

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5840364号  
(P5840364)

(45) 発行日 平成28年1月6日(2016.1.6)

(24) 登録日 平成27年11月20日(2015.11.20)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34

請求項の数 88 (全 177 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-536208 (P2010-536208)	(73) 特許権者	505086495
(86) (22) 出願日	平成20年11月28日(2008.11.28)		アッヴィ バイオテクノロジー リミテッド
(65) 公表番号	特表2011-518110 (P2011-518110A)		イギリス領バミューダ諸島 ハミルトン
(43) 公表日	平成23年6月23日(2011.6.23)		エイチ エム 11 チャーチ ストリート 2 クラレンドン ハウス
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/085066	(74) 代理人	110001173
(87) 国際公開番号	W02009/073569		特許業務法人川口国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成21年6月11日(2009.6.11)	(72) 発明者	フラウンホーファー、ボルフガング
審査請求日	平成23年11月25日(2011.11.25)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01545、シユルズベリー、ジョン・ストリート・5
(31) 優先権主張番号	61/004, 992		
(32) 優先日	平成19年11月30日(2007.11.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質製剤及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アダリムマブ及び水を含む水性製剤であって、前記製剤は 2 . 5 m S / c m 未満の伝導度を有し、かつ前記アダリムマブの濃度は少なくとも 3 0 m g / m L である水性製剤。

【請求項 2】

製剤が 2 m S / c m 未満の伝導度を有する、請求項 1 の製剤。

【請求項 3】

製剤が 1 . 5 m S / c m 未満の伝導度を有する、請求項 1 の製剤。

【請求項 4】

製剤が 1 m S / c m 未満の伝導度を有する、請求項 1 の製剤。

10

【請求項 5】

製剤が 0 . 5 m S / c m 未満の伝導度を有する、請求項 1 の製剤。

【請求項 6】

アダリムマブの濃度が少なくとも 5 0 m g / m L である、請求項 1 の製剤。

【請求項 7】

アダリムマブの濃度が 5 0 m g / m L である請求項 1 の製剤。

【請求項 8】

アダリムマブの濃度が少なくとも 1 0 0 m g / m L である、請求項 1 の製剤。

【請求項 9】

アダリムマブの濃度が 1 0 0 m g / m L である、請求項 1 の製剤。

20

## 【請求項10】

アダリムマブの濃度が少なくとも150 mg/mLである、請求項1の製剤。

## 【請求項11】

アダリムマブの濃度が150 mg/mLである、請求項1の製剤。

## 【請求項12】

アダリムマブの濃度が少なくとも200 mg/mLである、請求項1の製剤。

## 【請求項13】

アダリムマブの濃度が200 mg/mLである、請求項1の製剤。

## 【請求項14】

アダリムマブの濃度が200 mg/mLより大きい、請求項1の製剤。

10

## 【請求項15】

少なくとも50 mg/mLの濃度のアダリムマブ及び水を含む水性製剤であって、前記製剤は、30 mOsmol/kg以下の浸透圧を有する水性製剤。

## 【請求項16】

製剤の浸透圧が15 mOsmol/kg以下である、請求項15の製剤。

## 【請求項17】

アダリムマブの濃度は少なくとも100 mg/mLである、請求項15の製剤。

## 【請求項18】

アダリムマブの濃度が50 mg/mLである、請求項15の製剤。

## 【請求項19】

アダリムマブの濃度が100 mg/mLである、請求項15の製剤。

20

## 【請求項20】

アダリムマブの濃度が少なくとも150 mg/mLである、請求項15の製剤。

## 【請求項21】

アダリムマブの濃度が150 mg/mLである、請求項15の製剤。

## 【請求項22】

アダリムマブの濃度が少なくとも200 mg/mLである、請求項15の製剤。

## 【請求項23】

アダリムマブの濃度が200 mg/mLである、請求項15の製剤。

## 【請求項24】

アダリムマブの濃度が200 mg/mLより大きい、請求項15の製剤。

30

## 【請求項25】

水及び少なくとも20 mg/mLのアダリムマブを含む水性製剤であって、前記抗体アダリムマブの水力学的直径( $D_h$ )は、緩衝化された溶液中のアダリムマブの $D_h$ より少なくとも50%小さく、緩衝化された溶液中のアダリムマブの濃度は、水性製剤中のアダリムマブの濃度と同じである、水性製剤。

## 【請求項26】

アダリムマブの $D_h$ が、リン酸緩衝化された生理的食塩水(PBS)中のアダリムマブの $D_h$ より少なくとも50%小さい、請求項25の製剤。

## 【請求項27】

アダリムマブの $D_h$ が、PBS中のアダリムマブの $D_h$ より少なくとも60%小さい、請求項26の製剤。

40

## 【請求項28】

アダリムマブの $D_h$ が、PBS中の前記アダリムマブの $D_h$ より少なくとも70%小さい、請求項26の製剤。

## 【請求項29】

少なくとも20 mg/mLの濃度のアダリムマブ及び水を含み、前記アダリムマブが4 nm未満の水力学的直径( $D_h$ )を有する、水性製剤。

## 【請求項30】

アダリムマブが3 nm未満の $D_h$ を有する、請求項29の製剤。

50

## 【請求項 3 1】

非イオン性の賦形剤をさらに含む、請求項 1 から 3 0 の何れか一項の製剤。

## 【請求項 3 2】

非イオン性の賦形剤がポリオール、非イオン性界面活性剤、ショ糖、トレハロース、ラフィノース及びマルトースからなる群から選択される、請求項 3 1 の製剤。

## 【請求項 3 3】

非イオン性界面活性剤がポリソルベート 2 0、ポリソルベート 4 0、ポリソルベート 6 0 又はポリソルベート 8 0 である、請求項 3 2 の製剤。

## 【請求項 3 4】

製剤が液体形態で少なくとも 3 ヶ月間安定である、請求項 1 から 3 0 の何れか一項の製剤。 10

## 【請求項 3 5】

製剤が液体形態で少なくとも 1 2 ヶ月間安定である、請求項 1 から 3 0 の何れか一項の製剤。

## 【請求項 3 6】

製剤が、凍結、凍結乾燥又は噴霧乾燥からなる群から選択される形態で、少なくとも 3 ヶ月間安定である、請求項 1 から 3 0 の何れか一項の製剤。

## 【請求項 3 7】

製剤が浸透圧修飾剤、安定化剤、界面活性剤、抗酸化剤、凍結保護剤、充填剤、凍結乾燥保護剤、塩基性成分及び酸性成分からなる群から選択される因子を含まない、請求項 1 から 3 0 の何れか一項の製剤。 20

## 【請求項 3 8】

少なくとも 1 つのさらなる別個のタンパク質をさらに含む、請求項 1 から 3 0 の何れか一項の製剤。

## 【請求項 3 9】

インビトロでの使用に適している、請求項 1 から 3 0 の何れか一項の製剤。

## 【請求項 4 0】

インビボでの使用に適している、請求項 1 から 3 0 の何れか一項の製剤。

## 【請求項 4 1】

皮下、静脈内、吸入、皮内、経皮、腹腔内及び筋肉内投与からなる群から選択される投与の様式を介して、対象に投与するのに適している、請求項 4 0 の製剤。 30

## 【請求項 4 2】

請求項 1 から 3 0 の何れか一項の製剤を含む装置。

## 【請求項 4 3】

注射器、ペン、インプラント、無針注入装置、吸入装置及びパッチからなる群から選択される、請求項 4 2 の装置。

## 【請求項 4 4】

請求項 1 から 3 0 の何れか一項の製剤を含む製品。

## 【請求項 4 5】

a) アダリムマブを含む、透析ろ過に供される第 1 の溶液を準備すること、及び 40  
b) アダリムマブの水性製剤を調製するために、少なくとも 5 倍の容積の水との交換が達成されるまで、透析ろ過溶媒として水を使用する透析ろ過に前記第 1 の溶液を供すること、  
を含む、アダリムマブ及び水を含む水性製剤を調製する方法。

## 【請求項 4 6】

a) アダリムマブを含む、透析ろ過に供される第 1 の溶液を準備すること；  
b) 透析ろ過されたアダリムマブ溶液を調製するために、少なくとも 5 倍の容積の水との交換が達成されるまで、透析ろ過溶媒として水を使用する透析ろ過に前記第 1 の溶液を供すること、及び

c) アダリムマブの水性製剤を調製するために、透析ろ過されたアダリムマブ溶液を濃 50

縮すること、  
を含む、アダリムマブの水性製剤を調製する方法。

【請求項 47】

透析ろ過されたアダリムマブ溶液の濃縮が遠心を介して達成される、請求項 46 の方法。

【請求項 48】

透析ろ過溶媒が水からなる、請求項 45 から 47 の何れか一項の方法。

【請求項 49】

少なくとも 6 倍の容積交換が達成されるまで、第 1 の溶液が水との透析ろ過に供される、請求項 45 から 47 の何れか一項の方法。

10

【請求項 50】

少なくとも 7 倍の容積交換が達成されるまで、第 1 の溶液が水との透析ろ過に供される、請求項 45 から 47 の何れか一項の方法。

【請求項 51】

水性製剤が、第 1 の溶液より少なくとも 95% 低い賦形剤の最終濃度を有する、請求項 45 から 47 の何れか一項の方法。

【請求項 52】

水性製剤が、第 1 の溶液より少なくとも 99% 低い賦形剤の最終濃度を有する、請求項 45 から 47 の何れか一項の方法。

【請求項 53】

最初のアダリムマブ溶液が、哺乳動物の細胞発現系から得られ、及び宿主細胞タンパク質 (HCP) を除去するために精製されている、請求項 45 から 47 の何れか一項の方法。

20

【請求項 54】

賦形剤を水性製剤に添加することをさらに含む、請求項 45 から 47 の何れか一項の方法であって、該水性製剤の伝導度が 2.5 mS/cm 未満である、方法。

【請求項 55】

水性製剤が医薬製剤である、請求項 54 の方法。

【請求項 56】

水性製剤が医薬製剤である、請求項 45 から 47 の何れか一項の方法。

30

【請求項 57】

水性製剤を対象に投与するのに適した装置中に水性製剤を搭載することをさらに含む、請求項 56 の方法。

【請求項 58】

装置が注射器、ペン、インプラント及び皮膚パッチからなる群から選択される、請求項 57 の方法。

【請求項 59】

水性製剤が少なくとも 2 つの異なるタンパク質を含む、請求項 45 から 47 の何れか一項の方法。

【請求項 60】

非イオン性の賦形剤がポリオールである、請求項 31 の製剤。

40

【請求項 61】

ポリオールがマンニトール又はソルビトールである請求項 60 の製剤。

【請求項 62】

ポリオールがマンニトールである請求項 61 の製剤。

【請求項 63】

非イオン性の賦形剤が、非イオン性界面活性剤である請求項 31 の製剤。

【請求項 64】

非イオン性界面活性剤がポリソルベート 80 である請求項 63 の製剤。

【請求項 65】

50

非イオン性の賦形剤が、シヨ糖である請求項 31 の製剤。

【請求項 66】

マンニトール及びポリソルベート 80 をさらに含む請求項 1 から 30 の何れか一項の製剤。

【請求項 67】

シヨ糖及びポリソルベート 80 をさらに含む請求項 1 から 30 の何れか一項の製剤。

【請求項 68】

マンニトール、ポリソルベート 80、少なくとも  $20 \text{ mg/mL}$  の濃度のアダリムマブ、及び水を含む水性製剤であって、 $2.5 \text{ mS/cm}$  未満の伝導度を有する水性製剤。

【請求項 69】

$1.0 \text{ mS/cm}$  未満の伝導度を有する請求項 68 の製剤。

【請求項 70】

$0.5 \text{ mS/cm}$  未満の伝導度を有する請求項 68 の製剤。

【請求項 71】

抗体の濃度が少なくとも  $50 \text{ mg/mL}$  である請求項 68 の製剤。

【請求項 72】

アダリムマブの濃度が  $50 \text{ mg/mL}$  である請求項 68 の製剤。

【請求項 73】

アダリムマブの濃度が  $100 \text{ mg/mL}$  である請求項 68 の製剤。

【請求項 74】

マンニトール、ポリソルベート 80、少なくとも  $20 \text{ mg/mL}$  の濃度のアダリムマブ、及び水を含む水性製剤であって、該アダリムマブの水力学的直径 ( $D_h$ ) は、緩衝化された溶液中におけるアダリムマブの  $D_h$  より少なくとも  $50\%$  小さい水力学的直径 ( $D_h$ ) を有する製剤であって、緩衝化された溶液中のアダリムマブの濃度は、水性製剤に含まれるアダリムマブの濃度と同じである、水性製剤。

【請求項 75】

アダリムマブの  $D_h$  が、リン酸緩衝化された生理的食塩水 (PBS) 溶液中におけるアダリムマブの  $D_h$  より少なくとも  $50\%$  小さい水力学的直径 ( $D_h$ ) を有する請求項 74 の製剤。

【請求項 76】

アダリムマブの  $D_h$  が、リン酸緩衝化された生理的食塩水 (PBS) 溶液中におけるアダリムマブの  $D_h$  より少なくとも  $60\%$  小さい水力学的直径 ( $D_h$ ) を有する請求項 75 の製剤。

【請求項 77】

アダリムマブの  $D_h$  が、リン酸緩衝化された生理的食塩水 (PBS) 溶液中におけるアダリムマブの  $D_h$  より少なくとも  $70\%$  小さい水力学的直径 ( $D_h$ ) を有する請求項 76 に記載の製剤。

【請求項 78】

製剤及び緩衝化された溶液におけるアダリムマブの濃度が少なくとも  $50 \text{ mg/mL}$  である請求項 74 の製剤。

【請求項 79】

製剤及び緩衝化された溶液におけるアダリムマブの濃度が  $50 \text{ mg/mL}$  である請求項 74 の製剤。

【請求項 80】

製剤及び緩衝化された溶液におけるアダリムマブの濃度が  $100 \text{ mg/mL}$  である請求項 74 の製剤。

【請求項 81】

マンニトール、ポリソルベート 80、少なくとも  $20 \text{ mg/mL}$  の濃度のアダリムマブ、及び水を含む水性製剤であって、アダリムマブの水力学的直径 ( $D_h$ ) が  $4 \text{ nm}$  より小さい製剤。

10

20

30

40

50

## 【請求項 8 2】

アダリムマブの水力学的直径 ( $D_h$ ) が 3 nm より小さい請求項 8 1 の製剤。

## 【請求項 8 3】

抗体の濃度が少なくとも 50 mg / mL である請求項 8 1 の製剤。

## 【請求項 8 4】

アダリムマブの濃度が 50 mg / mL である請求項 8 1 の製剤。

## 【請求項 8 5】

抗体の濃度が少なくとも 100 mg / mL である請求項 8 1 の製剤。

## 【請求項 8 6】

アダリムマブの濃度が 100 mg / mL である請求項 8 1 の製剤。

10

## 【請求項 8 7】

請求項 6 8、7 4 及び 8 1 のいずれか一つの製剤を含む装置。

## 【請求項 8 8】

請求項 6 8、7 4 及び 8 1 のいずれか一つの製剤を含む製品。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(関連出願)

本願は、2007年11月30日に出願された米国仮出願 61 / 004992号の優先権の利益を主張する。優先出願の内容は、参照により、本明細書に組み込まれる。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

(発明の背景)

医薬タンパク質製剤の基本原則は、ある種の不安定性を克服しなければならないことである。タンパク質の分解経路は2つの異なるクラスに分けることが可能であり、化学的不安定性と物理的不安定性が含まれる。化学的不安定性は、結合形成又は切断を通じて、タンパク質の修飾をもたらす。化学的不安定性の問題の例には、脱アミド化、ラセミ化、加水分解、酸化、脱離及びジスルフィド交換が含まれる。他方、物理的不安定性は、タンパク質中の共有的变化をもたらさない。むしろ、物理的不安定性は、タンパク質の高次構造(二次及びそれ以上)の変化を伴う。これらには、変性、表面への吸着、凝集及び沈降が含まれる(Manning et al., Pharm. Res., 6, 903 (1989))。

30

## 【0003】

医薬タンパク質製剤の商業的実現性及び効果に対して多大な影響を与え得るこれらの不安定性は、製剤中に追加分子を含めることによって克服できることが一般に認められている。タンパク質の安定性は、タンパク質を安定に、可溶性に及び凝集しないように保つために、溶液中のタンパク質と相互作用する賦形剤を含めることによって改善することができる。例えば、塩化合物及び他のイオン性の種は、タンパク質製剤への極めて一般的な添加物である。これらは、非特異的な様式でタンパク質に結合し、熱的安定性を増加させることによって、タンパク質の変性と戦う上での補助を行う。塩化合物(例えば、NaCl、KCl)は、凝集及び沈殿と戦うために、市販のインシュリン調製物中で首尾よく使用されてきた(既出、911)。アミノ酸(例えば、ヒスチジン、アルギニン)は、製剤添加物として使用したときに、タンパク質の二次構造の変化を低減することが示されている(Tian et al., Int'l J. Pharm., 355, 20 (2007))。一般的に使用される添加物の他の例には、グリセロール及び糖などのポリアルコール材料並びに洗浄剤などの界面活性剤(非イオン性(例えば、Tween、Pluronic)及び陰イオン性(ドデシル硫酸ナトリウム)の両方)が含まれる。全ての市販の液体タンパク質製剤中にほぼ一貫して添加物が存在することは、このような化合物を持たないタンパク質溶液が不安定性に起因する分解に伴う問題に遭遇し得ることを示唆している。

40

## 【0004】

50

タンパク質製剤の第一の最終目標は、医薬タンパク質薬の許容可能な保存寿命を保証するために、医薬的に活性な原型状態の形態にある所定のタンパク質の安定性を長期間にわたって維持することである。しかしながら、溶液中のタンパク質の安定性及び溶解性を維持することは、添加物が治療薬の中に含まれている医薬製剤においては特に困難である。現在のところ、生物製剤は、タンパク質の安定性を維持するために、追加の賦形剤を必要とする。典型的には、液体医薬製剤は、安定性のために複数の添加物を含有する。例えば、ヒト成長ホルモンであるNorditropin Simplex X<sup>(R)</sup>の患者による自己投与用の液体製剤は、このホルモンを安定化させるために、添加物マニトール（糖アルコール）、ヒスチジン及びポロキサマー188（界面活性剤）を含有する。

【0005】

医薬添加物は、可溶性で、無毒である必要があり、特定の治療用タンパク質に対して安定化効果を付与する特定の濃度で使用する必要がある。添加物の安定化効果はタンパク質及び濃度依存性であるので、医薬製剤中での使用が検討されている各添加物が不安定性を引き起こさず、又は製剤の化学的若しくは物理的構成に対して他の有害な効果を有さないことを確保するために、各添加物は慎重に検査しなければならない。タンパク質を安定化させるために使用される成分は、時間とともにタンパク質の安定性に伴う問題又は保存中の環境の変化に際するタンパク質の安定性に伴う問題を引き起こし得る。

【0006】

典型的には、長い保存寿命は、（例えば、-80℃で）凍結された形態でタンパク質を保存することによって、又はタンパク質を凍結乾燥プロセスに供することによって、すなわち、凍結乾燥された形態でタンパク質を保存することによって達成され、使用直前に再構成工程を必要とするので、患者の利便性に関して著しい欠点をもたらす。しかしながら、保存のためにタンパク質製剤を凍結させることは、タンパク質及び添加物の局所的高濃度をもたらし得、これは、製剤内のpH、分解及びタンパク質凝集の局所的な極端な状態を作出し得る。さらに、凍結及び融解のプロセスは、しばしば、タンパク質の安定性に影響を与えることが当業者に周知であり、凍結形態での医薬タンパク質の保存でさえ、凍結及び融解工程に起因する安定性の喪失が伴い得ることを意味する。また、凍結乾燥の第一のプロセス工程には、タンパク質の安定性に対して悪影響を及ぼし得る凍結が伴う。産業状況では、薬物物質製造の間（保持工程、保存、薬物製品充填仕上げにおけるタイミング及びバッチサイズの柔軟性を増大させるための再凍結及び再融解）及びその後の薬物製品充填仕上げ（凍結乾燥）の間の反復凍結融解処理に、医薬タンパク質を供し得る。タンパク質の不安定性現象に遭遇するリスクは、医薬タンパク質が遭遇する凍結融解サイクルの数が増加するにつれて増加することが周知であるので、反復された凍結融解処理にわたってタンパク質の安定性を維持する製剤条件を達成することは、困難な作業である。製剤中に望ましくない特性、特に、pH、浸透圧、密度又はタンパク質若しくは賦形剤濃度の勾配をもたらすことなく凍結及び融解することができる製剤に対する要望が生物医薬産業に存在する。

【0007】

しばしば、タンパク質を基礎とする医薬製品は、治療効果のために、高い濃度で製剤化する必要がある。より小容量での投薬を可能とし、患者の不快感を制限し、より経済的に梱包及び保存することを可能とするので、高度に濃縮されたタンパク質製剤は治療用途のために望ましい。しかしながら、高いタンパク質濃度の製剤の開発は、製造、安定性、分析、並びに、特に、治療用タンパク質に関して送達の困難性など多くの課題を提起する。例えば、タンパク質の凝集、不溶性及び分解に伴う困難さは、製剤中のタンパク質濃度が上昇するにつれて一般に増加する（概説として、Shire, S. J. et al., J. Pharm. Sci., 93, 1390 (2004) 参照）。添加物又はタンパク質のより低い濃度では、有益な効果を与えた添加物によって、以前には見られなかった有害な効果が引き起こされ得る。高濃度タンパク質製剤の製造は、乳白色、凝集及び沈殿に伴う顕著な問題をもたらし得る。非固有状態のタンパク質凝集及び粒状物形成の可能性に加えて、増大した粘度又は注射による送達を困難にする他の特性をもたらし得る可逆的な自己

10

20

30

40

50

会合が起こり得る。高い粘度は、ろ過アプローチによる高いタンパク質濃度の製造も困難にし得る。

【0008】

従って、一切の有害な副作用を限定させながら、タンパク質の安定性及び治療的な必要性を強化するために、医薬タンパク質製剤は、通例、成分及び濃度を慎重に釣り合わせる。生物製剤は、治療上の問題の可能性、保存の問題及び全体的な費用を低減させる賦形剤の特定量とともに、高い濃度でさえ安定なタンパク質を含むべきである。

【0009】

薬物分子として、タンパク質及び他の生物巨大分子が増大する関心を集めるにつれて、このような分子を送達するための製剤は、重要な問題となりつつある。治療用タンパク質の大規模製造における革命的な進歩にも関わらず、体内でのこれらの因子の効果的で便利な送達は、生物膜を通じた乏しい浸透性、巨大な分子サイズ、短い血漿半減期、自己会合、物理的及び化学的不安定性、凝集、吸着並びに免疫原性など、これらの因子に内在する物理化学的及び生物学的特性のために、大きな課題であり続けている。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Manning他、Pharm. Res. 6, 903, 1989年

【非特許文献2】Tian他、Int'l J. Pharm. 355, 20, 2007年

【非特許文献3】Shire, S. J. 他、J. Pharm. Sci., 93, 1390、2004年

20

【発明の概要】

【0011】

(発明の要旨)

本発明は、長期の液体保存又は凍結/融解及び凍結乾燥などの他の処理工程の間に、高い濃度においてさえ、水の中に製剤化されたタンパク質が溶解度及び安定性を維持するという驚くべき発見に向けられる。

【0012】

本発明は、水及びタンパク質(該タンパク質は、さらなる因子の必要なしに安定である。)を含む水性タンパク質製剤のための方法及び組成物に関する。具体的には、本発明の方法及び組成物は、透析ろ過溶媒として水を用いて、目的のタンパク質を含有する第1の溶液が透析ろ過される透析ろ過プロセスを基礎とする。このプロセスは、例えば、少なくとも所定容量の水との交換(例えば、5倍容量の交換)が存在するように行われる。本発明の方法を実施することによって、得られた水性製剤は、当初タンパク質溶液と比べて、賦形剤の総パーセントの著しい減少を有する。例えば、最初のタンパク質溶液と比べて、95から99%少ない賦形剤が水性製剤中に見出される。賦形剤の減少に関わらず、タンパク質は、高い濃度においてさえ、なお可溶性であり、その生物活性を保持する。一態様において、本発明の方法は、イオン性賦形剤などの追加成分を減少させながら、タンパク質の濃度の増加を含む組成物をもたらす。従って、水性製剤中のタンパク質の水力学的直径は、リン酸緩衝化された生理的食塩水(PBS)などの標準的な緩衝溶液中の同じタンパク質と比べてより小さい。

30

40

【0013】

本発明の製剤は、標準的な緩衝化された製剤に対して多くの利点を有する。一態様において、水性製剤は、高いタンパク質濃度(例えば、50から200mg/mL又はそれ以上)を含む。増大した濃度でさえ、あらゆるサイズのタンパク質を本発明の製剤中に含めることができる。タンパク質の高い濃度に関わらず、製剤は最小限の凝集を有し、高タンパク質製剤に予想され得る有害な効果なしに、様々な方法及び形態(例えば凍結)を用いて保存することができる。本発明の製剤は、溶液中のタンパク質を安定化させるために伝統的な製剤中で使用されている、例えば、界面活性剤及び緩衝系などの賦形剤を必要としない。イオン性賦形剤の低いレベルの結果、本発明の水性製剤は、低い伝導度、例えば、

50

2 m S / c m 未満を有する。本発明の方法及び組成物は、低い浸透圧、例えば、30 m O s m o l / k g 以下を有する水性タンパク質製剤も提供する。さらに、本明細書に記載されている製剤は、タンパク質の安定化のために必要とされる追加因子の欠如のために減少した免疫原性を有するので、標準的な製剤より好ましい。

【0014】

本発明の方法及び組成物は、水及び目的のタンパク質のあらゆる種類を含む水性製剤を提供するために使用され得る。一態様において、本発明の方法及び組成物は、47 k D a 未満であるタンパク質を含む巨大タンパク質に対して使用される。抗体及びその断片（インピボ及びインピトロ目的のために使用されるものを含む。）は、本発明の方法及び組成物中で使用され得るタンパク質の別の例である。

10

【0015】

さらに、タンパク質及びペプチド製剤を調製するために必要な複数工程の精製及び濃縮プロセスは、製剤の正確な組成がロットごとに変動し得るように、しばしば組成物中に変動を導入する。連邦規則は、製造の場所又はロット番号に関わらず、薬物組成物がその製剤中で高度に一貫していることを要求する。本発明の方法は、正確な量で緩衝液及び賦形剤が添加し直される水中に製剤化されたタンパク質の溶液を作製するために使用することができ、緩衝液及び/又は賦形剤の正確な濃度を有するタンパク質製剤の作製を可能にする。

【0016】

一実施形態において、本発明は、タンパク質及び水を含む水性製剤（該製剤は、低い伝導度（例えば、約2.5 m S / c m 未満の伝導度）、少なくとも約10  $\mu$  g / m L のタンパク質濃度、約30 m O s m o l / k g 以下の浸透圧などの（但し、これらに限定されない。）ある種の特徴を有し、及び/又はタンパク質は約47 k D a 超の分子量（ $M_w$ ）を有する。）を提供する。一実施形態において、本発明の製剤は、長期間（例えば、少なくとも約3ヶ月又は少なくとも約12ヶ月）にわたる液体形態での安定性又は少なくとも1つの凍結/融解サイクル（より多くの凍結/融解サイクルでなければ）を通じた安定性などの（但し、これらに限定されない。）改善された安定性を有する。一実施形態において、製剤は、凍結、凍結乾燥又は噴霧乾燥からなる群から選択される形態で、少なくとも3ヶ月間安定である。

20

【0017】

一実施形態において、本発明の製剤中に含まれるタンパク質は、例えば、約47 k D a 超の分子量、約57 k D a 超の分子量、約100 k D a 超の分子量、約150 k D a 超の分子量、約200 k D a 超の分子量又は約250 k D a 超の分子量などの最小サイズを有し得る。

30

【0018】

一実施形態において、本発明の製剤は、例えば、約2.5 m S / c m 未満の伝導度、約2 m S / c m 未満の伝導度、約1.5 m S / c m 未満の伝導度、約1 m S / c m 未満の伝導度又は約0.5 m S / c m 未満の伝導度などの低い伝導度を有する。

【0019】

一実施形態において、本発明の製剤中に含まれるタンパク質は、例えば、少なくとも約1 m g / m L、少なくとも約10 m g / m L、少なくとも約50 m g / m L、少なくとも約100 m g / m L、少なくとも約150 m g / m L、少なくとも約200 m g / m L 又は約200 m g / m L 超の濃度など、所定の濃度を有する。

40

【0020】

一実施形態において、本発明の製剤は、約15 m O s m o l / k g 以下の浸透圧を有する。

【0021】

一実施形態において、本発明は、水及びタンパク質（該タンパク質は、所定の濃度の緩衝化された溶液中にタンパク質の $D_h$ より少なくとも約50%小さい水力学的直径（ $D_h$ ）を有する。）の所定濃度を含む水性製剤を提供する。一実施形態において、タンパク質

50

の $D_h$ は、所定の濃度のリン酸緩衝化された生理的食塩水(PBS)中のタンパク質の $D_h$ より少なくとも約50%小さく、タンパク質の $D_h$ は、所定の濃度のPBS中のタンパク質の $D_h$ より少なくとも約60%小さい。タンパク質の $D_h$ は、所定の濃度のPBS中のタンパク質の $D_h$ より少なくとも約70%小さい。

【0022】

一実施形態において、本発明は、約5 $\mu$ m未満の水力学的直径( $D_h$ )を有するタンパク質(抗体又は抗原結合断片など(但し、これらに限定されない。))を含む水性製剤を提供する。一実施形態において、タンパク質は、約3 $\mu$ m未満の $D_h$ を有する。

【0023】

本発明の方法及び組成物において、あらゆるタンパク質が使用され得る。一実施形態において、製剤は治療用タンパク質を含む。一実施形態において、製剤は、抗体又はその抗原結合断片を含む。本発明の方法及び組成物中に含まれ得る抗体又は抗原結合タンパク質の種類には、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体及びドメイン抗体(dAb)が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、抗体又はその抗原結合断片は、アダリムマブ又はゴリムマブなどの(但し、これらに限定されない。)抗TNFa又はJ695などの(但し、これらに限定されない。)抗IL-12抗体である。さらに、本発明の製剤は、タンパク質の少なくとも2つの異なる種類(例えば、アダリムマブ及びJ695)も含み得る。

10

【0024】

本発明のさらに別の実施形態において、製剤は、非イオン化可能な賦形剤をさらに含み得る。非イオン化可能な賦形剤の例には、糖アルコール若しくはポリオール(例えば、マニトール又はソルビトール)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80、ポリソルベート20、ポリソルベート40、ポリソルベート60)及び/又は糖(例えば、ショ糖)が含まれるが、これらに限定されない。本発明の製剤中にさらに含まれ得る非イオン化可能な賦形剤の他の非限定的な例には、非トレハロース、ラフィノース及びマルトースが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0025】

一実施形態において、製剤は、浸透圧修飾剤、安定化剤、界面活性剤、抗酸化剤、凍結保護剤、充填剤、凍結乾燥保護剤、塩基性成分及び酸性成分からなる群から選択される因子を含まない。

30

【0026】

本発明の製剤は、インビトロ及びインビボでの使用の両方を含むあらゆる使用に適し得る。一実施形態において、本発明の製剤は、皮下、静脈内、吸入、皮内、経皮、腹腔内及び筋肉内投与などの(但し、これらに限定されない。)投与の様式を介して対象に投与するのに適している。本発明の製剤は、対象中の疾患の治療において使用され得る。

【0027】

本発明の製剤を送達するために使用され得る装置も本発明に含まれる。このような装置の例には、シリンジ、ペン、インプラント、無針注射装置、吸入装置及びパッチが含まれるが、これらに限定されない。

【0028】

一実施形態において、本発明の製剤は、医薬製剤である。

40

【0029】

本発明は、第1の溶液中にタンパク質を与えること、及び水との少なくとも5倍容量交換が達成されるまで、透析ろ過溶媒として水を使用する透析ろ過に前記第1の溶液を供することにより水性製剤を調製することを含む、タンパク質及び水を含む水性製剤を調製する方法も提供する。一実施形態において、得られた製剤中のタンパク質は、その生物活性を保持する。

【0030】

本発明は、第1の溶液中にタンパク質を与えること、水との少なくとも5倍容量交換が達成されるまで、透析ろ過溶媒として水を使用する透析ろ過に第1の溶液を供することに

50

より透析ろ過されたタンパク質溶液を調製すること、及び透析ろ過されたタンパク質溶液を濃縮し、これにより、タンパク質の水性製剤を調製することを含む、タンパク質の水性製剤を調製する方法をさらに提供する。一実施形態において、得られた製剤中のタンパク質は、その生物活性を保持する。

【0031】

一実施形態において、透析ろ過されたタンパク質溶液の濃縮は、遠心を介して達成される。

【0032】

一実施形態において、透析ろ過溶媒は水からなる。

【0033】

一実施形態において、5倍容量交換を上回る容量交換が達成されるまで、第1の溶液が水との透析ろ過に供される。一実施形態において、少なくとも約6倍の容積交換が達成されるまで、第1の溶液が水との透析ろ過に供される。一実施形態において、少なくとも約7倍の容積交換が達成されるまで、第1の溶液が水との透析ろ過に供される。

【0034】

一実施形態において、水性製剤は、第1の溶液より少なくとも約95%低い賦形剤の最終濃度を有する。

【0035】

一実施形態において、水性製剤は、第1の溶液より少なくとも約99%低い賦形剤の最終濃度を有する。

【0036】

一実施形態において、最初のタンパク質溶液は、哺乳動物の細胞発現系から得られ、宿主細胞タンパク質(HCP)を除去するために精製される。

【0037】

一実施形態において、本発明の方法は、水性製剤に賦形剤を添加することをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】図1は、アダリムマブ参照標準AFP04C(下の線)、アダリムマブDS(DF/UF処理前(中央の線)及び後(上の線)の薬物物質)のSECクロマトグラムを示す。

【図2】図2は、DF/UF処理されたアダリムマブ単量体への賦形剤化合物を添加した際の、アダリムマブ単量体の水力学的直径(Dh)に対するソルビトール(非イオン化可能な賦形剤)及びNaCl(イオン化可能な賦形剤)濃度の影響を示す。

【図3】図3は、J695参照標準(下のグラフ)及びpH4.4になるようにpH調整されたJ695DS(上のグラフ)のIEC特性を示す。

【図4】図4は、Milli-Q水、pH4.7を用いたDF/UF後のJ695(上のグラフ)及びpH4.4になるようにpH調整された、DF/UF前のJ695(下の曲線)のIEC特性を示す。

【図5】図5は、水力学的直径(z-平均)及び(WFI中に溶解された)アダリムマブの濃度の相関をグラフで図示する。X:仮定される試料粘度として1.1mPasを用いるSOPを用いて測定。y:仮定される試料粘度として1.9mPasを用いるSOPを用いて測定。

【図6】図6は、水力学的直径(ピーク単量体)及び(WFI中に溶解された)アダリムマブの濃度の相関をグラフで図示する。X:仮定される試料粘度として1.1mPasを用いるSOPを用いて測定。y:仮定される試料粘度として1.9mPasを用いるSOPを用いて測定。

【図7】図7は、水力学的直径(z-平均)及び(WFI中に溶解された)J695の濃度の相関をグラフで図示する。X:仮定される試料粘度として1.1mPasを用いるSOPを用いて測定。:仮定される試料粘度として1.9mPasを用いるSOPを用いて

10

20

30

40

50

測定。

【図 8】図 8 は、水力学的直径（ピーク単量体）及び（WFI 中に溶解された）J695 の濃度の相関をグラフで図示する。X：仮定される試料粘度として 1.1 mPa s を用いる SOP を用いて測定。y：仮定される試料粘度として 1.9 mPa s を用いる SOP を用いて測定。

【図 9】図 9 は、注射用水中のアダリムマブ濃度に依存するアダリムマブのリジン 0、1 及び 2 の合計 [%] を示す。

【図 10】図 10 は、注射用水中の J695 濃度に依存する J695 のピーク 1 から 7 の合計 [%] を示す。

【図 11】図 11 は、注射用水中の J695 濃度に依存する J695 の酸性ピークの合計 [%] を示す。

10

【図 12】図 12 は、注射用水（WFI）中の J695 濃度に依存する J695 の塩基性ピークの合計 [%] を示す。

【図 13】図 13 は、製剤の浸透圧及び伝導度に必要な成分の低下に関する、実施例 12 において行われた透析の効率を示す（BDS、74 mg/mL、10 mL 試料容積、SpectraPor 7 MWCO 10 k）。

【図 14】図 14 は、透析されたアダリムマブバルク溶液中の pH レベルの安定性を示す。脱イオン水に対する透析（1:1, 000, 000）前及び後の pH レベルが示されている。（BDS、74 mg/mL、10 mL 試料容積、SpectraPor 7 MWCO 10 k）。

20

【図 15】図 15 は、凍結融解後の 250 mg/mL 及び 200 mg/mL の低イオン性アダリムマブ溶液に対するボトルマッピング密度データを示す。

【図 16】図 16 は、凍結融解後の 250 mg/mL 及び 200 mg/mL の低イオン性アダリムマブ溶液に対するボトルマッピング pH データを示す。

【図 17】図 17 は、凍結融解後の 250 mg/mL 及び 200 mg/mL の低イオン性アダリムマブ溶液に対するボトルマッピング濃度データを示す。

【図 18】図 18 は、凍結融解後の 250 mg/mL 及び 200 mg/mL の低イオン性アダリムマブ溶液に対するボトルマッピング浸透圧データを示す。

【図 19】図 19 は、凍結融解後の 250 mg/mL 及び 200 mg/mL の低イオン性アダリムマブ溶液に対するボトルマッピング伝導度データを示す。

30

【図 20】図 20 は、DF/UF 後に、2 から 8 で 8.5 ヶ月保存された（下の曲線）又は DF/UF 後に、-80 で 4.5 ヶ月保存された（上の曲線）低イオン性アダリムマブ（図 20 では、D2E7 と称される。）溶液の SEC 分析を示す。

