはたんぱく質の安定性にとって有害であった。

(実施例 9)

該製剤の Tween 必要性の評価

界面劣化との関連において実施例 8 から主要な候補製剤において Tween が必要であるか、どうかを検討するために、振とう試験および冷凍・解凍試験を、表 7 に載せた 8 つの主要な候補を用いて行った。

【0093】

【表 7】

表7. 主要な候補

No.	製剤
1.	10 mM ヒスチジン, 0% スクロース, pH 6.0
2.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, pH 6.0
3.	10 mM ヒスチジン, 10% スクロース, pH 6.0
4.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, 0.01% Tween 80, pH 6.0
5.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, 2% アルギニン, pH 6.0
6.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, 2% アルギニン, 0.01% Tween 80, pH 6.0
7.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, 70 mM メチオニン, pH 6.0
8.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, 70 mM メチオニン, 0.01% Tween 80, pH 6.0

振とう試験は、ガラスバイアル中の 100 mg / ml の IMA - 638 液体製剤を 0 . 25 ml 用い、ゲルシェーカー上約 200 rpm にて 24 時間該ガラスバイアルを室温で振とうして行った。振とうした試料の濃度は、振とうしなかった試料（対照）と比較した。種々の抗体製剤の振とう後の IMA - 638 の濃度は、図 24 に示している。濃度は製剤間でほとんど差はなかった。図 25 は、IMA - 638 製剤の振とう後 H M W 種 (%) を提示している。該製剤の H M W 種は、約 1 . 2 % ~ 約 1 . 5 % の範囲内にあった。

【0094】

冷凍・解凍試験は、ポリプロピレン・チューブ中で 100 mg / ml の IMA - 638 液体製剤を 0 . 25 ml 用いて行った。冷凍サイクルは -80 °C で、解凍サイクルは 37 °C で行った。冷凍・解凍サイクルは、1 回 (FT1) 、3 回 (FT3) 、または 5 回 (FT5) 行った。冷凍・解凍サイクルを受けなかった対照に比べて、冷凍・解凍サイクル後の試料の濃度は、図 26 に示している。冷凍・解凍後の H M W 種 (%) も測定し、図 27 に示している。冷凍・解凍後の製剤中の H M W 種 (%) は、約 1 . 2 % ~ 約 1 . 5 % の範囲内にあった。

【0095】

Tween の存在は、これらの条件の場合、剪断感受性に対して保護する効果を明確に証明しなかった。

(実施例 10)

薬液充填済みシリンジにおける液体 I L - 13 抗体製剤の評価

下の表 8 に載せた 100 mg / ml の IMA - 638 抗体製剤の安定性は、West

10

20

30

40

50

4432/50の栓をつけた薬液充填済みのBD Hypak(商標)シリンジに1mlの製剤を詰めて、7ヶ月にわたり4、25、および40においてHMW種(%)を測定して評価した。これらの試験の結果は、図28、29、および30に示している。

【0096】

【表8】

表8. 薬液充填済みのHypakTMシリンジ製剤

No.	製剤
1.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, pH 6.0
2.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, 0.01% Tween 80, pH 6.0
3.	10 mM ヒスチジン, 10% スクロース, 0.01% Tween 80, pH 6.0
4.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, 2% アルギニン, 0.01% Tween 80, pH 6.0
5.	10 mM ヒスチジン, 5% スクロース, 55 mM NaCl, 0.01% Tween 80, pH 6.0

4では、t=0ヶ月からt=7ヶ月まで、HMW種は0.70%と0.90%との間にあった。25では、HMW種は約0.75%と約2.00%との間にあり、凝集物は時間と共に増加した。40では、凝集物は、すべての製剤において時間と共に増加し、製剤1~3および5では7ヶ月目に、4.5%と6.5%との間にあった。凝集物の増加が最も少なかったのは、製剤4であった(7ヶ月で約3%)。

【0097】

10 mMのヒスチジンと5%のスクロースからなる製剤にアルギニンとTweenとを添加すると、試験したすべての温度で薬液充填済みシリンジとの関連でIL-13抗体の安定性を改善するように見える。

【0098】

したがって、これらの賦形剤の1つまたは両方が、抗IL-13製剤の安定性を、さらに、高めると考えられる。

(実施例11)

薬液充填済みシリンジにおけるIMA-638液体製剤に対するアルギニンの効果

10 mMのヒスチジン、5%のスクロース、および0.01%のTween 80で処方した100mg/mlのIMA-638抗体製剤の安定性に対する低濃度のアルギニン(0.1%~2%)の添加効果を、West W4023 Duraflo栓をつけた、薬液充填済みの1mlのBD Hypak(商標)SCFシリンジを40で4週間、8週間、12週間、および28週間貯蔵後、HMW種のパーセント変化により調べた。この試験の結果は、図31に示している。

【0099】

このデータは、アルギニンを添加すると時間と共に形成されたHMW凝集物の量が低下することを示している。

(実施例12)

PARI LC Plus噴霧器からのIMA-638エアロゾルの特徴付け

本発明のIL-13抗体製剤は、エアロゾルとして含む種々の手段により対象に投与することができる。エアロゾルは、液体または固体の粒子が空気に懸濁したものである。本発明の一部の実施態様では、IL-13抗体製剤は、肺への送達に使われる。肺送達に関わる薬剤粒子は、通常、幾何学的直径よりも空気力学的直径により特徴付けられる。空気力学的直径は、問題の粒子と同じ重力沈降速度を有する単位密度(1g/ml)の球の直径である。空気力学的直径は、密度および形状などの空気中の粒子の挙動に影響を及ぼす物理特性を考慮に入れている。粒子が沈降する速度は、空気力学的直径に比例する。空気力学的直径に関する空中浮遊粒子量の分布の中央値は、質量中央値空気力学的直径(MMAD)と呼ばれる。幾何学的標準偏差(GSD)は、MMADに関する分散の尺度である

10

20

30

40

50

。最後に、微粒子画分（F P F）は、特定の空気力学的直径（4.7 μm未満）以下である粒子の画分である。M M A D、G S DおよびF P Fは、Anderson Cascade Impactor（A C I）により測定する。A C Iは、噴霧器、定量吸入器、乾燥粉末吸入器、環境など、から生じた液滴／粒子のサイズ分布を測定する。

【0100】

この実験では、P A R I L C P l u s 噴霧器により50 mg / ml および0.5 mg / ml のI M A - 638 製剤（10 mMのヒスチジン、5%のスクロース、p H 6.0）から作られたエアロゾルのM M A D、G S DおよびF P Fを測定した。表9はこの試験の結果を提示している。

【0101】

【表9】

10

表9

	50 mg/ml IMA-638	0.5 mg/ml IMA-638
M M A D	3.45	3.37
G S D	1.82	2.88
F P F < 4.7 μm	0.44	0.39