【図 21】図 21 は、凍結融解操作（T0）前及び 4 回の凍結融解の各々の後（T1、T2、T3 及び T4）に、様々な溶液中及び水中に製剤化されたモノクローナル抗体 1D4.7 の安定性を示す。

【図 22】図 22 は、凍結融解操作（T0）前及び 4 回の凍結融解の各々の後（T1、T2、T3 及び T4）に、水中に及び様々な緩衝液とともに製剤化されたモノクローナル抗体 13C5.5 の安定性を示す。ブランク = WFI 対照試料。

【図 23】図 23 は、凍結融解操作前（T0）及び 4 回の凍結融解の各々の後（T1、T2、T3 及び T4）に、水中に及び添加された様々な賦形剤とともに製剤化されたモノクローナル抗体 13C5.5 の安定性を示す。ブランク = WFI 対照試料。

40

【図 24】図 24 は、溶液粘度に対するアダリムマブ（WFI 製剤）の濃度及び溶液 pH の影響を示す。

【図 25】図 25 は、様々な濃度及び pH 値のアダリムマブ溶液（WFI 製剤）に対する濁度データを示す。

【図 26】図 26 は、様々な pH 値及び濃度のアダリムマブ溶液（WFI 製剤）に対する水力学的直径（Dh）データを示す。

【図 27】図 27 は、様々な濃度の水溶液、pH 5 中のアダリムマブに対する強度グラフ（Dh 測定）によるサイズ分布を示す。

50

【図28】図28は、様々なpHレベルの水中のアダリムマブ100mg/mLに対する強度によるサイズ分布を示している。

【図29】図29も、様々なpHレベルの水中のアダリムマブ100mg/mLに対する強度によるサイズ分布を示している。

【図30】図30は、水中のアダリムマブに対する単量体含量(SEC)を示す。

【図31】図31は、水中のアダリムマブに対する凝集物含量(SEC)を示す。

【図32】図32は、溶液温度の関数としての2つのJ695溶液(WFI製剤)の粘度を示す。

【図33】図33は、多数の異なる製剤に対する反復された凍結/融解(f/t)サイクル間の目に見えない粒子(>1μm)によって測定されたID4.7抗体の安定性をグラフ的に図示する。

10

【図34】図34は、多数の異なる製剤に対する反復された凍結/融解(f/t)サイクル間の目に見えない粒子(>10μm)によって測定されたI3C5.5抗体の安定性をグラフ的に図示する。

【図35】図35は、多数の異なる製剤に対する反復された凍結/融解(f/t)サイクル間の目に見えない粒子(>1μm)によって測定された13C5.5抗体の安定性をグラフ的に図示する。

【図36】図36は、多数の異なる製剤に対する反復された凍結/融解(f/t)サイクル間の目に見えない粒子(>1μm)によって測定された7C6抗体の安定性をグラフ的に図示する。

20

【発明を実施するための形態】

【0039】

(発明の詳細な記述)

I. 定義

本発明をより容易に理解できるようにするために、まず、ある種の用語を定義する。

【0040】

本明細書において使用される「酸性成分」という用語は、酸性pH(すなわち、7.0未満)を有する溶液を含む因子を表す。酸性成分の例には、リン酸、塩酸、酢酸、クエン酸、シュウ酸、コハク酸、酒石酸、乳酸、リンゴ酸、グリコール酸及びフマル酸が含まれる。一実施形態において、本発明の水溶性製剤は、酸性成分を含まない。

30

【0041】

本明細書において使用される「抗酸化剤」という用語は、酸化を阻害し、従って、酸化的プロセスによる調製物の崩壊を防ぐために使用される因子を意味するものとする。このような化合物には、例として、限定なしに、アセトン、銻亜硫酸ナトリウム、重硫酸ナトリウム、アスコルピン酸、パルミチン酸アスコルビル、クエン酸、ブチル化されたヒドロキシアニソール、ブチル化されたヒドロキシトルエン、ヒドロリン酸、モノチオグリセロール、没食子酸プロピル、メチオニン、アスコルピン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、硫化ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、ナトリウムホルムアルデヒド、スルホキシラート、チオグリコール酸、メタ重亜硫酸ナトリウム、EDTA(エデタート)、ペンテタート及び当業者に公知の他の化合物が含まれる。

40

【0042】

「水溶性製剤」という用語は、溶媒が水である溶液を表す。

【0043】

本明細書において使用される「塩基性成分」という用語は、アルカリ(すなわち、7.0より大きなpH)である因子を表す。塩基性成分の例には、水酸化カリウム(KOH)及び水酸化ナトリウム(NaOH)が含まれる。

【0044】

本明細書において使用される「充填剤」という用語は、再構成可能な固体にバルクを添加するために、及び/又は調製のための製剤の特性の調節を補助するために使用される化合物を意味するものとする。このような化合物には、例として、限定なしに、デキストラン

50

、トレハロース、ショ糖、ポリビニルピロリドン、乳糖、イノシトール、ソルビトール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、アルブミン、ラクトビオン酸カルシウム及び当業者に公知の他の化合物が含まれる。

【 0 0 4 5 】

本明細書において使用される「伝導度」という用語は、2つの電極間に電流を伝導させる水溶液の能力を表す。一般に、電気伝導度又は比伝導度は、物質が電流を伝導する能力の指標である。溶液では、電流はイオンの輸送によって流れる。従って、水溶液中に存在するイオンの量が増加するに連れて、溶液はより高い伝導度を有する。伝導度に対する測定単位は、 $\text{mmho (mS/cm)}$  であり、例えば、Orion Research, Inc. (Beverly, MA) によって販売される伝導度メータを用いて測定することができ、10

【 0 0 4 6 】

本明細書において使用される「凍結保護剤」という用語には、凍結によって誘導されたストレスからタンパク質に安定性を与える因子が一般に含まれる。凍結保護剤の例には、例えば、マニトールなどのポリオールが含まれ、並びに、例えば、ショ糖などの糖質及び例えば、ポリソルベート、ポロキソマー又はポリエチレングリコールなどの界面活性剤などが含まれる。凍結保護剤は、製剤の浸透圧にも寄与する。

【 0 0 4 7 】

本明細書において使用される、「限外ろ過」又は「UF」という用語は、溶媒及び小さな溶質分子の通過を可能とさせながら、溶液又は懸濁液が高分子を保持する半透膜に供されるあらゆる技術を表す。限外ろ過は、溶液又は懸濁液中の高分子の濃度を増加させるために使用され得る。好ましい実施形態において、限外ろ過は、水中のタンパク質の濃度を増加させるために使用される。

【 0 0 4 8 】

本明細書において使用される「透析ろ過」又は「DF」という用語は、可溶性浸透物質成分の濃度を低下させるために、保持物質が溶媒によって希釈され、再度ろ過されるろ過の特殊なクラスを意味するために使用される。透析ろ過は、例えば、タンパク質などの保持された成分の濃度の増加をもたらす場合があり得、又はもたらさない場合があり得る。30

例えば、連続的透析ろ過では、ろ液が生成されるのと同じ速度で、溶媒が保持物質に連続的に添加される。この場合には、保持物質の容量及び保持された成分の濃度はプロセスの間に変化しない。他方、非連続的又は逐次希釈透析ろ過では、限外ろ過工程の後に保持物質側への溶媒の添加が続く。保持液側に添加される溶媒の容量が生成されるろ液の容量と等しくなく又は生成されるろ液の容量より多い場合には、保持される成分は高い濃度を有する。透析ろ過は、pH、イオン強度、塩組成、緩衝液組成又は高分子の溶液若しくは懸濁液の他の特性を変化させるために使用され得る。

【 0 0 4 9 】

本明細書において使用される「透析ろ過/限外ろ過」又は「DF/UF」という用語は、逐次に又は同時に限外ろ過及び/又は透析ろ過を達成するあらゆる方法、技術又は技術の組み合わせを表す。40

【 0 0 5 0 】

本明細書において使用される「透析ろ過工程」という用語は、透析ろ過のプロセスの間の全容量交換を表す。

【 0 0 5 1 】

「賦形剤」という用語は、安定性を向上させるために及び/又は浸透圧を調整するために、所望の浸透圧を与える(例えば、バルク特性を変化させる)ために製剤に添加される因子を表す。一般的に使用される賦形剤の例には、糖、ポリオール、アミノ酸、界面活性剤及びポリマーが含まれるが、これらに限定されない。本明細書において互換的に使用される「イオン性賦形剤」又は「イオン化可能な賦形剤」という用語は、正味の電荷を有50

する因子を表す。一実施形態において、イオン性賦形剤は、pHなどのある製剤条件下で正味の電荷を有する。イオン性賦形剤の例には、ヒスチジン、アルギニン及び塩化ナトリウムが含まれるが、これらに限定されない。本明細書において互換的に使用される「非イオン性賦形剤」又は「イオン化不可能な賦形剤」という用語は、正味の電荷を有さない因子を表す。一実施形態において、非イオン性賦形剤は、pHなどのある種の製剤条件下で正味の電荷を有さない。非イオン性賦形剤の例には、糖（例えば、ショ糖）、糖アルコール（例えば、マニトール）及び非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80）が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0052】

本明細書において使用される「最初のタンパク質溶液」又は「第1の溶液」という用語は、本発明の方法において使用される当初タンパク質溶液又は初発材料、すなわち、水の中に透析ろ過された当初タンパク質溶液を表す。一実施形態において、最初のタンパク質溶液は、イオン性賦形剤、非イオン性賦形剤及び/又は緩衝系を含む。

10

#### 【0053】

粒子の「水力学的直径」又は「 $D_h$ 」という用語は、水の密度及び前記粒子と同じ速度を有する球体の直径を表す。従って、本明細書において使用される「タンパク質の水力学的直径」という用語は、動的光散乱(DLS)を用いる溶液中のタンパク質に対するサイズ測定を表す。DLS測定装置は、固定された散乱角度で溶液中のタンパク質から散乱される光の強度の時間依存性振動を測定する。タンパク質の $D_h$ は、時間依存的な強度の振動の強度自己相関関数から測定される。散乱強度データは、散乱分子、すなわちタンパク質試料の水力学的直径及びサイズ分布に対する値を測定するためのDLS装置ソフトウェアを用いて処理される。

20

#### 【0054】

本明細書において使用される「凍結乾燥保護剤」という用語には、例えば、タンパク質の適切な立体構造を維持することによって、乾燥又は凍結乾燥プロセスの間の水の除去の間に、タンパク質に対して安定性を付与する因子が含まれる。凍結乾燥保護剤の例には、糖質、特に、二糖又は三糖が含まれる。凍結保護剤は、凍結乾燥保護効果も提供し得る。

#### 【0055】

組成物、例えば水性製剤に関して本明細書で使用される「医薬」という用語は、疾病又は疾患を治療するのに有用である。

30

#### 【0056】

「タンパク質」という用語は、二次及び/又は三次及び/又は四次構造のより高次のレベルを生成するのに、鎖長が十分であるアミノ酸の配列を含むものとする。これは、このような構造を持たない「ペプチド」又は他の小分子量薬物から区別されるべきである。一実施形態において、本明細書において使用されるタンパク質は、少なくとも約47kDの分子量を有する。本明細書において使用される定義に包含されるタンパク質の例には、治療用タンパク質が含まれる。「治療活性を有するタンパク質」又は「治療用タンパク質」は、治療目的のために、すなわち、対象中の疾患を治療するために使用され得るタンパク質を表す。治療用タンパク質は治療目的のために使用され得るが、前記タンパク質はインビトロ研究のためにも使用され得るので、本発明はこのような用途に限定されるものではないことを銘記すべきである。好ましい実施形態において、治療用タンパク質は、融合タンパク質又は抗体若しくはその抗原結合部分である。一実施形態において、本発明の方法及び組成物は、異なるアミノ酸配列を有する2つのタンパク質として定義される少なくとも2つの異なるタンパク質を含む。追加の異なるタンパク質は、タンパク質の分解産物を含まない。

40

#### 【0057】

本明細書において使用される「タンパク質が水中に溶解されている」という用語は、DF/UF処理プロセスによって、小分子（例えば、緩衝液、賦形剤、塩、界面活性剤）の量が低下されている水溶液中にタンパク質が溶解されているタンパク質の製剤を表す。DF/UF処理プロセスによって、絶対的な意味で、小分子の完全な除去が達成され得ない

50

としても、DF/UFを適用することによって達成可能な賦形剤の理論的な低減は、専ら実質的に水の中にタンパク質の製剤を作製するのに十分に大きい。例えば、連続様式のDF/UFプロトコールで6容量の交換を用いると、賦形剤の理論低減率は、約99.8% ( $c_i = e^{-x}$ ) ( $c_i$ は当初の賦形剤濃度であり、及び $x$ は容量交換の回数である。)である。

【0058】

「医薬製剤」という用語は、活性成分の生物活性を有効とし得る形態であり、従って、治療用途のために対象に投与され得る調製物を表す。

【0059】

「安定な」製剤とは、保存時に、その中のタンパク質が、その物理的安定性及び/又は化学的安定性及び/又は生物学的活性を実質的に保持する製剤である。タンパク質の安定性を測定するための様々な分析技術が本分野において利用可能であり、例えば、「Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)」及び「Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)」に概説されている。一実施形態において、タンパク質の安定性は、溶液中の単量体タンパク質のパーセントに従って測定され、分解された(例えば、断片化された)及び/又は凝集されたタンパク質の低いパーセントを有する。例えば、安定なタンパク質を含む水性製剤は、少なくとも95%の単量体タンパク質を含み得る。あるいは、本発明の水性製剤は、5%以下の凝集物及び/又は分解されたタンパク質を含み得る。

【0060】

「安定化剤」という用語は、安定性を向上させ又はその他強化する賦形剤を表す。安定化剤には、-リボ酸、-トコフェロール、バルミチン酸アスコルビル、ベンジルアルコール、ピオチン、亜硫酸水素塩、ホウ素、ブチル化されたヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化されたヒドロキシトルエン(BHT)、アスコルビン酸及びそのエステル、カロテノイド、クエン酸カルシウム、アセチル-L-カルニチン(camitine)、キレート剤、コンドロイチン、クロム、クエン酸、補酵素Q-10、システイン、システイン塩酸塩、3-デヒドロシキミ酸(DHS)、EDTA(エチレンジアミン四酢酸;エデト酸二ナトリウム)、硫酸第一鉄、葉酸、フマル酸、没食子酸アルキル、ニンニク、グルコサミン、ブドウ種子抽出物、ググル(gugul)、マグネシウム、リンゴ酸、メタ重亜硫酸塩、N-アセチルシステイン、ナイアシン、ニコチンアミド(nicotinamide)、イラクサの根、オルニチン、没食子酸プロピル、ピクノゲノール、ノコギリヤシ、セレン、重亜硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸カリウム、酒石酸、チオサルファート、チオグリセロール、チオソルピトール、トコフェロール及びそのエステル、例えば、酢酸トコフェロール、コハク酸トコフェロール、トコトリエナール、d-トコフェロールアセタート、ビタミンA及びそのエステル、ビタミンB及びそのエステル、ビタミンC及びそのエステル、ビタミンD及びそのエステル、ビタミンE及びそのエステル、例えば、ビタミンEアセタート、亜鉛並びにこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【0061】

「界面活性剤」という用語には、空気/溶液界面によって誘導されるストレス及び溶液/表面によって誘導されるストレスからタンパク質を保護する因子が一般に含まれる。例えば、界面活性剤は、タンパク質を凝集から保護し得る。適切な界面活性剤には、例えば、ポリソルベート、Brij 35(登録商標)などのポリオキシエチレンアルキルエーテル又はTween 20、Tween 80若しくはポロキサマー188などのポロキサマーが含まれ得る。好ましい洗浄剤には、ポロキサマー、例えば、Poloxamer 188、Poloxamer 407、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、例えば、Brij 35(登録商標)、Cremophor A25、Sympatens ALM/230;並びにポリソルベート/Tween、例えば、Polysorbate 20、Polysor

10

20

30

40

50

rbate 80 及び Poloxamer、例えば、Poloxamer 188 及び Tween、例えば、Tween 20 及び Tween 80 が含まれ得る。

【0062】

本明細書において使用される「浸透圧修飾物質」という用語は、液体製剤の浸透圧を調整するために使用することができる一又は複数の化合物を意味するものとする。適切な浸透圧修飾物質には、グリセリン、ラクトース、マンニトール、デキストロース、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸ナトリウム、ソルビトール、トレハロース、ショ糖、ラフィノース、マルトース及び当業者に公知の他の浸透圧修飾物質が含まれる。一実施形態において、液体製剤の浸透圧は、血液又は血漿の浸透圧とほぼ同じである。

10

【0063】

「水」という用語は、通常蒸留又は逆浸透によってきょう雑物を除去するために精製された水を意味するものとし、本明細書において、「純水」とも称される。好ましい実施形態において、本発明の方法及び組成物において使用される水は、賦形剤を含まない。一実施形態において、水は、対象への投与に適した滅菌水を含む。別の実施形態において、水は、注射用水(WFI)を含むものとする。一実施形態において、水は、蒸留水又はインビトロアッセイでの使用に適した水を表す。好ましい実施形態において、透析ろ過は、透析ろ過溶媒として水のみを用いて、本発明の方法に従って行われる。

【0064】

本明細書において使用される「抗体」という用語には、完全な抗体及びあらゆるその抗原結合断片(すなわち、「抗原結合部分」)又は一本鎖が含まれる。「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質又はその抗原結合タンパク質を表す。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書において $V_H$ と略記される。)及び重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン $CH_1$ 、 $CH_2$ 及び $CH_3$ から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書において $V_L$ と略記される。)及び軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン $CL$ から構成される。 $V_H$ 及び $V_L$ 領域は、より保存された領域(フレームワーク領域(FR))と称される。)に介在された超可変性の領域(相補性決定領域(CDR))と称される。)へさらに細分することができる。各 $V_H$ 及び $V_L$ は、以下の順序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端へ配置された3つのCDRと4つのFRから構成される。重及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)及び古典的な補体系の第一成分( $C1q$ )など、宿主の組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

20

30

【0065】

本明細書において使用される抗体の「抗原結合部分」(又は、単に「抗体部分」)という用語は、抗原(例えば、TNF、IL-12)へ特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ又はそれ以上の断片を表す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって実行され得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」内に包含される結合断片の例には、(i) Fab断片( $V_L$ 、 $V_H$ 、 $CL$ 及び $CH_1$ ドメインからなる一価断片); (ii)  $F(ab')_2$ 断片(ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片); (iii)  $V_H$ 及び $CH_1$ ドメインからなるFd断片; (iv) 抗体の単一アームの $V_L$ 及び $V_H$ ドメインからなるFv断片、(v)  $V_H$ 又は $V_L$ ドメインからなるdAb断片(Ward et al, (1989) Nature 341: 544-546); 並びに(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメイン $V_L$ 及び $V_H$ は別個の遺伝子によってコードされているが、 $V_L$ 及び $V_H$ が対合して一価の分子を形成している単一のタンパク質鎖(一本鎖Fv(scFv))として知られる。)として2つのドメイン $V_L$ 及び $V_H$ を作製することを可能にする合成リンカーによって、組み換え法を用いて連結することができる(例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; 及

40

50

びHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 85: 5879 - 5883参照)。このような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されるものとする。これらの抗体断片は、当業者に公知の慣用技術を用いて取得され、完全状態の抗体と同じ様式で使用可能性に関して断片がスクリーニングされる。本発明の一実施形態において、抗体断片は、Fab、Fd、Fd'、一本鎖Fv (scFv)、scFv<sub>2</sub>及びドメイン抗体(dAb)からなる群から選択される。

【0066】

さらに、抗体又はその抗原結合部分は、抗体又は抗体部分の1つ又はそれ以上のタンパク質又はペプチドとの共有又は非共有会合によって形成されるより大きな免疫接着分子の一部であり得る。これらの他のタンパク質又はペプチドは、抗体若しくはその抗原結合部分の精製を可能にする又は互いに若しくは他の分子との会合を可能にする官能性を有し得る。従って、このような免疫接着分子の例には、四量体の一本鎖可変断片(scFv)分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanov et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93 - 101)及び二価の及びビオチン化されたscFv分子を作製するためのシステイン残基、マーカーペプチド及びC末端ポリヒスチジンタグの使用(Kipriyanov et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047 - 1058)が含まれる。Fab及びF(ab')<sub>2</sub>断片などの抗体部分は、それぞれ、完全抗体のパイン又はペプシン消化などの慣用技術を用いて、完全抗体から調製することができる。さらに、抗体、抗体部分及び免疫接着分子は、標準的な組換えDNA技術を用いて取得することができる。

【0067】

同属の対若しくは群を形成する構造のファミリーに属し、又はこのようなファミリーに由来し、及びこの特徴を保持する場合に、2つの抗体ドメインは、「相補的」である。例えば、抗体のVHドメイン及びVLドメインは相補的である。2つのVHドメインは相補的でなく、及び2つのVLドメインは相補的でない。相補的ドメインは、T細胞受容体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>(又はV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>)ドメインなど、免疫グロブリンスーパーファミリーの他のメンバー中に見出され得る。

【0068】

「ドメイン」という用語は、タンパク質の残部とは独立に、その四次構造を保持する折り畳まれたタンパク質構造を表す。一般に、ドメインは、タンパク質の別個の機能特性に必要とされ、多くの事例で、タンパク質の及び/又はドメインの残部の機能を失わせることなく、他のタンパク質に付加され、除去され、又は転移され得る。単一の抗体可変ドメインは、抗体可変ドメインに特徴的な配列を含む折り畳まれたポリペプチドドメインを意味する。従って、単一の抗体可変ドメインには、完全な抗体可変ドメイン並びに例えば、抗体可変ドメインに特徴的でない配列によって1つ若しくはそれ以上のループが置換されている修飾された可変ドメイン、又は末端切断されている若しくはN末端若しくはC末端伸長を含む抗体可変ドメイン及び完全長ドメインの結合活性及び特異性を少なくとも部分的に保持する可変ドメインの折り畳まれた断片が含まれる。

【0069】

本発明の可変ドメインは、ドメインの群を形成するために組み合わせられ得る。例えば、相補性ドメインが組み合わせられ得る(VHドメインと組み合わせられているVLドメインなど)。非相補的ドメインも組み合わせられ得る。ドメインは共有又は非共有的手段によるドメインの連結など、多数の方法で組み合わせられ得る。

【0070】

「dAb」又は「ドメイン抗体」は、抗原を特異的に結合する単一の抗体可変ドメイン(V<sub>H</sub>又はV<sub>L</sub>)ポリペプチドを表す。

【0071】

本明細書において使用される「抗原結合領域」又は「抗原結合部位」用語は、抗原と相互作用し、抗原に対する抗体の特異性及び親和性を抗体に付与するアミノ酸残基を含有す

10

20

30

40

50

る、抗体分子の一部又はその抗原結合部分を表す。

【0072】

「エピトープ」という用語は、抗体の抗原結合領域の1つ又はそれ以上において、抗体によって認識され得、及び抗体によって結合され得るあらゆる分子の部分を表すものとする。本発明において、第一及び第二の「エピトープ」は、同一でなく及び単一の一重特異的抗体又はその抗原結合部分によって結合されないエピトープであると理解される。

【0073】

「組換え抗体」という用語は、宿主細胞中に形質移入された組換え発現ベクターを用いて発現された抗体、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子に関して遺伝子導入された動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295）又は他のDNA配列への特定の免疫グロブリン遺伝子配列（ヒト免疫グロブリン遺伝子配列など）のプライミングを含むあらゆる他の手段によって調製され、発現され、作製され、又は単離された抗体など、組換え手段によって調製され、発現され、作製され、又は単離された抗体を表す。組換え抗体の例には、キメラ、CDR移植され及びヒト化抗体が含まれる。

【0074】

「ヒト抗体」という用語は、例えば、Kabatah他(Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)によって記載されているように、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に対応し又は由来する可変及び定常領域を有する抗体を表す。しかしながら、本発明のヒト抗体は、例えば、CDR中に、特にCDR3中に、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロで無作為若しくは部位特異的突然変異導入による又はインビボで体細胞変異による変異）を含み得る。

【0075】

本発明の組換えヒト抗体は、可変領域を有し、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する定常領域も含み得る(Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242参照)。しかしながら、ある種の実施形態において、このような組換えヒト抗体は、インビトロ突然変異誘発（又は、ヒトIg配列に対して遺伝子導入された動物を使用する場合には、インビボ体細胞突然変異誘発）に供され、従って、組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列VH及びVL配列に由来し、関連するが、インビボにおいて、ヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然には存在しない場合があり得る配列である。ある実施形態において、しかしながら、このような組換え抗体は、選択的突然変異誘発又は逆変異又は両者の結果である。

【0076】

「逆変異」という用語は、ヒト抗体の体細胞的に変異されたアミノ酸の幾つか又は全部を相関な生殖系列抗体配列由来の対応する生殖系列残基で置換する方法である。本発明のヒト抗体の重及び軽鎖配列は、最高の相同性を有する配列を同定するために、VBASEデータベース中の生殖系列配列と別個に並置される。このような異なるアミノ酸をコードする所定のヌクレオチド位置を変異させることによって、本発明のヒト抗体中の差は生殖系列配列に復帰される。このようにして逆変異のための候補として同定された各アミノ酸の役割は、抗原結合における直接又は間接的役割に関して調査されるべきであり、ヒト抗体のあらゆる望ましい特徴に影響を与えることが変異後に見出された何れのアミノ酸も、最終のヒト抗体中に含まれるべきでない。逆変異に供されるアミノ酸の数を最小限に抑えるために、第二の生殖系列配列が同一であり、問題のアミノ酸の両側で少なくとも10個

10

20

30

40

50

、好ましくは12個のアミノ酸に関して本発明のヒト抗体の配列と同一及び同一直線上である限り、最も近い生殖系列配列と異なるが、第二の生殖系列配列中の対応するアミノ酸と同一であることが明らかとなったアミノ酸位置は残存することができる。逆変異は、抗体最適化のあらゆる段階において行われ得る。

【0077】

「キメラ抗体」という用語は、ヒト定常領域に連結されたマウス重及び軽鎖可変領域を有する抗体など、ある種から得られる重及び軽鎖可変領域並びに別の種から得られる定常領域配列を含む抗体を表す。

【0078】

「CDR移植抗体」という用語は、マウスCDR（例えば、CDR3）の1つ又はそれ以上がヒトCDR配列で置換されているマウス重及び軽鎖可変領域を有する抗体など、ある種に由来する重及び軽鎖可変領域配列を含むが、VH及び/又はVLのCDR領域の1つ又はそれ以上の配列が別の種のCDR配列で置換されている抗体を表す。

【0079】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト以外の種（例えば、マウス）由来の重及び軽鎖可変領域配列を含むが、VH及び/又はVL配列の少なくとも一部がより「ヒト様」に改変されている、すなわち、ヒト生殖系列可変配列により類似している抗体を表す。ヒト化抗体の1つの種類は、対応する非ヒトCDR配列を置換するために、ヒトCDR配列が非ヒトVH及びVL配列中に導入されているCDR移植抗体である。

【0080】

本発明の様々な態様が、以下の節において、さらに詳しく記載されている。

【0081】

II. 本発明の方法

一般に、透析ろ過は、タンパク質、ペプチド、核酸及びその他の生物分子を含有する溶液から塩又は溶媒を除去し、置換し、又はこれらの濃度を低下させるために膜を使用する技術である。タンパク質作製操作は、タンパク質の発現に起因する不純物（例えば、宿主細胞のタンパク質）からタンパク質が精製されたら、製剤緩衝液中へのタンパク質溶液の最終透析ろ過をしばしば伴う。本明細書に記載されている発明は、透析ろ過溶液として水のみを使用する透析ろ過にタンパク質溶液を供することによって、水性製剤を得るための手段を提供する。従って、本発明の製剤は、透析ろ過プロセスの間の製剤溶媒として水を使用することに基づき、最終製剤中のタンパク質を可溶化及び/又は安定化するために使用される賦形剤（界面活性剤など）を含む伝統的な製剤溶媒に依拠しない。本発明は、安定な製剤中で使用するためにタンパク質（該タンパク質は溶液中に残存し、その安定性を維持するために他の因子を使用せずに、高いレベルで濃縮することができる。）を純水に移すための方法を提供する。

【0082】

本明細書の教示に従う透析ろ過又はDF/UFの前に、前記方法は、第1の溶液中に、まずタンパク質を提供することを含む。タンパク質は、合成技術（例えば、組換え技術、ペプチド合成又はこれらの組み合わせ）などの本分野において十分に確立されている技術を用いた製剤など、あらゆる第1の溶液中に製剤化され得る。あるいは、本発明の方法及び組成物中に使用されるタンパク質は、タンパク質の内因性の源から単離される。最初のタンパク質溶液は、タンパク質の不均質な混合物からタンパク質を精製する精製法を用いて取得され得る。一実施形態において、本発明において使用される最初のタンパク質溶液は、タンパク質溶液から宿主細胞タンパク質（HCP）を除去する多数のクロマトグラフィー工程に、哺乳動物発現系中に発現されたタンパク質（抗体など）が供される精製法から取得される。一実施形態において、最初のタンパク質溶液は、哺乳動物の細胞発現系から取得され、宿主細胞タンパク質（HCP）を除去するために精製されている。精製の方法の例は、米国特許出願11/732,918号（US20070292442）（参照により、本明細書に組み込まれる。）に記載されている。本発明の方法において最初のタンパク質溶液の特殊な調製は必要とされないことを銘記すべきである。

## 【 0 0 8 3 】

本発明の組成物及び方法において使用され得るタンパク質は、あらゆるサイズ、すなわち、分子量 ( $M_w$ ) であり得る。例えば、タンパク質は、約 1 kDa 以上の分子量、約 10 kDa 以上の分子量、約 47 kDa 以上の分子量、約 57 kDa 以上の分子量、約 100 kDa 以上の分子量、約 150 kDa 以上の分子量、約 200 kDa 以上の分子量又は約 250 kDa 以上の分子量を有し得る。上に明記されている分子量の中間の数字、例えば、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170 など並びに本明細書中に明記されている全ての他の数字も、本発明の一部であるものとする。上限及び/又は下限として上に明記されている値の何れかの組み合わせを用いた値の範囲は、本発明の範囲に含まれるものとする。例えば、本発明において使用されるタンパク質は、57 kDa から 250 kDa まで、56 kDa から 242 kDa まで、60 kDa から 270 kDa までなどのサイズの範囲であり得る。

10

20

## 【 0 0 8 4 】

本発明の方法は、少なくとも 2 つの異なるタンパク質を含む最初のタンパク質溶液の透析る過も含む。例えば、タンパク質溶液は、異なる分子又は同じ分子の異なるエピトープに対して誘導された抗体の 2 つ又はそれ以上の種類を含有し得る。

## 【 0 0 8 5 】

一実施形態において、溶液中のタンパク質は、融合タンパク質及び酵素などの(但し、これらに限定されない。)治療用タンパク質である。治療用タンパク質の例には、Pulmozyme (ドルナーゼ)、Regranex (ベカプレルミン)、Activase (アルテプラーゼ)、Aldurazyme (ラロニダーゼ)、Amevive (Alfacept)、Aranesp (ダルベポエチン)、Becaplermin 濃縮物、Betaseron (インターフェロン - 1b)、BOTOX (ボツリヌス毒素 A 型)、Elitek (ラスプリカーゼ)、Elspar (アスパラギナーゼ)、Epopogen (エポエチン)、Enbrel (Etanercept)、Fabrazyme (アガルシダーゼ)、Infergen (インターフェロン con-1)、Intron A (インターフェロン - 2a)、Kineret (Anakinra)、MYOBLOC (ボツリヌス毒素 B 型)、Neulasta (Pegfilgrastim、Neumega (Oprelvekin)、Neupogen (Filgrastim)、Ontak (Denileukin diftitox)、PEGASYS (Pegインターフェロン - 2a)、Proleukin (Aldesleukin)、Pulmozyme (ドルナーゼ)、Rebif (インターフェロン - 1a)、Regranex (Becaplermin)、Retavase (Retepase)、Roferon-A (インターフェロン - 2)、TNKase (Tenecteplase) 及び Xigris (Drotrecogin)、Arcalyst (Rilonacept)、NPlate (Romiplostim)、Mircera (メトキシポリエチレングリコール - エポエチン)、Cinryze (C1 エステラーゼ阻害剤)、Elaprase (イズロン酸硫酸化酵素)、Myozyme (アルグルコシダーゼ)、Orencia (abatacept)、Naglazyme (ガルスルファーゼ)、Kepivance (palifermin) 及び Actimmune (インターフェロン - 1b)

30

40

50

が含まれるが、これらに限定されない。

【0086】

本発明において使用されるタンパク質は、抗体又はその抗原結合断片でもあり得る。本発明において使用され得る抗体の例には、キメラ抗体、非ヒト抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体及びドメイン抗体 (dAb) が含まれる。一実施形態において、抗体又はその抗原結合断片は、抗TNF 及び/又は抗IL-12抗体である (例えば、抗体又はその抗原結合断片は、二重可変ドメイン (DVD) 抗体であり得る。)。本発明の方法及び組成物において使用され得る抗体又はその抗原結合断片の他の例には、1D4.7 (抗IL-12 / IL-23抗体; Abbott Laboratories)、2.5 (E)mg1 (抗IL-18; Abbott Laboratories)、13C5.5 (抗IL-13抗体; Abbott Laboratories)、J695 (抗IL-12; Abbott Laboratories)、Afelimomab (Fab2抗TNF; Abbott Laboratories)、Humira (adalimumab) Abbott Laboratories)、Campath (Alemtuzumab)、CEA-Scan Arcitumomab (fab断片)、Erbitux (Cetuximab)、Herceptin (Trastuzumab)、Myoscint (Imcromab Pentetate)、ProstaScint (Capromab Pendetide)、Remicade (Infliximab)、ReoPro (Abciximab)、Rituxan (Rituximab)、Simulect (Basiliximab)、Synagis (Palivizumab)、Verluma (Nofetumomab)、Xolair (Omalizumab)、Zenapax (Daclizumab)、Zevalin (Ibritumomab Tiuxetan)、Orthoclone OKT3 (Muromonab-CD3)、Panorex (Edrecolomab)、Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicin)、golimumab (Centocor)、Cimzia (Certolizumab pegol)、Soliris (Eculizumab)、CNTO1275 (ustekinumab)、Vectibix (panitumumab)、Bexxar (tositumomab及びI<sup>131</sup> tositumomab)、国際出願WO2007/149032に記載されているような抗IL-17抗体であるAntibody7 (Cambridge Antibody Technology) (その内容全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。)、抗IL-13抗体であるCAT-354 (Cambridge Antibody Technology)、抗ヒトCD4抗体であるCE9y4PE (IDEC-151, clenoliximab) (Biogen IDEC/Glaxo Smith Kline)、抗ヒトCD4抗体であるIDEC CE9.1/SB-210396 (keliximab) (Biogen IDEC)、抗ヒトCD80抗体であるIDEC-114 (galiximab) (Biogen IDEC)、抗狂犬病ウイルスタンパク質抗体であるCR4098 (foravirumab)、及び抗ヒトTNF-関連アポトーシス誘導リガンド受容体2 (TRAIL-2) 抗体であるHGS-ETR2 (lexatumumab) (Human Genome Sciences, Inc.) 及びAvastin (bevacizumab) が含まれるが、これらに限定されない。

【0087】

抗体を作製するための技術は、以下に提供されている。

【0088】

ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、ある抗原に対して特異的であるが、前記抗原上の異なるエピートープに結合する抗体の混合物を一般に表す。ポリクローナル抗体は、関連する抗原及びアジュバントの複数回の皮下 (sc) 又は腹腔内 (ip) 注射によって動物内で一般に産生される。二官能性剤又は誘導化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル (システイン残基を通じた連結)、N-ヒドロキシスクシンイミド (リジン残基

10

20

30

40

50

による)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、 $\text{SOCl}_2$ 又は $\text{R}_1\text{NCNR}$ ( $\text{R}$ 及び $\text{R}_1$ は、異なるアルキル基である。)を用いて、免疫化されるべき種内において免疫原性であるタンパク質(例えば、キーホールリンベットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン又は大豆トリプシン阻害剤)へ関連抗原を連結するのに有用であり得る。ポリクローナル抗体を作製するための方法は本分野において公知であり、例えば、「Antibodies: A Laboratory Manual, Lane and Harlow(1988)」(参照により、本明細書に組み込まれる。)に記載されている。

#### 【0089】

##### モノクローナル抗体

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」とは、ハイブリドーマに由来する抗体(例えば、標準的なKohler及びMilsteinハイブリドーマ法などのハイブリドーマ技術によって調製されたハイブリドーマによって分泌される抗体)を表すものとする。例えば、モノクローナル抗体は、「Kohler et al., Nature, 256:495(1975)」によって最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製され得、又は組換えDNA法(米国特許第4,816,567号)によって作製され得る。従って、本発明のハイブリドーマ由来二重特異性抗体は単一の抗原より多くの抗原に対して抗原特異性を有するが、なおモノクローナル抗体と称される。

10

#### 【0090】

モノクローナル抗体は、実質的に均一な抗体(すなわち、集団を構成する各抗体は、微量に存在する可能性がある天然の変異を除き同一である。)の集団から得られる。従って、「モノクローナル」という修飾語は、異なる抗体の混合物でないという抗体の特徴を示す。

20

#### 【0091】

さらなる実施形態において、抗体は、「McCafferty et al., Nature, 348:552-554(1990)」に記載されている技術を用いて作製された抗体ファージライブラリーから単離され得る。「Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991)」及び「Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)」は、それぞれ、ファージライブラリーを使用したマウス及びヒト抗体の単離を記載する。その後の刊行物は、極めて巨大なファージライブラリーを構築するための戦略として、鎖シャッフリング(Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783(1992))並びにコンビナトリアル感染及びインビボ組換え(Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266(1993))による高親和性(nM範囲)ヒト抗体の作製を記載する。従って、これらの技術は、モノクローナル抗体を単離するための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する実行可能な代替技術である。