評価したI M A - 638 製剤は、噴霧により抗I L - 13 抗体の肺への送達に適しているエアロゾル特性（粒子サイズおよびたんぱく質の品位を含む）を有する。

20

（実施例13）

凍結乾燥したI L - 13 抗体、I M A - 026 の安定性

凍結乾燥した抗I L - 13 抗体製剤の長期安定性を調べた。つまり、抗I L - 13 抗体、I M A - 026（50 mg / ml）、10 mMのヒスチジン、5%のスクロース（重量 / 容量）、p H 6.0 を含む製剤は、無菌ろ過により調製し、約3.2 ml はW e s t 4432 / 50 1319シリコン処理した灰色の栓を有する5 ml の発熱物質を除いたガラス管バイアルに分配し、次いで、凍結乾燥した。該製剤は、4、25、または40で、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、および12ヶ月貯蔵し、次いで、凍結乾燥物は、1.3 ml の無菌水（U S P）を用いて再構成し約1.6 ml にしたので、該製剤は、100 mg / ml の抗I L - 13 抗体、20 mMのヒスチジン、および10%のスクロース、p H 6.0 であった。

30

【0102】

H M W種のパーセンテージは、S E C - H P L Cを用いてアッセイした。凍結乾燥および再構成前の該製剤中のH M W種のパーセンテージは、製剤中の総たんぱく質の約1%であり、4および25で貯蔵したすべての試料中でも約1%であった（図32）。40で12ヶ月貯蔵後、該製剤のH M W種は約3.0%であった（図32）。したがって、5および25で12ヶ月貯蔵した試料中のH M W種のレベルの増加はほとんどなかった。

40

【0103】

凍結乾燥した抗I L - 13 抗体製剤は、細胞を基礎にしたアッセイを用いて生物活性についてもアッセイした。該アッセイでは、I L - 13 依存性の細胞増殖の抑制を、生物活性を証明するために、すなわち、細胞に結合する能力およびI L - 13 を細胞から隔離する能力を実証するために種々の濃度の処方された抗体の存在下で調べた。アッセイの結果は、貯蔵しなかった抗I L - 13 抗体を用いた結果と比較している。図33は、この種の1組のバイオアッセイからのデータを示している。全般的に見れば、あらゆる試料において12ヶ月の貯蔵後、生物活性の量の変化はほとんどなかった。したがって、生物活性により測定したように、該製剤は、少なくとも12ヶ月間凍結乾燥した製剤の貯蔵に適している。

【0104】

50

これらのデータは、本明細書で説明した凍結乾燥抗IL-13製剤は、少なくとも12ヶ月間の貯蔵に適していることを実証している。

(実施例14)

凍結乾燥した抗IL-13製剤、IMA-026の安定性

この実験は、用いた抗体がIMA-026であったことを除いて、実施例1で説明したとおりに行った。用いたIMA-026製剤は、50mg/mlのIMA-026、10mMのヒスチジン、5%のスクロース、0.01%のTween-80、pH6.0であった。これらの結果は、実施例1で得られた結果とほぼ類似していた。したがって、凍結乾燥したIMA-026は、凍結乾燥したIMA-638のように安定な製剤である。

(実施例15)

10

Tweenがある場合とない場合のIMA-026のエアロゾル化

この実験では、HMW(%)、回収率(%)、および生物活性に対するIMA-026エアロゾル化の効果を調べた。この実験のデータは、下の表10に示している。

【0105】

【表10】

表10

	% HMW	回収率(%)*	生物活性 (U/mg)
プレ噴霧化	0.13	100.0	6.40 E+07
噴霧する-Tweenなし	0.13	76.0	7.30 E+07
噴霧する-Tweenあり	0.14	81.3	6.08 E+07

* = SEC-HPLCによる

表10から分かるように、IMA-026のプレおよびポスト噴霧化特性は、Tweenの有無とは関係なく、ほぼ類似している。したがって、IMA-026はエアロゾル製剤として適切である。

20

他の実施態様

30

本発明は、その詳細な説明と併せて説明しているが、前述の説明は例示することを意図しており、本発明の範囲を限定するものではない。本発明の範囲は、添付した特許請求の範囲により規定されている。他の態様、利点、および変形例は、次の特許請求の範囲内にある。