30

#### 【0092】

抗体及び抗体断片は、米国特許第6,423,538号;6,696,251号;6,699,658号;6,300,065号;6,399,763号及び6,114,147号に記載されているように、発現ライブラリーを用いて、酵母及びその他の真核細胞からも単離され得る。真核細胞は、細胞表面上に提示するために、コンビナトリアル抗体ライブラリーから得られるものなどのライブラリータンパク質を発現するように改変され得、標的分子を選択するための親和性を有する抗体に関して、ライブラリークローンを含む特定の細胞を選択することが可能となる。単離された細胞からの回収後に、目的の抗体をコードするライブラリークローンは、適切な哺乳動物細胞株から高レベルで発現され得る。

40

#### 【0093】

目的の抗体を開発するためのさらなる方法には、米国特許第7,195,880;同第6,951,725号;同第7,078,197号;同第7,022,479号、同第6,518,018号;同第7,125,669号;同第6,846,655号;同第6,

50

281, 344号;同第6, 207, 446号;同第6, 214, 553号;同第6, 258, 558号;同第6, 261, 804号;同第6, 429, 300号;同第6, 489, 116号;同第6, 436, 665号;同第6, 537, 749号;同第6, 602, 685号;同第6, 623, 926号;同第6, 416, 950号;同第6, 660, 473号;同第6, 312, 927号;同第5, 922, 545号;及び同第6, 348, 315号に記載されているように、核酸ディスプレイ技術を用いた無細胞スクリーニングが含まれる。これらの方法は、タンパク質が由来する核酸にタンパク質が物理的に会合又は結合されるように、核酸からインビトロでタンパク質を転写するために使用することができる。標的分子を有する発現されたタンパク質に関して選択することによって、タンパク質をコードする核酸も選択される。無細胞スクリーニング技術に対する一つの変法において、抗体の多様性を増大させるために、免疫系細胞から単離された抗体配列を単離し、ポリメラーゼ連鎖反応突然変異誘発技術を部分的に無作為化することができる。次いで、これらの部分的に無作為化された抗体遺伝子は、無細胞系内で発現され、核酸と抗体の間に同時の物理的会合が作出される。

10

## 【0094】

DNAは、例えば、相同なマウス配列の代わりに、ヒト重および軽鎖定常ドメインに対するコード配列を置換することによって、(米国特許第4, 816, 567号; Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851(1984))、又は非免疫グロブリンポリペプチドに対するコード配列の全部又は一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合することによっても修飾され得る。

20

## 【0095】

抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位及び異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作製するために、典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインに対して置換され、又は抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに対して置換される。

## 【0096】

キメラ又はハイブリッド抗体は、架橋剤を用いるものなど、合成タンパク質化学における公知の方法を用いて、インビトロでも調製され得る。例えば、イムノトキシンは、ジスルフィド交換反応を用いて、又はチオエーテル結合を形成することによって構築され得る。この目的のための適切な試薬の例には、イミノチオラート及びメチル-4-メルカプトブチルイミダートが含まれる。

30

## 【0097】

## ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、本分野において周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである源からその中に導入された1つ又はそれ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「輸入」可変ドメインから通例採取される「輸入」残基としばしば称される。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列に対する非ヒト(例えば、げっ歯類)CDR又はCDR配列を置換することによって、Winter及び共同研究者(Jones et al., Nature, 321:522-525(1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536(1988))の方法に従って本質的に実施することができる。従って、このような「ヒト化」抗体は、非ヒト種由来の対応する配列によって、完全状態より大幅に少ないヒト可変ドメインが置換されているキメラ抗体である(米国特許第4, 816, 567号)。実際には、ヒト化抗体は、通例、幾つかのCDR残基及びおそらくは幾つかのフレームワーク(FR)残基がげっ歯類抗体中の同等の部位に由来する残基によって置換されているヒト抗体である。ヒト化プロセスを記載するさらなる参考文献には、Sims et al., J. Immunol., 151:2296(1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901(1987); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); Pre

40

50

sta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993) (これらの各々は、参照により、本明細書に組み込まれる。)が含まれる。

【0098】

ヒト抗体

あるいは、免疫化時に、内在の免疫グロブリン産生の不存在下でヒト抗体の完全なレパートリーを作製可能なトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作製することが現在では可能である。例えば、キメラ及び生殖系列変異体マウス中の抗体重鎖連結領域( $J_H$ )遺伝子のホモ接合欠失は内在の抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。このような生殖系列変異体マウス中へのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子列の導入は、抗原攻撃誘発時に、ヒト抗体の作製をもたらす。例えば、「Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993)」を参照されたい。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーから得ることもできる(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991))。

10

【0099】

一実施形態において、本発明の製剤は、例えば、アダリムマブ(Humira、アダリムマブ又はD2E7とも称される。Abbott Laboratories)など、ヒトTNFを結合する抗体又はその抗原結合部分を含む。一実施形態において、抗体又はその抗原結合断片は、 $1 \times 10^{-8}$  M又はそれ以下の $K_D$ 及び $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 又はそれ以下の $K_{off}$ 速度定数(何れも、表面プラズモン共鳴によって測定される。)で、ヒトTNFから解離し、 $1 \times 10^{-7}$  M又はそれ以下の $IC_{50}$ で、標準的なインビトロL929アッセイ中でヒトTNF細胞毒性を中和する。ヒトTNFに対して高い親和性を有するヒト中和抗体の例及び作製方法(この抗体の配列を含む。)は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,090,382号(D2E7と称される。)に記載されている。

20

【0100】

一実施形態において、本発明の製剤は、例えば、抗体J695(Abbott Laboratories; ABT-874とも称される。)(米国特許第6,914,128号)など、ヒトIL-12を結合する抗体又はその抗原結合部分を含む。J695は、インターロイキン-12及びインターロイキン-23を標的とし、これらを中和するように設計された完全なヒトモノクローナル抗体である。一実施形態において、抗体又はその抗原結合断片は、以下の特徴を有する。抗体又はその抗原結合断片は、 $3 \times 10^{-7}$  M又はそれ以下の $K_D$ でヒトIL-1から解離し、 $5 \times 10^{-5}$  M又はそれ以下の $K_D$ でヒトIL-1から解離し、マウスIL-1又はマウスIL-1を結合しない。ヒトIL-12に対して高い親和性を有するヒト中和抗体の例及び作製方法(この抗体の配列を含む。)が、米国特許第6,914,128号(参照により、本明細書に組み込まれる。)に記載されている。

30

40

【0101】

一実施形態において、本発明の製剤は、例えば、抗体2.5(E)mg1(Abbott Biosearch; ABT-325とも称される。)など、ヒトIL-18を結合する抗体又はその抗原結合部分を含む(米国特許出願2005/0147610参照(参照により、本明細書に組み込まれる。))。

【0102】

一実施形態において、本発明の製剤は、抗体1D4.7(Abbott Laboratories; ABT-147とも称される。)である抗IL-12/抗IL-23抗体又はその抗原結合部分を含む(2007年1月11日に公開されたWO2007/005608A2参照。参照により、本明細書に組み込まれる。))。

50

## 【0103】

一実施形態において、本発明の製剤は、抗体13C5.5 (Abbott Laboratories; ABT-308とも称される。)である抗IL-13抗体又はその抗原結合部分を含む(PCT/US2007/19660(WO08/127271)参照。参照により、本明細書に組み込まれる。)

## 【0104】

一実施形態において、本発明の製剤は、抗体7C6 (抗アミロイド 抗体)である抗体又はその抗原結合部分を含む(Abbott Laboratories; PCT公開WO07/062852参照。参照により、本明細書に組み込まれる。)

## 【0105】

二重特異的抗体

二重特異的抗体(BsAb)は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して特異性を有する抗体である。このような抗体は、完全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')<sub>2</sub>二重特異的抗体)に由来し得る。

## 【0106】

二重特異的抗体を作製するための方法は、本分野において公知である。完全長二重特異的抗体の伝統的な作製は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(2つの鎖は異なる特異性を有する。)の同時発現を基礎としている(Millstein et al., Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重及び軽鎖の無作為仕分けのために、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10の異なる抗体分子(そのうち一つのみが正しい二重特異的構造を有する。)を含む可能性を有する混合物を産生する。通常アフィニティークロマトグラフィー工程によって行われる正しい分子の精製はかなり骨が折れ、産物の収率は低い。類似の操作が、WO93/08829及び「Trauneker et al., EMBO J., 10:3655-3659(1991)」に開示されている。

## 【0107】

異なるアプローチによれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗体-抗原結合部位)が免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。

## 【0108】

好ましくは、融合は、ヒンジ、CH2及びCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインを用いて行われる。融合物の少なくとも1つの中に存在する軽鎖結合のために必要な部位を含有する第一の重鎖定常領域(CH1)を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物及び所望に応じて、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別個の発現ベクター中に挿入され、適切な宿主生物中へ同時形質移入される。これにより、構築に使用される3つのポリペプチドの鎖の等しくない比率が最適な収率を与える実施形態において、3つのポリペプチド断片の相互割合を調整する上で大幅な柔軟性が得られる。しかしながら、等しい比率の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高い収率をもたらす場合に、又は比率がまったく重要でない場合に、1つの発現ベクター中に、2つ又は3つ全てのポリペプチド鎖に対するコード配列を挿入することが可能である。

## 【0109】

このアプローチの好ましい実施形態において、二重特異的抗体は、一方のアーム中の第一の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖及び他方のアーム中のハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を与える。)から構成される。二重特異的分子の半分のみ免疫グロブリン軽鎖が存在することによって、容易な分離法が与えられるので、この非対称的な構造は、望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせからの所望の二重特異的化合物の分離を容易にすることが見出された。このアプローチは、1994年3月3日に公開されたWO94/04690に開示されている。二重特異的の作製に関するさらなる詳細については、例えば、「Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210(1986)」を参照されたい。

## 【0110】

10

20

30

40

50

二重特異的抗体には、架橋された又は「ヘテロ連結」抗体が含まれる。例えば、ヘテロ連結中の抗体の1つはアビジンに、他方はビオチンに結合させることが可能である。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を望ましくない細胞に標的誘導することが提案され（米国特許第4,676,980号）及びHIV感染の治療（WO91/00360、WO92/200373及びEP03089）が提案されている。ヘテロ連結抗体は、あらゆる都合のよい架橋法を用いて作製され得る。適切な架橋剤は本分野において周知であり、多数の架橋技術とともに、米国特許第4,676,980号に開示されている。

#### 【0111】

抗体断片から二重特異的抗体を作製するための技術も、この文献中に記載されている。二価の抗体断片（必ずしも二重特異的でない。）を作製するために、以下の技術を使用することもできる。例えば、二価抗体を形成するために、イー・コリ（*E. coli*）から回収されたFab'断片をインビトロで化学的に結合することができる。「Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)」を参照されたい。

10

#### 【0112】

組換え細胞培養から直接得られた二価抗体断片を作製及び単離するための様々な技術も記載されている。例えば、ロイシンジッパーを用いて、二価のヘテロ二量体を作製されている。Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドが、遺伝子融合によって、2つの異なる抗体のFab'部分に連結された。単量体を形成するために、ヒンジ領域において、抗体ホモ二量体が還元され、次いで、抗体ヘテロ二量体を形成するために再酸化した。「Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)」によって記載された「ダイアボディ」技術は、二重特異的/二価抗体断片を作製するための別の機序を与えた。断片は、同じ鎖上の2つのドメイン間での対合が不可能であるほど極めて短いリンカーによって軽鎖可変ドメイン（VL）に接続された重鎖可変ドメイン（VH）を含む。従って、1つの断片のVH及びVLドメインは、別の断片の相補的VL及びVHドメインと強制的に対合され、これにより、2つの抗原結合部位を形成する。一本鎖Fv（sFv）二量体の使用によって二重特異的/二価抗体断片を作製するための別の戦略も報告されている。「Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)」を参照されたい。

20

30

#### 【0113】

一実施形態において、本発明の製剤は、IL-1（IL-1及びIL-1を含む。）に対して二重特異的である抗体を含む。二重特異的IL-1抗体を作製するための例及び方法は、2006年12月29日に出願された米国仮特許出願60/878165号に見出すことができる。

#### 【0114】

透析ろ過/限外ろ過（本明細書において、DF/UFとも一般に称される。）は、成分の分子サイズに基づいて、溶液及び懸濁液の成分を分離するために、透過性（多孔性）膜フィルターを選択的に使用する。膜は、膜の孔より大きな分子を保持するのに対して、塩、溶媒及び水など、透過性のより小さな分子は膜を自由に通過する。膜によって保持された溶液は、濃縮物質又は保持物質として知られる。膜を通過する溶液は、ろ液又は浸透物として知られる。濃縮のための膜を選択するための1つのパラメータは、濃縮されるべき試料に対するその保持特性である。一般則として、膜の分子量カットオフ（MWCO）は、保持されるべき分子の分子量の1/3から1/6とすべきである。これは、完全な保持を確保するためである。MWCOが試料のMWCOに近づくほど、濃縮の間の幾らかの小産物の喪失のリスクが大きくなる。本発明の方法とともに使用することができる膜の例には、Omega<sup>TM</sup> PES膜（30kDa MWCO、すなわち、30kDaより大きな分子が膜によって保持され、30kDa未満の分子は膜のろ液側に通過することができる（Pall Corp., Port Washington, NY）; Millex<sup>®</sup>

40

50

) - GV Syringe Driven Filter Unit, PVDF 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore Corp., Billerica, MA); Millex<sup>(R)</sup> - GV Syringe Driven Filter Unit, PES 0.22  $\mu\text{m}$ ; Sterivex<sup>(R)</sup> 0.22  $\mu\text{m}$  Filter Unit (Millipore Corp., Billerica, MA); 及び Vivaspin concentrators (MWCO 10 kDa, PES; MWCO 3 kDa, PES) (Sartorius Corp., Edgewood, NY)。本発明の低イオン性タンパク質製剤を調製するために、タンパク質溶液(緩衝化された製剤中に可溶化され得る。)は、DF/UF溶媒として水が使用されるDF/UFプロセスに供される。好ましい実施形態において、DF/UF溶媒は水からなり、他の何れの賦形剤も含まない。

10

**【0115】**

本発明のDF/UFプロセスにおいてあらゆる水を使用することができるが、好ましい水は、精製された又は脱イオン化された水である。本発明の実施において使用され得る本分野で公知の水の種類には、注射用水(WFI)(例えば、HyPure WFI Quality Water (HyClone)、AQUA-NOVA<sup>(R)</sup> WFI (Aqua Nova))、UltraPure<sup>TM</sup> Water (Invitrogen) 及び蒸留水 (Invitrogen; Sigma-Aldrich) が含まれる。

**【0116】**

非連続様式のDF/UF及び連続様式のDF/UFを含むDF/UFの2つの形態が存在する。本発明の方法は、何れの様式に従っても実施され得る。

20

**【0117】**

連続的DF/UF(定容積DF/UFとも称される。)は、ろ液が生成されるのと同じ速度で、水又は新しい緩衝液を保持物質に添加することによって、保持物質(試料又は最初のタンパク質溶液)中の元の緩衝液塩(又は他の低分子量種)を洗浄除去することを含む。その結果、保持物質の容積及び産物濃度は、DF/UFプロセスの間に変化しない。除去される塩の量は、保持物質容積と比較した生成されるろ液容積に関連する。生成されるろ液容積は、「透析ろ過容積」という用語で通常表される。単一の透析ろ過容積(DV)は、透析ろ過が開始された時点の保持物質の容積である。連続的透析ろ過に関しては、液体は、ろ液が生成されるのと同じ速度で添加される。収集されたる液の容積が最初の保持物質容積と等しいときに、1DVが処理される。

30

**【0118】**

非連続的DF/UF(その例は、実施例の部で以下に記載されている。)には、2つの異なる方法、非連続的逐次DF/UF及び容積低下非連続的DF/UFが含まれる。逐次希釈による非連続的DF/UFは、水を用いて、試料(又は最初のタンパク質溶液)を所定の容量まで、まず希釈することを含む。次いで、希釈された試料は、UFによって、その元の容積まで再度濃縮される。容積低下による非連続的DF/UFは、まず、試料を所定の容積まで濃縮し、次いで、水又は交換緩衝液を用いて、試料をその元の容積まで再度希釈することを含む。連続的DF/UFと同様、望ましくない溶質(例えば、イオン性賦形剤)のレベルが除去されるまで、このプロセスは繰り返される。

**【0119】**

40

DF/UFは、DF/UF溶媒として、水(例えば、WFI)を用いて、本分野で公知の慣用技術に従って実施され得る(例えば、Industrial Ultrafiltration Design and Application of Diafiltration Processes, Beaton & Klinkowski, J. Separ. Proc. Technol., 4(2)1-10(1983))。DF/UFを実施するための市販の装置の例には、Millipore Lab scale<sup>TM</sup> TFF System (Millipore)、LV Centramate<sup>TM</sup> Lab Tangential Flow System (Pall Corporation) 及び UniFlux System (GE Healthcare) が含まれる。

**【0120】**

50

例えば、好ましい実施形態において、透析ろ過された抗体溶液を作製するために本発明の方法を実施するために、500 mLの貯蔵容器を備えたMillipore Labscale<sup>TM</sup> Tangential Flow Filtration (TFF) システムが使用される。DF/UF操作は、水の中に高濃度抗体製剤を作製するために使用される14のプロセス工程とともに、非連続の様式で実施される。本発明の具体的な実施形態のさらなる典型的な装置、溶液及び水の容積、プロセス工程の数及び他のパラメータに関しては、以下の実施例の部を参照されたい。

#### 【0121】

本発明に従って、水の中に、タンパク質が再製剤化される緩衝液交換のための透析ろ過に対する別の方法には、透析及びゲルろ過（何れの技術も、本分野において公知の技術である。）が含まれる。透析には、透析袋（所定の多孔性の膜ケース）を充填すること、袋を縛ること、及び袋を水槽中に配置することが必要とされる。拡散を通じて、袋の中の塩の濃度は、槽の中の塩の濃度と平衡化し、巨大分子、例えば、袋を通じて拡散することができないタンパク質は袋の中に残存する。袋の中の試料容積に比べて槽の容積が大きくなるほど、到達され得る平衡濃度はより低くなる。一般に、塩の全てを完全に除去するために、槽の水の置換が必要とされる。ゲルろ過は、分子サイズに基づいて分子を分離する非吸着性クロマトグラフィー技術である。ゲルろ過では、大きな分子（例えば、タンパク質）は、サイズ排除によって、より小さな分子（例えば、塩）から分離され得る。

#### 【0122】

本発明の好ましい実施形態において、実質的に水とタンパク質である水性製剤が達成されるように、第一のタンパク質溶液は、水との容積交換に繰り返し供される。透析ろ過工程は、溶液中のタンパク質に応じて、あらゆる回数実施され得、1つの透析ろ過工程は1つの全容積交換に等しい。一実施形態において、透析ろ過プロセスは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又はタンパク質が水の中に実質的に溶解されるように、第一のタンパク質溶液から賦形剤（例えば、塩）を除去するのに必要と考えられる最大の回数まで実施される。タンパク質溶液の最初の容積に等しい水の容積が保持物質側に添加されたときに、透析ろ過の一回のラウンド又は工程が達成される。

#### 【0123】

一実施形態において、タンパク質溶液は、少なくとも2回の透析ろ過工程に供される。一実施形態において、水との透析ろ過工程又は容積交換は、少なくとも4回反復され、好ましくは、少なくとも5回反復され得る。一実施形態において、少なくとも6倍の容積交換が達成されるまで、最初のタンパク質溶液が水との透析ろ過に供される。別の実施形態において、少なくとも7倍の容積交換が達成されるまで、最初のタンパク質溶液が水との透析ろ過に供される。上に明記されている数字、例えば、4から6又は5から7の中間の範囲も、本発明の一部であることが意図される。例えば、上限及び/又は下限として上に明記されている値の何れの組み合わせを用いた値の範囲も、含まれるものとする。

#### 【0124】

好ましい実施形態において、限外ろ過膜のろ液側へのタンパク質の喪失は最小限に抑えられるべきである。ある膜のろ液側へのタンパク質喪失のリスクは、膜の孔サイズに対するタンパク質のサイズ及びタンパク質の濃度に関連して変動する。タンパク質濃度の増加とともに、ろ液へのタンパク質喪失のリスクは増加する。ある膜孔サイズに関して、タンパク質喪失のリスクは、より大きなタンパク質より、膜のMWCOとサイズが近いより小さなタンパク質に関してより大きい。従って、より小さなタンパク質に対してDF/UFを実施する場合、許容できないタンパク質喪失を招くことなく、同じ膜を用いて、より大きなタンパク質に対してDF/UFを行う場合と比べて、同じ容積の低下を達成することは不可能であり得る。換言すれば、同じ装置及び膜を用いるより小さなタンパク質の溶液の限外ろ過と比べて、より大きなタンパク質の溶液はより小さな容積まで限外ろ過することができ、同時に、溶液中のタンパク質の濃度はより高くなる。ある孔サイズの膜を使用するDF/UF操作は、より大きなタンパク質と比べて、より小さなタンパク質に対してより多くのプロセス工程を必要とし得る。より大きなタンパク質に対して容積の低下及び

10

20

30

40

50

濃縮がより大きくなることによって、より多くの水の容量を添加し直すことが可能となり、その各プロセス工程に対して、タンパク質溶液中の残存する緩衝液又は賦形剤成分の希釈がより大きくなる。従って、より小さなタンパク質に比べて、より大きなタンパク質に対して溶質のある低下を達成するために、より少ないプロセス工程が必要とされ得る。タンパク質のサイズ及び操作において使用される限外ろ過装置の孔サイズが与えられれば、当業者は、各プロセス工程を用いて可能な濃縮の量及び溶質のある低下を達成するために必要とされる総プロセス工程の数を計算することができる。

#### 【0125】

本発明の透析ろ過法の結果、最初のタンパク質溶液中の溶質の濃度は、実質的に水及びタンパク質を含む最終水性製剤中において、著しく低下される。例えば、水性製剤は、最初のタンパク質溶液の少なくとも95%低い、好ましくは、最初のタンパク質溶液の少なくとも99%低い賦形剤の最終濃度を有し得る。例えば、一実施形態において、WFI中にタンパク質を溶解することは、理論的な最終賦形剤濃度を与えるプロセスであり、 $C_i e^{-5} = 0.00674$  (すなわち、約99.3%の最大賦形剤低下) に等しい又はほぼ等しい5つの透析ろ過容積を用いる一定容積の透析ろ過によって達成される。一実施形態において、当業者は、一定容積の透析ろ過を用いる市販のDF/UFの最後の工程の間に、6つの容積交換を実施し得る(すなわち、 $C_i$ は、 $C_i e^{-6} = 0.0025$ である)。これは、約99.75%の最大理論的賦形剤低下率を与える。別の実施形態において、当業者は、理論的な約99.9%の最大賦形剤減少率を得るために、8つの透析ろ過容積交換を使用し得る。

#### 【0126】

「賦形剤なし」又は「賦形剤を含まない」という用語は、製剤が、実質的に賦形剤を含まないことを示す。一実施形態において、賦形剤なしとは、緩衝液なし、塩なし、糖なし、アミノ酸なし、界面活性剤なし及び/又はポリオールなしを示す。一実施形態において、「実質的に賦形剤を含まない」という用語は、溶液又は製剤が賦形剤の少なくとも99%を含まないことを示す。しかしながら、ある種の実施形態において、製剤は、ある種の特定の非イオン性賦形剤(例えば、ショ糖又はマニトール)を含み得るが、製剤は、それ以外、賦形剤を含まないことに注目すべきである。例えば、製剤は、水、タンパク質及びマニトールを含み得、製剤は、それ以外の賦形剤を含まない。別の例において、製剤は、水、タンパク質及びポリソルベート80を含み得、製剤は、それ以外の賦形剤を含まない。さらに別の例において、製剤は、水、タンパク質、ソルビトール及びポリソルベート80を含み得、製剤は、それ以外の賦形剤を含まない。

#### 【0127】

本明細書に記載されている方法に従って最初のタンパク質溶液を透析ろ過するために水が使用される場合、イオン性賦形剤は洗浄除去され、その結果、透析ろ過された水性製剤の伝導度は、最初のタンパク質溶液より低い。水溶液が電気を伝えれば、イオン性賦形剤を用いた場合に見出されるように、水はイオンを含有するはずである。従って、低い伝導度の測定は、本発明の水性製剤が著しく低下した賦形剤(イオン性賦形剤を含む。)を有することを示唆する。

#### 【0128】

溶液の伝導度は、本分野で公知の方法に従って測定される。水性製剤の伝導を測定するために、伝導度メータ及びセルを使用することができ、伝導度メータ及びセルは、使用前に、標準溶液に対して較正すべきである。本分野において利用可能な伝導度メータの例には、MYRON L Digital (Cole Parmer<sup>(R)</sup>)、Conductometer (Metrohum AG) 及び Series 3105 / 3115 Integrated Conductivity Analyzers (Kemotron) が含まれる。一実施形態において、水性製剤は、3 mS / mc 未満の伝導度を有する。別の実施形態において、水性製剤は、2 mS / mc 未満の伝導度を有する。さらに別の実施形態において、水性製剤は、1 mS / mc 未満の伝導度を有する。本発明の一態様において、水性製剤は、0.5 mS / mc 未満の伝導度を有する。上に明記されている数値の中

間の範囲（例えば、1 から 3 m S / c m）も、本発明によって包含されるものとする。例えば、上限及び / 又は下限として、上に明記されている値の何れかの組み合わせを用いた値の範囲が含まれるものとする。さらに、明記されている数値の中に属する値、例えば、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、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0 なども、本発明に含まれる。

#### 【0129】

本発明の重要な態様は、透析ろ過されたタンパク質溶液（最初のタンパク質溶液の透析ろ過プロセス後に得られた溶液）を濃縮できるということである。このプロセスに従うことによって、タンパク質の高い濃度が水の中で安定的であることが発見された。透析ろ過後の濃縮は、水及び最初のタンパク質溶液に比べて増加したタンパク質濃度を含有する水性製剤をもたらす。従って、本発明は、透析ろ過溶媒として水を用いてタンパク質溶液を透析ろ過すること及び続いて、得られた水溶液を濃縮することも含む。透析ろ過されたタンパク質溶液の濃縮は、遠心などの本分野で公知の手段を通じて達成され得る。例えば、透析ろ過に続いて、水を基礎とする透析ろ過されたタンパク質溶液は、水を基礎とする溶液を維持しながら、高濃度製剤中への限外ろ過を介してタンパク質を濃縮する役割を果たす遠心プロセスに供される。限外ろ過膜及び / 又は装置を用いた遠心を介して、例えば、Vivaspin centrifugal concentrator (Sartorius Corp. Edgewood, NY) を用いて溶液を濃縮するための手段が、本分野において公知である。

#### 【0130】

本発明の方法は、さらなる安定化剤の必要なしに、水の中に極めて高いレベルでタンパク質を濃縮する手段を提供する。本発明の方法を用いて得られた水性製剤中のタンパク質の濃度は、所望の濃度に従うあらゆる量であり得る。例えば、本明細書中の方法に従って作製された水溶液中のタンパク質の濃度は、少なくとも 10 µg / mL、少なくとも約 1 mg / mL、少なくとも約 10 mg / mL、少なくとも約 20 mg / mL、少なくとも約 50 mg / mL、少なくとも約 75 mg / mL、少なくとも約 100 mg / mL、少なくとも約 125 mg / mL、少なくとも約 150 mg / mL、少なくとも約 175 mg / mL、少なくとも約 200 mg / mL、少なくとも約 220 mg / mL、少なくとも約 250 mg / mL、少なくとも約 300 mg / mL 又は約 300 mg / mL 超である。上に明記されている濃度の中間の範囲、例えば、少なくとも約 113 mg / mL、少なくとも約 214 mg / mL 及び少なくとも約 300 mg / mL も、本発明によって包含されるものとする。さらに、上限及び / 又は下限として上に明記されている値（又は上に記載されている範囲の間の値）の何れかの組み合わせを用いた値の範囲、例えば、100 から 125 mg / mL、113 から 125 mg / mL 及び 126 から 200 mg / mL 又はそれ以上が含まれるものとする。

#### 【0131】

本発明の方法は、水性タンパク質製剤の高い濃度に関わらず、得られた製剤がタンパク質凝集物の低いパーセントを有するという利点を提供する。一実施形態において、水及びタンパク質（例えば、抗体）の高い濃度を含む水性製剤は、界面活性剤又は賦形剤の他の種類の不存在下でさえ、約 5 % 未満のタンパク質凝集物を含有する。一実施形態において、製剤は、約 7.3 % 以下の凝集物タンパク質を含み、製剤は、約 5 % 以下の凝集物タンパク質を含み、製剤は、約 4 % 以下の凝集物タンパク質を含み、製剤は、約 3 % 以下の凝集物タンパク質を含み、又は、製剤は約 1 % 以下の凝集物タンパク質を含む。一実施形態において、製剤は、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 % 又は少なくとも約 99 % の単量体タンパク質を含む。上に明記されている濃度の中間の範囲、例えば、少なくとも約 98.6 %、約 4.2 % 以下も、本発明の一部であるものとする。さらに、上限及び / 又は下限として上に明記されている値の何れかの組み合わせを用いる値の範囲が含まれるものとする。

## 【0132】

タンパク質を基礎とする多くの医薬製品は、高い濃度で製剤化される必要がある。適切な効力を達成するために、及び最大約1 mLの注射容積の典型的な患者による使用要件を充足させるために、例えば、抗体を基礎とする製品は、医薬品(DP; Drug Product)製剤中で100 mg/mLを超える傾向が増大している。従って、タンパク質濃度を増加させるために、最終製剤緩衝液中への透析ろ過又は限外ろ過などの下流処理工程も、より高い濃度で行われる。

## 【0133】

古典的な熱力学は、とりわけ、より高いタンパク質濃度で、分子間相互作用が透析膜を横切る小さな溶質の分配に影響を与え得ること、並びに非理想的な透析平衡化を記載するモデル及び分子間相互作用の効果が利用可能であることを予想する(Tandord Physical chemistry or macromolecules. New York, John Wiley and Sons, Inc., p. 182, 1961; Tester and Modell Thermodynamics and its applications, 3<sup>rd</sup> ed. Upper Saddle River, NJ, Prentice-Hall, 1997)。モデルのこれらの種類を適用するために必要とされる、プロセス開発環境において詳細な熱力学的データが利用不能である際には、商業的なDF/UF操作の設計の間に、分子間相互作用が考慮されることは稀である。その結果、DP賦形剤濃度は、表示された濃度とは著しく異なり得る。市販の及び開発中の製品におけるこの相違の幾つかの例、例えば、IL-1受容体アンタゴニストにおける表示より最大30%少ない塩化物、PEG-sTNF受容体における表示より40%少ないヒスチジン及び融合連結物タンパク質における表示より最大200%高いアセタートが公表されている(Stoner et al., J. Pharm. Sci., 93, 2332-2342 (2004))。Donnan効果(Tombs and Peacocke (1974) Oxford; Clarendon Press)、非特異的相互作用(Arakawa and Timasheff, Arch. Biochem. Biophys., 224, 169-77 (1983); Timasheff, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 22, 67-97 (1993)及び容積排除効果など、実際のDPが、タンパク質がその中に透析ろ過される緩衝液の組成と異なり得る幾つかの理由が存在する。多くのタンパク質部分的特異的容積を含む容積排除は、0.7と0.8 mL/gの間である<sup>5</sup>。従って、100 mg/mLの球状タンパク質に関して、タンパク質分子は総溶液容積の約7.5%を占める。著しい分子間相互作用が存在しないと仮定すれば、これは、膜の浸透物質側のモル濃度の92.5%である膜の保持物質側の溶質モル濃度に相当する。これは、基本的に全てのタンパク質溶液組成が限外ろ過処理の間に必ず変化するかを説明する。例えば、40 mg/mLにおいて、タンパク質分子は総溶液容積の約3%を占め、150 mg/mLまで濃度を増加させる限外ろ過工程は、(150 mg/mLのタンパク質は総溶液容積の11%超に相当するので)8%を超える変化になるようにモル賦形剤濃度を必ず誘導する。上に明記されているパーセントの中間の範囲も、本発明の一部であるものとする。さらに、上限及び/又は下限として上に明記されている値の何れかの組み合わせを用いた値の範囲が含まれるものとする。

## 【0134】

本発明の方法及び組成物に従えば、DF/UF操作の間の緩衝液組成の変化は、透析ろ過溶媒として純水を使用することによって回避することができる。最終のBulk DS中に所望される濃度より約20%高くタンパク質を濃縮することによって、その後、例えば、高度に濃縮された賦形剤原溶液を介して、賦形剤が添加され得る。次いで、賦形剤濃度及び溶液のpHは、表示と同じになることが保証され得る。

## 【0135】

本発明の水性製剤は賦形剤を実質的に含有しないので、出発材料として利点を与える。水中での透析ろ過後に製剤に添加されるあらゆる賦形剤は正確に計算することができる。すなわち、賦形剤の予め存在する濃度は、計算を妨害しない。医薬として許容される賦形

10

20

30

40

50

剤の例は、「Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)」(参照により、本明細書に組み込まれる。)に記載されている。従って、本発明の別の態様は、賦形剤(非イオン性賦形剤又はイオン性賦形剤を含む。)の公知の濃度を有する製剤、特に医薬製剤を調製するために、本明細書に記載されている方法を通じて得られた水性製剤を使用することを含む。本発明の一態様は、水及びタンパク質を含む水性製剤に賦形剤を添加する追加の工程を含む。従って、本発明の方法は、賦形剤を実質的に含まず、水、タンパク質及び賦形剤の特定の濃度を含む製剤を調製するための出発材料として使用され得る水性製剤を提供する。

【0136】

10

一実施形態において、本発明の方法は、特徴(例えば、タンパク質濃度、タンパク質の水力学的直径、伝導度など)を変化させずに、非イオン性賦形剤(例えば、糖)又は非イオン性界面活性剤(ポリソルベート及びポロキサマーなど)を製剤に添加するために使用され得る。

【0137】

上の方法を用いて得られた水性製剤のさらなる特徴及び利点は、以下のIII節に記載されている。本発明の方法を実施するための典型的なプロトコールも、以下の実施例に記載されている。

【0138】

#### III. 本発明の製剤

20

本発明は、追加の賦形剤が不要な水中でのタンパク質の安定性、タンパク質の溶解度を維持するための追加の賦形剤が不要なタンパク質の増大した濃度及び低い浸透圧など、本分野における旧来の製剤に比べて多数の利点を有する、タンパク質及び水を含む水性製剤を提供する。製剤中のタンパク質は、高いタンパク質濃度及び凍結/融解処理工程の繰り返しでさえ、保存(例えば、7で3ヶ月を超えて液体形態として又は凍結/融解条件として保存される)の間に安定な状態を保つので、本発明の製剤は、有利な保存特性も有する。一実施形態において、本発明の製剤は、水性製剤が著しい乳白光、凝集又は沈降を示さないように、タンパク質の高い濃度を含む。

【0139】

本発明の水性製剤は、標準的な賦形剤、例えば、浸透圧修飾剤、安定化剤、界面活性剤、抗酸化剤、凍結保護剤、充填剤、凍結乾燥保護剤、塩基性成分及び酸性成分に依存しない。本発明の他の実施形態において、製剤は、水、1つ又はそれ以上のタンパク質を含有し、及びイオン性賦形剤(例えば、塩、遊離のアミノ酸)を含まない。

30

【0140】

ある種の実施形態において、本発明の水性製剤は、少なくとも50mg/mLのタンパク質濃度及び水を含み、製剤は、30mOsmol/kg以下の浸透圧を有する。水性製剤の浸透圧のより低い限度も、本発明によって包含される。一実施形態において、水性製剤の浸透圧は、15mOsmol/kg以下である。本発明の水性製剤は、30mOsmol/kg未満の浸透圧を有し得、高いタンパク質濃度も有する。例えば、タンパク質の濃度は、少なくとも100mg/mLであり、最大200mg/mL又はそれ以上であり得る。上に明記されている濃度及び浸透圧単位の中間の範囲も、本発明の一部であるものとする。さらに、上限及び/又は下限として上に明記されている値の何れかの組み合わせを用いる値の範囲が含まれるものとする。

40

【0141】

本発明の水性製剤の濃度は、タンパク質のサイズによって限定されず、製剤は、タンパク質のあらゆるサイズ範囲を含み得る。タンパク質の少なくとも50mg/mL及び最大200mg/mL又はそれ以上(5kDaから150kDa又はそれ以上のサイズ範囲であり得る。)を含む水性製剤が、本発明の範囲に含まれる。一実施形態において、本発明の製剤中のタンパク質は、少なくとも約15kDのサイズ、少なくとも約20kDのサイズ、少なくとも約47kDのサイズ、少なくとも約60kDのサイズ、少なくとも約80

50

kDのサイズ、少なくとも約100kDのサイズ、少なくとも約120kDのサイズ、少なくとも約140kDのサイズ、少なくとも約160kDのサイズ又は約160kDを上回るサイズである。上に明記されているサイズの間際の範囲も、本発明の一部であるものとする。さらに、上限及び/又は下限として上に明記されている値の何れかの組み合わせを用いる値の範囲が含まれるものとする。

#### 【0142】

本発明の水性製剤は、溶液中のタンパク質の水力学的直径( $D_h$ )によって特徴付けられ得る。溶液中のタンパク質の水力学的直径は、タンパク質の $D_h$ を測定するための確立された分析法である動的光散乱(DLS)を用いて測定され得る。モノクローナル抗体(例えば、IgG)に対する典型的な値は、約10nmである。本明細書に記載されているもののような低イオン性製剤は、イオン性賦形剤を含むタンパク質製剤より、タンパク質の $D_h$ が顕著に低いことを特徴とし得る。交換溶媒として純水を使用するDF/UFBプロセスを用いて作製された水性製剤中の抗体の $D_h$ 値は、タンパク質濃度と独立して、慣用の製剤中の抗体の $D_h$ より顕著に低い。一実施形態において、本発明の水性製剤中の抗体は、4nm未満又は3nm未満の $D_h$ を有する。