【図1】

凍結乾燥した抗IL-13抗体IMMA-638の安定性
SEC-HPLCにより測定した高分子量種の%

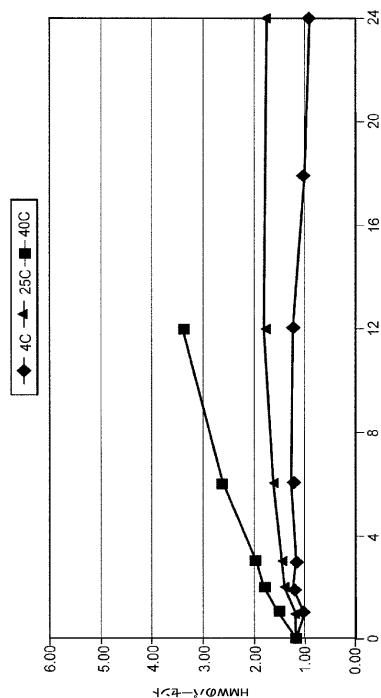


FIG. 1

【図2】

抗IL-13抗体IMMA-638の安定性
24ヶ月貯蔵中にアセイした生物活性

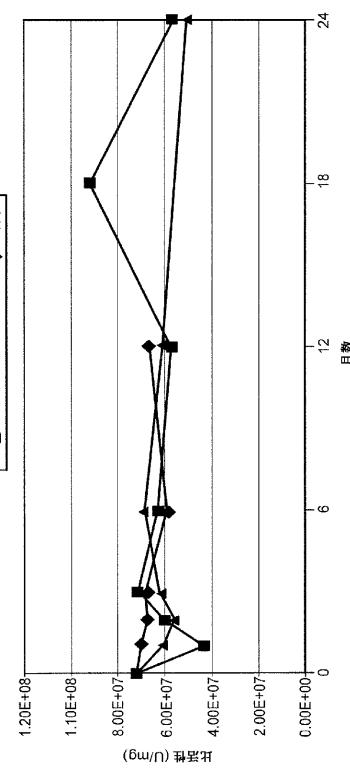


FIG. 2

【図3】

IMMA-638液体安定性試料における高分子量種のバーセント
SEC-HPLCにより測定した高分子量種の%

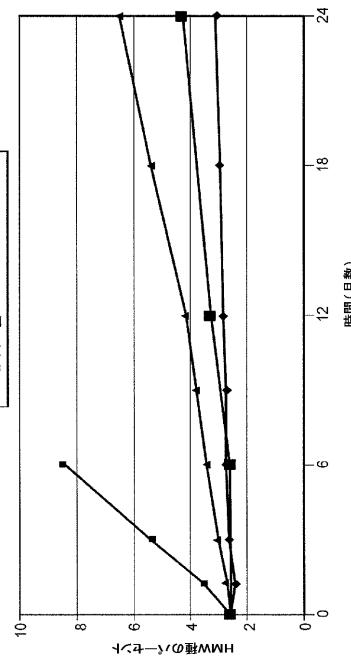


FIG. 3

【図4】

IMMA-638液体安定性試料における低分子量種のバーセント
SEC-HPLCにより測定した低分子量種の%

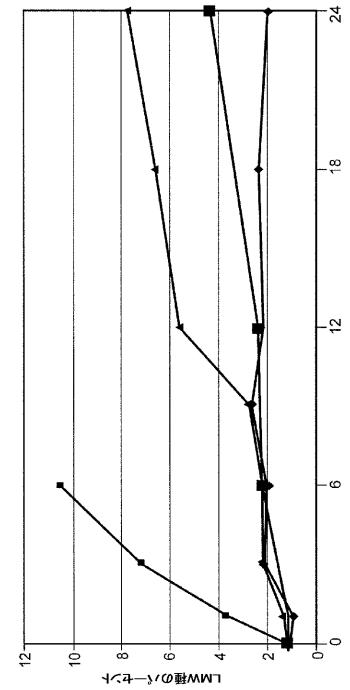


FIG. 4

【図5】

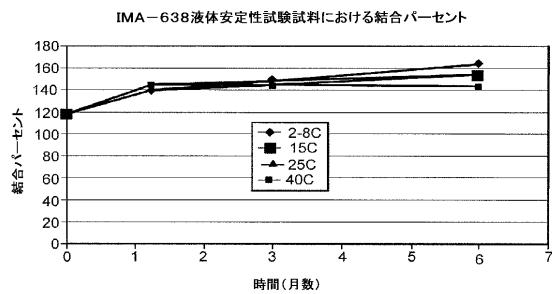


FIG. 5

【図6】

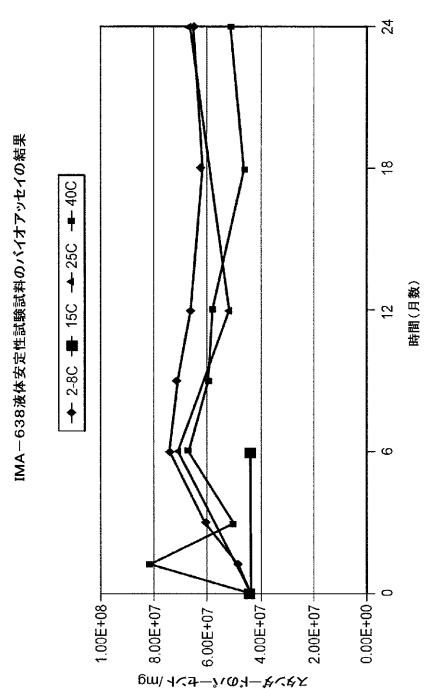


FIG. 6

【図7】

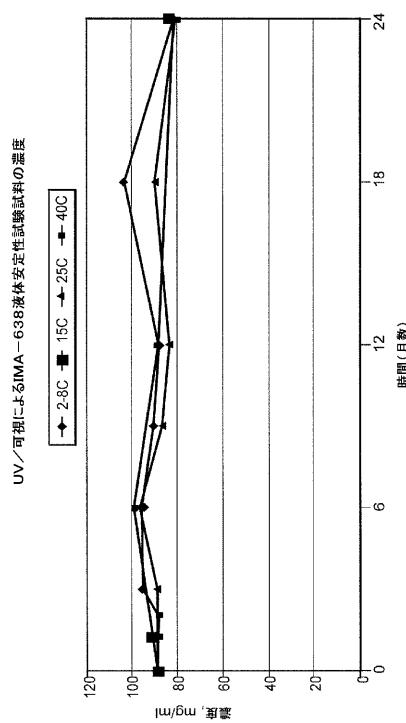


FIG. 7

【図8】

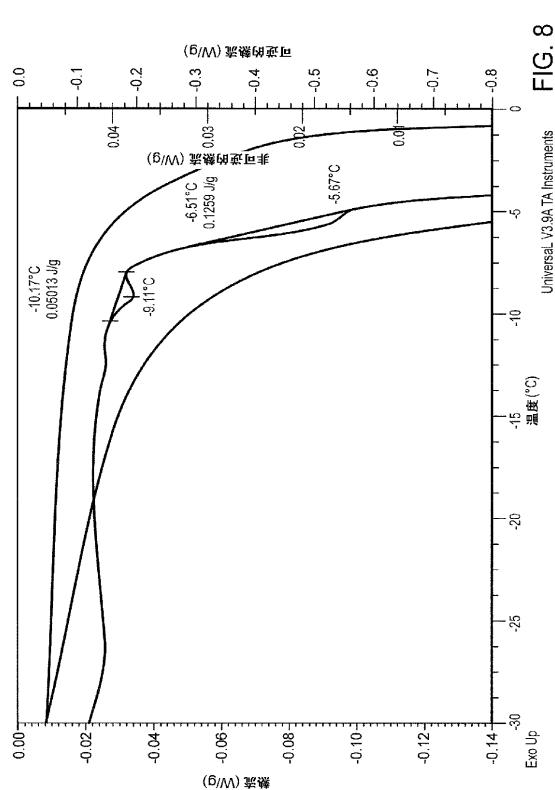
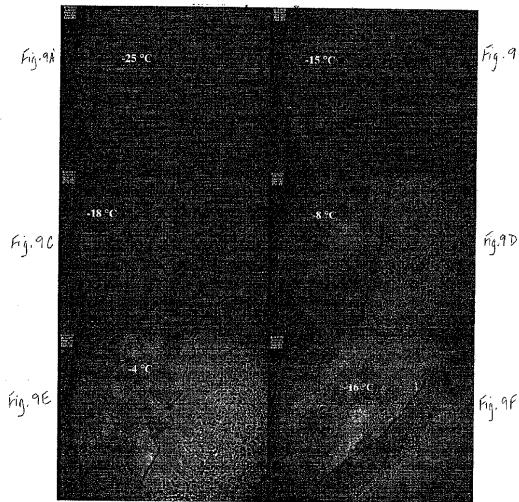
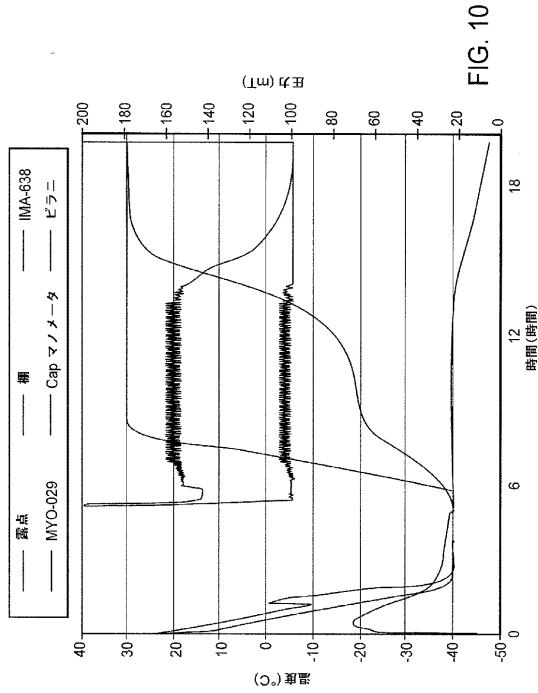