10

#### 【0143】

一実施形態において、水性製剤中のタンパク質の $D_h$ は、タンパク質濃度と無関係に、緩衝化された溶液中の同じタンパク質の $D_h$ と比べてより小さい。したがって、ある実施形態において、本明細書に記載されている方法に従って作製された水性製剤中のタンパク質は、同じ所定濃度の緩衝化された溶液中のタンパク質の $D_h$ より少なくとも25%小さい $D_h$ を有する。緩衝化された溶液の例には、リン酸緩衝化された生理的食塩水(PBS)が含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態において、本発明の水性製剤中のタンパク質は、所定の濃度のPBS中のタンパク質の $D_h$ より少なくとも50%小さい、所定の濃度のPBS中のタンパク質の $D_h$ より少なくとも60%小さい、所定の濃度のPBS中のタンパク質の $D_h$ より少なくとも70%小さい、又は所定の濃度のPBS中のタンパク質の $D_h$ より少なくとも70%超小さい $D_h$ を有する。上に明記されているパーセントの間際の範囲、例えば、55%、56%、57%、64%、68%なども、本発明の一部であるものとする。さらに、上限及び/又は下限として上に明記されている値の何れかの組み合わせを用いる値の範囲、例えば、50%から80%が含まれるものとする。

20

#### 【0144】

タンパク質の凝集は、タンパク質溶液に共通する問題であり、タンパク質の増加した濃度からしばしば生じる。本発明は、高濃度低タンパク質凝集製剤を達成するための手段を提供する。本発明の製剤は、タンパク質を製剤中に可溶性に保ち、凝集しないようにするために、緩衝系及び界面活性剤などの賦形剤に依存しない。本発明の製剤は、タンパク質濃度が高く、水を基礎としており、溶液中において高い安定なタンパク質濃度を達成するための他の因子に依存しないので、治療目的のために有利であり得る。

30

#### 【0145】

生物的産物(抗体など)の大半は、溶液中での非酵素的反応にしばしば起因する数多くの分解過程に供せられる。これらの反応は、産物の安定性、安全性及び有効性に対して長期の影響を有し得る。これらの不安定性は、ゼロを下回る温度で産物を保存することによって、消失されないまでも、遅延させることができ、したがって、産物のライフサイクルにわたる供給物の柔軟性及び利用可能性に関して、製造者に対する多大な利点を得られる。多くの場合、凍結は、生物的産物保存の最も安全で、最も信頼できる方法であるが、固有のリスクを有する。凍結は、氷-液体界面を導入することによって、及び水が結晶化するとき溶質の凍結濃縮(凍結濃縮)によって、冷変性を通じて、タンパク質中にストレスを誘導し得る。

40

#### 【0146】

凍結濃縮は、溶質分子(ショ糖、塩などの小分子、及びタンパク質製剤中で典型的に使用される他の賦形剤又はタンパク質などの高分子)を排除する、制御されずに移動する平坦な氷の前面が凍結の間に形成され、局所的なpH又は極端なイオン濃度をもたらす可能

50

性を秘めた濃度の他の溶質の存在下において、タンパク質が相対的に高い濃度で見出され得るゾーンをもたらす過程である。多くのタンパク質において、これらの条件は変性をもたらすことができ、幾つかの事例では、タンパク質及び溶質の沈降をもたらすことができる。緩衝液塩及び他の溶質も、このような条件下で濃縮されるので、これらの成分は、凍結塊内のゾーン中にpH及び/又は酸化還元変化をもたらすのに十分高い濃度に達し得る。凍結の間に、溶液中での緩衝液塩の結晶化(例えば、リン酸塩)の結果として観察されるpHシフトは、数pH単位にわたり得、これは、タンパク質の安定性に影響を及ぼし得る。

#### 【0147】

濃縮された溶質は、溶質が全く凍結され得ず、これらの有害な条件下でタンパク質が溶液内に存在する程度まで、凝固点の低下ももたらし得る。これらの望ましくない条件にタンパク質が曝露される期間を短縮させるために、しばしば、急速な冷却が適用され得る。しかしながら、急速な凍結は、巨大な面積の氷-水界面を誘導し得るのに対して、遅い冷却はより小さな界面領域を誘導する。例えば、1つの凍結/融解工程の間に、6つのモデルタンパク質を急速冷却することによって、遅い冷却の10サイクルを上回る変性効果をもたらすことが示され、氷表面によって誘導された疎水性変性の大規模な不安定化の可能性を示す。

#### 【0148】

本発明の水性製剤は、有利な安定性及び保存特性を有する。水性製剤の安定性は保存の形態に依存せず、凍結され、凍結乾燥され又は噴霧乾燥された製剤が含まれるが、これらに限定されない。安定性は、選択された期間、選択された温度で測定することができる。本発明の一態様において、水性製剤中のタンパク質は、少なくとも3ヶ月、少なくとも4ヶ月、少なくとも5ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも12ヶ月、液体形態で安定である。上に明記されている期間の中間の範囲、例えば、9ヶ月なども、本発明の一部であるものとする。さらに、上限及び/又は下限として上に明記されている値の何れかの組み合わせを用いる値の範囲が含まれるものとする。好ましくは、製剤は、室温(約30)で又は40で少なくとも1ヶ月安定であり、及び/又は約2から8で少なくとも1年間安定であり、又はより好ましくは、約2から8で少なくとも2年間安定である。さらに、好ましくは、製剤は、製剤の凍結(例えば、-80への)及び融解(以下、「凍結/融解サイクル」と称される。)後に安定である。

#### 【0149】

タンパク質の安定性は、生物学的に活性な状態を保つ能力としても定義することができる。対象に投与したときに、医薬製剤中のタンパク質が生物学的に活性を有すれば、タンパク質は、医薬製剤中で「その生物活性を保持する」。例えば、(例えば、抗原結合アッセイにおいて測定された場合に)医薬製剤中の抗体の生物活性が、医薬製剤が調製された時点で示された生物活性の(アッセイの誤差内で)約30%、約20%又は約10%以内であれば、抗体の生物活性が保持されている。

#### 【0150】

水性製剤中のタンパク質の安定性は、製剤中のタンパク質の単量体、凝集物若しくは断片又はこれらの組み合わせのパーセントとしても定義され得る。色及び/又は透明性の視覚的検査に際して、又は紫外線光散乱によって若しくはサイズ排除クロマトグラフィーによって測定された場合に凝集、沈殿及び/又は変性の兆候を実質的に示さなければ、タンパク質は、製剤中で、「その物理的安定性を保持する」。本発明の一態様において、安定な水性製剤は、製剤中に凝集物として存在しているタンパク質の約10%未満、好ましくは約5%未満を有する製剤である。

#### 【0151】

本発明の水性製剤の別の特徴は、幾つかの事例において、水を用いたタンパク質の透析ろ過は、最初のタンパク質溶液と比べて改善された粘度特性(すなわち、透析ろ過されたタンパク質溶液の粘度は、最初のタンパク質溶液と比べて低下している。)を有す水性製剤をもたらす。当業者は、本発明の様々な実施形態での製剤の調製において、粘度を測定

10

20

30

40

50

するための複数の方法を使用できることを認識する。例えば、運動学的な粘度データ (cSt) は、毛細管を用いて作成され得る。他の実施形態において、動的粘度データは、単独で又は他の粘度データとともに表示される。動的粘度データは、運動学的な粘度データに密度を乗ずることによって作成され得る。

【0152】

一実施形態において、本発明は、他の所望の特徴 (非乳白光など) を変化させずに、マニトールなどの非イオン性賦形剤を添加することによって、高タンパク質濃度 - 水溶液において所望されるように、浸透圧及び/又は粘度などのある種の特徴を調整する方法も提供する。従って、水を基礎とし、タンパク質の高い濃度を有し、タンパク質を水に移す間若しくは移した後に、又は透析ろ過の間に、例えば、製剤の浸透圧又は粘度特徴を改善する賦形剤が添加されている製剤が本発明の範囲に含まれる。従って、タンパク質を最終の低イオン性製剤中に移す過程の間に、このような非イオン性賦形剤を添加することも本発明の範囲に属する。製剤の所望される特徴を変化させるために本発明の水性製剤に添加され得る非イオン化可能な賦形剤の例には、マニトール、ソルビトール、非イオン性界面活性剤 (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 又はポリソルベート 80)、シヨ糖、トレハロース、ラフィノース及びマルトースが含まれるが、これらに限定されない。

【0153】

本明細書の製剤は、2以上のタンパク質も含有し得る。医薬製剤に関して、治療されている具体的な適応症に対する必要に応じて、さらなる別個のタンパク質、好ましくは、他のタンパク質に悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを添加し得る。例えば、TNF 又は IL-12 に結合する 2 つ又はそれ以上の抗体を単一の製剤中に与えることが望ましい場合があり得る。さらに、抗 TNF 又は抗 IL-12 抗体を 1 つの製剤中に組み合わせ得る。このようなタンパク質は、意図される予定に対して有効である量で組み合わせると好適に存在する。

【0154】

水性製剤中に含まれ得るタンパク質の例には、抗体又はその抗原結合断片が含まれる。本発明において使用され得る抗体又はその抗原結合断片の異なる種類の例には、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体及びドメイン抗体 (dAb) が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、本発明の方法及び組成物において使用される抗体は、抗 TNF 抗体若しくはその抗原結合部分又は抗 IL-12 抗体若しくはその抗原結合部分である。本発明において使用され得る抗体又はその抗原結合断片の別の例には、1D4.7 (抗 IL-12 / 抗 IL-23; Abbott Laboratories)、2.5 (E) mg1 (抗 IL-18; Abbott Laboratories)、13C5.5 (抗 IL-13; Abbott Laboratories)、J695 (抗 IL-12; Abbott Laboratories)、A felimomab (Fab2 抗 TNF; Abbott Laboratories)、Humira (アダリムマブ (D2E7); Abbott Laboratories)、Campath (Alemtuzumab)、CEA-Scan Arcitumomab (fab断片)、Erbiximab (Cetuximab)、Herceptin (Trastuzumab)、Myoscint (Imciromab Pentetate)、ProstaScint (Capromab Pendetide)、Remicade (Infliximab)、Reopro (Abciximab)、Rituxan (Rituximab)、Simullect (Basiliximab)、Synagis (Palivizumab)、Verluma (Nofetumomab)、Xolair (Omalizumab)、Zenapax (Daclizumab)、Zevalin (Ibritumomab Tixetan)、Orthoclone OKT3 (Muromonab-CD3)、Panorex (Edrecolomab) 及び Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicin) golimumab (Centocor)、Cimzia (Certolizumab pegol)、Soliris (Eculizumab)、CN

10

20

30

40

50

TO1275 (ustekinumab)、Vectibix (panitumumab)、Bexxar (tositumomab 及び I<sup>131</sup> tositumomab) 及び Avastin (bevacizumab) が含まれるが、これらに限定されない。

【0155】

1つの別例において、タンパク質は、Pulmozyme (ドルナーゼ)、Regranex (ベカプレルミン)、Activase (アルテプラゼ)、Aldurazyme (ラロニダーゼ)、Amevive (Alefcept)、Aranesp (ダルベポエチン)、Becaplermin 濃縮物、Betaseron (インターフェロン - 1b)、BOTOX (ボツリヌス毒素A型)、Elitek (ラスブリカーゼ)、Elspar (アスパラギナーゼ)、Epogen (エポエチン)、Enbrel (Etanercept)、Fabrazyme (アガルシダーゼ)、Infergen (インターフェロン con - 1)、IntronA (インターフェロン - 2a)、Kineret (Anakinra)、MYOBLOC (ボツリヌス毒素B型)、Neulasta (Pegfilgrastim)、Neumega (Oprelvekin)、Neupogen (Filgrastim)、Ontak (Denileukin diftitox)、PEGASYS (Peginterferon - 2a)、Proleukin (Aldesleukin)、Pulmozyme (ドルナーゼ)、Rebif (インターフェロン - 1a)、Regranex (Becaplermin)、Retavase (Retepase)、Roferon - A (インターフェロン - 2)、TNKase (Tenecteplase) 及び Xigris (Drotrecogin)、Arcalyst (Rilonacept)、NPlate (Romiplostim)、Mircera (メトキシポリエチレングリコール - エポエチン)、Cinryze (C1 エステラーゼ阻害剤)、Elaprase (イズロン酸硫酸化酵素)、Myozyme (アルグルコシダーゼ)、Orencia (abatcept)、Naglazyme (ガルスルファーゼ)、Kepivance (palifermin) 及び Actimmune (インターフェロン - 1b) などの (但し、これらに限定されない。) 治療用タンパク質である。

【0156】

本明細書に記載されている方法及び組成物中に含まれ得るタンパク質の他の例には、例えば、成長ホルモン (ヒト成長ホルモン及びウシ成長ホルモンを含む。)、成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質； - 1 - アンチトリプシン；インシュリンA鎖；インシュリンB鎖；プロインシュリン；濾胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；第VIIIC因子；第IX因子；組織因子及びフォン・ビルブランド因子などの凝固因子；プロテインCなどの抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺界面活性剤；ウロキナーゼ又は組織型プラスミノゲン活性化因子 (t - PA) などのプラスミノゲン活性化因子；ボムバジン；トロンビン；腫瘍壊死因子 - 及び - エンケファリナーゼ；RANTES (regulated on activation normally T - cell expressed and secreted)；ヒトマクロファージ炎症タンパク質 (MIP - 1 - )；ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン；ミューラー管抑制因子；リラキシンA - 鎖；リラキシンB - 鎖；プロリラキシン；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；DNアーゼ；インヒピン；アクチピン；血管内皮性成長因子 (VEGF)；ホルモン又は成長因子に対する受容体；インテグリン；プロテインA又はD；リウマチ因子；骨由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン - 3、 - 4 -、 - 5 - 若しくは - 6 (NT - 3、NT4、NT - 5 又は NT - 6) 又は NGF - などの神経成長因子などの神経栄養因子；血小板由来成長因子 (PDGF)；aFGF 及び bFGF などの繊維芽成長因子；上皮成長因子 (EGF)；TGF 及び TGF - (TGF - 1、TGF - 2、TGF - 3、TGF - 4 又は TGF - 5 など) などの形質転換成長因子 (TGF)；インシュリン様成長因子 - I 及び - II (IGF - I 及び IGF - II)；des (1 - 3) - IGF - I (脳 IGF - I)；インシュリン様成長因子結合タンパク質；CD3、CD4、CD8、

CD19及びCD20などのCDタンパク質；エリスロポエチン（EPO）；トロンボポエチン（TPO）；骨誘導性因子；イムノトキシン；骨形成タンパク質（BMP）；インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ などのインターフェロン；コロニー刺激因子（CSF）、例えば、M-CSF、GM-CSF及びG-CSF；インターロイキン（IL）、例えば、IL-1からIL-10；スーパーオキシドディスムターゼ；T細胞受容体；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；例えば、AIDS外被の一部などのウイルス抗原；輸送タンパク質；ホーミング受容体；アドレッシン；制御タンパク質；免疫接着物質；抗体及び上に列記されているポリペプチドの何れかの生物学的に活性な断片又は変形物などの哺乳動物タンパク質（その組換えタンパク質を含む。）が含まれる。

【0157】

IV．本発明の使用

本発明の製剤は、治療的に（すなわち、インビボで）又はインビトロ若しくはインサイチュ用の試薬として使用され得る。

【0158】

治療的使用

本発明の方法は、治療的使用に有利な特徴を有する水を基礎とする製剤を作製するためにも使用され得る。水性製剤は、対象中の疾患を治療するための医薬製剤として使用され得る。

【0159】

本発明の製剤は、治療用タンパク質が治療に適しているあらゆる疾患を治療するために使用され得る。「疾患」は、タンパク質を用いた治療が有益であるあらゆる症状である。これには、問題の疾患に対して哺乳動物が素因を有するようにする病的症状を含む、慢性及び急性疾患又は疾病が含まれる。抗TNF抗体の場合には、抗体の治療的有効量は、関節リウマチなどの自己免疫疾患、クローン病などの腸疾患、強直性脊椎炎などの脊椎関節症又は乾癬などの皮膚疾患を治療するために投与され得る。抗IL-12抗体の場合には、多発性硬化症などの神経疾患又は乾癬などの皮膚疾患を治療するために、抗体の治療的有効量が使用され得る。治療のために本発明の製剤を使用し得る疾患の他の例には、乳癌、白血病、リンパ腫及び大腸癌などの癌が含まれる。

【0160】

「対象」という用語は、生物（例えば、原核生物及び真核生物）が含まれるものとする。対象の例には、哺乳動物、例えば、ヒト、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、マウス、ウサギ、ラット及びトランスジェニック非ヒト動物が含まれる。本発明の特定の実施形態において、対象はヒトである。

【0161】

「治療」という用語は、治療的処置及び予防的又は防止的措置の何れをも表す。治療が必要なものには、疾患を既に有するものの他に、疾患を予防すべきものが含まれる。

【0162】

水性製剤は、投与の公知の方法に従って、治療を必要としている哺乳動物（ヒトを含む。）に投与され得る。投与の方法の例には、大量瞬時投与又はある期間にわたる継続的注入によるなどの静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑膜内、くも膜下腔内、皮内、経皮、経口、局所又は吸入投与が含まれる。

【0163】

一実施形態において、水性製剤は、皮下投与によって、哺乳動物に投与される。このような目的のために、製剤は、注射器及び注射装置（例えば、Inject-ease及びGenject装置）、注射用ペン（GenPenなど）、無針装置（例えば、Medijector及びBiojector 2000）及び皮下パッチ送達系などのその他の装置を用いて注射され得る。一実施形態において、装置、例えば、注射器、自動注射用ペンは、25G又はそれ以下の直径のサイズ範囲のゲージを有する針を含有する。一実施形態において、針のゲージは、25Gから33G（これらの中間の範囲、例えば、25sG、26、26sG、27G、28G、29G、30G、31G、32G及び33Gを含む

10

20

30

40

50

。)のサイズの範囲である。好ましい実施形態において、最小の針の直径及び適切な長さは、製剤の粘度特性及び本発明の製剤を送達するために使用される装置に従って選択される。

#### 【0164】

本発明の方法/組成物の1つの利点は、無針装置を用いてタンパク質を対象に投与するのに理想的であり得る溶液中のタンパク質の高い濃度を与えることである。このような装置は、針による注射の必要なしに、対象の組織全体を通じたタンパク質の分散を可能とする。無針装置の例には、Biojector 2000 (Bioject Medical Technologies)、Cool Click (Bioject Medical Technologies)、Iject (Bioject Medical Technologies)、VitaJet 3, (Bioject Medical Technologies)、Mhi500 (The Medical House PLC)、Injex 30 (INJEX - Equidyne Systems)、Injex 50 (INJEX - Equidyne Systems)、Injex 100 (INJEX - Equidyne Systems)、Jet Syringe (INJEX - Equidyne Systems)、Jet injector (Becton-Dickinson)、J-Tip (National Medical Devices, Inc.)、Medi-Jector VISION (Antares Pharma)、MED-JET (MIT Canada, Inc.)、DermoJet (Akra Dermojet)、Sonoprep (Sontra Medical Corp.)、PenJet (PenJet Corp.)、MicroPor (Altea Therapeutics)、Zeneo (Crossject Medical Technology)、Mini-Ject (Valeritas Inc.)、ImplaJect (Caretex Medical LTD)、Intraject (Aradigm) 及び Serojet (Bioject Medical Technologies) が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0165】

水性製剤を収容する送達装置も、本発明に含まれる。このような装置の例には、注射器、ペン(自動注射用ペンなど)、インプラント、吸入装置、無針装置及びパッチが含まれるが、これらに限定されない。自動注射用ペンの例は、2007年6月29日に出願された米国特許出願11/824516号に記載されている。

#### 【0166】

本発明は、吸入によって本発明の製剤を送達する方法及びこのような送達のために前記前記製剤を含有する吸入装置も含む。一実施形態において、水性製剤は、噴霧器又は液体吸入装置を用いて、吸入を介して対象に投与される。一般に、噴霧器は、吸入のために湿潤エアロゾル又はミストとして医薬を送達するために、圧縮空気を使用し、従って、薬物を水の中に溶解させることが必要である。噴霧器の種類には、ジェット噴霧器(エアジェット噴霧器及び液体ジェット噴霧器)及び超音波噴霧器が含まれる。

#### 【0167】

噴霧器の例には、Akita<sup>TM</sup> (Activaero GmbH) (US 2001037806、EP 1258264 参照) が含まれる。Akita<sup>TM</sup> は、患者の呼吸パターンを完全に制御するPariのLC Starを基礎とする卓上式噴霧器吸入システム(重量: 7.5 kg、B x W x H: 260 x 170 x 270)である。装置は、肺及び肺末梢部への極めて高い送達率で、10分未満に、溶液中の最大500 mgの薬物を送達することができる。噴霧化された粒子の65%は5ミクロン未満であり、質量中央空力学的直径(MMAD)は、1.8パールで3.8ミクロンである。最小充填容積は2 mLであり、最大容積は8 mLである。吸入流量(200 mL/秒)及び噴霧器の圧力(0.3から1.8パール)は、スマートカードによって設定される。装置は、肺機能検査に基づいて、各患者に対して個別に調節され得る。

#### 【0168】

本発明の組成物とともに使用され得る噴霧器の別の例には、Aeroneb<sup>(R)</sup>Go / Pro / Lab噴霧器(AeroGen)が含まれる。Aeroneb<sup>(R)</sup>噴霧器は、OnQ<sup>T M</sup>技術、すなわち、振動要素によって囲まれた、正確に形成された1000超の先細形状の穴を含有する独特のドーム形状の有孔プレートから構成される電気式マイクロポンプ(直径3/8インチ及びウェハーの薄さ)を基礎とする。Aeroneb<sup>(R)</sup>Goは、家庭用の携帯式ユニットであるのに対して、Aeroneb<sup>(R)</sup>Proは、病院及び救急医療施設で使用するための再使用可能及び加熱滅菌可能な装置であり、Aeroneb<sup>(R)</sup>Labは、前臨床エアロゾル研究及び吸入試験で使用するための装置である。システムの特徴には、エアロゾルの液滴の大きさの最適化及びカスタマイズ；正確に調節された液滴サイズを有する低速のエアロゾル送達；呼吸系内での標的化された薬物送達の補助；投薬の柔軟性；溶液若しくは懸濁液中に薬物の一定容量を含有する特注の単回投薬アンプルの収容又は汎用噴霧器において使用するための市販の溶液；連続的、呼吸活性化された又はプログラム可能；並びに小児及び高齢者を含む幅広い患者の要望に適合させることが可能；単一又は複数患者の使用が含まれる。

10

## 【0169】

Aerocurrent<sup>T M</sup>(Aerovertrix corp)も、本発明の組成物とともに使用され得る(WO2006006963参照)。この噴霧器は、使い捨て可能な、予め充填される又は使用者によって充填される薬物カートリッジを特徴とする携帯式の振動メッシュ噴霧器である。

20

## 【0170】

Staccato<sup>T M</sup>(Alexza Pharm)も、本発明の組成物とともに使用することができる(WO03095012参照)。Staccato<sup>T M</sup>技術の中心的特点是、熱分解なしに薬物を蒸発させることであり、これは、薬物の薄いフィルムを急速に加熱することによって達成される。1/2秒未満で、固体の薬物フィルムを蒸気に転化させるのに十分な温度まで薬物が加熱される。吸入装置は、加熱基材、基材の上に被覆された薬物の薄いフィルム及び患者が吸入する気道という3つの中心的成分からなる。吸入装置は、呼吸によって作動され、送達される最大用量は20から25mg、MMADは1から2ミクロンの範囲である。

## 【0171】

AERx<sup>(R)</sup>(Aradigm)も、本発明の組成物とともに使用することができる(WO9848873、US5469750、US5509404、US5522385、US5694919、US5735263、US5855564参照)。AERx<sup>(R)</sup>は、AERx<sup>(R)</sup>Stripから製剤を排出するためにピストン機構を使用するバッテリー駆動式の携帯式装置である。この装置は、患者の吸入気流をモニターし、最適な呼吸パターンが達成されたときにのみ駆動する。この装置は、用量の約60%を放出用量として送達し、放出用量の50から70%を肺深部に送達し、対象間の変動性は25%未満である。

30

## 【0172】

本発明の組成物とともに使用され得る噴霧器装置の別の例には、Respimat<sup>(R)</sup>(Boehringer)が含まれる。Respimat<sup>(R)</sup>は、装置基部をねじれさせ、これにより、バネを圧縮し、製剤の計量された容積を薬物カートリッジから投薬チャンバーに移すことによって開始される複数回投薬のリザーバシステムである。装置が作動されると、バネが緩和され、バネの緩和が微小ピストンを投薬チャンバー中に強制的に移動させ、単一ブロックを通じて溶液を押し出す。ユニブロックは、2つの微細な排出ノズルチャンネルを有するフィルター構造からなる。Respimat<sup>(R)</sup>によって作製されたMMADは2µmであり、この装置は、呼吸疾患を治療するために伝統的に使用される低用量薬物に適している。

40

## 【0173】

本発明の組成物は、膜の上に堆積された薬物から構成される噴霧器システムであるCollegium Nebulizer<sup>T M</sup>(Collegium Pharma)を用い

50

て送達することもできる。剤形は、再構成溶媒を用いた再構成の後に、Colligium Nebulizerを用いた経口又は経鼻吸入を通じて患者に投与される。

【0174】

同じく本発明の組成物とともに使用され得る噴霧器装置の別の例には、Inspiration<sup>(R)</sup> 626 (Respironics)が含まれる。626は、コンプレッサを基礎とする自宅介護用噴霧器である。626は、0.5から5ミクロンの間の粒子サイズを送達する。

【0175】

本発明の組成物とともに使用することができる噴霧器には、患者の年齢、大きさ又は呼吸パターンの変動に関わらず、正確で再現性のある吸入薬用量をこのような患者へ送達するAdaptive Aerosol Delivery<sup>(R)</sup>技術 (Respironics)が含まれ得る。AAD<sup>(R)</sup>システムは、吸気及び呼気間の圧力変化を検出することによって、患者の呼吸パターンを監視するためのハンドピース内電子装置及びセンサーを取り込んでいる。センサーは、吸気の最初の部分の間に、医薬のエアロゾル送達を何時拍動させるかを決定する。治療を通じて、センサーは、先行する3つの呼吸を監視し、患者の吸気及び呼気パターンに対して適合する。AAD<sup>(R)</sup>システムは、患者がマウスピースを通じて呼吸しているときに、医薬を送達するに過ぎないので、これらの装置によって、患者は、医薬を無駄にせず、治療において休憩を取ることができる。AAD<sup>(R)</sup>システム噴霧器の例には、HaloLite<sup>(R)</sup> AAD<sup>(R)</sup>、ProDose<sup>(R)</sup> AAD<sup>(R)</sup>及びI-Neb<sup>(R)</sup> AAD<sup>(R)</sup>が含まれる。

【0176】

HaloLite<sup>(R)</sup> Adaptive Aerosol Delivery (AAD)<sup>(R)</sup> (Respironics)は、携帯型コンプレッサによって駆動される気圧式エアロゾル化システムである。AAD<sup>(R)</sup>技術は、患者の呼吸パターンを(典型的には、10ミリ秒ごとに)モニターし、使用されているシステムに応じて、吸入の特異的部分へエアロゾル化された薬物のパルスを放出させ、又は「常置されたエアロゾル雲 (standing aerosol cloud)」からの吸入の間に吸引された用量を計算する (EP0910421 (参照により、本明細書に組み込まれる。))を参照)。

【0177】

ProDose AAD<sup>(R)</sup> (Respironics)は「ProDose Disc<sup>T M</sup>」システム (Respironics)によって調節される噴霧システムである。ProDose AAD<sup>(R)</sup>は、携帯型コンプレッサによって駆動される気圧式エアロゾルシステムであり、送達されるべき用量は、とりわけ、送達する用量についてシステムに指示を与えるシステム中に挿入されたマイクロチップ含有ディスクによって調節される。ProDose Disc<sup>T M</sup>は、ProDose AAD<sup>(R)</sup> System中に挿入され、送達する量、投薬の回数についての指示 (ドラッグバッチコード及び有効期限などの様々な管理データと一緒に送達され得る。)を与えるマイクロチップを含有するプラスチックディスクである (EP1245244 (参照により、本明細書に組み込まれる。))参照)。Promixin<sup>(R)</sup>は、シュードモナス・アエルギノサ (pseudomonas aeruginosa) 肺感染症、特に、嚢胞性繊維症の管理のために、ProDose AAD<sup>(R)</sup>を介して送達することができる。Promixin<sup>(R)</sup>は、使用前に再構成される噴霧用粉末として供給される。

【0178】

I-neb AAD<sup>(R)</sup>は、別個のコンプレッサ (「I-Neb」)の必要なしに、患者の呼吸パターン中に、正確で再現性のある薬物用量を送達する携帯型AAD<sup>(R)</sup>システムである。I-neb AAD<sup>(R)</sup>は、メッシュを基礎とする電気式のエアロゾル化技術 (Omron)と患者の呼吸パターンへの投薬を調節するためのAAD<sup>(R)</sup>技術の組み合わせに基づく小型化されたAAD<sup>(R)</sup>吸入装置である。システムは、概ね、携帯電話の大きさであり、8オンス未満の重量である。I-neb AAD<sup>(R)</sup>は、Ventavis<sup>(R)</sup> (イロプロスト) (CoTherix/Schering AG)の送達のため

10

20

30

40

50

めに使用されてきた。本発明の組成物とともに使用され得る噴霧器の別の例は、Aria<sup>TM</sup> (Chrysalis)である。Ariaは、毛細管エアロゾル生成系を基礎としている。エアロゾルは、電氣的に加熱された小さな毛細管を通じて薬物製剤を拍動させることによって形成される。毛細管を出ると、製剤は、周囲の空気によって急速に冷却されて、0.5から2.0 μmの範囲のMMADを有するエアロゾルを生成する。

【0179】

さらに、本発明の組成物を送達するために、Touch Spray<sup>TM</sup> 噴霧器 (Odem) を使用し得る。Touch Spray<sup>TM</sup> 噴霧器は、リザーバの流体と接触して、超音波周波数で振動してエアロゾル雲を生成する有孔膜を使用する携帯式装置である。振動作用は、膜内の穴を通じて、液体のジェットを吸引し、ジェットを分裂して薬物の雲とする。液滴の大きさは、穴の形状/サイズ並びに表面の化学及び薬物溶液の組成によって調節される。この装置は、計量された用量の83%を深部肺に送達すると報告されている。Touch Spray<sup>TM</sup> 噴霧器の詳細は、米国特許第6,659,364号(参照により、本明細書に組み込まれる。)に記載されている。

10

【0180】

本発明の組成物とともに使用され得るさらなる噴霧器には、2つの一方向バルブを用いて患者の吸気時にエアロゾル出力を最大化し、患者の呼気時にエアロゾル出力を最小化する携帯式ユニットである噴霧器が含まれる(PARI噴霧器(PARI GmbH)参照)。隔壁によって、最適なサイズの粒子が噴霧器から排出されることが可能となる。その結果、呼吸可能な範囲中の粒子のパーセントが高くなり、肺への改善された薬物送達をもたらされる。このような噴霧器は、特定の患者集団向けに設計され得る(3歳未満の患者(PARIBABY<sup>TM</sup>)及び高齢患者用の噴霧器(PARILCPLUS<sup>(R)</sup>及びPARILCSTAR<sup>(R)</sup>)。)

20

【0181】

本発明の組成物とともに使用され得るさらなる噴霧器は、薬物溶液及び懸濁液又はコロイド状分散液をエアロゾル化させるために膜技術を振動させることを使用するe-Flow<sup>(R)</sup>噴霧器(PARI GmbH)である(、Touch Soart<sup>TM</sup>; ODEM(イギリス))。e-Flow<sup>(R)</sup>噴霧器は、0.5 mLから5 mLまでの流体容積を取り扱うことが可能であり、活性薬物の極めて高い密度、正確に規定された液滴サイズ及び可能な限り短い時間で送達される呼吸可能な液滴の高い割合を有する液滴を生成することができる。e-Flow<sup>(R)</sup>噴霧器を用いて送達されてきた薬物には、アズトレオナム及びリドカインが含まれる。e-Flow<sup>(R)</sup>噴霧器に関するさらなる詳細は、参照により、本明細書に組み込まれる米国特許第6,962,151号に記載されている。

30

【0182】

本発明の組成物とともに使用され得るさらなる噴霧器には、Microair<sup>(R)</sup>電気式噴霧器(Omron)及びMystic<sup>TM</sup>噴霧器(Ventaira)が含まれる。Microair<sup>(R)</sup>噴霧器は極めて小型であり、溶液医薬を効率的に送達するためにVibrating Mesh Technologyを使用する。Microair装置は、7 mLの収容量を有し、約5ミクロンの薬物粒子MMADサイズを生成する。Microair<sup>(R)</sup>噴霧器に関するさらなる詳細については、米国特許公開20040245547(参照により、本明細書に組み込まれる。)を参照されたい。Mystic<sup>TM</sup>噴霧器は、ほぼ単分散された帯電粒子のスプレーへ液体を分裂させるために強い電場を使用する。Mystic<sup>TM</sup>システムは、封じ込めユニット、用量計測システム、エアロゾル生成ノズル及び共同して、複数用量又は単位用量送達の選択肢を与える電圧変換装置を含む。Mystic<sup>TM</sup>装置は呼吸によって活性化され、Corus1030<sup>TM</sup>(塩酸リドカイン)、Resmycin<sup>(R)</sup>(塩酸ドキシソルピシン)、Acuair(プロピオン酸フルチカゾン)、ViroPharmのNCE及びPfizerのNCEとともに使用されてきた。Mystic<sup>TM</sup>噴霧器に関するさらなる詳細は、米国特許第6,397,838号(参照により、本明細書に組み込まれる。)に見出され得る。

40

【0183】

50

本発明の製剤を経肺送達するためのさらなる方法は、米国特許出願 12 / 217,972 号（参照により、本明細書に組み込まれる。）に提供されている。

【0184】

タンパク質の適切な投薬量（「治療的有効量」）は、例えば、治療されるべき症状、症状の重度及び期間、タンパク質が予防目的又は治療目的のために投与されるかどうか、以前の治療、患者の既往歴及び当該タンパク質に対する応答、使用されるタンパク質の種類並びに担当医の裁量に依存する。タンパク質は、一回で又は一連の治療にわたって患者に適切に投与され、診断開始から任意の時点で患者に投与され得る。タンパク質は、単一の治療として、又は問題の症状を治療する上で有用な他の薬物若しくは治療と組み合わせで投与され得る。

10

【0185】

本発明の製剤は、タンパク質の高い濃度にしばしば伴うタンパク質凝集という一般的な問題を克服し、従って、治療用タンパク質の高いレベルを患者に投与し得る新たな手段を提供する。本発明の高濃度製剤は、投薬において利点を与え、標準的な治療のための製剤と等しい又は下回る容量を用いて、より高い用量が対象に投与され得る。治療用タンパク質に対する標準的な治療は、タンパク質の製造業者によって提供されるラベルの上に記載される。例えば、製造業者によって提供されるラベルに従って、インフリキシマブは、10 mg/mL の濃度になるように凍結乾燥されたタンパク質を再構成することによって、関節リウマチの治療のために投与される。本発明の製剤は、インフリキシマブの高い濃度を含み得、高い濃度には、標準的な 10 mg/mL より高い濃度が含まれる。別の例において、製造業者によって提供されるラベルに従って、Xolair（オマリズマブ）は、125 mg/mL の濃度になるように凍結乾燥されたタンパク質を再構成することによって、喘息の治療のために投与される。この例では、本発明の高濃度製剤は、標準的な 125 mg/mL を上回る抗体オマリズマブの濃度を含む。

20

【0186】

従って、一実施形態において、本発明の製剤は、少なくとも約 10%、少なくとも約 20%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 100%、少なくとも約 110%、少なくとも約 120%、少なくとも約 130%、少なくとも約 140%、少なくとも約 150%、少なくとも約 175%、少なくとも約 200%、少なくとも約 225%、少なくとも約 250%、少なくとも約 275%、少なくとも約 300%、少なくとも約 325%、少なくとも約 350%、少なくとも約 375%、少なくとも約 400% など、公知の標準的製剤中の治療用タンパク質の濃度を上回る高い濃度を含む。

30

【0187】

別の実施形態において、本発明の製剤は、公知の標準的製剤中の治療用タンパク質の濃度より少なくとも約 2 倍大きい、少なくとも約 3 倍大きい、少なくとも約 4 倍大きい、少なくとも約 5 倍大きい、少なくとも約 6 倍大きい、少なくとも約 7 倍大きい、少なくとも約 8 倍大きい、少なくとも約 9 倍大きい、少なくとも約 10 倍大きいなど、高い濃度を含む。

40

【0188】

水性製剤の特徴は、治療的使用のために改善され得る。例えば、抗体製剤の粘度は、透析ろ過溶媒として、賦形剤を加えない水を用いる透析ろ過に抗体タンパク質溶液を供することによって改善され得る。II 節に上述されているとおり、賦形剤の最終濃度が知られ、製剤の特異的な特徴が指定された使用に関して改善されるように、粘度を改善する賦形剤などの賦形剤を水性製剤へ添加し直し得る。例えば、当業者は、医薬製剤の所望される粘度が製剤を送達する様式（例えば、注射、吸入、皮膚吸収など）に依存することを認識する。しばしば、所望の粘度は、製剤を服用する際の対象の快適性と治療効果を有するために必要とされる製剤中のタンパク質の用量のバランスを採る。例えば、注射されている製剤に対する粘度の一般に許容されるレベルは、約 100 mPa s 未満の粘度レベル、好

50

ましくは75 mPa s未満、さらに好ましくは50 mPa s未満である。従って、水性製剤の粘度は、治療的使用に関して許容可能であり得、又は所望の特徴を改善するために賦形剤を添加する必要がある得る。

【0189】

一実施形態において、本発明は、水及びヒトTNF 抗体又はその抗原結合部分を含む水性製剤を提供し、該製剤は賦形剤を含まず、該製剤は治療としての使用を有利とする粘度（例えば、タンパク質濃度が約175 mg/mLであるときに、8 で40 cP未満及び25 で25 cP未満の低い粘度）を有する。一実施形態において、改善された粘度を有する製剤中の抗体又はその抗原結合部分の濃度は、少なくとも約50 mg/mLである。一実施形態において、本発明の製剤は、約1と約2 mPa sの間の範囲の粘度を有する。