FIG. 8

【図 9 A - 9 F】



【図 10】



【図 11】

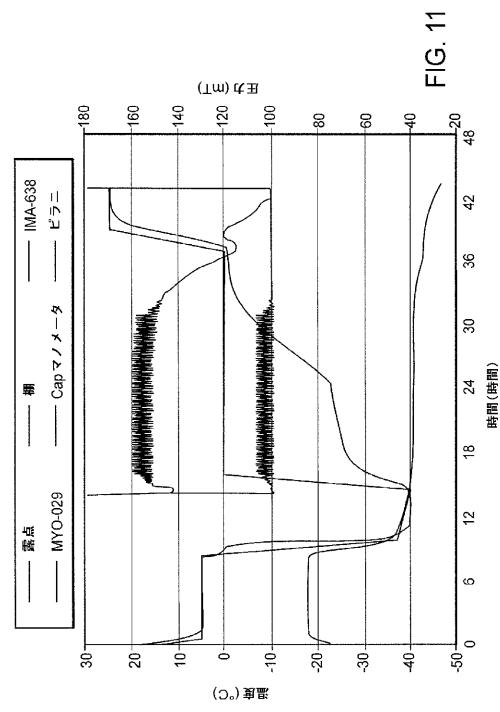


FIG. 11

【図 12】

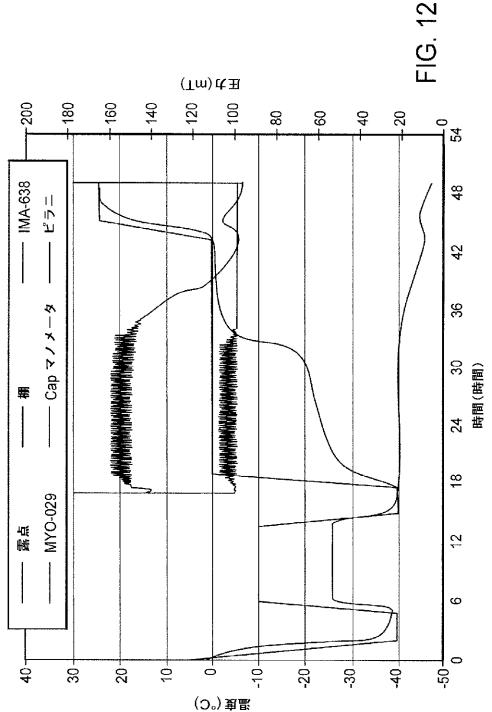


FIG. 12

【図 1 3】

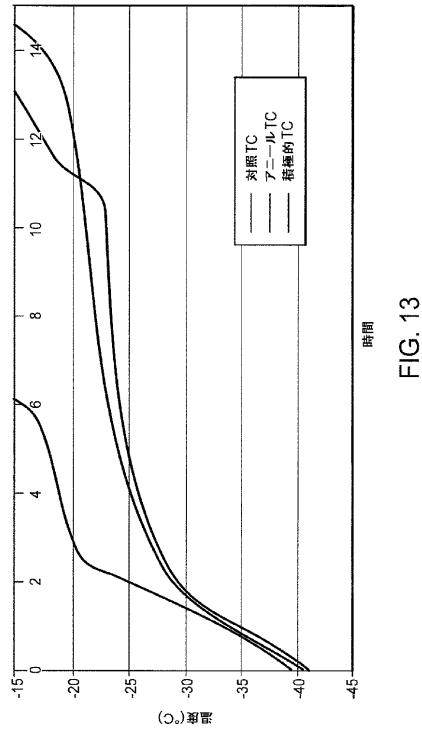


FIG. 13

【図 1 4】

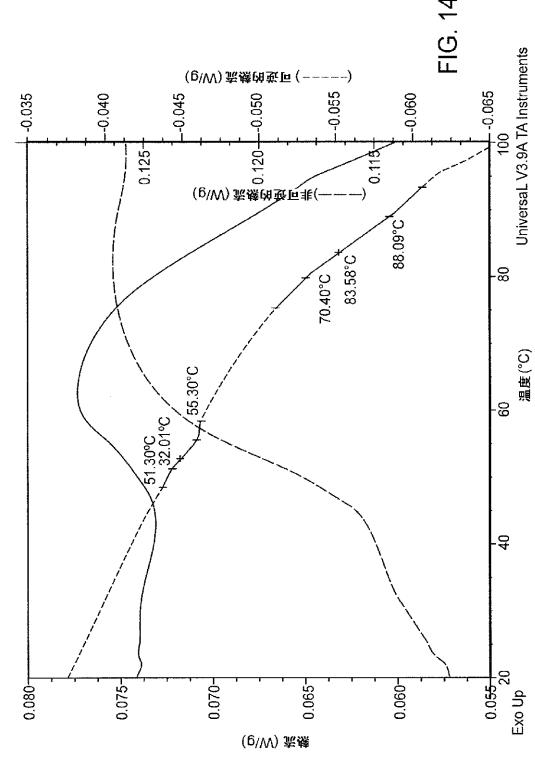


FIG. 14

【図 1 5】

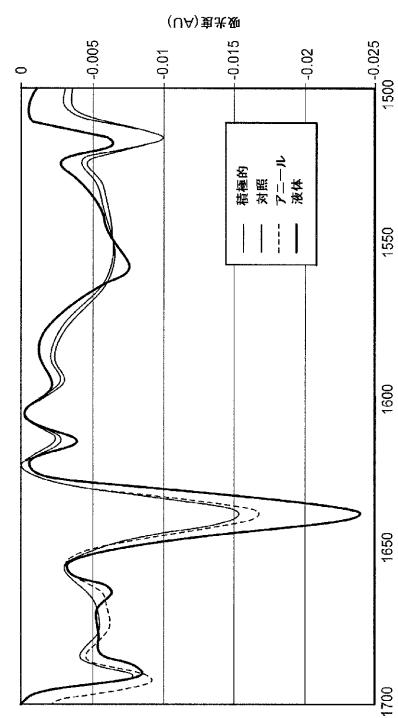


FIG. 15

【図 1 6】

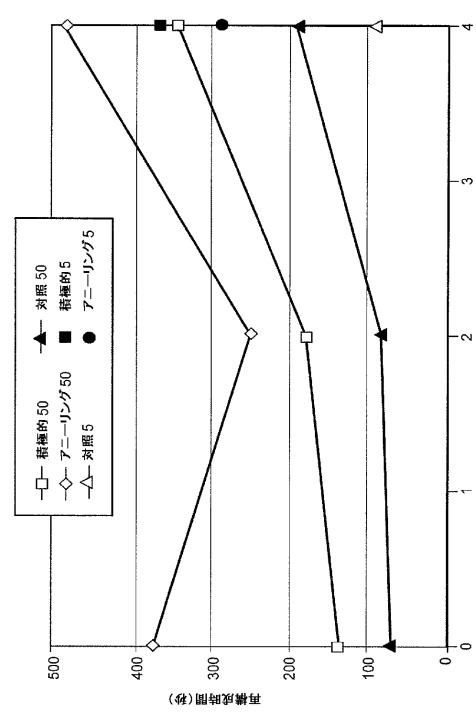


FIG. 16

【図17】

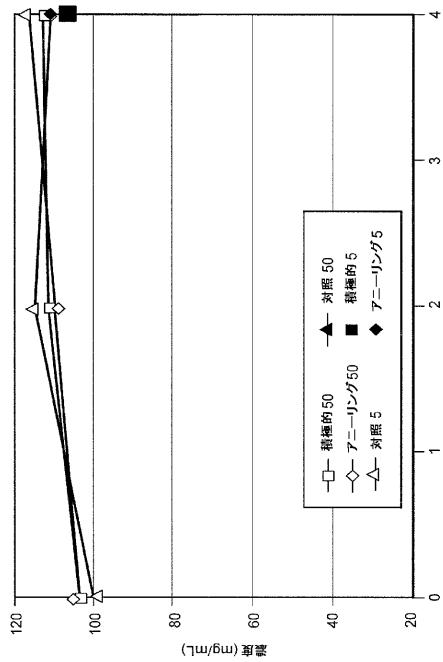


FIG. 17

【図18】