10

【0190】

非治療的使用

本発明の水性製剤は、非治療的使用、すなわち、インビトロ目的のためにも使用され得る。

【0191】

本明細書に記載されている水性製剤は、ゲノミクス、プロテオミクス、バイオインフォマティクス、細胞培養、植物生物学及び細胞生物学における使用など（但し、これらに限定されない。）、医薬及びバイオテクノロジーにおける診断又は実験法のために使用され得る。例えば、本明細書に記載されている水性製剤は、標識及び検出法における分子プローブとして必要とされるタンパク質を提供するために使用され得る。本明細書に記載されている製剤に対するさらなる使用は、製造目的のための細胞増殖及びタンパク質産生など、細胞培養試薬用の補充物を提供することである。

20

【0192】

本明細書に記載されている水性製剤は、製剤中の賦形剤が実験環境とどのようにして反応し得るか、例えば、プロトコールにおいて使用されている別の試薬をどのようにして妨害するかに関する懸念を軽減させて、プロトコールにおいて使用され得る。別の例において、タンパク質の高い濃度を含有する水性製剤を、研究室用の試薬として使用し得る。タンパク質のこのような高度に濃縮された形態は、研究室実験の現時の限界を拡張する。

【0193】

本発明の製剤に対する別の用途は、食品への添加物を提供することである。本発明の水性製剤は実質的に水とタンパク質からなるので、製剤は、栄養補助食品などの所望されるタンパク質の高い濃度を食品に送達するために使用され得る。本発明の水性製剤は、ヒトによる摂取に好適でない場合があり得る安定性/可溶性のために必要とされる賦形剤に対する懸念なしに、水の中にタンパク質の高い濃度を与える。例えば、乳漿及び大豆由来タンパク質は、脂肪の口当たりと触感を模倣することができるので、食物に対して多用途性を与える。従って、乳漿及び大豆由来タンパク質は、満足を犠牲にせずに、全体的な脂肪含量を減少させるために、食物に添加され得る。従って、食品を補完するために、乳漿及び大豆由来タンパク質の適切な量を含む水性製剤を製剤化し、使用し得る。

30

【0194】

製品

本発明の別の実施形態において、本発明の水性製剤を含有し、その使用に関する指示書を提供する製品が提供される。製品は、容器を含む。適切な容器には、例えば、瓶、バイアル（例えば、二重チャンパーのバイアル）、注射器（二重チャンパーの注射器など）、注射器を含有する自動注射用ペン及び試験管が含まれる。容器は、ガラス、プラスチック又はポリカーボネートなどの様々な材料から形成され得る。容器は水性製剤を保持し、容器上のラベル又は容器に添付されたラベルは、使用上の指示を表示し得る。例えば、ラベルは、製剤が皮下投与に有用であり、又は皮下投与用であることを示し得る。製剤を保持する容器は複数回使用のバイアルであり得、水性製剤の反復投与（例えば、2から6回の投与）が可能となる。製品は、第二の容器をさらに含み得る。製品は、他の緩衝液、希釈

40

50

液、フィルター、針、注射器及び使用のための指示を有する同封物など、商業的な見地及び使用者の見地から望ましい他の物品をさらに含み得る。

【0195】

本願を通じて引用されている全ての参考文献、特許及び公開された特許出願の内容は、参照により、本明細書に組み込まれる。

【0196】

本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、以下の実施例を限定的なものとして解釈すべきではない。

【実施例】

【0197】

次の実施例は、溶液媒体として水を含む水性製剤に関する実験を記載する。場合によっては、少数位は欧州10進表記法(European decimal notation)を用いて示されることに注意されたい。例えば、表31において、「0,296」という数字は、「0.296」と同義である。

【0198】

(実施例1)

アダリムマブ及びJ695での透析ろ過/限外ろ過

材料及び方法

純水を用いてアダリムマブ及びJ695を透析ろ過処理した。純水で少なくとも5倍体積の交換を行った後、少なくとも150mg/mLの最終目標濃度までタンパク質溶液を限外ろ過した。DF/UF処理中のタンパク質の状態を監視するために、浸透圧、目視及びタンパク質濃度測定(OD280)を行った。

【0199】

出発製剤、例えば、製剤原料(DS)出発物質及びタンパク質標準物質と比較する際、各最終DF/UF産物におけるタンパク質安定性の特徴を調べるために、サイズ排除クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーを使用した。製剤原料又は「DS」は、活性医薬成分を表し、一般には、通常バルク溶液における治療用タンパク質を指す。

【0200】

・アダリムマブ製剤原料、(アダリムマブ吸光係数280nm:1.39mL/mg cm)。製剤原料はポリソルベート80を含有しなかった。DS組成物:5.57mMリン酸一ナトリウム、8.69mMリン酸二ナトリウム、106.69mM塩化ナトリウム、1.07mMクエン酸ナトリウム、6.45mMクエン酸、66.68mMマニトール。

【0201】

・動的光散乱(DLS)測定に対して使用されるアダリムマブ溶液:それぞれ、Milli-Q水及び賦形剤原溶液(Milli-Q水中で溶解した賦形剤)でアダリムマブ溶液を希釈することによって、交換媒体として純水を用いて透析ろ過処理したアダリムマブ溶液を1mg/mL濃度に調整した。

【0202】

・J695製剤原料、(J695吸光係数280nm:1.42mL/mg cm)。DS組成物:ヒスチジン、メチオニン、マニトール、pH5.8及びポリソルベート80。

【0203】

・500mLリザーバーを備えるMillipore Lab scale™ Tangential Flow Filtration(タンジェンシャルフロー濾過)(TFF)システム。Millipore操作説明書に従い、周囲温度で不連続モードでLab scale TFFシステムを操作した。攪拌速度をおよそ1.5に設定し、ポンプ速度をおよそ3に設定した。標的とするインレット及びアウトレット圧は、それぞれ15m psi g、およそ50m psi gであった。

【0204】

10

20

30

40

50

・Omega<sup>TM</sup> PES膜、30kDaカットオフを備えるMinimate<sup>TM</sup> Tangential Flow Filtration (タンジェンシャルフロー濾過) カプセル。0.1N NaOHで30分間及びMilli-Q水でさらに30分間、このカプセルをすすいだ。

## 【0205】

・緩衝校正液VWR、pH4.00緩衝溶液赤色、カタログ番号34170-127及びpH7.00緩衝溶液黄色、カタログ番号34170-130で校正したpHプローブPt1000、No.6.0258.010を備える780pHメーター、Metrohm。

## 【0206】

・タンパク質濃度測定(280nm波長)のために、固定されたCary50セル付きのVarian 50 Bio UV可視分光光度計、AI9655を使用した。DF/UF後の全てのJ695試料及びアダリムマブ溶液のタンパク質濃度測定のために、50.00mLの最終体積まで、水(HPLC用のMilli-Q水)で100µLタンパク質試料を希釈した。1960µL Milli-Q水で40µL試料溶液を希釈することによって、全てのその他のアダリムマブ試料の濃度を監視した。濃度測定のために、使い捨てUVキュベット、1.5mL、セミマイクロ、ポリ(メチルメタクリレート)(PMA)を使用し、OD280ブランクとしてMilli-Q水を使用した。

## 【0207】

・DF/UF媒体としてHPLCグレード用のMilli-Q水を使用した。

## 【0208】

・DLS測定のために、Malvern Zetasizer Nano ZS、機器番号AI9494を使用した。

## 【0209】

・DLS測定のために、Hellma精密セル、suprasil、型番105.251-QS、光路3mm、中央8.5を使用した(75µL試料、Malvern Mastersizer Nano ZS、商品番号AI9494を充填)。

## 【0210】

・浸透圧測定のために、Knauer Osmometer Automatic、機器番号83963、Berlin、Germanyを使用した(400mOsmol/kg NaCl校正溶液、商品番号Y1241、Herbert Knauer GmbH、Berlin、Germanyで校正)。

## 【0211】

・DF/UF操作後のタンパク質溶液の保存のために、250mL Corning細胞培養フラスコ、75cm<sup>2</sup>、ポリスチレン、滅菌、Corning、NY、USAを使用した。

## 【0212】

・塩化ナトリウム: 2M NaCl原溶液を調製するために、J.T.Bakerを使用した。様々なNaCl濃度(10、20、30及び50mM)の純水中の1mg/mLアダリムマブ溶液を調製するために、この原溶液を使用した。

## 【0213】

・200mg/mLソルビトール原溶液を調製するために、D-ソルビトール、Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO63178を使用した。様々なソルビトール濃度(10、20、30及び40mg/mL)の純水中の1mg/mLアダリムマブ溶液を調製するために、この原溶液を使用した。

## 【0214】

## HPLC法

・アダリムマブ、SEC分析: Sephadex 200カラム(Pharmaciaカタログ番号175175-01、S/N0504057)。移動相: 20mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH7.5、0.5mL/分流速、周囲温度、検

10

20

30

40

50

出UV214nm及び280nm。Milli-Q水で各試料を1.0mg/mLに希釈、試料注入処理量50µg(2回注入)。

【0215】

・アダリムマブ、IEC分析：対応するガードカラム(p/n054994)付きのDionex、PropacWCX-10カラム(p/n054993)。分離条件：移動相A：10mMリン酸ナトリウム、pH7.5；移動相B：10mMリン酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、pH5.5。1.0mL/分流速、周囲温度。Milli-Q水で1.0mg/mLに各試料を希釈、試料注入処理量100µg(2回注入)。

【0216】

・J695、SEC分析：Tosoh Bioscience G3000swxl、7.8mm x 30cm、5µm(カタログ番号08541)。移動相：211mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/92mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH7.0。0.3mL/分流速、周囲温度、検出UV214nm及び280nm。Milli-Q水で2.5mg/mLに各試料を希釈、試料注入処理量50µg(2回注入)。

10

【0217】

・J695、IEC分析：対応するガードカラム(p/n054994)付きのDionex、PropacWCX-10カラム(p/n054993)。分離条件：移動相A：10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH6.0；移動相B：10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、500mM NaCl、pH6.0。1.0mL/分流速、35℃温度。Milli-Q水で各試料を1.0mg/mLに希釈、試料注入処理量100µg。J695参照基準物質29001BFを比較として3回流し、分析試験成績書からの濃度に基づき、Milli-Q水中で1mg/mLに希釈した。

20

【0218】

タンパク質濃度の計算

計算式：

【0219】

【数1】

$$E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\varepsilon \times d}$$

30

- 吸光係数

c - 濃度

d - 光が通過しなければならないキュベットの長さ

E - 吸光度

I<sub>0</sub> - 最初の光強度

I - 試料を通過した後の光強度

【0220】

【数2】

$$\varepsilon_{\text{Adalimumab}} = 1.39 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}$$

40

$$\varepsilon_{\text{J695}} = 1.42 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}$$

$$\varepsilon_{\text{HSA}} = 1.042 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}$$

【0221】

1.1：アダリムマブのDF/UF処理

DF/UF装置製造者の標準的な操作手順に従い、DF/UF実験を行う。例えば、Millipore Lab scale<sup>TM</sup> TFFシステムには500mLリザーバーが備

50

えられており、Millipore操作説明書に従い、周囲温度にて不連続モードでシステムを操作した。攪拌速度はおよそ1.5に設定し、ポンプ速度はおよそ3に設定した。標的インレット及びアウトレット圧は、それぞれ、15 mm p s i g及びおよそ50 mm p s i gであり、標的圧力を超過しないように、標的圧力を監視した。

【0222】

Omega<sup>TM</sup> P E S膜 (Pall Corp., Port Washington, NY)、30 kDaカットオフを備えるMinimate<sup>TM</sup> Tangential Flow Filtration (タンジェンシャルフロー濾過) カプセルを使用した。使用前に、0.1 N NaOHで30分間及びMilli-Q水でさらに30分間、このカプセルをすすいだ。

【0223】

アダリムマブ溶液およそ500 mLをTFFリザーバーに入れ、DF/UF処理を不連続モードで開始した。表1は、DF/UFプロセスの特徴を示すIn-Process-Control (IPC) データでの詳細を提供する。

【0224】

表1：アダリムマブDF/UF処理における概要

【0225】

【表1】

表1: アダリムマブDF/UF処理の概要

プロセスの工程	添加された Milli-Q 水の容量 (mL)	保持物質中のアダリムマブ溶液のおよその容積 (mL)	保持物質のアダリムマブ濃度 (mg/mL)	オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)	浸透物質のアダリムマブ濃度 (mg/mL)
1		500	54.66	305	—
2		400	68.33	297	3.15
3		300	—	—	—
4	250	550	43.73	169	1.39
5		300			4.45
6	250	550	47.27	93	2.58
7		250	—	—	—
8	250	500	—	—	—
9		250	—	—	—
10	250	500	—	—	—
11		250	—	—	—
12	250	500	52.24	9	1.24
13		300	90.27	7.5	—
14		130	231.87	—	4.08

【0226】

およそ5倍体積交換後(1体積交換はおよそ250 mL透析ろ過溶液に相当)、DF/UF処理を停止した。望ましい100%の賦形剤の膜透過性を仮定すると、適用される実験パラメータにより得られる理論的最終賦形剤濃度は、 $C_i (250/500)^5 = 0.03125 * C_i$  ( $C_i$ は初期濃度である。)である。従って、最大の賦形剤減少率は、96.875%であった(定容透析ろ過を使用した場合、5透析ろ過体積での理論的な賦形剤減少率は、 $C_i e^{-5} = 0.00674$ 、即ちおよそ99.3%の最大賦形剤減少率であった。)。アダリムマブ溶液がTFFシステムから250 mL細胞培養フラスコに排

10

20

30

40

50

出された（少量のWFIでTFFシステムを濯ぎ、濃度は175.05 mg/mLとなり；濯ぎなしでは、保持液濃度は213.87 mg/mLとなった。）。pH、浸透圧及びアダリムマブ濃度を調べるために試料を採取した。さらに、SEC及びIECにより特徴を調べるために、試料を採取した。DF/UF処理前後のアダリムマブ溶液の特徴的パラメータはそれぞれ表2で挙げる。

【0227】

表2：アダリムマブ溶液におけるDF/UF処理の影響

【0228】

【表2】

表2：アダリムマブ溶液に対するDF/UF処理の影響

パラメータ	DF/UF 前の溶液	DF/UF 後の溶液
pH	5.19	5.22
濃度 (mg/mL)	54.66	175.05
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)	305	24
*SEC データ (%凝集物、単量体、断片)	0.26 99.74 0.00	00.50 99.50 0.00
*IEC データ (酸性領域、 lys 0, lys 1, lys 2, %)	13.89 62.05 19.14 4.83	14.07 61.97 18.51 4.73

\*SEC 及び IEC を介した分析の前に、試料を1回の凍結/融解工程 (-80°C/25°C) に供した

【0229】

DF/UF処理の過程で、アダリムマブ濃度は210 mg/mLを超えた。実験を通じて、タンパク質溶液は透明なままであり、溶液の濁度又はタンパク質沈殿（アダリムマブ溶解性限界を示している。）は観察されなかった。元のアダリムマブDS溶液（約55 mg/mL）と比較して、DF/UF交換媒体として純水を使用することにより透析ろ過処理したアダリムマブ溶液は、タンパク質濃度が3倍を超えて上昇したにもかかわらず（約175 mg/mL）、乳白光がより低いことが分かった。

【0230】

1.2：クロマトグラフィーを介したアダリムマブ特性

図1は、DF/UF処理手順前（中央の行）後（最上行）のアダリムマブ薬物標準物質溶液と比較したアダリムマブ参照基準物質（アダリムマブ標準物質（最下行））のSECクロマトグラムを示す。分析前に-80で全試料を凍結させたことに注意。

【0231】

表3もまた、IECクロマトグラムデータを含む（分析前に-80で全試料を凍結させたことに注意。）。

【0232】

表3：様々なアダリムマブ試料のIECデータ

【0233】

10

20

30

40

## 【表 3】

表3：様々なアダリムマブ試料の IEC データ

試料名	%酸性領域 1	%酸性領域 2	%0 Lys	%1 Lys	%2 Lys
参照標準	2.69	11.66	60.77	19.42	5.40
アダリムマブ DS	2.51	11.38	62.05	19.14	4.83
アダリムマブ、 DF/UF 後	2.26	11.81	61.97	18.51	4.73

## 【0234】

10

1.3：アダリムマブ流体力学直径 ( $D_h$ ) における賦形剤の影響

純水中に J695 を処方した場合、動的光散乱 (DLS) 測定により測定したときの J695 の流体力学直径が顕著に縮小したことが既に分かっている。WFI 中の J695 の  $D_h$  は約 3 nm であり、免疫グロブリンに対して予想される値をはるかに下回る。イオン化 NaCl の少量を添加した際、 $D_h$  値は、~ 10 nm に上昇した (NaCl 濃度と独立)。非イオン化マニトールの添加により、J695 溶液浸透圧が上昇したが、J695  $D_h$  には影響しなかった。

## 【0235】

上記の DF/UF 手順に従い処理されたアダリムマブの流体力学直径における賦形剤の影響を評価するために、DF/UF 実験からのアダリムマブ溶液を使用して、それぞれ純水 (しかし、NaCl (0 - 50 mM) 及びソルビトール (0 - 40 mg/mL) のレベルは様々) 中でアダリムマブ溶液を処方した。アダリムマブ単量体の  $D_h$  におけるソルビトール (非イオン化賦形剤) 及び NaCl (イオン化賦形剤) 濃度の影響を図 2 で示す。

20

## 【0236】

純水におけるアダリムマブ単量体の流体力学直径は 2.65 nm であった。塩及び非イオン性賦形剤に対するアダリムマブ  $D_h$  反応は、以前に見られた J695 反応と同一であった。アダリムマブ  $D_h$  は、実質的には、ソルビトールの存在により影響を受けなかった。低濃度の NaCl により、~ 11 nm の予想レベルへの単量体流体力学直径の拡大が誘発された。これらの所見から、動的光散乱により測定した場合、タンパク質流体力学直径がイオン化賦形剤の存在によって大きな影響を受けることが分かる。イオン化賦形剤がないことはまた、溶液粘度とも関連する。

30

## 【0237】

これらの所見は、高度濃縮タンパク質溶液に影響がある：流体力学直径が小さいほど、タンパク質が占有する空間体積は小さくなる。高濃度の状況において、DF/UF 交換媒体として水を使用することによって調製されるタンパク質溶液の粘度は、実質的に、多量のイオン化緩衝賦形剤を含有する伝統的なタンパク質製剤の粘度よりも低くなる。これは、pH に依存して (例えば、pH 4、pH 5 及び pH 6) 注射用水中の 200 mg/mL アダリムマブ溶液の粘度が 50 mPa s を優に下回ったことが分かったので、アダリムマブデータから確認された。下記実施例 17 で、 $D_h$  における pH の影響に対するより多くのデータが見出され得る。

40

## 【0238】

全体的に、これらの所見は、高濃度タンパク質製剤活性において有用であり、粘度に関連する製造及び投与/送達の問題点は周知である。さらに、これらの所見は、それぞれタンパク質  $D_h$  及び溶液粘度の上昇を誘発することなく、必要に応じて、最終的薬物製品の浸透圧値が、それぞれ糖又は糖アルコールなどの非イオン化賦形剤で調整され得ることを示す。

## 【0239】

## 1.4：J695 の DF/UF 処理 (抗 - IL12 抗体)

1M リン酸で J695 溶液およそ 200 mL を pH 4.4 に調整し、TFF リザーバーに満たした (J695 単量体のゼータ電位が確実に正になるように pH 調整を行い、この

50

ようにして、データに対する非荷電タンパク質単量体の潜在的効果を回避する。)。次いで、TFFリザーバーにMilli-Q水300mLを添加し、不連続モードでDF/UF処理を開始した。250mLリザーバー体積、Milli-Q水250mLを添加し、DF/UF処理を再び開始した。全部で5体積交換段階を行った後、DF/UF処理を停止した(1体積交換はおよそ250mLに相当)。

【0240】

理想的な100%の賦形剤の膜透過性を仮定すると、適用される実験パラメータにより得られる理論的最終賦形剤濃度は、 $C_i (250/500) \cdot 5 = 0.03125 \cdot C_i$  ( $C_i$ は初期濃度である。)である。従って、最大賦形剤減少は、96.875%であった(定容透析ろ過を使用した場合、5透析ろ過体積での理論的な賦形剤の減少率は、 $C_i e^{-5} = 0.00674$ 、即ちおよそ99.3%の最大賦形剤減少率であった。)。J695溶液をTFFシステムから250mL細胞培養フラスコに排出させた(TFFシステムの濯ぎを行わなかった。)。pH、浸透圧及びJ695濃度を調べるために試料を採取した。さらに、SEC及びIECにより特徴を調べるために、試料を採取した。それぞれDF/UF処理前後のJ695溶液の特徴的パラメータを表4で挙げる。

10

【0241】

表4：J695溶液におけるDF/UF処理の影響

【0242】

【表4】

表4：J695溶液に対するDF/UF処理の影響

20

パラメータ	DF/UF 前の溶液	DF/UF 後の溶液
pH	4.40	4.70
濃度 (mg/mL)	122.9	192.8
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)	265	40
*SEC データ (%凝集物、単量体、断片)	0.41 98.42 1.18	0.69 98.11 1.21
*IEC データ (イソフォームの合計、 酸性種、 塩基性種、%)	92.00 5.17 2.83	92.11 5.30 2.59

30

【0243】

アダリムマブと同様に、J695におけるDF/UF実験から、DF/UF操作での交換媒体として純水を使用することにより、J695を処理し処方する第一の可能性が実証される。SEC及びIECデータの両方から、透析ろ過媒体としてMilli-Q水を用いて周囲温度で全部で1.5日間にわたり(処理を一晩中断)、DF/UF処理中のJ695安定性に対する実質的な影響は示されない。実験を通じて、タンパク質溶液は透明なままであり、このことから、潜在的なJ695溶解度制限は示されなかった。

【0244】

1.5：J695の特徴

表5は、SECクロマトグラムにより測定した場合の、3種類の溶液に対する、凝集体、単量体及び断片含量に対する%を示す。

【0245】

表5：SECクロマトグラムからのデータ

【0246】

40

## 【表5】

表5：SECクロマトグラムから得られたデータ

試料名	%凝集物含量	%単量体含量	%断片含量
参照標準	0.45	98.00	1.56
DF/UF 前の J695	0.41	98.42	1.18
DF/UF 後の J695	0.69	98.11	1.21

10

## 【0247】

図3は、J695参照基準（一番下のグラフ）及びpH4.4にpH調整されたJ695DSのIECプロファイル（一番上のグラフ）を示す。

## 【0248】

DF/UF処理後にJ695試料においてごく少量の凝集体含量の上昇が観察された。

## 【0249】

図4は、Milli-Q水、pH4.7でのDF/UF後のJ695（一番上のグラフ）及びpH4.4にpH調整されたDF/UF前のJ695DS（一番下の曲線）のIECプロファイルを示す。図4で示されるように、IECにより監視した場合、DF/UF段階は、J695安定性に顕著な影響はなかった。2種類のJ695参照基準（図3参照）の間の相違は、3000L及び6000L DS期間中の製造過程の相違に起因し得る。表6は、IECデータにおいて詳細を強調する。

20

## 【0250】

表6：様々なJ695試料のIECデータ

## 【0251】

## 【表6】

表6：様々なJ695試料のIECデータ

試料名	0 glu (l)	他のイソフォーム	酸性	塩基性
参照標準	43.57	50.06	4.47	1.90
J695	35.74	56.26	5.17	2.83
DF/UF 後の J695	36.59	55.52	5.30	2.59

30

## 【0252】

## 1.6：結論

上記の実施例は、モノクローナル抗体アダリムマブ及びJ695に対する透析ろ過媒体として水（HPLC用のMilli-Q水）を使用した、透析ろ過/限外ろ過（DF/UF）実験を提供する。

## 【0253】

DF/UF交換媒体として純水を使用することによりアダリムマブをDF/UF処理に供し、溶液混濁、顕著な乳白光又は濁度の発生を誘導することなく、高濃度（>200mg/mL）でpH5.2にて処方した。続く1回の凍結/融解段階で、SEC及びIECデータから、DF/UF処理を介して水中で処方されたアダリムマブ溶液と元のアダリムマブDSとの間で顕著な相違は示されなかった。

40

## 【0254】

J695もまた、DF/UF交換媒体として純水を用いることによりDF/UF処理に供し、J695安定性（目視、SEC、IEC）に影響を与えることなく、pH4.7で処方した。

## 【0255】

50

このようなDF/UF処理を用いて処方される場合、アダリムマブ単量体の流体力学直径(Dh)はおよそ2.65nmであった。40mg/mL以下の濃度のソルビトールなどの非イオン性賦形剤が存在しても、Dhデータには影響がないことが示されたが、一方で、NaClなどのイオン性賦形剤は既に低濃度でアダリムマブ単量体Dhのおよそ11nmへの上昇を誘導することが示された(このようなDhデータは一般的にIgGに対して観察される。)。J695に対して同様の所見が既にあった。

#### 【0256】

結論として、DF/UF交換媒体として純水を用いたタンパク質の処理及び処方は、実現可能である。理想的な100%の賦形剤の膜透過性を仮定すると、5透析ろ過体積を用いた定容透析ろ過により得られる理論的な最終賦形剤濃度は、 $C_i e^{-5} = 0.00674$ 、即ちおよそ99.3%の最大賦形剤減少率である。6透析ろ過体積交換を用いると、結果は、~99.98%の理論的最大賦形剤減少率となる。

10

#### 【0257】

実施例2から5は、水性製剤中に濃縮された3種類の異なるタンパク質に関する実験遂行を記載し、実施例6から11は、水性製剤のそれぞれの分析を記載する。

#### 【0258】

実施例2-11に対する材料及び方法

・注射用水中のアダリムマブタンパク質溶液(10mg/mL)、タンパク質製剤原料(DS)物質(49.68mg/mL)、DSは、Tween80、アダリムマブ、アダリムマブ製品(DP)(40mg、注射用の溶液、市販製品からのろ過済み溶液)を含有する。タンパク質吸収係数280nm:1.39。

20

#### 【0259】

・注射用水中のJ695タンパク質溶液(10mg/mL)、タンパク質製剤原料(DS)(54mg/mL)、DSはTween80を含有する。吸収係数280nm:1.42。

#### 【0260】

・注射用水中のHSAタンパク質溶液(10mg/mL)、Tween80なしのDP、Grifolsヒト血清アルブミン Grifols<sup>(R)</sup>、20%、50mL。吸収係数280nm:1.042

・6Rバイアル及び10Rバイアル

30

・バイアルの準備:バイアルを洗浄し、加圧滅菌処理

・停止液、19mm、West、4110/40/グレイ

・試料容器(例えば、エッペンドルフ試料容器、Safe-Lock又は単純なスナップ式、1-2mL)

・使い捨てシリンジ、滅菌、20mL; Normject、10mL

・使い捨てフィルターユニット(フィルターMillex<sup>(R)</sup>-GV、Syringe Driven Filter Unit、PVDF0.22µm; Millex<sup>(R)</sup>-GP、Syringe Driven Filter Unit、PES 0.22µm、Sterivex<sup>(R)</sup>0.22µmフィルターユニット)

・Vivaspin濃縮装置(カットオフ10kDa、PES; カットオフ3kDa、PES)

40

・ピペット(例えば、Eppendorf、max.:1000µL)

・注射用水

・遠心機(Eppendorf)及びCentrifuge No.1(温度制御)

・透析ろ過装置: Millipore Labscale<sup>TM</sup>TFFシステム、Millipore透析ろ過膜: アダリムマブ: ポリエーテルスルホン; J695: ポリエーテルスルホン; HSA: 再生セルロース

・pHプローブ(Metrohm pHメーター、タンパク質に適切なプローブ、biotrode 46)

・Laminar-Air-Flow(層流)ベンチ、Steag LF-Werkb

50

ank、Mp. - No. 12.5

- ・ NaCl ; マニトール
- ・ Gemini 150 ペルチェプレートレオメーター、Malvern
- ・ レオメーターMCR301 [ 温度制御P-PTD200 ( ペルチェ・テンパーリング ( Peltier tempering ) 付きプレート ) ] 及びコーン/プレート測定系CP50/0.5°TiならびにCP50/1° ( ステンレス鋼 ) ; Anton Paar
- ・ 毛細管粘度計、Schott、毛細管：タイプ537 20、タイプ537 10、タイプ537 13
- ・ 1M塩酸 ( J. T. Baker )

分析

- ・ UV/VIS分光光度計 ( OD 280 nm ) ; 光子相関分光法 ( PCS ) : およそ 10 mg / mL 及びおよそ 20 mg / mL に対して : 1 . 1 mPas、3回操作、30s、1回測定、25、およそ 30 mg / mL 以上 : 1 . 9 mPas、30s、3回操作、1回測定、25

・ 下記記載のとおり、サイズ排除クロマトグラフィー ( SEC ) 及びイオン交換クロマトグラフィー ( IEC )

- ・ 粘度測定 : 個別及び異なる設定の様々な粘度計を使用

タンパク質濃度の計算

計算式 :

【 0 2 6 1 】

【 数 3 】

$$E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\epsilon \times d}$$

- 吸光係数

c - 濃度

d - 光が通過しなければならないキュベットの長さ

E - 吸光度

$I_0$  - 最初の光強度

I - 試料を通過した後の光強度

【 0 2 6 2 】

【 数 4 】

$$\epsilon_{\text{Adalimumab}} = 1.39 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}$$

$$\epsilon_{\text{J695}} = 1.42 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}$$

$$\epsilon_{\text{HSA}} = 1.042 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}$$

アダリムマブに対する粘度データ及び計算

アダリムマブ市販製剤 ( およそ 194 mg / mL ) 密度 :

$$= 1.05475 \text{ g} / \text{cm}^3$$

アダリムマブ市販製剤 ( およそ 194 mg / mL ) 動粘性率 :

K - 毛細管の定数

t - 毛細管を通過するために溶液が必要とする時間 [ s ]

v - 動粘性率

$$v = K \times t = 0.03159 \text{ mm}^2 / \text{s}^2 \times 279.36 \text{ s} = 8.825 \text{ mm}^2 / \text{s}$$

アダリムマブ市販製剤 ( およそ 194 mg / mL ) 動的粘度 :

- 動的粘度

10

20

30

40

50

p - 密度

【 0 2 6 3 】

【数 5】

$$\eta = \nu \times \rho = 8,825 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}} \times 1,05475 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = \underline{9,308 \text{mPas}}$$

ヒト血清アルブミンに対する粘度データ及び計算

H S A 市販製剤 ( およそ 2 0 0 m g / m L ) 密度 :

【 0 2 6 4 】

【数 6】

$$\rho = 1,05833 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$$

H S A 市販製剤 ( およそ 2 0 0 m g / m L ) 動粘性率 :

K - 毛細管の定数

t - 毛細管を通過するために溶液が必要とする時間 [ s ]

v - 動粘性率

【 0 2 6 5 】

【数 7】

$$\nu = K \times t = 0,01024 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}^2} \times 337,69 \text{s} = \underline{3,46 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}}}$$

H S A 市販製剤 ( およそ 2 0 0 m g / m L ) 動的粘度 :

- 動的粘度

p - 密度

【 0 2 6 6 】

【数 8】

$$\eta = \nu \times \rho = 3,46 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}} \times 1,05833 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = \underline{3,662 \text{mPas}}$$

W F I 中の H S A ( およそ 1 8 0 m g / m L ) 密度 :

【 0 2 6 7 】

【数 9】

$$\rho = 1,07905 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$$

W F I 中の H S A ( およそ 1 8 0 m g / m L ) 動粘性率 :

K - 毛細管の定数

t - 毛細管を通過するために溶液が必要とする時間 [ s ]

v - 動粘性率

【 0 2 6 8 】

【数 10】

$$\nu = K \times t = 0,01024 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}^2} \times 337,69 \text{s} = \underline{3,46 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}}}$$

W F I 中の H S A ( およそ 1 8 0 m g / m L ) 動的粘度 :

- 動的粘度

p - 密度

【 0 2 6 9 】

10

20

30

40

## 【数 1 1】

$$\eta = \nu \times \rho = 3,46 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}} \times 1,05833 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = \underline{3,662 \text{mPas}}$$

高濃度製剤に到達するための一般的実験の遂行

一般に、高濃度の、塩不含、タンパク質製剤に到達するための本発明のプロセスには、最初の製剤原料の透析ろ過とそれに続く、溶液中で製剤原料の濃度を上昇させるための手順が含まれる。これは、個別の手順で行われ得るか又は同じ手順中で個別にもしくは同じ段階で行われ得る。

## 【0270】

10

透析ろ過

製剤原料 (DS) 材料の十分量 (DS のタンパク質濃度に依存) を透析ろ過に供した。透析ろ過前に、注射用水で DS 材料を約 10 mg / mL に希釈した。この実験に対して全部で 10 mg / mL 溶液およそ 540 mL が必要とされたことに注意。

## 【0271】

透析ろ過媒体として注射用水を使用した。行われる透析ろ過段階の数は 5 から 7 であった (1 回の透析ろ過段階は、1 回の総体積交換と同等である)。透析ろ過段階前後にプロセス内対照 (IPC) 試料を採取した (浸透圧に対して 200  $\mu$ L、SEC に対して 120  $\mu$ L)。

## 【0272】

20

次のパラメータを適用することにより TFF 装置で透析ろ過を行う：

攪拌機：ポジション 2

ポンプ：ポジション 2

圧力 上流 / インレット：最大 20 - 30 psi

圧力 下流 / アウトレット：最大 10 psi

(この実験で使用されるパラメータは製造者の推奨からのものであった。特定のタンパク質又は、装置、処方、粘度及びその他の可変要素の相違を調節するために、当業者は、装置作動のパラメータを変更することができる。)

## 【0273】

透析ろ過後、OD 280 によってタンパク質濃度を評価した。タンパク質濃度が > 10 mg / mL である場合、注射用水で溶液を適切に希釈することによって、タンパク質濃度を 10 mg / mL に調整した。

30

## 【0274】

濃度

透析ろ過処理されたタンパク質溶液 (例えば、アダリムマブ、J695、HSA) 20 mL を Vivaspin 20 濃縮装置に添加した。濃縮装置を閉じ、遠心機に入れた。タンパク質溶液を最大速度 (5000 rpm) で遠心した。

## 【0275】

試料採取

10 mg / mL で及び次いで 10 mg / mL ごとに (20、30、40 mg / mL など) 又はタンパク質の凝集体が視覚的に見られるまで、濃縮溶液の試料を採取し、試料を次のように分析した。

40

## 【0276】

- Vivaspin 濃縮装置中でタンパク質溶液を均質化し、適切なバイアルに充填した。

## 【0277】

- バイアルにおいて目視で外観を直接調べた。

## 【0278】

- UV 分光法に対して 300  $\mu$ L、PCS に対して 160  $\mu$ L、SEC に対して 120  $\mu$ L 及び IEX に対して 300  $\mu$ L を使用した。

50

## 【0279】

- SEC及びIEXに対する試料を - 80 で保存した。

## 【0280】

## 動的光散乱(DLS)プロトコール

そのままタンパク質試料を用いて、Hellma精密セル(Plainview, NY)、suprasilクウォーツ、型番105.251-QS、光路3mm、中央Z8.5mm(少なくとも60µL試料充填)を備え、測定セルに直接置かれた、Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments, Southborough, MA)を用い、動的光散乱を行った。測定前に、DLS測定に影響を及ぼし得る気泡又は粒子/塵/その他の夾雑物が溶液中にないことを確認するために、セルの窓部を調べた。標準的な操作手順下で測定を行った(「汎用」モード、25、屈折率は1.45に設定し、測定モードは「手動」に設定し、各測定あたり1回作動、それぞれ30秒ごとに3回測定、測定タイプを「サイズ」に設定)。データを分析するために、Dispersion Technology Software、バージョン4.10b1、Malvern Instrumentsを使用した。流体力学直径(Dh)の分析のために、試料溶液約70µLを精密セルに充填した。初期設定試料粘度は、低濃縮タンパク質溶液(例えば<5mg/mL)に対して1.1mPasに設定した。基本的な測定原理から、測定しようとする試料溶液の実際の粘度値と初期設定粘度の使用の僅かな差異はDLSデータ読み取りに実質的に影響を与えないと結論付けられた。低タンパク質濃度溶液(<5mg/mL)のDLS測定を行うことにより、これを確認した(溶液粘度を測定し、続くDLS測定の際に考慮に入れる。)。より高いタンパク質濃度の全ての試料に対して、粘度を測定し、DLS測定中に考慮に入れた。

10

20

## 【0281】

## (実施例2)

## 高TNF 抗体濃度を含む製剤

## 2.1: 透析ろ過

透析ろ過前に、アダリムマブ(49.68mg/mL)を注射用水でおよそ15mg/mLの濃度に希釈した。従って、140.8mLアダリムマブ溶液(49.68mg/mL)を500mL容量フラスコに入れた。このフラスコに較正目盛まで注射用水を入れた。この容量フラスコを閉じ、溶液を均質化するために穏やかに振盪した。TFFLab scaleシステムを水で洗い流した。次に、膜(PES)を適合させ、これも1Lの蒸留水で洗い流した。次に、TFFLab scaleシステム及び膜を注射用水およそ300mLで洗い流した。次に、希釈したアダリムマブ溶液をTFFのリザーバーに入れた。浸透圧測定(300µL)、UV分光光度計(500µL)用の試料及びSEC分析(120µL)用の試料を採取した。このシステムを閉じ、透析ろ過を開始した。5体積交換の後、及び3mosmol/kgの浸透圧値に到達した後、DF/UF(透析ろ過/限外ろ過)を終了した。透析ろ過後のアダリムマブ溶液のpH値はpH5.25であった。