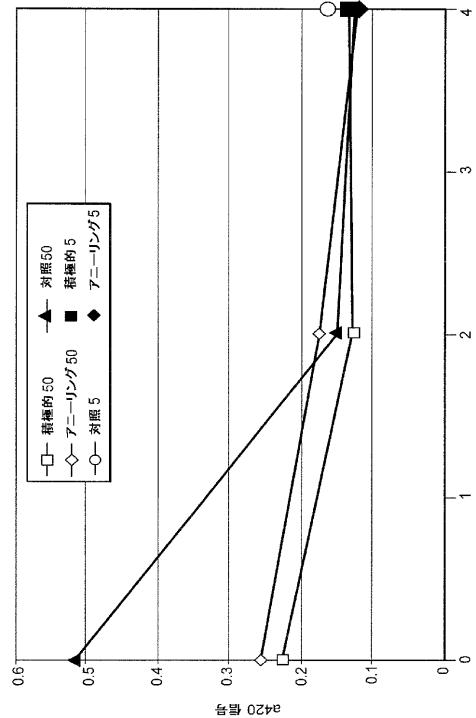


FIG. 18

【図19】

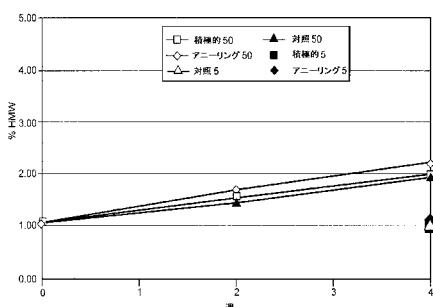


FIG. 19

【図20】

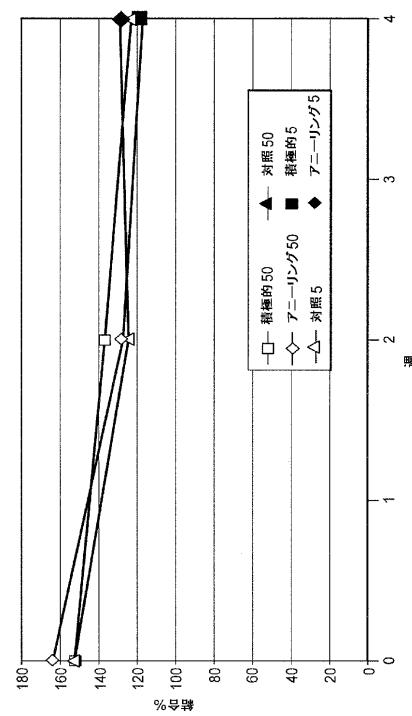


FIG. 20

【図21】

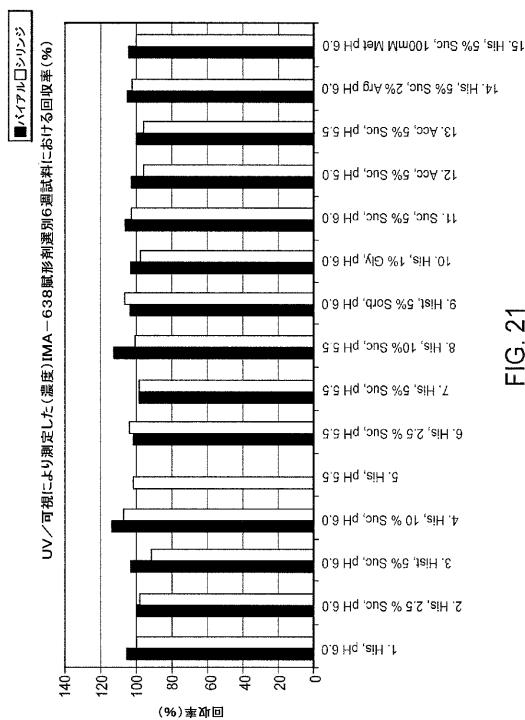


FIG. 21

【図22】

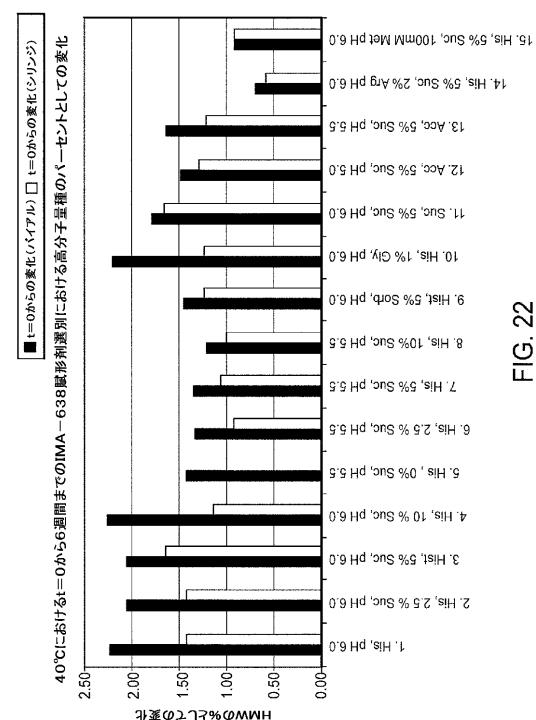


FIG. 22

【図23】

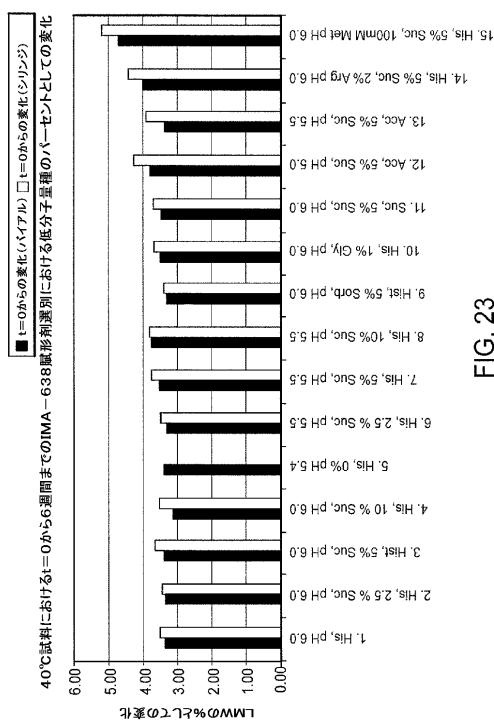


FIG. 23

【図24】

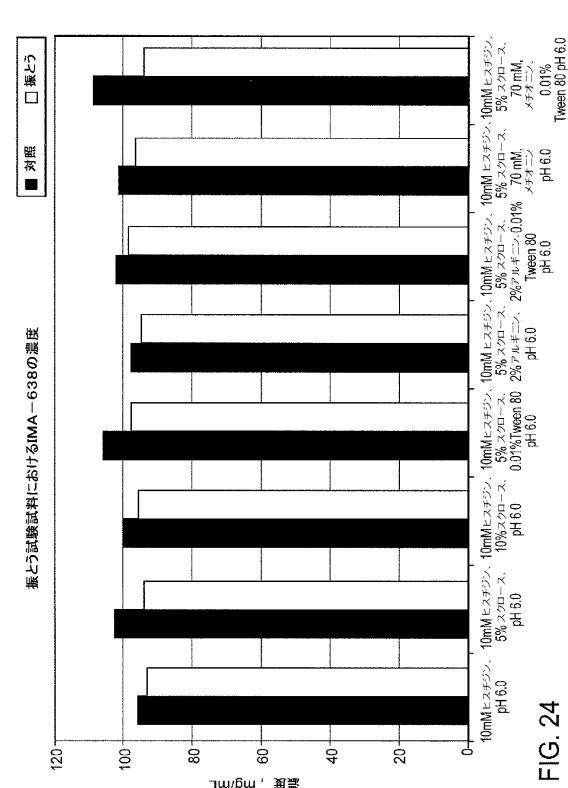


FIG. 24

【 図 25 】

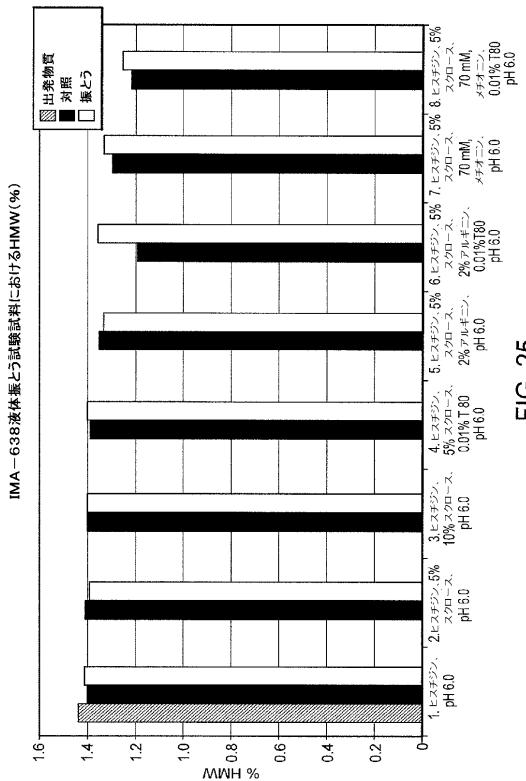


FIG. 25

【図27】