30

## 【0282】

次のパラメータを適用することによって、TFF装置での透析ろ過を行った。

## 【0283】

- 攪拌機: ポジション2
- ポンプ: ポジション2
- 圧力 上流/インレット: 最大20-30psi
- 圧力 下流/アウトレット: 最大10psi

透析ろ過後、OD280によりタンパク質濃度を評価した。濃度を測定したところ、13.29mg/mLであった。

## 【0284】

アダリムマブ溶液をろ過滅菌した。

## 【0285】

TFF及び膜をおよそ1Lの蒸留水で、次いで500mLの0.1N NaOHで洗い

40

50

流した。この膜を 0.1 M NaOH 中で保存し、およそ 500 mL の蒸留水で TFF を再び洗い流した。

【0286】

2.2: タンパク質濃度

抗体を濃縮する前に、OD280 によりタンパク質濃度を再び評価した。アダリムマブ濃度を測定したところ、13.3 mg/mL であった。次に、アダリムマブ溶液を 10 mg/mL に希釈した。アダリムマブ溶液 (13.3 mg/mL) 375.94 mL を 500 mL 容量フラスコに入れ、フラスコに較正目盛まで注射用水 (WFI) を入れた。アダリムマブ溶液 (13.3 mg/mL) 75.19 mL もまた 100 mL 容量フラスコに入れ、較正目盛まで純水、即ち注射用水 (WFI) を入れた。均質化するために両フラスコを穏やかに振盪した。両フラスコからの溶液を 1 L PETG ボトルに入れた。均質化するためにこのボトルを穏やかに振盪した。

10

【0287】

4 個の Vivaspin 20 濃縮装置 (10 kDa) を使用した。3 個の Vivaspin に、アダリムマブ溶液 (10 mg/mL) 20 mL を (それぞれ) 入れた。4 個目の Vivaspin 装置には、遠心中の平衡錘として水を入れた。濃縮装置を閉じ、遠心機に入れた。4500 x g の遠心力をかけて (スイングアウト型ローター中で) アダリムマブ溶液を遠心した。

【0288】

2.3: 試料採取

濃縮アダリムマブ溶液の濃度が 10 mg/mL に到達した際及びそれぞれ続いて 10 mg/mL 濃度ずつ上昇した際に (20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL など、およそ 200 mg/mL まで)、この試料を採取した。40 分間隔で、濃縮装置を遠心機から取り出し、溶液を均質化し、溶液及び遠心アダプターをおよそ 10 分間水中で冷却した。10 mg/mL ずつ濃度が上昇した後ごとに、濃縮装置中の溶液を均質化し、視覚的な様相を調べ、UV (300 µL)、PCS (160 µL)、SEC (120 µL) 及び IEC (300 µL) による分析のために試料を採取した。試料採取後、濃縮装置におよそ 20 mL までアダリムマブ溶液 (10 mg/mL) を入れた。

20

【0289】

溶液中のアダリムマブタンパク質 (即ちアイソフォーム) の溶解限度を調べるために、タンパク質沈殿の目視及び PCS 分析を用いた。

30

【0290】

およそ 80 mg/mL の濃度において、アダリムマブ溶液はもはや乳白光がないことが明らかになった (乳白光は、大量の断片があるアダリムマブ溶液の既知の特徴である。) 。従って、実験遂行中に断片化が起こり得た疑いがあった。さらなる分析のために、SEC によってアダリムマブ溶液 (およそ 80 mg/mL) の試料を分析した。各 Vivaspin 中の溶液の残り、ならびにアダリムマブ溶液 (10 mg/mL) の残りを取り出し、50 mL ファルコンチューブに移し、-80 で保存した。SEC 分析から、99.6% の単量体の純度が示された。

【0291】

この溶液を 25 の水浴中で融解し、ろ過滅菌した。その後、3 本のファルコンチューブからの溶液を各 Vivaspin に入れた。濃縮装置におよそ 20 mL まで入れ、濃縮を続けた。およそ 200 mg/mL の濃度に到達したところでこの実験を終了した。

40

【0292】

さらなる分析まで、全ての SEC 及び IEC 試料を -80 で保存した。試料採取後、UV 及び PCS を直接測定した。濃縮アダリムマブ溶液の残りをエッペンドルフ容器に入れ、-80 で保存した。

【0293】

下記で示される表 7 は、アダリムマブ溶液を濃縮する間に濃縮装置に再充填すべきタンパク質溶液の体積の計算を記載する。どの程度の体積の試料を採取すべきかを決定するた

50

めに、実験遂行前にスキームを計算した。遠心の持続時間は表 8 で示す。

【 0 2 9 4 】

表 7 : 遠心スキーム

【 0 2 9 5 】

【 表 7 】

表 7 : 遠心スキーム

	工程	容量 [mL]	濃度 [mg/mL]	容量 10mg/mL タンパク質溶液
	0	20	10	
濃縮	1	10	20	
試料採取	2	9	20	
充填	3	20	14, 5	11
濃縮	4	9, 66	30	
試料採取	5	8, 66	30	
充填	6	20	18, 66	11, 34
濃縮	7	9, 33	40	
試料採取	8	8, 33	40	
充填	9	20	22, 49	11, 67
濃縮	10	8, 99	50	
試料採取	11	7, 99	50	
充填	12	20	25, 98	12, 01
濃縮	13	8, 66	60	
試料採取	14	7, 66	60	
充填	15	20	29, 15	12, 34
濃縮	16	8, 32	70	
試料採取	17	7, 32	70	
充填	18	20	31, 96	12, 68
濃縮	19	7, 99	80	
試料採取	20	6, 99	80	
充填	21	20	34, 46	13, 01
濃縮	22	6, 65	90	
試料採取	23	6, 65	90	
充填	24	20	36, 6	13, 35
濃縮	25	7, 32	100	
試料採取	26	6, 32	100	
充填	27	20	38, 44	13, 68
濃縮	28	6, 98	110	
試料採取	29	5, 98	110	
充填	30	20	39, 9	14, 02
濃縮	31	6, 65	120	
試料採取	32	5, 65	120	
充填	33	20	41, 07	14, 35
濃縮	34	6, 31	30	
試料採取	35	5, 31	130	
充填	36	20	41, 86	14, 69
濃縮	37	5, 98	140	
試料採取	38	4, 98	140	
濃縮	39	4, 64	150	154, 14
				174, 14

【 0 2 9 6 】

【表 8】

表 8 : アダリムマブ溶液を濃縮するために必要とされた遠心時間

濃度 [から→へ] [mg/mL]	時間 [分]
10 から 20	15
20 から 30	20
30 から 40	27
40 から 50	30
50 から 60	40
60 から 70	50
70 から 80	60
80 から 90	67
90 から 100	80
100 から 110	100
110 から 200	206

10

## 【 0 2 9 7 】

アダリムマブの濃縮からの結果はまた下記表 1 2 で示す。

20

## 【 0 2 9 8 】

## 2 . 4 : 粘度測定

W F I 中の 5 0 m g / m L 又は W F I 中の 2 0 0 m g / m L の何れかを含むアダリムマブ溶液の粘度を測定した。G e m i n i 1 5 0 ペルチェ・プレートレオメーター、M a l v e r n を用いて W F I 中の 5 0 m g / m L 及び 2 0 0 m g / m L を測定し、W F I 溶液中の 2 0 0 m g / m L はまた、レオメーター M C R 3 0 1 [ 温度制御 P - P T D 2 0 0 ( ペルチェ・テンパーリング ( P e l t i e r t e m p e r i n g ) 付きプレート) ] 及びコーン/プレート測定系 C P 5 0 / 1 ( ステンレス鋼 ) ; A n t o n P a a r ) でも測定した。

## 【 0 2 9 9 】

保存チューブ中のアダリムマブ溶液 ( 2 0 0 m g / m L ) を融解し、6 R バイアル中で均質化した。( 5 0 m g / m L アダリムマブ溶液に対する ) 希釈溶液を得るために、1 m L アダリムマブ ( 2 0 0 m g / m L ) を 3 m L W F I で希釈した。

30

## 【 0 3 0 0 】

レオメーター G e m i n i 1 5 0 の場合、およそ 2 m L を必要とし、M C R 3 0 1 の場合、測定に必要なものは 1 m L 未満であった。

## 【 0 3 0 1 】

V i v a s p i n チューブを用いることにより、市販製剤中のアダリムマブ ( およそ 1 9 4 m g / m L ) を得た。このチューブに市販緩衝液中のアダリムマブ溶液を入れ、1 9 4 m g / m L の濃度に到達するまで遠心した。毛細管粘度計 S c h o t t により粘度を測定した。

40

## 【 0 3 0 2 】

## 2 . 5 : 要約

まとめると、4 本の異なるチューブ中の V i v a s p i n 2 0 チューブで 5 0 m g / m L からおよそ 1 9 4 m g / m L までアダリムマブを濃縮した。初めに、アダリムマブ溶液 ( 5 0 m g / m L ) 2 0 m L が各チューブ ( 4 本 ) に入っていた。濃縮終了時に、アダリムマブ溶液 ( およそ 1 9 4 m g / m L ) 5 m L が各チューブに入っていた。5 0 0 0 r p m ( およそ 4 5 0 0 g ) でこの濃縮段階を行った。1 時間ごとに、楕円ビーカー及び V i v a s p i n チューブ中のタンパク質溶液を砕いた氷の中でおよそ 1 0 から 1 5 分間冷却した。密度測定装置 D M A 4 5 0 0 、 A n t o n P a a r で密度を測定した。高アダ

50

リムマブ濃度製剤のさらなる分析は実施例 5 から 11 で与える。

【0303】

(実施例 3)

高濃度 IL-12 抗体を含む製剤

3.1: 透析ろ過

透析ろ過前に、およそ 15 mg/mL の濃度まで、IL-12 抗体 J695 (54 mg/mL) を注射用水で希釈した。500 mL 容量フラスコ中に 150 mL の J695 溶液 (54 mg/mL) を入れ、注射用水を較正目盛までフラスコに入れることによって、この希釈を行った。容量フラスコを閉じ、溶液の均質化のために振盪した。TFFLab  
scale システムを水で洗い流した。次に、ポリエーテルスルホン膜 (PES) を付け  
、また蒸留水 1 L で洗い流した。その後、TFFLab scale システム及び膜を注射用水およそ 300 mL で洗い流した。次に、希釈した J695 溶液を TFF のリザーバ  
ーに入れた。浸透圧測定のための試料 (300 µL)、UV 分光光度計 (500 µL) 及び SEC 分析のための試料 (120 µL) を採取した。このシステムを閉じ、透析ろ過を  
開始した。DF 体積 200 mL を処理した後、透析ろ過を停止し、UV 測定のための別の  
試料を採取した。1800 mL 透析ろ過体積 (およそ係数 (factor) 3.5 体積交換) 後、DF/UF を停止し、浸透圧値は 4 mosmol/kg の値に到達した。透析ろ  
過後の J695 溶液の pH 値は pH 6.48 であった。

10

【0304】

次のパラメータを適用することにより、TFF 装置での透析ろ過を行った。

20

【0305】

- 攪拌機: ポジション 2
- ポンプ: ポジション 2
- 圧力 上流/インレット: 最大 20 - 30 psi
- 圧力 下流/アウトレット: 最大 10 psi

透析ろ過後、OD 280 によりタンパク質濃度を評価した。

【0306】

濃度を測定したところ、16.63 mg/mL であった。

【0307】

J695 溶液をろ過滅菌した。

30

【0308】

TFF 機器及び膜を、蒸留水およそ 1 L、次いで 500 mL の 0.1 M NaOH で洗い流した。0.1 M NaOH 中で膜を保存し、TFF を再び蒸留水およそ 500 mL で洗い流した。

【0309】

3.2: 濃縮

濃縮前に、J695 溶液を 10 mg/mL に希釈し、J695 溶液 (16.63 mg/mL) 316 mL を 500 mL 容量フラスコに入れ、このフラスコに較正目盛まで注射用水 (WFI) を入れた。さらに、J695 溶液 (16.63 mg/mL) 64 mL を 100 mL 容量フラスコに入れ、WFI を較正目盛まで入れた。均質化のために両フラスコを穏やかに振盪した。両フラスコからの溶液を 1 L PETG ボトルに入れた。均質化のためにこのボトルを穏やかに振盪した。

40

【0310】

4 個の Vivaspin 20 濃縮装置 (10 kDa カットオフ) を使用した。3 個の各 Vivaspin に、J695 溶液 (10 mg/mL) を入れた。4 個目の Vivaspin 濃縮装置には、遠心中の平衡錘として水を入れた。濃縮装置を閉じ、遠心機に入れた。4500 x g 遠心力をかけて (スイングアウト型ローター中で) J695 溶液を遠心した。

【0311】

3.3: 試料採取

50

濃縮 J 6 9 5 溶液の濃度が 1 0 m g / m L 濃度に到達した際及びそれぞれ続く 1 0 m g / m L 濃度ずつ上昇した際に ( 2 0 m g / m L 、 3 0 m g / m L 、 4 0 m g / m L など、 2 0 0 m g / m L まで)、この試料を採取した。4 0 分間隔で、濃縮装置を遠心機から取り出し、溶液を均質化し、溶液及び遠心アダプターをおよそ 1 0 分間水中で冷却した。1 0 m g / m L ずつ濃度が上昇した後ごとに、濃縮装置中の溶液を均質化し、視覚的な様相を調べ、U V ( 3 0 0  $\mu$  L )、P C S ( 1 6 0  $\mu$  L )、S E C ( 1 2 0  $\mu$  L ) 及び I E C 分析 ( 3 0 0  $\mu$  L ) に対して試料を採取した。試料採取後、濃縮装置におよそ 2 0 m L まで J 6 9 5 溶液 ( 1 0 m g / m L ) を入れた。

## 【 0 3 1 2 】

J 6 9 5 の、溶解度 ( 即ち、潜在的な沈殿を調べるために ) 及び安定性を調べるために、目視及び P C S 分析を使用した。

10

## 【 0 3 1 3 】

実験の終了時、およそ 2 0 0 m g / m L の濃度に到達した。

## 【 0 3 1 4 】

さらなる分析 ( 下記参照 ) のために、全ての S E C 及び I E C 試料を - 8 0 で保存した。各試料採取後、U V 分光光度法及び P C S 測定を直接行った。濃縮 J 6 9 5 溶液の残りをエッペンドルフ容器に入れ、- 8 0 で保存した。

## 【 0 3 1 5 】

遠心スキームに関する詳細は上記表 7 で与える。J 6 9 5 遠心の持続時間は表 9 で与える。

20

## 【 0 3 1 6 】

表 9 : J 6 9 5 溶液を濃縮するために使用される遠心時間

## 【 0 3 1 7 】

## 【表 9】

表 9 : J695 溶液を濃縮するために使用された遠心時間

濃度 [から->へ] [mg/mL]	時間 [分]
10 から 20	13
20 から 30	22
30 から 40	27
40 から 50	38
50 から 60	45
60 から 70	80
70 から 80	90
80 から 90	105
90 から 100	165
100 から 200	270

30

40

## 【 0 3 1 8 】

## 3 . 4 : J 6 9 5 の流体力学直径における賦形剤の影響

この実験において、J 6 9 5 の流体力学直径における塩化ナトリウム及びマニトールの影響を個別に分析した。このために、塩化ナトリウム ( 1 2 m g / m L ) 及びマニトール ( 1 2 0 m g / m L ) の原溶液を調製した。ビーカー中で 1 . 2 g の N a C l を秤量した。これに W F I およそ 7 0 m L を入れ、ビーカー中でマニトール 1 2 . 0 0 2 g を秤量し、このビーカーに W F I およそ 7 0 m L を入れた。均質化するためにこの 2 種類の溶液を撈拌した。各溶液を容量フラスコに入れ、較正目盛まで W F I を入れた。均質化するためにこのフラスコを穏やかに振盪した。

## 【 0 3 1 9 】

50

J695 溶液 (およそ 200 mg/mL) およそ 8 mL を 37 で融解した。この溶液を 10 R バイアルに入れて均質化した。7 本の 2 R バイアルにそれぞれ 500  $\mu$ L J695 溶液 (およそ 200 mg/mL) を入れた。下記表 10 で充填スキームを述べる。

【0320】

表 10 : NaCl 又はマニトールの様々な濃度を含有する J695 溶液の調製のための充填スキーム

【0321】

【表 10】

表 10 : NaCl 又はマニトールの異なる濃度を含有する J695 溶液を調製するための充填スキーム

賦形剤	濃度 賦形剤	容量 ABT-874 (200mg/mL) [ $\mu$ L]	容量 NaCl 原溶液 (12mg/mL) [ $\mu$ L]	容量マニトール 原溶液 (12mg/mL) [ $\mu$ L]	容量 WFI [ $\mu$ L]
—	—	500	—	—	500
NaCl	2mg/mL	500	167	—	333
NaCl	4mg/mL	500	333	—	167
NaCl	6mg/mL	500	500	—	—
マニトール	20mg/mL	500	—	167	333
マニトール	40mg/mL	500	—	333	167
マニトール	60mg/mL	500	—	500	—

【0322】

2 R バイアルを振盪により穏やかに均質化した。その後、様々な J695 溶液 (100 mg/mL) の、PCS 及び浸透圧測定を行った。

【0323】

PCS 分析用の試料を調製するために、キュベットを最初に試料 50  $\mu$ L で洗い流した。次に、試料 100  $\mu$ L を用いて測定を行った。

【0324】

実施例 5 から 11 において、J695 高濃度製剤のさらなる分析を提供する。

【0325】

(実施例 4)

高濃度ヒト血清アルブミン (HSA) 製剤

4.1 : 透析ろ過

透析ろ過前に、15.29 mg/mL の濃度まで、HSA 溶液 (200 mg/mL、市販製剤) を注射用水で希釈した。これを行うために、38 mL HSA (200 mg/mL) を 500 mL 容量フラスコに入れた。このフラスコに校正目盛まで注射用水を入れた。この容量フラスコを閉じ、溶液の均質化のために穏やかに振盪した。TFF Lab scale システムを水で洗い流した。次に、膜 (再生セルロース) を付け、これをまた蒸留水 1 L で洗い流した。その後、TFF Lab scale システム及び膜をおよそ 300 mL の注射用水で洗い流した。次に、希釈した HSA 溶液を TFF のリザーバーに入れた。浸透圧測定用の試料 (300  $\mu$ L)、UV 分光光度計 (500  $\mu$ L) 及び SEC 分析 (120  $\mu$ L) 用の試料を採取した。このシステムを閉じ、透析ろ過を開始した。体積およそ 300 mL の透析ろ過後、透過液の UV 測定を行った。透過液から 2.74 mg/mL の濃度が明らかとなり、このことから、タンパク質が膜を通過していたことが示された。DF およそ 500 mL 後に透析ろ過を停止し、UV 測定用の別の試料を採取した (HSA 濃度 11.03 mg/mL)。透析ろ過体積 950 mL (およそ 2 体積交換) 後及び浸透圧値が 4 mosmol/kg に達した後、DF/UF を終了した。透析ろ過後の HSA 溶液の pH 値は pH 7.13 であった。

【0326】

透過液の UV 分光光度計測定を 3 回行った ( $n = 3$ )。

## 【0327】

次のパラメータを適用することにより、TFF装置による透析ろ過を行った。

## 【0328】

- 攪拌機：ポジション2
- ポンプ：ポジション2
- 圧力 上流/インレット：最大20 - 30 psi
- 圧力 下流/アウトレット：最大10 psi

透析ろ過後、OD280によりタンパク質濃度を評価した。濃度を測定したところ、9.41 mg/mLであった。

## 【0329】

HSA溶液をろ過滅菌した。TFF及び膜を蒸留水およそ1Lで洗い流した。その後、完全性試験を行った(Operating Instructions Lab scale<sup>TM</sup> TFFシステム、p.5-3から5-5、1997参照)。体積流量は1.2 mL/分であり、従って、完全性試験を通過した(許容可能な最大限度3 mL/分)。膜をもう1度蒸留水500 mLで洗い流し、次いで0.05 M NaOH 500 mLで洗い流した。0.05 M NaOH中で膜を保存し、TFFを蒸留水およそ500 mLで再び洗い流した。

## 【0330】

## 4.2: 濃縮プロセス

HSAタンパク質溶液を濃縮する前に、OD280により濃度を評価し、測定したところ、9.52 mg/mLであった。4本のVivaspin 20濃縮装置(10 kDa)を使用した。HSA溶液(9.52 mg/mL) 20 mLを3本のVivaspin濃縮装置のそれぞれに入れた。4個目のVivaspin装置に、遠心中の平衡錘として水を入れた。濃縮装置を閉じ、遠心機に入れた。4500 x g遠心力をかけて(スイングアウト型ローター中で)HSA溶液を遠心した。

## 【0331】

## 4.3: 試料採取

濃縮HSA溶液の濃度が10 mg/mLに到達した際及びそれぞれ続き10 mg/mL濃度ずつ上昇した際に(20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mLなど、およそ180 mg/mLまで)、この試料を採取した。40分間隔で、濃縮装置を遠心機から取り出し、溶液を均質化し、溶液及び遠心アダプターをおよそ10分間水中で冷却した。10 mg/mLずつ濃度が上昇した後ごとに、濃縮装置中の溶液を均質化し、視覚的な様相を調べ、UV(300 µL)、PCS(160 µL)、SEC(120 µL)及びIEC(300 µL)による分析のために試料を採取した。試料採取後、濃縮装置におよそ20 mLまでHSA溶液(9.52 mg/mL)を添加した。

## 【0332】

濃縮装置中のHSA溶液に対する予測濃度がおよそ20 mg/mLに到達した際に、OD280により透過液を測定し、0.5964 mg/mLの濃度であることが分かった。HSA溶液の濃度はわずかに15.99 mg/mLであり、これは予想よりも低かった。断片化の可能性について調べるために、SECによりWFI中の濃縮HSAの試料(10 mg/mL)を分析した。Vivaspin中のHSA溶液(15.99 mg/mL)をファルコンチューブに入れ、-80 で保存した。濃縮装置を満たすために使用した元のHSA溶液(9.52 mg/mL)の残りもまた-80 で保存した。

## 【0333】

膜を通過し得る小さな断片を生じるHSAタンパク質の分解が起こるか否かを調べるために、SEC分析を行った。しかし、SEC分析から、実質的に断片はなく、WFI中の10 mg/mL HSAに対して92.45%の単量体量であることが分かった。

## 【0334】

-80 で保存された溶液を25 で融解し、ろ過滅菌した。ファルコンチューブ中の溶液を1個のVivaspin 20濃縮容器(3 kDaカットオフ)にそれぞれ移した

10

20

30

40

50

。VivaspinにHSA溶液(9.52mg/mL)を入れ、遠心した(上述の3.2濃縮プロセス参照)。

【0335】

HSAの溶解限度を調べるために、目視及びPCS分析を使用した。

【0336】

実験終了時に、およそ180mg/mL HSAの濃度に到達した。

【0337】

さらなる分析まで、全てのSEC及びIEC試料を-80で保存した。試料採取後、UV及びPCS測定を直接行った。濃縮HSA溶液の残りをエッペンドルフ容器に入れ、-80で保存した。

10

【0338】

遠心スキームの概略は上記表7で述べる。HSAを濃縮するために使用される遠心持続時間は表11で述べる。

【0339】

表11：HSA溶液を濃縮するために必要な遠心時間

【0340】

【表11】

表11：HSA溶液を濃縮するために必要な遠心時間

濃度 [から->へ] [mg/mL]	時間 [分]
10から20	9
20から30	30
30から40	40
40から50	50
50から60	80
60から70	90
70から80	110
80から90	130
90から100	170
100から180	360

20

30

【0341】

4.4：HSAの流体力学直径におけるpH値の影響

タンパク質がWFI中で溶解される場合の、HSAの流体力学直径におけるpHの潜在的影響を評価するために、実験の次の部分を行った。4個の6Rバイアルに5.09mLのHSA溶液(9.83mg/mL)を入れ、1M HClで3から6のpH値に設定した(実際のpH: 3.04、3.99、5.05、6.01)。別個の10mL容量フラスコにこれらの溶液をそれぞれ移した。次にこれらのフラスコを校正目盛まで満たし、均質化のために穏やかに振盪した。

40

【0342】

10RバイアルにHCl溶液を入れ、PCSにより分析した。この溶液をろ過滅菌し、PCSにより再び測定した。また、5.09mLのHSA溶液(9.83mg/mL)を10mL容量フラスコに移し、これに校正目盛までWFIを入れた。均質化のためにこのフラスコを穏やかに振盪し、次いで溶液をろ過滅菌し、PCSにより測定した。

【0343】

PCS測定のための試料調製:

キュベットを試料50μLで洗い流した。試料体積100μLを用いて測定を行った。

【0344】

50

## 4.5: 粘度測定

市販製剤中のHSA(200mg/mL)に対して及びWFI中のHSA(およそ180mg/mL)に対して、毛細管粘度計(Schott、MP-No.33.2)で粘度を測定した。

## 【0345】

市販製剤のHSAの50mLボトルから15mLアリコートを採取した。WFI中のHSAをおよそ20で融解し、およそ9mLをファルコンチューブに分注した。密度測定装置DMA4500、Anton Paarで密度を測定した。

## 【0346】

実施例5から11において高HSA濃度製剤のさらなる分析を示す。

10

## 【0347】

(実施例5)

高タンパク質製剤の分析 - 視覚的な様相

市販製剤中のアダリムマブとは対照的に、WFI中のアダリムマブは、乳白光が見られなかった。J695もまた、WFI中で溶解された場合、何ら乳光現象は見られなかった。アダリムマブのタンパク質濃度がWFI中で80mg/mL及び200mg/mLであったという事実にもかかわらず、実際に乳白光は観察されなかった。一方、50mg/mLアダリムマブを含む市販製剤から、市販製剤において顕著な乳白光が見られた。従って、溶解媒体としての純水即ちWFIの使用は、タンパク質溶液の乳白光に好ましい効果があった。

20

## 【0348】

(このような高タンパク質濃度で可溶性であることに加えて)WFI中のアダリムマブは、200mg/mLなどのより高い濃度でも低粘度であると思われることは驚くべき観察であった。

## 【0349】

濃度に依存して、HSA溶液の光学的特性/色は、透明で僅かに黄色(WFI中10mg/mL)から透明で黄色に変化した(WFI中およそ180mg/mL)。

## 【0350】

濃縮プロセス中、アダリムマブ溶液及びHSA溶液に対して沈殿は観察されなかった。沈殿は溶解限度に対する指標となろう。実験が終了するまで、この溶液は透明なままであった。潜在的な溶解限度が近づいたので実験を終了したのではなく、濃縮装置中に残存する溶液体積が濃縮を進めるのに十分ではなかったため、この実験を終了した(即ち材料不足)ことを強調したい。アダリムマブ、J695及びHSAの溶解限度が220mg/mLをはるかに上回る可能性が非常に高いと思われる。

30

## 【0351】

J695溶液において、濃縮装置中で高濃度溶液を一晩2-8で保存した場合(およそ120mg/mL)、沈殿様の結晶が観察された。沈殿のような結晶は、溶液を周囲温度で保存した場合、およそ3-5分後に再溶解した。従って、純水中で高濃度のJ695を溶解することによって生じる環境により、単なる温度サイクル(例えば、周囲温度から2-8)によってタンパク質結晶化が起こり得る状態がもたらされる。

40

## 【0352】

(実施例6)

高タンパク質製剤の分析 - タンパク質濃度

タンパク質濃度の計算は、上記材料及び方法セクションで示す。

## 【0353】

純水、高タンパク質製剤へのアダリムマブ、J695及びHSAの濃縮のまとめは下記表12-14で示す。

## 【0354】

表12: 濃縮プロセス中にOD280により評価した場合のアダリムマブの濃度

## 【0355】

50

【表 1 2】

表 1 2 : 濃縮プロセスの間に OD280 を介して評価されたアダリムマブの濃度

試料名	吸光度	平均値	希釈	濃縮
WFI 中のアダリムマブ 10mg/mL	0.680	0.650	20	9.35
	0.695			
	0.575			
試料名	吸光度	平均値	希釈	濃縮
WFI 中のアダリムマブ 20mg/mL 1	1.064	0.813	40	23.40
	0.688			
	0.687			
WFI 中のアダリムマブ 20mg/mL 2	0.781	0.788	40	22.68
	0.793			
	0.791			
WFI 中のアダリムマブ 20mg/mL 3	0.870	0.824	40	23.71
	0.883			
	0.719			
WFI 中のアダリムマブ 30mg/mL 1	0.817	0.807	60	34.84
	0.812			
	0.793			
WFI 中のアダリムマブ 30mg/mL 2	0.839	0.827	60	35.69
	0.813			
	0.829			
WFI 中のアダリムマブ 30mg/mL 3	0.770	0.744	60	32.10
	0.729			
	0.732			
WFI 中のアダリムマブ 40mg/mL 1	0.494	0.491	100	35.35
	0.493			
	0.488			
WFI 中のアダリムマブ 40mg/mL 2	0.499	0.501	100	36.06
	0.516			
	0.489			
WFI 中のアダリムマブ 40mg/mL 3	0.495	0.512	100	36.81
	0.523			
	0.517			

10

20

30

試料名	吸光度	平均値	希釈	濃縮
WFI 中のアダリムマブ 50mg/mL 1	0,574	0,585	100	42,11
	0,579			
	0,603			
WFI 中のアダリムマブ 50mg/mL 2	0,671	0,634	100	45,63
	0,630			
	0,601			
WFI 中のアダリムマブ 50mg/mL 3	0,579	0,574	100	41,27
	0,574			
	0,568			
WFI 中のアダリムマブ 60mg/mL 1	0,838	0,837	100	60,21
	0,833			
	0,840			
WFI 中のアダリムマブ 60mg/mL 2	0,793	0,777	100	55,89
	0,767			
	0,770			
WFI 中のアダリムマブ 60mg/mL 3	0,802	0,780	100	56,10
	0,759			
	0,779			
WFI 中のアダリムマブ 70mg/mL 1	0,911	0,878	100	63,15
	0,866			
	0,857			
WFI 中のアダリムマブ 70mg/mL 2	1,012	0,996	100	71,68
	0,976			
	1,001			
WFI 中のアダリムマブ 70mg/mL 3	0,879	0,871	100	62,66
	0,874			
	0,861			

10

20

30

試料名	吸光度	平均値	希釈	濃縮
WFI 中のアダリムマブ 80mg/mL 1	0,512	0,510	200	73,45
	0,489			
	0,531			
WFI 中のアダリムマブ 80mg/mL 2	0,542	0,526	200	75,64
	0,519			
	0,517			
WFI 中のアダリムマブ 80mg/mL 3	0,551	0,531	200	76,42
	0,511			
	0,531			
WFI 中のアダリムマブ 90mg/mL 1	0,550	0,547	200	78,64
	0,550			
	0,539			
WFI 中のアダリムマブ 90mg/mL 2	0,549	0,548	200	78,80
	0,551			
	0,543			
WFI 中のアダリムマブ 90mg/mL 3	0,532	0,534	200	76,81
	0,533			
	0,537			
WFI 中のアダリムマブ 100mg/mL 1	0,640	0,628	200	90,36
	0,621			
	0,623			
WFI 中のアダリムマブ 100mg/mL 2	0,748	0,747	200	107,41
	0,735			
	0,757			
WFI 中のアダリムマブ 100mg/mL 3	0,625	0,621	200	89,39
	0,616			
	0,623			
WFI 中のアダリムマブ 110mg/mL 1	0,674	0,669	200	96,19
	0,671			
	0,660			
WFI 中のアダリムマブ 110mg/mL 2	0,693	0,668	200	96,05
	0,690			
	0,620			

10

20

30

試料名	吸光度	平均値	希釈	濃縮
WFI 中のアダリムマブ 110mg/mL 3	0,604	0,640	200	92,05
	0,664			
	0,652			
WFI 中のアダリムマブ 200mg/mL 1	0,863	0,698	400	201,00
	0,612			
	0,621			
WFI 中のアダリムマブ 200mg/mL 2	1,055	0,791	400	227,53
	0,658			
	0,659			
WFI 中のアダリムマブ 200mg/mL 3	0,732	0,665	400	191,44
	0,648			
	0,615			

【 0 3 5 6 】

【表 1 3】

表 1 3 : 濃縮プロセスの間に OD280 を介して評価された J695 の濃度

試料名	吸光度	平均値	希釈	濃度
WFI 中の AVT-874 10mg/mL	0,715	0,703	20	9,90
	0,708			
	0,705			
WFI 中の AVT-874 20mg/mL 1	0,686	—	40	19,31
WFI 中の AVT-874 20mg/mL 2	0,684	—	40	19,26
WFI 中の AVT-874 20mg/mL 3	0,685	—	40	19,29
WFI 中の AVT-874 30mg/mL 1	0,700	—	60	29,59
WFI 中の AVT-874 30mg/mL 2	0,703	—	60	29,70
WFI 中の AVT-874 30mg/mL 3	0,684	—	60	28,91
WFI 中の AVT-874 40mg/mL 1	0,539	—	100	37,97
WFI 中の AVT-874 40mg/mL 2	0,540	—	100	38,02
WFI 中の AVT-874 40mg/mL 3	0,520	—	100	36,65
WFI 中の AVT-874 50mg/mL 1	0,698	—	100	49,15
WFI 中の AVT-874 50mg/mL 2	0,653	—	100	45,95
WFI 中の AVT-874 50mg/mL 3	0,623	—	100	43,87
WFI 中の AVT-874 60mg/mL 1	0,834	—	100	58,75
WFI 中の AVT-874 60mg/mL 2	0,781	—	100	5,02
WFI 中の AVT-874 60mg/mL 3	0,778	—	100	54,76
WFI 中の AVT-874 70mg/mL 1	1,103	—	100	77,69
WFI 中の AVT-874 70mg/mL 2	1,102	—	100	77,62
WFI 中の AVT-874 70mg/mL 3	1,110	—	100	78,13
WFI 中の AVT-874 80mg/mL 1	0,671	—	200	94,45
WFI 中の AVT-874 80mg/mL 2	0,746	—	200	105,06
WFI 中の AVT-874 80mg/mL 3	0,664	—	200	93,45
WFI 中の AVT-874 90mg/mL 1	0,826	—	200	116,37
WFI 中の AVT-874 90mg/mL 2	0,809	—	200	113,92
WFI 中の AVT-874 90mg/mL 3	0,804	—	200	113,27
WFI 中の AVT-874 100mg/mL 1	0,861	—	200	121,21
WFI 中の AVT-874 100mg/mL 2	0,993	—	200	139,80
WFI 中の AVT-874 100mg/mL 3	0,985	—	200	138,73
WFI 中の AVT-874 200mg/mL 1	0,681	0,805	400	226,67
	0,864			
	0,869			
WFI 中の AVT-874 200mg/mL 2	0,690	0,767	400	216,10
	0,828			
	0,784			
WFI 中の AVT-874 200mg/mL 3	0,708	0,745	400	209,83
	0,789			
	0,738			

【 0 3 5 7 】

表 1 4 a 及び 1 4 b : 濃縮プロセス中に OD 2 8 0 により評価した場合の H S A の濃度

【 0 3 5 8 】

【表 1 4】

表 1 4 a

試料名	吸光度	希釈	濃度
WFI 中の HSA 10mg/mL	0,715	20	9,88
WFI 中の HSA 30mg/mL 1	0,515	60	22,94
WFI 中の HSA 30mg/mL 2	0,395	60	22,73
WFI 中の HSA 30mg/mL 3	0,400	60	23,00
WFI 中の HSA 40mg/mL 1	0,383	100	36,78
WFI 中の HSA 40mg/mL 2	0,389	100	37,33
WFI 中の HSA 40mg/mL 3	0,368	100	35,29
WFI 中の HSA 50mg/mL 1	0,479	100	45,97
WFI 中の HSA 50mg/mL 2	0,496	100	47,61
WFI 中の HSA 50mg/mL 3	0,465	100	44,61
WFI 中の HSA 60mg/mL 1	0,609	100	58,47
WFI 中の HSA 60mg/mL 2	0,653	100	62,69
WFI 中の HSA 60mg/mL 3	0,568	100	54,52
WFI 中の HSA 70mg/mL 1	0,645	100	61,89
WFI 中の HSA 70mg/mL 2	0,623	100	59,76
WFI 中の HSA 70mg/mL 3	0,618	100	59,28
WFI 中の HSA 80mg/mL 1	0,393	200	75,37
WFI 中の HSA 80mg/mL 2	0,436	200	83,69
WFI 中の HSA 80mg/mL 3	0,363	200	69,67
WFI 中の HSA 90mg/mL 1	0,484	200	92,90
WFI 中の HSA 90mg/mL 2	0,439	200	84,22
WFI 中の HSA 90mg/mL 3	0,419	200	80,50
WFI 中の HSA 100mg/mL 1	0,604	200	115,93
WFI 中の HSA 100mg/mL 2	0,573	200	110,00
WFI 中の HSA 100mg/mL 3	0,585	200	112,30

【 0 3 5 9】

【表 1 5】

表 1 4 b

試料名	吸光度	平均値	希釈	濃度
WFI 中の HSA 180mg/mL 1	0,946	0,952	200	182,79
	0,950			
	0,961			
WFI 中の HSA 180mg/mL 2	0,994	0,929	200	178,24
	0,906			
	0,886			
WFI 中の HSA 180mg/mL 3	0,843	0,896	200	172,05
	0,963			
	0,884			

【 0 3 6 0】

評価した 3 種類のタンパク質は全て、評価される濃度範囲（即ちアダリムマブ及び J 6

10

20

30

40

50

95に対して $> 200 \text{ mg/mL}$ 、HSAに対して $> 175 \text{ mg/mL}$ )で可溶性のままであった。不溶性の兆候(例えば、溶液中で混濁現象又は沈殿などが生じること)は観察されなかった。アダリムマブの場合、この結果から、評価した濃度範囲にわたり、沈殿は全く生じなかったため、全てのアダリムマブのアイソフォーム(即ちリジン変異体)は可溶性のままであったことが示された。この観察は、実施例11(これは、アダリムマブ濃度に関わらず、リジン変異体の集合体(sum)が実質的に一貫したままであったことを記載する。)に記載される、イオン交換クロマトグラフィーデータとも一致する。

## 【0361】

(実施例7)

高タンパク質製剤の分析 - 粘度

7.1: アダリムマブ粘度

注射用水中のアダリムマブ(およそ $50 \text{ mg/mL}$ )の粘度を調べたところ、 $1.5 - 2 \text{ mPas}$ 前後であった。WFI中のアダリムマブ(およそ $200 \text{ mg/mL}$ )に対して、2種類の値を調べた。Malvern(Gemini150)からのコーン/プレートレオメーターで測定した一方の値はおよそ $6 - 6.5 \text{ mPas}$ であり、他方の値(Anton Paar、MCR301からのコーン/プレートレオメーターで測定)はおよそ $12 \text{ mPas}$ であった。

## 【0362】

アダリムマブ市販製剤(およそ $194 \text{ mg/mL}$ )粘度:

K - 毛細管の定数

t - 毛細管を通過するために溶液が必要とする時間 [s]

v - 動粘性率

- 動的粘度

p - 密度

## 【0363】

## 【表16】

時間 [秒]	K [mm <sup>2</sup> /s <sup>2</sup> ]	V [mm <sup>2</sup> /s]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	$\eta$ [mPas]
279,36	0,03159	8,825	1,05475	9,31

## 【0364】

WFI中のアダリムマブの粘度(およそ $200 \text{ mg/mL}$ )を測定したところ、Anton Paarからの粘度計でおよそ $12 \text{ mPas}$ であり、Malvernからの粘度計で測定するとおよそ $6 \text{ mPas}$ であった。一方、市販製剤中のアダリムマブ(およそ $194 \text{ mg/mL}$ )の粘度はより高く、 $9.308 \text{ mPas}$ であった(Schotttからの毛細管粘度計で測定)。

## 【0365】

7.2: ヒト血清アルブミン粘度

HSA市販製剤(およそ $200 \text{ mg/mL}$ )粘度:

K - 毛細管の定数

t - 毛細管を通過するために溶液が必要とする時間 [s]

v - 動粘性率

- 動的粘度

p - 密度

## 【0366】

## 【表17】

時間 [秒]	K [mm <sup>2</sup> /s <sup>2</sup> ]	V [mm <sup>2</sup> /s]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	$\eta$ [mPas]
337,69	0,01024	3,46	1,05475	3,66

10

20

30

40

50

## 【 0 3 6 7 】

W F I 中の H S A ( およそ 1 8 0 m g / m L ) 粘度 :

K - 毛細管の定数

t - 毛細管を通過するために溶液が必要とする時間 [ s ]

v - 動粘性率

- 動的粘度

p - 密度

## 【 0 3 6 8 】

## 【表 1 8】

時間 [秒]	K [mm <sup>2</sup> /s <sup>2</sup> ]	V [mm <sup>2</sup> /s]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	$\eta$ [mPas]
185,3	0,09573	17,72	1,07905	19,12

10

## 【 0 3 6 9 】

W F I 中の H S A ( およそ 1 8 0 m g / m L ) の粘度を測定したところ、およそ 1 9 . 1 2 1 m P a s であった。市販製剤中の H S A ( およそ 1 9 4 m g / m L ) の粘度を測定したところ、9 . 3 0 8 m P a s ( S c h o t t からの毛細管粘度計で測定 ) であった。

## 【 0 3 7 0 】

7 . 3 : アダリムマブ及び H S A の粘度の分析

W F I 中のアダリムマブ 5 0 m g / m L の動的粘度は、それぞれ W F I 中及び市販緩衝液中のアダリムマブ 2 0 0 m g / m L の粘度よりも低い。H S A の場合、W F I 中の 1 8 0 m g / m L の濃度に対する動的粘度は、市販緩衝液中の 2 0 0 m g / m L の濃度に対するものよりも約 6 倍高い。従って、溶解媒体としての純水によりもたらされる影響による粘度変化の強度 ( 即ちそれぞれ上昇及び低下 ) は、個々のタンパク質に依存し得ると思われる。

20

## 【 0 3 7 1 】

( 実施例 8 )

高タンパク質製剤の流体力学直径の分析 - 光子相関分光法 ( P C S )

次の実施例は、本発明の D F / U F 法を用いて得られる水性製剤中の様々なタンパク質の流体力学直径 ( D <sub>h</sub> ) ( 平均流体力学的分子直径の z - 平均 ) の分析を提供する。

## 【 0 3 7 2 】

8 . 1 : アダリムマブ流体力学直径

図 5 及び 6 で示されるように、アダリムマブ濃度の上昇とともに流体力学直径 ( D <sub>h</sub> ) が拡大するという傾向が観察され得る。図 5 は、W F I 中のアダリムマブの流体力学直径 ( z - 平均 ) と濃度との間の相関を示す。図 6 は、W F I 中のアダリムマブの流体力学直径 ( ピーク単量体 ) と濃度との間の相関を示す。

30

## 【 0 3 7 3 】

流体力学直径測定に対する標準実施要領 ( S O P ) においてなされた仮定のために、3 4 . 2 0 m g / m L の試料と比較して 2 3 . 2 7 m g / m L の試料から測定された D <sub>h</sub> の間に差が存在する。2 3 . 2 7 m g / m L の濃度のアダリムマブ試料に対して、試料の粘度に対して 1 . 1 m P a s の値を仮定する S O P を用いて P C S 測定を行った。3 4 . 2 0 m P a s のアダリムマブ試料に対して、1 . 9 m P a s 試料粘度を仮定する S O P を使用した。P C S データは試料検体の不規則なブラウン運動 ( 試料粘度により影響を受ける。 ) に基づくので、P C S データは、試料溶液のある一定の粘度により強い影響を受けることが知られている。従って、タンパク質濃度上昇に伴い流体力学直径が増大することは、タンパク質濃度の上昇により溶液の粘度が上昇する ( 粘度が高くなると、ブラウン運動が低下し、D <sub>h</sub> データ計算値が大きくなる。 ) というように説明され得る。タンパク質分子の不規則なブラウン運動が低下し、従って、ある一定の粘度に対して試料検体の流体力学直径を計算すると高くなる。全体的に、z - 平均に基づく D <sub>h</sub> 値及び単量体の D <sub>h</sub> 値はよく一致する。さらに、濃度の上昇とともに、タンパク質不溶性を示唆する D <sub>h</sub> の拡大は観察されない ( 即ち高分子量凝集体及び沈殿 ( あるならば ) ) により、実質的な D <sub>h</sub> の

40

50

拡大が誘導される。 )。

【 0 3 7 4 】

8 . 2 : J 6 9 5 流体力学直径

図 7 及び 8 は、J 6 9 5 の流体力学直径が、1 1 4 . 5 2 m g / m L 濃度に到達するまで、タンパク質濃度とは比較的独立であったことを示す。1 1 4 . 5 2 m g / m L から 1 3 3 . 2 5 m g / m L に J 6 9 5 濃度が上昇することによって、 $D_h$  の急速な拡大が誘導された。2 1 7 . 5 3 m g / m L の濃度での流体力学直径は、1 1 4 . 5 2 m g / m L での流体力学直径よりも大きかった。この所見は、実際にタンパク質濃度が上昇するにつれて粘度が上昇した場合、同じ S O P ( 1 . 9 m P a s の同じ粘度を仮定 ) を用いて両方のタンパク質溶液を測定したので、驚くことではなかった。従って、1 1 4 . 5 2 m g / m L から 1 3 3 . 2 5 m g / m L への大幅な上昇は、アーチファクトと説明され得る。

10

【 0 3 7 5 】

8 . 3 : ヒト血清アルブミン流体力学直径

9 . 8 8 m g / m L から 1 1 2 . 7 4 m g / m L に濃度が上昇した場合、W F I 中の H S A の流体力学直径が縮小することが分かった。しかし、1 1 2 . 7 4 m g / m L から 1 7 7 . 6 9 m g / m L までは、流体力学直径が拡大することが分かった。

【 0 3 7 6 】

H S A は、基本的な理論的原理と一致してタンパク質濃度が上昇するにつれて、流体力学直径 ( ピーク単量体 ) が拡大するという全般的な傾向を示した。9 . 8 8 m g / m L から 2 2 . 8 9 m g / m L での  $D_h$  の縮小は、測定 S O P の変更 ( 1 . 1 m P a s の仮定粘度から 1 . 9 m P a s の仮定粘度に変更 ) によるものである。

20

【 0 3 7 7 】

上記を示す数値データは付録 A で示す。

【 0 3 7 8 】

( 実施例 9 )

J 6 9 5 : 流体力学直径の賦形剤の影響

純水中で高濃度でタンパク質が溶解され得るという驚くべき結果が分かったので、流体力学直径における、非経口製剤で通常使用されるイオン化及び非イオン化賦形剤の影響を評価した。モデルタンパク質として J 6 9 5 を使用した。

【 0 3 7 9 】

表 1 5 は、溶液浸透圧が塩化ナトリウム濃度に対して正比例することを示す。タンパク質溶液における浸透圧は、N a C l 濃度とともに上昇する ( 殆ど線形相関 ) 。興味深いことに、J 6 9 5 タンパク質の流体力学直径は、塩濃度上昇とともに拡大した。N a C l は、イオン性賦形剤であり、正荷電ナトリウムイオン及び、タンパク質表面に吸着し得る負荷電塩素イオンに解離する。塩が存在しない場合、J 6 9 5 の流体力学直径は、J 6 9 5 に対して通常予想されるものよりも劇的に小さかった ( 通常、1 0 n m 前後の値が測定される。 ) 。

30

【 0 3 8 0 】

表 1 5 で示されるように、浸透圧は、タンパク質溶液中のマニトール濃度の上昇とともに直線的に上昇した。一方、流体力学直径は、マニトール濃度への依存は示さなかった。マニトールは、非イオン性の糖アルコール / ポリオールである。マニトール又はポリオールは、非経口製剤開発中及び最終的処方中に安定化剤として使用される。マニトールは、選択的排除により、タンパク質を安定化する。その他の浸透圧調節物質として、マニトールは選択的にタンパク質表面から排除され、タンパク質の水和殻 ( h y d r a t e s h e l l ) の外側にある。従って、表面がより大きい非折り畳み状態は熱力学的にあまり好ましくなくなるので、タンパク質の折り畳み状態が安定化される ( F o s t e r , T . M . , T h e r m a l i n s t a b i l i t y o f l o w m o l e c u l a r w e i g h t u r o k i n a s e d u r i n g h e a t t r e a t m e n t . I I I . E f f e c t o f s a l t s , s u g a r s a n d T w e e n 8 0 , 1 3 4 I n t e r n a t i o n a l J o u r n a l o f P h a r m a c e u t i c s

40

50

193 (1996); Singh, S. 及び Singh, J., Effects of polyols on the conformational stability and biological activity of a model protein lysozyme, 4 AAPS PharmSciTech, Article 42 (2003)。しかし、浸透圧は、タンパク質のD<sub>h</sub>に影響を与えることなく、必要に応じて基本的に調整され得ることは興味深く、これは、本明細書中に記載のタンパク質の所見の重要な特徴である。これらの所見は、高濃度タンパク質製剤において有用であり得、マニトールでの浸透圧調整にはタンパク質D<sub>h</sub>の拡大が反映されないので(平均粘度は一定のままであると予想される。)、粘度に関連する製造及び投与の問題が存在し得る。

10

【0381】

【表19】

表15: J695 のオスモル浸透圧濃度及びZ-平均に対する賦形剤の影響

NaCl 濃度 [mg/mL]	オスモル浸透圧濃度 [mosmol/kg]	z-平均 [nm]
0	16	4,19
2	92	12,2
4	158	16,2
6	230	17

20

マニトール濃度 [mg/mL]	オスモル浸透圧濃度 [mosmol/kg]	z-平均 [nm]
0	16	4,19
20	148	5,49
40	276	3,22
60	432	3,54

【0382】

(実施例10)

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)での高タンパク質製剤の分析

SEC分析の場合、注入前にアダリムマブ、J695及びHSAの試料を2mg/mLに希釈した。アダリムマブに対する注入体積は20μLであった。J695及びHSAの場合、10μLの注入体積を使用した。

【0383】

10.1: アダリムマブのSEC分析

9.35mg/mLから206.63mg/mLに濃縮される一方で、アダリムマブ単量体の量は、99.4%から98.8%に僅かに減少する傾向がある。この単量体の減少には、それぞれ、23.27mg/mLから206.62mg/mLへの濃縮の一方で0.4%から1.1%のアダリムマブ溶液の凝集体量の増加が付随する。

40

【0384】

断片の量は、タンパク質濃度と独立して、0.1%で一定のままであった(付録Bの表参照)。従って、アダリムマブはWFI中で安定であった。

【0385】

全体的に、タンパク質濃度の上昇を伴うタンパク質凝集の増加は、ごく僅かとみなされる。何れかのタンパク質が緩衝系中で処方された場合及びさらに界面活性剤が添加される場合、単量体減少の同様の傾向が予想される。アダリムマブタンパク質は、純水中で処方される場合、驚くべきことに安定的であると思われる。

【0386】

50

## 10.2: J695のSEC分析

J695単量体の量は、9.99 mg/mLから217.53 mg/mLのタンパク質濃度の上昇に伴い、99.4%から98.6%に僅かに減少した。単量体の減少には、タンパク質濃度が9.99 mg/mLから217.53 mg/mLに上昇する一方で、約0.4%から約1.2%の凝集の増加が付随した。タンパク質濃度と独立して、断片の量は、タンパク質濃度が9.99 mg/mLから217.53 mg/mLに上昇する一方で、0.17%から0.23%と殆ど一定であった。

## 【0387】

全体的に、タンパク質濃度上昇に伴うタンパク質凝集の増加は、ごく僅かであると見なされた。タンパク質が緩衝系で処方される場合及びさらなる界面活性剤が添加される場合、単量体減少の同様の傾向が予想される。従って、J695タンパク質は、純水中で処方される場合、驚くべきことに安定的であると思われる。

10

## 【0388】

## 10.3: HSAのSEC分析

単量体HSAの量は、9.88 mg/mLから112.1 mg/mLへの濃縮と同時に、95.9%から92.75%に減少した。177.69 mg/mLの試料の場合、最大で94.5%単量体が増加することが分かった。単量体量の減少には、9.88 mg/mLから112.74 mg/mLへの濃縮の一方で、4.1%から7.25%のタンパク質凝集体の増加が付随する。従って、HSAタンパク質もまた、純水中で処方される場合、安定であると思われる。

20

## 【0389】

上述のSEC実験を示す数値データは付録Bで与える。

## 【0390】

## (実施例11)

## 高タンパク質製剤の分析 - イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

IEC分析の場合、注入前に、アダリムマブ、J695及びHSAの試料を1 mg/mLに希釈した。全てのタンパク質に対する注人体積は100 µLであった。

## 【0391】

## 11.1: アダリムマブのIEC分析

図9で示されるように、アダリムマブはWFI中で安定であった。図9は、WFI中のアダリムマブ濃度上昇に伴い、リジン変異体の集合体(リジン0、1及び2)が減少することを示すように解釈され得る僅かな傾向を示す。しかし、全体的に、リジン変異体の%の変動は0.25%未満であった。

30

## 【0392】

## 11.2: J695のIEC分析

図10は、J695濃度の上昇とともに、J695ピーク1から7の合計が僅かに低下することを示す。ピーク1-7の低下とともに、酸性及び塩基性ピークの合計は僅かに上昇し、酸性ピークの上昇は僅かにより顕著である(図11及び12参照)。それぞれ、酸性ピークの合計はおよそ10.2%から10.6%に僅かに上昇し、塩基性ピークの合計は0.52%から0.59%に上昇する。

40

## 【0393】

全体的に、純水中のJ695製剤の主要な不安定効果又は不溶性効果はIECにより観察されなかったと言える。

## 【0394】

上記のIEC実験を示す数値データは付録Cで提供される。

## 【0395】

## 実施例2-11の所見のまとめ

最初、抗体などのタンパク質をWFIに移すことによって、純水中のその溶解限度を超えるタンパク質を濃縮することによるタンパク質沈殿が誘導されるようであると考えられた。上記研究から、抗体を含むタンパク質は、何ら沈殿現象及び溶解制限を起こすことな

50

くより低濃度で純粋なWFIに移され得るだけでなく、驚くべきことに、アダリムマブ（ならびにその他の2種類の試験タンパク質）が、UF/DF及び遠心技術（例えば、TFF装置、Vivaspin装置）を用いて200mg/mLを超える超高濃度まで、純水中で濃縮され得ることが示される。さらに、タンパク質がWFI中で処方された場合、予想外にアダリムマブ乳白光が実質的に低下することが分かった。アダリムマブ緩衝液が純粋な塩不含有水（即ちWFI）により完全に交換されたことを確認するために、浸透圧を監視した。さらに、分析のための試料調製中に凍結融解処理を行い、実質的には、SEC及びIEC分析により不安定現象は観察されなかった。

【0396】

WFI中の高濃度での、例えばアダリムマブなどのタンパク質を処方する方法から、粘性現象（高タンパク質濃度で直接的な製剤開発を妨げることが多い。）を減弱させる可能性が明らかになった。

【0397】

最後に、アダリムマブの流体力学直径（光子相関分光法、PCSを介して測定）は、市販緩衝液中よりもWFI中で顕著に小さいことが分かった（低粘性傾性の指標）。

【0398】

全体的に、例えば、

- 高濃縮タンパク質製剤の乳白光を低下させることにより、
- 高濃縮タンパク質製剤の粘度を低下させることにより、
- 粘度及び非乳白光性などの特性を変化させることなくマニトールなどの非イオン性賦形剤を添加することによってタンパク質-WFI溶液で所望されるように浸透圧を調整することができることにより（J695に対して、マニトールが添加された場合、流体力学直径及び乳白光性は変化しなかったが、NaClを添加した場合、劇的に上昇したことが示された。）

- タンパク質が、実質的な安定性への影響なく、超高濃度になるようにWFI中でタンパク質を濃縮するためのDF/UFなどの操作及び凍結及び融解に共され得ることが示されたので、製剤原料処方及び処理における新しいパラダイムを提供することにより、

抗体及び球状モデルタンパク質HSAが超高濃度で純水中で可溶性であるという所見が、基本的なタンパク質計画への新しい識見を提供し、タンパク質薬物処方及び製造における新しいアプローチを潜在的に与える可能性があるというように結論付けられた。DF/UF中に、タンパク質製剤の組成物が、特に高濃度への処理中に、必ず変化することが周知であるという背景を仮定すると（Stoner, M.ら、Protein-solute interactions affect the outcome of ultrafiltration/diafiltration operations、93 J. Pharm. Sci. 2332 (2004)）、これらの新しい所見は、純水中でのタンパク質のDF/UFにより製剤原料濃度を調整し、続いて高DS濃度で賦形剤を添加することによって、（これが、プロセス単位の操作中のDS製剤の変化のリスクを回避することにより）有利に適用され得る。あるいは、製剤最終製品化（fill finishing）中に、製剤原料に賦形剤が添加され得る。

【0399】

（実施例12）

水溶液製剤中のアダリムマブの調製

次の実施例は、DF/UF手順の拡大を示すが、この結果として水中のアダリムマブの大規模製造が可能となる。

【0400】

12.1：プロセスパラメータの評価

その他の賦形剤、例えば、マニトール及び塩化ナトリウムを含有するリン酸/クエン酸緩衝系中で処方されるバルクアダリムマブ薬物溶液の透析に対する適切なパラメータを定めるために、実験室規模で透析プロセス評価実験を行った（図13及び14）。

【0401】

10

20

30

40

50

タンパク質溶液における伝導性分析に適切な何らかの市販の伝導度メーター、例えば、広いpH範囲に対して拡大能力がある伝導度メーター Model Sevenmulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) により、伝導性測定を行い得る。製造者の説明書に従い、この装置を操作する(例えば、伝導度センサがMettler Toledo装置に変更される場合、各センサは異なるセル定数を有するので、較正を再び行わなければならない; Operating Instructions of Model SevenMulti伝導度メーターを参照)。説明書に従う場合、試料溶液に測定プローブを直接浸すことにより伝導度測定を行い得る。

【0402】

10

図13は、74 mg/mLでアダリムマブを含有する製剤の浸透圧及び伝導度に関する成分の減少に関して、透析手順の効率を示す。100の係数による抗体溶液中の溶質の換算後、浸透圧及び伝導度測定は、市販製剤由来のこれらのパラメータの元の測定よりもはるかに低いレベルで非常によく安定した。

【0403】

図14は、透析されたアダリムマブバルク溶液中のpHの安定性を示す。最初のpH読み取りが多岐にわたるアダリムマブ溶液に対して、脱イオン水に対する透析前後(1:1, 000, 000)のpHレベルを示す。pHレベルは、透析前後で保持液中でほぼ同じままであった。

【0404】

20

12.2: バルク薬物水溶液中の高濃縮アダリムマブの調製

第一段階で、処方されたバルク薬物溶液(その他の賦形剤、例えば、マニトール及び塩化ナトリウムを含有するリン酸/クエン酸緩衝系)を限外ろ過/透析ろ過により、およそ100 mg/mL(12 Lスケール、Millipore Pellicon 2 Mini Bio-A MWCO10kカラム)の濃度まで濃縮(up-concentrated)した。第二段階において、濃縮(up-concentrated)溶液を脱イオン水に対して透析した(SpectraPor7 MWCO10k、希釈係数 1:100, 000)。第三段階として、Millipore Pellicon 2 Mini Bio-A MWCO10kカラムを用いて、およそ250 mg/mLの濃度まで、透析済み溶液を限外ろ過/透析ろ過により濃縮(up-concentrated)した。

30

【0405】

表16aは、本手順の段階3後の水中の高濃縮アダリムマブ(DF/UF処理済)バルク薬物溶液の分析の結果を示す。

【0406】

【表20】

表16a: DF/UFバルク処理済アダリムマブに対する浸透圧及び伝導度データ

オスモル浸透圧濃度 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
62	0.95	5.28	1.0764	277.8

40

【0407】

12.3: 製造条件を想定する凍結/融解(F/T)手順

-50 以下、通常は-70 から-80 の温度で、凍結しようとする液体47 kgの製造規模処理量で、超低温冷凍庫(Revco Ultima II, 20 cu. ft.)を用いて凍結を行った。1.6 kgの充填重量(例えば、Nalgene 2 L PETG square media)の個々のボトルに液体を入れた。48時間後、凍結を完了した。物質が完全に融解するまで、20 から40 の間の温度、通常は30 で、24 kgの製造規模処理量で循環水浴(例えば、Lindbergh/Blue)中で融

50

解を行った。

【0408】

12.4：凍結及び融解中のボトルマッピング ( bottle - mapping )

ボトル容積中の個別の水平な溶液層を単離し、分析した。250mg/mL及び200mg/mLのタンパク質濃度では、図15から19で見られるように、アダリムマブ水溶液中でごく僅かな勾配形成しか検出されなかった。しかし、250mg/mL及び200mg/mLで処方されたアダリムマブ溶液(その他の賦形剤、例えば、マニトール及び塩化ナトリウムを含有するリン酸/クエン酸緩衝系入りの溶液)の凍結及び融解により、ボトルの底部に沈殿が形成された。

【0409】

12.5：アダリムマブの市販及び低イオン性製剤における勾配形成

アダリムマブの市販及び低イオン性(水)製剤における凍結融解手順による勾配形成を比較した。表16bは、f/t段階後の様々な濃度の市販アダリムマブ溶液の目視の結果を示す。沈殿の形成から、f/t手順により溶液において不安定性が生じたことが示される。100mg/mL以上で、顕著な沈殿形成が観察された。表17は、凍結融解実験前の2種類の50mg/mL溶液及び1種類の100mg/mL低イオン性製剤の分析データを示す。

【0410】

【表21】

表16b：凍結/融解後に市販のアダリムマブ溶液中に観察された沈殿

	250mg/ml	220mg/ml	200mg/ml	150mg/ml	120mg/ml	100mg/ml	60mg/ml
超低温凍結装置中での商業的凍結プロセス： -70°C/ 23°C	沈殿	沈殿	沈殿	沈殿	一部沈殿	透明	透明

【0411】

【表22】

表17：凍結融解前の溶解分析データ

	製剤	pH	密度 (g/cm <sup>3</sup> )	オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)	タンパク質濃度 (mg/mL)
E167 130 01 CL 50mg/mL、水中	低イオン性	5.18	1.0121	5	49.3
E167 140 01 CL 50mg/mL、緩衝液中	市販の製剤	5.20	1.0224	280	48.7
100mg/mL、水中	低イオン性	5.32	1.0262	12	99.8

【0412】

各製剤約1600mL(50mg/mL溶液)又は800mL(100mg/mL溶液)をPETGボトルに入れ、従来からの凍結(-80)融解(23、水浴)手順に供した。次に、PETGボトルの最上部、中央及び底部から試料を採取し、pH、密度、浸透圧及びタンパク質濃度について分析した。分析結果を表18で示す。

【0413】

表18：凍結/融解溶液からのボトル-マップ ( bottle - mapped ) 層の分析

【0414】

【表 2 3】

試料	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	オスモル浸透 圧濃度 mOsmol/kg	タンパク質含 量 (容量的) mg/mL
50mg/mL、水中				
上	5.20	1.0119	6	48.72
中央	5.19	1.0120	8	49.35
下	5.17	1.0120	6	49.76
市販の製剤				
上	5.16	1.0165	236	37.9
中央	5.13	1.0221	306	45.58
下	5.12	1.0257	368	55.48
100mg/mL、水中				
上	5.29	1.0259	13	98.7
中央	5.3	1.0262	16	99.9
下	5.28	1.0262	14	101.2

## 【0415】

アダリムマブの市販製剤から、密度（タンパク質及び賦形剤の不均一性／勾配を示唆）、浸透圧（賦形剤勾配を示唆）及びタンパク質含量に関して、凍結／融解において顕著な勾配が明らかになった。一方、凍結／融解において、50 mg/mL 低イオン性アダリムマブ製剤では勾配は見られなかった。

## 【0416】

より高いタンパク質濃度では、時に勾配形成が悪化すると予想されることがあり得る。しかし、pH、密度、浸透圧及びタンパク質濃度に関して、凍結／融解時に、100 mg/mL 低イオン性アダリムマブ製剤において勾配は見られなかった。

## 【0417】

（実施例 13）

DF / UF 後の J 6 9 5 の安定性

次の実施例は、本発明の方法に従う DF / UF 処理後の J 6 9 5 の安定性におけるデータを与える。

## 【0418】

pH 調整後又は透析る過後の何れかに、通常の DS 緩衝液中の J 6 9 5 からのタンパク質試料を分析した。0.1 M リン酸、タンパク質濃度 112 mg/mL で pH を pH 4.4 に調整した。WFI 中の濃縮試料の場合、30 kDa RC 膜を備えた TFF を用いて、周囲温度で、およそ 1.5 日間にわたり、タンパク質試料を水に対して透析る過処理（DF / UF）した。DF / UF 後のタンパク質濃度を調べたところ、およそ 192 mg/mL であった。pH 4.7。

## 【0419】

13.1 : サイズ排除分析（SEC）実験手順

J 6 9 5 の純度評価のために、サイズ排除法を開発した。サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、分子量に従い巨大分子を分離する。レジンは、ふるい剤として働き、より小さい分子はレジンの孔に保持され、より大きな分子はカラムを通過できる。保持時間及び分解能は、選択されるレジンの孔サイズの関数である。

## 【0420】

定められた濃度に基づき、各試料を純水（Milli-Q）で 2.5 mg/mL に希釈した。各試料 50 µg をカラムに注入した（各 2 回ずつ）。Tosoh Biosci

10

20

30

40

50

n c e G 3 0 0 0 s w x l、7.8 mm x 30 cm、5 μm (カタログ番号 08541) SECカラムを分離のために使用する。緩衝液 A の場合、211 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / 92 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH 7.0 を使用した。280 nm 及び 214 nm で検出を行った。室温にて 0.3 mL / 分の流速でカラムを維持した。

【0421】

このクロマトグラフィーは、50 分間の継続時間にわたり、100% 移動相 A 溶媒での定組成勾配を使用した。

【0422】

13.2 : SEC データ

表 19 は、サイズ排除クロマトグラフィー実験からのデータを記す。

10

【0423】

【表 24】

表 19 : J695 参照標準、DS 及び DF/UF (水中) 後に対する SEC 分析データ

ABT-874					
	搭載量	HM	単量体	断片	
BF 参照標準	50 μ	0.49	97.9	1.28	0.26
BF 参照標準 dup	50 μ	0.41	98.0	1.29	0.27
BF 参照標準 avg		0.45	98.0	1.29	0.27
標準偏差		0.06	0.05	0.01	0.01
%RS		12.5	0.05	0.55	2.67
緩衝液 pH4.4 中の DS	50 μ	0.42	98.3	1.04	0.16
緩衝液 pH4.4 中の DS dup	50 μ	0.40	98.4	1.01	0.13
緩衝液 pH4.4 中の DS avg		0.41	98.4	1.03	0.15
標準偏差		0.01	0.06	0.02	0.02
%RS		3.45	0.06	2.07	14.6
水 pH4.7 中の DS UF/DF	50 μ	0.69	98.1	1.04	0.14
水 pH4.7 中の DS UF/DF dup	50 μ	0.69	98.0	1.07	0.16
水 pH4.7 中の DS UF/DF avg		0.69	98.1	1.06	0.15
標準偏差		0.00	0.04	0.02	0.01
%RS		0.00	0.04	2.01	9.43

20

30

【0424】

13.3 : SEC 分析の結論

表 19 におけるデータは、J695 (DS PFS、pH = 4.4) の市販製剤が J695 参照基準と同程度の断片及び凝集体レベルを有することを示す。市販製剤 J695 対照と、水中 (H<sub>2</sub>O 中 DS、pH = 4.7、192 mg / mL) で DF / UF を行った J695 と、の間で、凝集体量の差があることが示され：0.4% から 0.7% への凝集の増加が見られた。これは有意な増加ではなく、UF / DF 中、室温で時間を費やしたことによるものであり得る。断片については変化はない。

40

【0425】

13.4 : IEC (WCX - 10) 実験手順

Dionex WCX - 10 カラムを用いて、J695 の不均一性の評価のために、陽イオン交換法を開発した。一般に、陽イオン交換クロマトグラフィーは、見かけの pI 及びレジンとの表面電荷相互作用に従い、タンパク質アイソフォームを分離する。関心のあるタンパク質を特異的な低塩出発条件下でカラムに結合させ、勾配を通じて塩濃度を上昇させることによりカラムから溶出させる。見かけの pI が低いタンパク質ほど、陽イオン交換カラムへの結合は弱く、最初に溶出され、見かけの pI が高いタンパク質ほど、強く結合し、最後に溶出される。

50

## 【0426】

ロットリリースアッセイとして、クオリティーコントロールにおいて、WCX-10を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーを使用した。既知のJ695アイソフォームの分離を改善するために、アッセイ条件を変更した。

## 【0427】

試料を純水(Milli-Q)で1.0 mg/mLに希釈した。比較として参照基準を3回測定にかけ、純水(Milli-Q)中で1 mg/mLに希釈した。

## 【0428】

分離のために、対応するガードカラム(p/n054994)とともに、Dionex Propac WCX-10カラム(p/n054993)を使用した。この手順で使用される緩衝液には、緩衝液A(10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、pH = 6.0)及び緩衝液B(10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、500 mM  $\text{NaCl}$ 、pH = 6.0)が含まれた。カラム温度を35 に維持し、カラム流速は1 mL/分であった。注入体積は100  $\mu\text{g}$  処分量に対して100  $\mu\text{L}$ であり、280 nmで検出を行った。一連のクロマトグラフィー分離にわたる緩衝液勾配は表20で与える。

## 【0429】

## 【表25】

表20：J695のIEC分析において使用された緩衝液勾配

時間(分)	% MPA	% MPB
0	75	25
3	60	40
33	40	60
36	0	100
41	0	100
43	75	25
48	75	25

## 【0430】

## 13.5：IECデータ

表21は、市販緩衝液(DS pH = 4.4)中のJ695とJ695参照基準を比較する実験からの結果ならびにDF/UF(DF/UF  $\text{H}_2\text{O}$ 、pH = 4.7)後のJ695と市販緩衝液製剤の比較を与える。

## 【0431】

【表 2 6】

表 2 1 : J695 参照標準、市販の製剤 (DS) 及び DF/UF (水中) 後の IEC データ

	0 glu (1)	0 glu (2+2a)	1 glu (3)	1 glu (4)	1 glu (5)+(5a)	2 glu (6)	2 glu (7)	酸性	塩基性
参照標準	43.77	7.55	8.00	21.87	4.28	4.82	3.75	4.05	1.92
参照標準 dup	43.49	7.49	7.98	21.70	4.26	4.81	3.75	4.61	1.90
参照標準 dup	43.44	7.49	8.00	21.65	4.24	4.81	3.74	4.75	1.89
参照標準 avg	43.57	7.51	7.99	21.74	4.26	4.81	3.75	4.47	1.90
標準偏差	0.20	0.04	0.01	0.12	0.01	0.01	0.00	0.40	0.01
%RSD	0.45	0.56	0.18	0.55	0.33	0.15	0.00	8.86	0.74
	0 glu (1)	0 glu (2+2a)	1 glu (3)	1 glu (4)	1 glu (5)+(5a)	2 glu (6)	2 glu (7)	酸性	塩基性
ABT-874 DS pH=4.4	35.65	14.74	7.26	18.06	6.76	5.32	3.98	5.55	2.70
ABT-874 DS pH=4.4 Dup	35.82	14.73	7.29	18.14	6.82	5.39	4.06	4.79	2.95
ABT-874 DS pH=4.4 avg	35.74	14.74	7.28	18.10	6.79	5.36	4.02	5.17	2.83
標準偏差	0.12	0.01	0.02	0.06	0.04	0.05	0.06	0.54	0.18
%RSD	0.34	0.05	0.29	0.31	0.62	0.92	1.41	10.39	6.26
	0 glu (1)	0 glu (2+2a)	1 glu (3)	1 glu (4)	1 glu (5)+(5a)	2 glu (6)	2 glu (7)	酸性	塩基性
ABT-874 DF/UF H2O pH=4.7	36.57	14.51	7.26	18.09	6.57	5.22	3.91	5.28	2.61
ABT-874 DF/UF H2O pH=4.7 Dup	36.60	14.43	7.25	18.02	6.66	5.18	4.00	4.31	2.56
ABT-874 DF/UF H2O pH=4.7	36.59	14.47	7.26	18.06	6.62	5.20	3.96	5.30	2.591
標準偏差	0.02	0.06	0.01	0.05	0.06	0.03	0.06	0.02	0.04
%RSD	0.06	0.39	0.10	0.27	0.96	0.54	1.61	0.40	1.37

【 0 4 3 2 】

1 3 . 6 : I E C 分析の結論

J 6 9 5 参照基準と市販製剤 ( D S 、 p H 4 . 4 ) との間である程度の差が示された。これらの差は、D S 作業稼動試料の最初の稼動で顕著であり、3 0 0 0 L と 6 0 0 0 L キャンペーンとの間の製造プロセスにおける差が原因である。D S 、 p H 4 . 4 対照と H<sub>2</sub>O p H = 4 . 7 中の J 6 9 5 、 1 9 2 m g / m L 試料との間に顕著な差はなかった。

10

20

30

40

50

## 【0433】

(実施例14)

DF/UF及び2-8での長期保存後のアダリムマブの安定性

次の実施例は、2-8での22.5ヶ月間の保存後の、本発明の方法に従う、水性製剤中のアダリムマブの安定性を示すデータを与える。

## 【0434】

SEC及びWCX-10分析用のアダリムマブ試料を水に対して透析ろ過処理し、約177mg/mLに濃縮した。試料を保存し、安定性について様々な時点で分析した。

## 【0435】

水中で濃縮溶液を生成させるために、出発物質として、市販Humira緩衝液中の標準的アダリムマブ溶液(DS、およそpH5.2)を使用した。30kDa RC膜を備えるTFFを用いて、周囲温度で、およそ1.5日間にわたり、タンパク質溶液試料を水に対して透析ろ過処理(DF/UF)した。

## 【0436】

DF/UF後のタンパク質濃度を測定したところ、およそ177mg/mL、pH5.2であった。分析前に22.5ヶ月間、2-8で試料を保存した。

## 【0437】

14.1: SEC実験手順

抗体断片及び凝集体の存在について調べるために、既にサイズ排除法を開発した。サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)は、分子量に従い巨大分子を分離する。レジンは、ふるい剤として働き、より小さい分子はレジンの孔に保持され、より大きな分子はカラムを通過できる。保持時間及び分解能は、選択されるレジンの孔サイズの関数である。

## 【0438】

各試料を純水(Milli-Q)で1.0mg/mLに希釈し、各試料50µgをカラムに注入した。SE-HPLCの場合、Sephadex 200カラム(Pharmaciaカタログ番号175175-01、S/N0504057)又はTSKゲルG3000SW(カタログ番号08541; 22.5ヶ月試料の分析用)を使用した。カラムの移動相は、20mMリン酸ナトリウム及び150mM塩化ナトリウム、pH7.5を含んだ。280nm及び214nmで検出を行った。カラムを周囲温度で維持し、流速は0.5mL/分(Sephadexカラム)又は0.3mL/分(TSKカラム)であった。

## 【0439】

14.2: SECデータ

図20及び表22は、-80で保存された同じ低イオン性アダリムマブ溶液と比較した、2-8で8.5ヶ月間液体として保存された低イオン性アダリムマブ溶液の分析の結果を含有する。表23は、アダリムマブの参照基準試料と比較した、2-8で22.5ヶ月間保存された低イオン性アダリムマブ溶液に対する分析データを含有する。

## 【0440】

## 【表27】

表22: 凍結保存から得られたアダリムマブと長期冷凍保存から得られたアダリムマブを比較するSEC分析のデータ

試料	搭載量	%HMW	%単量体	%LMW
水に対するDF/UF、177mg/mL、-80°Cで4.5ヶ月	50µg	0.1	99.6	0.3
水に対するDF/UF、177mg/mL、2から8°Cで9ヶ月	50µg	0.2	99.5	0.3

## 【0441】

10

20

30

40

## 【表 2 8】

表 2 3 : アダリムマブ参照標準と長期冷蔵保存から得られたアダリムマブを比較する SEC 分析のデータ

試料	搭載量	%HMW	%単量体	%LMW
参照標準、アダリムマブ	50 $\mu$ g	0.31	98.85	0.84
水に対する DF/UF、177mg/mL、2 から 8°C で 22.5 ヶ月	50 $\mu$ g	1.42	97.59	0.98

## 【 0 4 4 2】

表 2 2 で見られ得るように、SEC 分析から、2 - 8 で 9 ヶ月又は - 8 0 で 4 . 5 ヶ月後でさえも、%凝集体 (%HMW) 及び%断片 (%LMW) が長期にわたり僅かだったので、水中のアダリムマブが安定であったことが明らかになった。