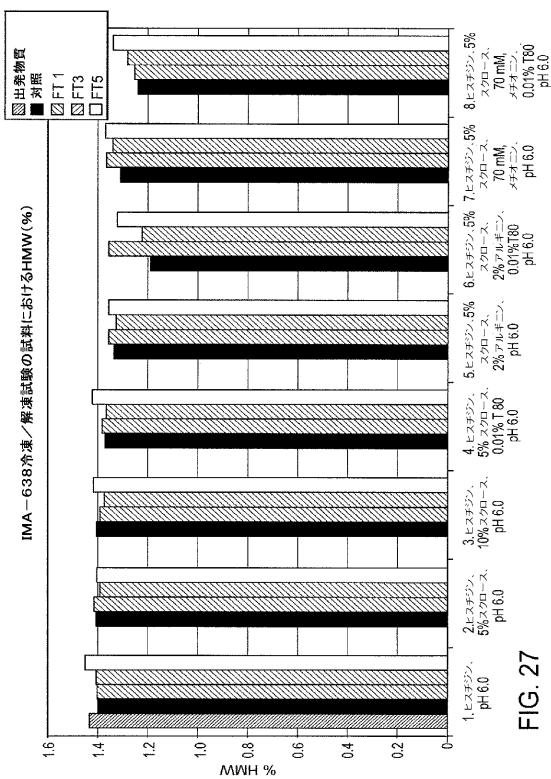


FIG. 27

【図26】

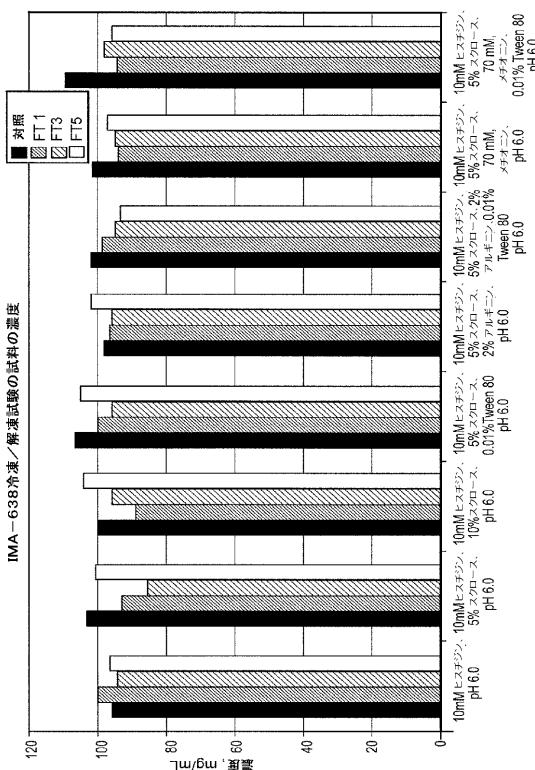


FIG. 26

【 図 2 8 】

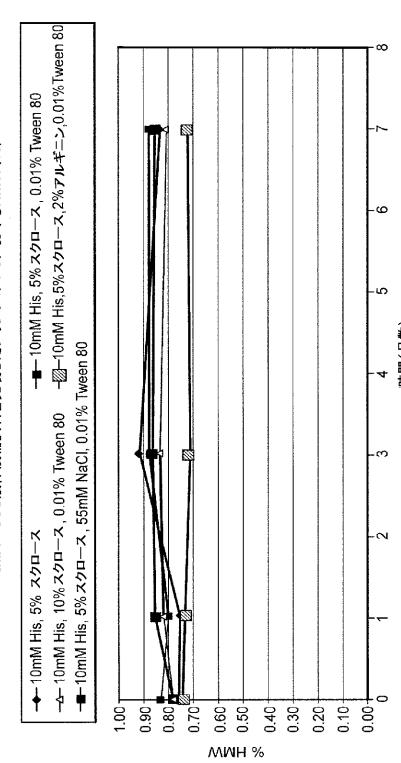


FIG. 28

【図29】

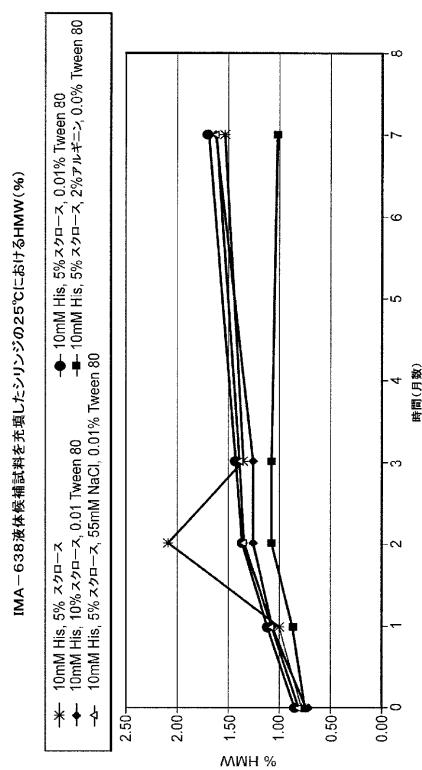


FIG. 29

【図30】

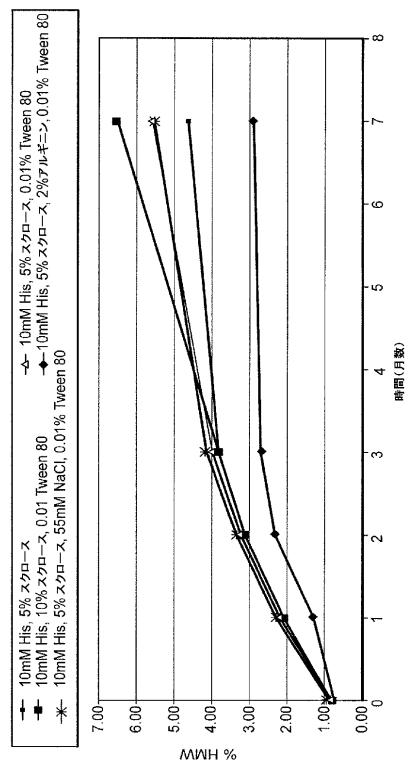


FIG. 30

【図31】

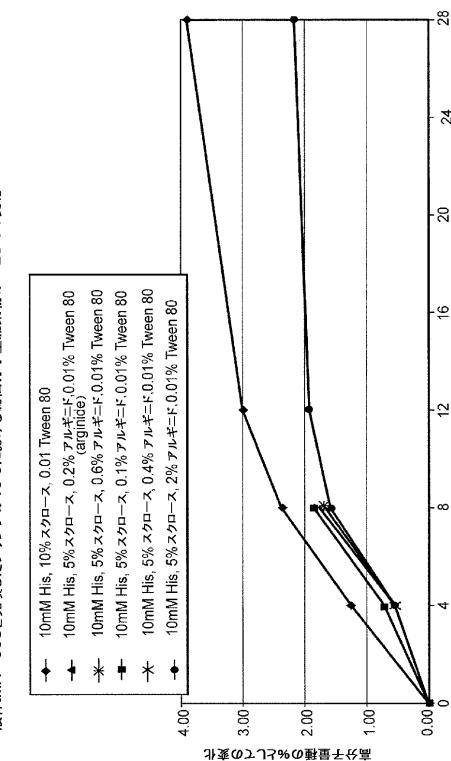


FIG. 31

【図32】

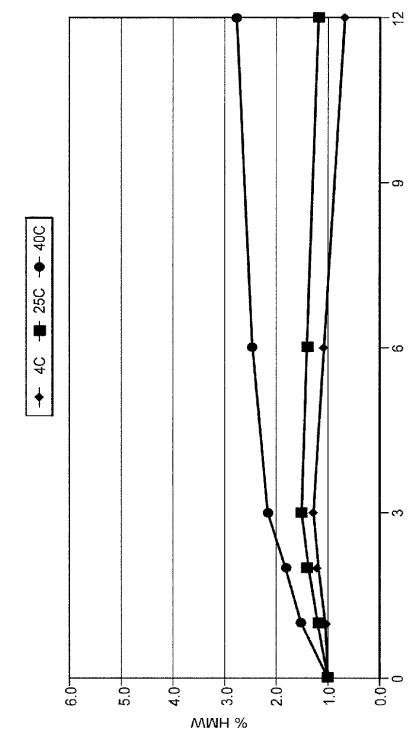


FIG. 32

【図 3 3】

凍結乾燥物再構成後のIMA-026安定性試験における生物活性

IMA-026
全長アミノ酸配列
IMA-026はヒト化抗IL-13抗体、ヒトIgG1 mut／カット／アイソ型である。

重鎖 -
可変領域フレームワークヒートIGHV3-1*02
IGKV3-1
IGKFRTISADNAKNSAYLQNMCSRAEDTAVYCCARSENWVDEDFYWGQGTLYTVSSASTV
IGPSVFLPFSKSISCGTAAGCLWDYPERFTVSWNSGALTSGVHTFAVLQSSGLYSLSVY
TVPSSELGIQTQYCNNEKPSNTKVDKVKVPEKSDKTHITCPCKPCPAPELAGAPSFLPPKPKDTLM
SRPEKTFVYVVDVSHDPEVKENWVYDGVFEVHAKTPREEQINSTYRUVSVSLTVLHODWLVNG
KEVYCKVSNKALAPPEKTISKAKGQREQFVYTLPSREEMTKAQVSLCLVKGFYPSDIAVENE
SNGOPENNYKTTIPVLDGSFLYSLKLTVDSKRWQQNVFSCSVVMHEALTHNHYIQKSLSLSPKG
[配列番号: 3]

アミノ酸配列

EVOLYESGGGLVQPGSQLRLSCAAGSGFIKOTYHWRQAPCKGLWGRIDPANDNIKYDP
IGKFRTISADNAKNSAYLQNMCSRAEDTAVYCCARSENWVDEDFYWGQGTLYTVSSASTV
IGPSVFLPFSKSISCGTAAGCLWDYPERFTVSWNSGALTSGVHTFAVLQSSGLYSLSVY
TVPSSELGIQTQYCNNEKPSNTKVDKVKVPEKSDKTHITCPCKPCPAPELAGAPSFLPPKPKDTLM
SRPEKTFVYVVDVSHDPEVKENWVYDGVFEVHAKTPREEQINSTYRUVSVSLTVLHODWLVNG
KEVYCKVSNKALAPPEKTISKAKGQREQFVYTLPSREEMTKAQVSLCLVKGFYPSDIAVENE
SNGOPENNYKTTIPVLDGSFLYSLKLTVDSKRWQQNVFSCSVVMHEALTHNHYIQKSLSLSPKG
[配列番号: 6]

KABAT

VH CDR1 DTYIH [配列番号: 5]
VH CDR2 RDPANDNIKYDKFROG [配列番号: 6]
VH CDR3 SEENWYDFFDY [配列番号: 7]

FIG. 35A

FIG. 35A
FIG. 35B

IMA-026
全長アミノ酸配列
IMA-026はヒト化抗IL-13抗体、ヒトIgG1 mut／カット／アイソ型である。

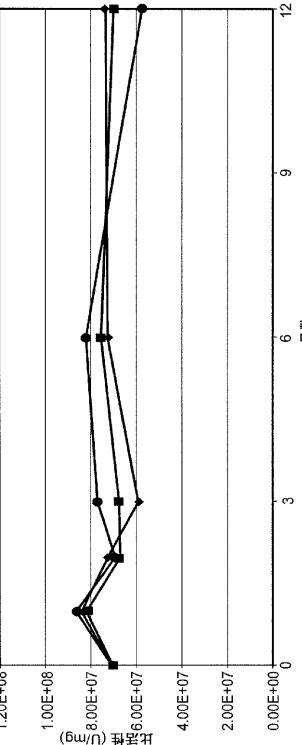


FIG. 33

【図 3 5 B】

IMGT ライブシステム
VH CDR1 GENEKDTY [配列番号: 8]
VH CDR2 IDPANDNI [配列番号: 9]
VH CDR3 SEENWYDFFDY [配列番号: 10]

軽鎖
可変領域フレームワークヒートIGKV3-1*39*01
KABAT 矢印: 基づいて推察されたCDR1下線を引いた。マウスのモノクローナル抗体から導かれた。
KABAT 常部 ヒト化抗IL-13抗体

FIG. 35B

IMGT ライブシステム
VL CDR1 RSSOSIVHSNGNTYLE [配列番号: 14]
VL CDR2 KYNMRIS [配列番号: 12]
VL CDR3 FGSHIPVT [配列番号: 13]

FIG. 35B

IMA-638の軽鎖および重鎖の予測アミノ酸配列
IMA-638
重鎖 -
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESYAMSVAWQARQKGLWVASSSGGNTYYPDSVKGRTFIS
GDNKANSILYQMSNRAEDIAYVYCARLDGYVYVWVNSGALTSGVHTFAYLQVQGLSYLSSSVTVPSLGLQTQTCVNHIKPS
GTAALGCLVYKDVPFPEPVTVWNSGALTSGVHTFAYLQVQGLSYLSSSVTVPSLGLQTQTCVNHIKPS
NTKVDKCKVPEKSDKTHITCPCKPCPAPELAGAPSFLVPPKPKDTLMISRPETVCTVWVSHDPEVKENW
YDGVGEVHNAAKTKPREGQVNTSYRUVSVLHDDWLNKEVYCKCYSNKALAPIECTISLAKGQPRE
POVYTLPSPREMTKNOVSLLTCKVGFYPSDIAVEWSNGOPENNYKTIPLVLDSDGSFLYSLKLTVDS
RNWQGNNYFSCSYMHEAHNHYTKSLSI.SPOK [配列番号: 1]

軽鎖
DIOMTOSSPLASVGDRVTICKAKASESDVNTYKGLMHWYQOKPGKAPKLITYRASNLESQPSRSQGV
PSRFQSGGTIDPLTILLSQPEFTAYYCFQSHPTFCGGTKEVRVRAAPSVFIFPSDEQ
LKGSTASVCLNNFTYPEREAKVQWKVTDNALQSGNQESVTEQSKDSTYSLSLTSLSKADYEFKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [配列番号: 2]

KSFNRGEC [配列番号: 2]

Fc-エフェクター機能を下げる2つの突然変異残基は、下線により示され
N-結合型クリシル化センサ配列は太字でキタバシにより示される。

FIG. 34

JP 5419709 B2 2014.2.19

【配列表】

0005419709000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 61 K 47/34 (2006.01) A 61 K 47/34
A 61 K 9/70 (2006.01) A 61 K 9/70 401

- (72)発明者 バリー, アンソニー ビー。
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01890, ウィンチェスター, ミスティック アベニュー
ユ- 29
- (72)発明者 クローリー, トマス ジェイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01887, ウィルミントン, ガーデン アベニュー
20
- (72)発明者 ディクソン, ダニエル エー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02476, アーリントン, サンセット ロード 11
8
- (72)発明者 ソレー, エリン クリストイン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01852, ローウェル, イースト メリマック スト
リート 408, アパートメント 2

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 国際公開第2006/085938 (WO, A1)
国際公開第2004/055164 (WO, A1)
特表2002-504907 (JP, A)
特表平11-510170 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 39/395
A 61 K 9/00 - 9/72
A 61 K 47/00 - 47/48
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)