## 【 0 4 4 3】

## 1 4 . 3 : SEC 分析の結論

2 - 8 での 8 . 5 ヶ月間にわたる保存後、アダリムマブ溶液 (水に対して DF / UF) において、ごく僅かな高分子量 (HMW) 種 (0 . 2 %) 及びごく僅かな断片 (0 . 3 %) が見られた。- 8 0 での 4 . 5 ヶ月間にわたる保存及び続く融解 (水浴、2 3 ) は、アダリムマブ安定性に影響を与えなかった (0 . 1 %凝集体、0 . 3 %断片)。

## 【 0 4 4 4】

2 - 8 で 2 2 . 5 ヶ月間保存された試料の分析からも、アダリムマブ参照基準と同等の断片含量が示される (表 2 3)。しかし、2 2 . 5 ヶ月間の安定試料で検出された凝集体レベル (1 . 6 6 %) は、参照基準中で検出された凝集体レベルよりも幾分高い。

## 【 0 4 4 5】

抗体の自己会合が抗体濃度に高く依存すること、即ち、非共有凝集体及び会合複合体の形成が高タンパク質濃度で最も顕著であることが知られている。この自己会合は可逆的であり、緩衝溶液での希釈の結果、自己会合傾向は低下する (Liu、J. ら、9 4 Journal of Pharmaceutical Sciences 1 9 2 8 (2 0 0 4))。

## 【 0 4 4 6】

従って、アダリムマブ溶液希釈 (1 7 7 mg / mL から 1 mg / mL) と SEC による続く試料分析との間の試料調製の違い及び遅延時間が異なることが、8 . 5 ヶ月及び 9 ヶ月の安定試料の凝集体含量の差に対する理由であると思われる。

## 【 0 4 4 7】

## 1 4 . 4 : IEC 実験手順

陽イオン交換法は、Dionex WCX - 1 0 カラムを用いて抗体電荷不均一性の評価のために開発された。陽イオン交換クロマトグラフィーは、見かけの pI 及びレジンとの表面電荷相互作用に従いタンパク質アイソフォームを分離する。関心のあるタンパク質を特異的な低塩出発条件下でカラムに結合させ、勾配を通じて塩濃度を上昇させることによりカラムから溶出させる。見かけの pI が低いタンパク質ほど、陽イオン交換カラムへの結合は弱く、最初に溶出され、見かけの pI が高いタンパク質ほど強く結合し、最後に溶出される。

## 【 0 4 4 8】

手順前に、ミリ Q 水で試料を 1 . 0 mg / mL に希釈した。分離のために、対応するガードカラム (p / n 0 5 4 9 9 4) とともに、Dionex Propac WCX - 1 0 カラム (p / n 0 5 4 9 9 3) を使用した。2 種類の移動相緩衝液、1 0 mM リン酸ナトリウム、pH 7 . 5 (緩衝液 A) 及び 1 0 mM リン酸ナトリウム、5 0 0 mM 塩化ナトリウム、pH 5 . 5 (緩衝液 B) を調製した。カラムを周囲温度で維持し、流速は 1 . 0 mL / 分であった。注入体積は 1 0 0  $\mu$ g 処理量に対して 1 0 0  $\mu$ L であり、2 8 0 nm で検出を行った。一連のクロマトグラフィー分離にわたる緩衝液勾配は表 2 4 で与える。

10

20

30

40

50

【 0 4 4 9 】

【 表 2 9 】

表 2 4 : アダリムマブの IEC 分析において使用された緩衝液勾配

時間 (分)	%MPA	%MPB
0.05	94	6
20	84	16
22	0	100
26	0	100
28	94	6
34	94	6
35	94	6

10

【 0 4 5 0 】

1 4 . 5 : イオン交換データ

表 2 5 は、保存前の、アダリムマブ参照基準、市販製剤 ( 1 5 0 m g / m L ) 及び D F / U F 後の低イオン性溶液に対するイオン交換クロマトグラフィーデータを示す。表 2 6 は、2 - 8 で 2 2 . 5 ヶ月間保存した後の低イオン性溶液と比較した参照基準に対するデータを示す。

20

【 0 4 5 1 】

【 表 3 0 】

表 2 5 : アダリムマブ参照標準、DS/市販の製剤及び DF/UF (水中) 後のアダリムマブの IEC 分析データ

試料名	%酸性領域 1	%酸性領域 2	% 0 Lys	% 1 Lys	% 2 Lys
アダリムマブ参照標準	2.69	11.66	60.77	19.42	5.40
アダリムマブ DS 150mg/L	2.51	11.38	62.05	19.14	4.83
水に対して透析ろ過されたアダリムマブ、177mg/mL	2.26	11.81	61.97	18.51	4.73

30

【 0 4 5 2 】

【 表 3 1 】

表 2 6 : 参照標準を長期冷蔵保存から得られた DF/UF 試料と比較する IEC 分析データ

試料名	%酸性領域 1	%酸性領域 2	% 0 Lys	% 1 Lys	% 2 Lys
アダリムマブ参照標準	2.1	10.9	63.8	18.4	4.6
水に対して透析ろ過/限外ろ過されたアダリムマブ、177mg/mL、2 から 8°C で 22.5 ヶ月	2.7	13.4	62	16.7	4.1

40

【 0 4 5 3 】

1 4 . 6 : イオン交換分析の結論

T 0 試料の場合、データから、参照基準アダリムマブ、市販製剤アダリムマブ ( D F / U F により水中でアダリムマブを処方するための D S として使用 ) と、水に対して透析ろ過処理され、1 7 7 m g / m L に濃縮されたアダリムマブとの間の酸性領域 1、2、0 L y s、1 L y s 又は 2 L y s の % の有意差 ( 即ち電荷不均一性 ) は示されない ( 表 2 5 ) 。

【 0 4 5 4 】

また、水中の 1 7 7 m g / m L アダリムマブ試料を 2 2 . 5 ヶ月間保存した後、アダリムマブ参照基準と比較した場合、0 L y s、1 L y s 及び 2 L y s 断片の僅かな差しか見

50

られ得ない。まとめると、DF / UF 処理によりアダリムマブが水中で処方され、177 mg / mL の濃度で 2 - 8 で 22.5 ヶ月間保存される場合、有意な化学的不安定性傾向は観察されない。

#### 【0455】

(実施例15)

低イオン性1D4.7溶液の凍結 / 融解安定性

透析により水中で1D4.7タンパク質(免疫グロブリンG1)抗-IL12 / 抗-IL23を処方し(製造者、Pierce Rockford、ILの操作説明書に従い使用される、slide-a-lyzerカセットを使用)、2mg / mLの濃度、pH6で反復凍結 / 融解(F / T)処理(-80 / 25 水浴)中に安定であることが分かった。通常製の剤(2mg / mL、pH6)とデータを比較し、水中で処方される1D4.7の安定性は、日常的にスクリーニングされる緩衝液系(例えば20mMヒスチジン、20mMグリシン、10mMリン酸、10mMクエン酸)中で処方される1D4.7の安定性を上回り、タンパク質製剤中で一般に使用される様々な賦形剤、例えば10mg / mL マニトール、10mg / mL ソルビトール、10mg / mL スクロース、0.01%ポリソルベート80、20mM NaCl入りの、ユニバーサル緩衝液(10mMリン酸、10mMクエン酸)に基づく1D4.7の安定性さえも上回ることが分かった。

10

#### 【0456】

タンパク質安定性を監視するためにSEC、DLS及び粒子計数を行い、1 - 200 µm測定範囲の粒子計数システム(例えば粒子計数モデルシリンジ、Markus Klotz GmbH、Bad Liebenzell、Germany)を使用することにより粒子計数を行った。実験の詳細は次のとおりである。

20

#### 【0457】

- 水中で処方された1D4.7を上記で列挙される製剤と比較
- 4回の凍結 / 融解サイクル適用
- 30mL PETG容器、約25mL充填、2mg / mL、pH6
- T0、T1(即ち1回のf / t段階後)、T2、T3及びT4で試料採取
- 分析法: 目視、SEC、DLS、肉眼で見えない粒子の測定

図21は、肉眼で見えない粒子 > 1 µmの形成により反映される、反復f / tサイクル(-80 / 25)中の1D4.7の安定性を示す。ユニバーサル緩衝液(10mMクエン酸、10mMリン酸)中で1D4.7を処方し、次いで、次の様々な賦形剤: ソルビトール(10mg / mL)、マニトール(10mg / mL)、スクロース(10mg / mL)、NaCl(100mM)及びポリソルベート80(0.01%)を試験した。賦形剤を全く添加せずに、(透析により)水中で1D4.7をまた処方した。粒子負荷における、物質操作、f / t及び試料採取の潜在的な影響を評価するために、注射用水をまたf / tサイクル及び肉眼では見えない粒子の試験に供した。

30

#### 【0458】

f / tにおける、水中で処方される1D4.7の安定性は、タンパク質製剤で通常使用される賦形剤とともに処方される1D4.7溶液の安定性を上回った。マニトール、スクロース及びソルビトールは、溶解保護剤(lyoprotectant)及び / 又は凍結保護剤(cryoprotectant)として作用することが知られており、ポリソルベート80は、それぞれ、空気-水及び氷-水などの疎水性-親水性界面への曝露時に、タンパク質の物理学的安定性を向上させることが広く知られている非イオン性賦形剤である。従って、水中で処方される1D4.7溶液は、適用されるその他の方法(例えばSEC、目視など)で分析される場合、安定的であると思われる。

40

#### 【0459】

(実施例16)

低イオン性13C5.5抗体溶液の凍結 / 融解安定性

水中で処方される13C5.5抗IL-13タンパク質は、2mg / mL濃度、pH6で、反復凍結 / 融解処理(-80 / 25 水浴)中に安定であることが示された。通常

50

の製剤 (2 mg/mL、pH 6) とデータを比較し、水中で処方された 13C5.5 の安定性が、日常的にスクリーニングされる緩衝液系 (例えば 20 mM ヒスチジン、20 mM グリシン、10 mM リン酸、10 mM クエン酸) 中で処方される 13C5.5 の安定性を上回り、タンパク質製剤において一般に使用される様々な賦形剤 (例えば 10 mg/mL マニトール、10 mg/mL ソルビトール、10 mg/mL スクロース、0.01% ポリソルベート 80、20 mM NaCl、200 mM NaCl) を含むユニバーサル緩衝液 (10 mM リン酸、10 mM クエン酸) に基づく 13C5.5 製剤の安定性さえも上回ることが分かった。

#### 【0460】

1D4.7 に対して実施例 15 で概説したものと同じように、試料調製、実験処理、試料採取及び試料分析を行った。

#### 【0461】

- 水中で処方された 13C5.5 を上記で列挙した製剤と比較
- 4 回の凍結/融解サイクル適用
- 30 mL PETG 容器
- 2 mg/mL、pH 6
- T0、T1、T2、T3 及び T4 で試料採取
- 分析法: 目視、SEC、DLS、肉眼で見えない粒子の測定

図 22 は、肉眼で見えない > 10 µm の形成により反映される、反復 f/t サイクル (-80 / 25) 中の 13C5.5 の安定性を示す。10 mM リン酸緩衝液、10 mM クエン酸緩衝液、20 mM グリシン緩衝液及び 20 mM ヒスチジン緩衝液の何れかの中で 13C5.5 を処方した。賦形剤を全く添加せずに、水中で (透析により) 13C5.5 をまた処方した。粒子負荷での、物質操作、f/t 及び試料採取の潜在的な影響を評価するために、注射用水も f/t サイクル及び肉眼で見えない粒子の試験に供した (ブランク)。

#### 【0462】

f/t における、水中で処方された 13C5.5 の安定性は、タンパク質製剤において一般に使用される緩衝液中で処方された 13C5.5 溶液の安定性を上回った。適用されるその他の分析法 (例えば SEC、目視など) により、水中で処方された 13C5.5 溶液の不安定性は観察されなかった。

#### 【0463】

図 23 は、肉眼で見えない粒子 > 1 µm の形成により反映される、反復 f/t サイクル (-80 / 25) 中の 13C5.5 の安定性を示す。ユニバーサル緩衝液 (10 mM クエン酸、10 mM リン酸) 中で 13C5.5 を処方し、次いで次の様々な賦形剤: ソルビトール (10 mg/mL)、マニトール (10 mg/mL)、スクロース (10 mg/mL)、NaCl (200 mM)、NaCl (20 mM) 及びポリソルベート 80 (0.01%) を試験した。比較のために、賦形剤を全く添加せずに (透析により) 水中で 13C5.5 をまた処方した (純水)。粒子負荷での、物質操作、f/t 及び試料採取の潜在的な影響を評価するために、注射用水も f/t サイクル及び肉眼で見えない断片の試験に供した。

#### 【0464】

水中で処方された 13C5.5 の f/t における安定性は、タンパク質製剤において一般に使用される賦形剤とともに処方された 13C5.5 溶液の安定性を上回った。マニトール、スクロース及びソルビトールは、溶解保護剤 (lyoprotectant) 及び/又は凍結保護剤 (cryoprotectant) として作用することが知られており、ポリソルベート 80 は、それぞれ、空気-水及び氷-水などの疎水性-親水性界面への曝露時に、タンパク質の物理学的安定性を向上させることが広く知られている、非イオン性賦形剤である。

#### 【0465】

適用されるその他の分析法 (例えば SEC、目視など) により、水中で処方された 13

10

20

30

40

50

C 5 . 5 溶液の不安定性は観察されなかった。

【 0 4 6 6 】

上述のように、f / t 手順後の 1 3 C 5 . 5 溶液の D L S 分析を行った。0 . 0 1 % T w e e n - 8 0 入りの 1 3 C 5 . 5 溶液は、1 回だけ f / t 段階を行った後に顕著な高分子量 ( H M W ) 凝集型を含有し、一方で水中の 1 3 C 5 . 5 は、3 回の f / t 段階後でも H M W 凝集型を含有しなかった。

【 0 4 6 7 】

( 実施例 1 7 )

W F I 中のアダリムマブにおける溶液 p H の影響

W F I 中で処方された高度濃縮アダリムマブの物理化学的特性における溶液 p H の影響を調べるために、次の実験を行った。次の濃度を試験した：2 m g / m L 、 5 0 m g / m L 、 1 0 0 m g / m L 、 1 5 0 m g / m L 、 2 0 0 m g / m L 及び 2 5 0 m g / m L 。

【 0 4 6 8 】

材料

- ・アダリムマブ製剤原料 ( D S ) 、市販材料
- ・融解のために使用される 2 5 水浴 ( 循環 )
- ・透析ろ過装置：S a r t o r i u s S a r t o c o n S l i c e 、膜：P E S 5 0 k D 、 1 0 0 0 c m <sup>2</sup>
- ・透析ろ過装置：M i l l i p o r e L a b s c a l e <sup>T M</sup> T F F システム、膜：P L C T K 3 0 k D 、再生セルロース、サイズ：5 0 c m <sup>2</sup>
- ・エッペンドルフ C e n t r i f u g e 5 8 1 0 R
- ・遠心用の A m i c o n U l t r a - 1 5 容器、U l t r a c e l - 3 0 k 、再生セルロース 3 0 , 0 0 0 M W C O
- ・M i l l e x G V 0 . 2 2 μ m 、試料のろ過滅菌用の M i l l i p o r e
- ・試料容器 ( エッペンドルフ試料容器 1 . 5 m L 、 R o t h 凍結バイアル 5 m L 、 P E T G ボトル 1 2 5 m L )

分析：

- ・B i o t h r o d e を用いた p H 測定
- ・密度測定
- ・浸透圧測定
- ・タンパク質濃度測定のための U V / V I S 分光光度計
- ・光子相関分光法 ( P C S )
- ・粘度測定
- ・濁度測定
- ・サイズ排除クロマトグラフィー ( S E C )
- ・フーリエ変換中赤外分光法 ( F T - M - I R )

1 7 . 1 アダリムマブ市販製剤の D F / U F のための調製の概要

アダリムマブ D S 溶液 ( 1 2 0 m g / m L ) を 7 つに分け、それぞれ 0 . 2 5 N N a O H 及び 0 . 2 5 N H C l でそれらを p H 3 、 p H 4 、 p H 5 、 p H 6 、 p H 7 、 p H 8 、 p H 9 に調整した。次に、個々の p H のアダリムマブ緩衝液で試料を 1 0 0 m g / m L に希釈した。この溶液は、僅かに濁度があり、これはろ過滅菌後に消失した ( 0 . 2 2 μ m 、 P V D F 滅菌フィルター)。希釈後、p H 値を再び監視した ( 下記表 2 7 参照)。

【 0 4 6 9 】

1 0 0 m g / m L 溶液の次の試料を各溶液から採取した：

- ・濁度及び続くゼータ電位測定に対して 4 m L
- ・粘度測定に対して 1 m L ( 落下球粘度計を使用 )
- ・浸透圧測定に対して 0 . 1 5 m L
- ・密度測定に対して 2 m L
- ・P C S に対して 0 . 1 5 m L ( 測定に対して試料粘度を考慮 )
- ・F T - M - I R に対して 1 m L

・粘度及び静的光散乱法測定に対して2 mL

ゼータ電位、粘度及び静的光散乱測定のための試料を凍結した(-80)。交換媒体として注射用水を用いて、pH 4、pH 5、pH 6、pH 7及びpH 8溶液の残存体積を連続モードの透析ろ過に共した。最初に試料を-80に凍結した。DF/UF前に、25でJulabo水浴中で試料を融解した。

【0470】

17.2 DF/UF及び濃縮手順

100 mg/mLの濃度で、4、5、6、7及び8のpHレベルの市販製剤中のアダリムマブ溶液をDF/UF処理に供し、遠心におけるUFでの濃縮プロセスにさらに共した。このセクションは、例として、pH 6のアダリムマブ溶液の処理を記す。同様にしてその他の溶液に対する処理を行った。

10

【0471】

アダリムマブ溶液(100 mg/mL、pH 6)を水浴中で25にて溶解し、次に均質化した。次に、次のパラメータを適用することにより、TFE装置M.P. 33.4での、交換媒体として注射用水を用いた透析ろ過に、この溶液を供した。

【0472】

- ・攪拌機：スピード2
- ・ポンプ：スピード1
- ・圧 上流/インレット：2 - 2.4 bar
- ・圧 下流/アウトレット：0.6 - 0.8 bar
- ・膜：再生セルロース、カットオフ30 kD
- ・連続モードDF/UF
- ・DF/UF操作中に約6倍体積の交換を適用

20

6体積交換段階を行った後、OD 280、光度計M.P. 9.7によりアダリムマブの濃度を調べた。透過液及び保持液の浸透圧を調べた。

【0473】

濃度：125.1 mg/mL

浸透圧 透過液：57 mOsmol/kg

浸透圧 保持液：12 mOsmol/kg

DF後の水中のアダリムマブ溶液を注射用水で100 mg/mLに希釈し、ろ過滅菌した。DF/UFプロセス後、100 mg/mL溶液から次の試料を採取した：

30

- ・濁度及び続くゼータ電位測定に対して4 mL
- ・粘度測定に対して1 mL
- ・浸透圧測定に対して0.15 mL
- ・密度測定に対して2 mL
- ・PCSに対して0.15 mL (測定に粘度を考慮)
- ・SECに対して0.15 mL
- ・pH - 測定
- ・FT - M - IRに対して1 mL
- ・粘度及び静的光散乱測定に対して2 mL

40

50 mg/mL及び2 mg/mL溶液を調製するために、100 mg/mLアダリムマブ溶液の一部を注射用水で希釈した。両溶液から次の試料を採取した。

【0474】

- ・濁度及び続くゼータ電位測定に対して4 mL
- ・粘度測定に対して2 mL
- ・浸透圧測定に対して0.15 mL
- ・密度測定に対して2 mL
- ・PCSに対して0.15 mL (粘度を考慮)
- ・pH - 測定

遠心を用いて、水中のアダリムマブ溶液(pH 6、100 mg/mL)を濃縮実験に供

50

した。エッペンドルフCentrifuge (5810R M.P.33.57)を用いて遠心を行った。4000rpmで15分間にわたり、各遠心段階を行った。その後、溶液を均質化し、それにより膜に直接隣接する領域でゲルが形成されるのを回避するために、穏やかに転倒攪拌することによって、遠心濃縮装置での試料溶液の均質化を行った。濃縮中の温度は15であった。約250mg/mLになるように遠心を行った。OD280 (光度計M.P.9.7)を測定することにより、濃度を調べた。次に、250mg/mL、200mg/mL及び150mg/mLの濃度になるようにアダリムマブ溶液を希釈した。

#### 【0475】

濃縮手順後及び希釈の各個々の段階後、次の試料を採取した。250mg/mL及び150mg/mL溶液から採取した試料体積は次のとおりであった。 10

#### 【0476】

- ・粘度 - 測定に対して2mL
- ・PCSに対して0.15mL (粘度を考慮)
- ・浸透圧測定に対して0.15mL
- ・SECに対して0.15mL
- ・pH - 測定

200mg/mL溶液から採取された試料体積は、次のとおりであった。

#### 【0477】

- ・濁度及び続くゼータ電位測定に対して4mL 20
- ・粘度測定に対して1mL
- ・浸透圧測定に対して0.15mL
- ・密度測定に対して2mL
- ・PCSに対して0.15mL (粘度を考慮)
- ・SECに対して0.15mL
- ・pH - 測定
- ・ABCにおいて行われるべき分析実験に対して2mL (粘度及び静的光散乱測定)

より高い濃度の、特にpIに近いpH (アダリムマブの場合約pH8.5)での、水中のアダリムマブ溶液の粘度が劇的に上昇したので (ゲル形成に接近する粘度)、水中でのアダリムマブ溶液の濃縮処理を各pH値においておよそ250mg/mLで停止した。 30

#### 【0478】

##### 17.3 アダリムマブ溶液の目視

DF/UF及び250mg/mLまでの濃縮後、様々なpHの水中のアダリムマブ溶液は、緩衝液中のアダリムマブ溶液 (市販製剤) よりも乳白光が少ないようであった。水中のアダリムマブ溶液は全て、各pH値で透明な溶液に見えた。アダリムマブ溶液で、希釈後に乳白光は見られなかった。全体的に、濃縮及び希釈手順中、水中のアダリムマブ溶液において沈殿は観察されなかった。

#### 【0479】

##### 17.4 粘度

個々の各濃度でのpH5アダリムマブ溶液の密度を考慮して、粘度測定を行った。落下球粘度計を使用した。200mPa<sup>\*</sup>sより高い粘度は毛细管粘度計を用いて測定した。 40

#### 【0480】

図24は、様々な濃度 (50mg/mL濃度間隔で2mg/mLから250mg/mL、) の4から8のpH範囲の水中のアダリムマブ溶液の粘度データの概要を与える。溶液pH、濃度及び粘度との間には明らかな相関がある。粘度は、タンパク質濃度の上昇に伴い上昇し、溶液pHとは独立である。アダリムマブのpIに近い溶液pH値において (即ちpH7及びpH8)、特により高いタンパク質濃度 (即ち200mg/mL、250mg/mL) で、溶液粘度の上昇は最も顕著であった。

#### 【0481】

##### 17.5 濁度

図25で見られるように、濁度データに対して同じ傾向が見出された（即ち、濁度は、濃度の上昇及びpHの上昇に伴い上昇した。）。濁度測定前に全試料をろ過滅菌（0.22 μm）した。

【0482】

#### 17.6 流体力学直径（PCS）

各濃度及び各pH値で、各試料に対する粘度を考慮に入れて、PCS測定を行った。200 mg/mL及び250 mg/mLの溶液を測定したが、Zetasizerナノシリーズ（Malvern Instruments）装置の試験パラメータの範囲外であり、それ故に、これらの測定からのデータは分析しなかった。

【0483】

流体力学直径（Dh）は、アダリムマブが水中で処方された場合（50 mg/mL、pH5でDh約2 nm）、市販製剤中に処方されたアダリムマブ（Dh約7 nm）と比較して、顕著に縮小することが分かった。図26は、PCSデータ（表39でも見出される。）を示す。対応するデータ表は、下記の17.11の部分で示される。

【0484】

図26で示されるように、4、5及び6のpH値の溶液に対して、アダリムマブ単量体のDhは、タンパク質濃度の上昇に伴い一定して縮小した。一方、アダリムマブのpIに近いpH値（即ち、pH7及びpH8）の溶液は、2 mg/mLから50 mg/mLまで濃度が上昇した際にDhの顕著な拡大を示した。しかし、pH7及び8溶液で50 mg/mLを超えて濃度が上昇したとき、Dhは縮小した。150 mg/mLの濃度において、溶液は全て、2 mg/mLの対応するpH溶液よりもDh値が小さかった。図27は、様々な濃度のpH5溶液に対するDhサイズ分布を示す。図28は、水中で処方された5種類のアダリムマブ溶液（それぞれ、100 mg/mLタンパク質濃度であり、様々なpH値である。）に対するDhサイズ分布を示す。図29は、5種類のアダリムマブ溶液が緩衝液中で処方されたことを除き、図28のデータと同様のデータを示す。

【0485】

#### 17.7 pH測定

水を用いたDF/UF前後に、100 mg/mLで溶液pHの測定を行った（即ち、それぞれ緩衝液中及び水中で処方されたアダリムマブにおいて行った。）。表27は、結果を示す。DF/UF前後で、pH値はpH5、pH6及びpH7では一定のままである。媒体交換なので溶液pHは変化しない。水を用いたDF/UF後に、pH4のpH値は僅かに上昇し、pH8では僅かに低下した。

【0486】

【表32】

表27：水を用いたDF/UF前及び後のpH値

	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
アダリムマブ100mg/mL、 緩衝液中	4.00	4.99	6.00	7.03	8.00
アダリムマブ100mg/mL、 水中	4.29	4.98	5.98	7.02	7.67

【0487】

#### 17.8 浸透圧測定

15 mOsmol/kg以下の値に浸透圧を低下させるために5倍体積交換が十分であるか否かを調べるため、pH5溶液試料のDF/UF中に、各体積交換段階後に溶液浸透圧を測定した（即ち、100 mL透過、200 mL透過後など）。表28は結果を示す。

【0488】

## 【表 3 3】

表 2 8 : 水、pH5 溶液を用いた DF/UF の間のオスモル浸透圧濃度の変化

mL での容量交換工程	保持物質 mOsmol/kg	浸透物質 mOsmol/kg
100	96	166
200	28	115
300	29	89
400	12	67
500	15	49

10

## 【 0 4 8 9 】

pH 4、pH 6、pH 7 及び pH 8 において、DF / UF プロセスの終了時にのみ浸透圧を測定した。表 2 9 は各 pH に対する浸透圧の結果 (mOsmol / kg 単位) を示す。

## 【 0 4 9 0 】

## 【表 3 4】

表 2 9 : 水を用いた DF/UF 前及び後における様々な pH 値でのオスモル浸透圧濃度

	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
アダリムマブ 100mg/mL、 緩衝液中	287	298	297	286	279
アダリムマブ 100mg/mL、 水中	40	13	11	5	5

20

## 【 0 4 9 1 】

凝固点粘度計により浸透圧測定を行った。

## 【 0 4 9 2 】

## 17.9 断片化 (SEC)

SEC データは、濃度範囲全体 (100 - 250 mg / mL) にわたり、pH 4 の溶液でのタンパク質の比較的顕著な断片化を示し、一方で、同じ濃度範囲で、5 から 8 の pH 範囲では断片化が殆ど検出されなかった。結果として、pH 4 溶液の単量体含量はこれに応じて減少した (図 3 0)。凝集体の値は、pH 値の上昇 (pH 4 から pH 8) に伴い上昇し、濃度とは独立していた (図 3 1)。

30

## 【 0 4 9 3 】

## 17.10 結論

DF / UF 処理により水中で処方されたアダリムマブ溶液の粘度及び Dh (流体力学直径) における溶液 pH 及びタンパク質濃度の影響を調べるために、この実験を計画した。このような溶液は低イオン性溶液と呼ばれる。4 - 8 の pH 範囲を評価し、試験したタンパク質濃度は、2 から 250 mg / mL の間の範囲であった。

40

## 【 0 4 9 4 】

粘度に関して (セクション 17.4)、低イオン性アダリムマブ溶液が、イオン (即ち有機緩衝成分又は塩などのイオン性賦形剤) 存在下で処方されたアダリムマブ溶液と同じ特性を有することが分かった。

## 【 0 4 9 5 】

- タンパク質濃度が高いほど溶液粘度が高くなる。この濃度 - 粘度相関は、アダリムマブ pI と近い pH 値 (即ち、pH 7 及び pH 8) の溶液の場合により顕著であった。逆に、一定濃度の溶液の場合、粘度は、溶液の pH 値とアダリムマブ pI との近さに相関した。

50

## 【 0 4 9 6 】

D L S データに関して (セクション 1 7 . 6 )、次の結論が導かれ得る。

## 【 0 4 9 7 】

- 低イオン性アダリムマブ溶液の D L S により測定されたアダリムマブ D h 値は、特に非常に低い溶液 p H において、アダリムマブ市販製剤中で測定された D h 値よりも小さいことが分かった。

## 【 0 4 9 8 】

- 溶液 p H が低いほど、D L S により測定される D h 値が小さくなった。

## 【 0 4 9 9 】

- タンパク質濃度が高いほど、所定の p H の低イオン性アダリムマブ溶液において D h 値が小さくなった。

## 【 0 5 0 0 】

この挙動に対する説明は、タンパク質溶液中のイオン強度 (即ちイオン及びイオン化賦形剤の存在) がタンパク質 - タンパク質相互作用の強さに対して重要であるということである。特により低い溶液 p H において、低イオン性アダリムマブ溶液中での電荷 - 電荷反発作用がより顕著である。D F / U F 処理において交換媒体として水を用いることによってタンパク質が水中で処方される場合、ヘルムホルツ層及びグイ - チャップマン層の両方を構成し得る、存在しているイオン化対イオンの量が、顕著に低下する。その結果として、(タンパク質の表面に存在するアミノ酸残基の電荷による) 分子間電荷 - 電荷相互作用は、イオン化対イオン (例えばイオン化賦形剤) が豊富で、タンパク質単量体間の電荷 - 電荷反発作用 (電荷 - 電荷反発作用の場合、分子運動をもたらず。) 及び不規則なブラウン運動が、D L S により測定されるタンパク質分子の運動性 / 運動に關与する環境におけるものよりも顕著であり得る。D L S 実験において、分子運動性が大きいほど、分子拡散係数が大きくなる (大きな分子拡散係数は、通常、ストークス - アインシュタインの式を使用することにより、流体力学的サイズがより小さい分子に割り当てられる。)。これにより、低イオン性製剤中でタンパク質の流体力学直径が小さくなる理由が説明され得る。

## 【 0 5 0 1 】

抗体分子間の電荷 - 電荷相互作用は、(より低い溶液 p H で) 反発性及び誘引性であり得る (タンパク質の p I に近い、より高い溶液 p H において)。

## 【 0 5 0 2 】

1 7 . 1 1 データ表

## 【 0 5 0 3 】

## 【表 3 5】

表 3 0 :

水に対する DF 前の緩衝液中のアダリムマブ 100mg/mL							
	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
濁り (NTU)	9, 9	15, 4	28, 5	36, 3	45, 0	48, 4	46, 5
粘度 (mPa*s)	2, 5197	2, 7935	3, 2062	3, 1512	3, 5116	3, 5494	3, 5844
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	2, 4366	2, 6991	3, 0969	3, 0444	3, 3893	3, 4261	3, 4589
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	1, 0341	1, 0350	1, 0353	1, 0351	1, 036	1, 0360	1, 0363
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)	293	287	298	297	286	279	285
Z-Ave d (nm) PCS	4, 3	4, 3	6, 0	7, 3	7, 7	8, 0	7, 8
pH		4, 00	4, 99	6, 00	7, 03	8, 00	9, 03

## 【 0 5 0 4 】

【表 3 6】

表 3 1 :

水に対する DF 後、濃縮前、以下の濃度になるように水で希釈されたアダリムマブ			
	pH4 2mg/mL	pH4 50mg/mL	pH4 100.5mg/mL
濁り (NTU)	0,296	1,46	3,30
粘度 (mPa*s)	0,9653	1,4471	2,2411
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	0,9665	1,4298	2,1834
密度 (g/cm <sup>3</sup> )			
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)			40
Z-Ave d (nm) PCS	3,37	2,24	1,81
pH			4,29
濃縮後及び以下の濃度になるように水で希釈されたアダリムマブ			
	pH4 150,5mg/mL	pH4 219,0mg/mL	pH4 251,8mg/mL
濁り (NTU)		3,56	
粘度 (mPa*s)	4,0283	13,304	48,642
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	3,8712	12,614	45,567
密度 (g/cm <sup>3</sup> )			
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)	64	96	141
Z-Ave d (nm) PCS	1,32	0,458	0,162
pH	4,32		4,54
水に対する DF 後、濃縮前、以下の濃度になるように水で希釈されたアダリムマブ			
	pH5 2mg/mL	pH5 50mg/mL	pH5 97,5mg/mL
濁り (NTU)	0,02	1,66	3,54
粘度 (mPa*s)	1,0563	1,6664	2,8661
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	1,0576	1,6465	2,7924
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	0,9988	1,0121	1,0264
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)			13
Z-Ave d (nm) PCS	157	32,4	1,3
pH	4,55	4,83	4,98
濃縮後及び以下の濃度になるように水で希釈されたアダリムマブ			
	pH5 150,7mg/mL	pH5 200,2mg/mL	pH5 253,0mg/mL
濁り (NTU)		7,24	
粘度 (mPa*s)	17,0866	19,539	79,272
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	6,8102	18,525	74,26
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	1,0406	1,0547	1,0675
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)	78	80	96
Z-Ave d (nm) PCS	0,727	0,335	0,255
pH	5,03	5,05	5,08

10

20

30

40

【 0 5 0 5 】

【表 3 7】

表 3 2 :

水に対する DF 後、濃縮前、以下の濃度になるように水で希釈されたアダリムマブ			
	pH6 2mg/mL	pH6 50mg/mL	pH6 100mg/mL
濁り (NTU)	0, 458	2, 24	2, 95
粘度 (mPa*s)	1, 0696	1, 8003	3, 1147
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	1, 0708	1, 7789	3, 0385
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	0, 9989	1, 012	1, 0251
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)	3+11=14; 2=7	27	11
Z-Ave d (nm) PCS	30, 8	2, 78	2, 48
pH	5, 72	5, 95	5, 98

10

【 0 5 0 6 】

【表 3 8】

表 3 3 :

濃縮後及び以下の濃度になるように水で希釈されたアダリムマブ			
	pH6 146. 6mg/mL	pH6 201. 8mg/mL	pH6 248. 5mg/mL
濁り (NTU)		9. 92	
粘度 (mPa*s)	9, 0193	32, 352	126, 06
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	8, 6775	30, 709	118, 07
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	1, 0394	1, 0535	1, 0677
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)	37	58	95
Z-Ave d (nm) PCS	0, 989	0, 355	0, 108
pH	5, 92	6, 05	6, 03

20

30

【 0 5 0 7 】

【表 3 9】

表 3 4 :

水に対する DF 後、濃縮前、以下の濃度になるように水で希釈されたアダリムマブ			
	pH7 2mg/mL	pH7 50mg/mL	pH7 103. 2mg/mL
濁り (NTU)	0, 1	7, 13	14, 9
粘度 (mPa*s)	1, 1252	1, 6898	4, 2257
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	1, 1268	1, 6688	4, 1146
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	0, 9986	1, 0126	1, 027
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)	0	2	5
Z-Ave d (nm) PCS	3, 31	4, 16	2, 89
pH	5, 72	5, 95	5, 98

40

【 0 5 0 8 】

【表 4 0】

表 3 5 :

濃縮後及び以下の濃度になるように水で希釈されたアダリムマブ			
	pH7 143.0mg/mL	pH7 203.4mg/mL	pH7 251.7mg/mL
濁り (NTU)		19.3	
粘度 (mPa*s)	14,024	74,987	343,881
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	13,492	70,928	321,144
密度 (g/cm <sup>3</sup> )		1,0571	1,0708
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)	65	106	160
Z-Ave d (nm) PCS	1,27	0,346	0,0876
pH	6,9	7,01	7,2

10

【 0 5 0 9】

【表 4 1】

表 3 6 :

水に対する DF 後、濃縮前、以下の濃度になるように水で希釈されたアダリムマブ			
	pH8 2mg/mL	pH8 50mg/mL	pH8 96.1mg/mL
濁り (NTU)	0,41	12,10	28,300
粘度 (mPa*s)	1,261	1,8444	4,3486
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	1,2625	1,8224	4,2368
密度 (g/cm <sup>3</sup> )			
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)			5
Z-Ave d (nm) PCS	5,59	5,62	4,28
pH			7,67

20

30

【 0 5 1 0】

【表 4 2】

表 3 7 :

濃縮後及び以下の濃度になるように水で希釈されたアダリムマブ			
	pH8 148,5mg/mL	pH8 200,6mg/mL	pH8 230,7mg/mL
濁り (NTU)		32,5	
粘度 (mPa*s)	20,102	85,5	233,14
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	19,318	81,066	218,04
密度 (g/cm <sup>3</sup> )			
オスモル浸透圧濃度 (mOsmol/kg)			
Z-Ave d (nm) PCS	1,42	0,398	0,168
pH		7,6	

40

【 0 5 1 1】

【表 4 3】

表 3 8 :

PCS データ : 緩衝液中のアダリムマブ								
	Z-Ave d, nm	PDI	Pk1 d, nm	PK1 面積%	Pk2 d, nm	Pk2 面積%	Pk3 d, nm	Pk3 面積%
pH3 100mg/mL	4, 23	0, 283	4, 443	86, 4	54, 1	13, 6	0	0
pH4 100mg/mL	4, 3	0, 101	4, 81	100	0	0	0	0
pH5 100mg/mL	6, 01	0, 065	6, 5	100	0	0	0	0
pH6 100mg/mL	7, 25	0, 063	7, 82	100	0	0	0	0
pH7 100mg/mL	7, 64	0, 094	8, 53	100	0	0	0	0
pH8 100mg/mL	7, 95	0, 099	8, 88	100	0	0	0	0
pH9 100mg/mL	7, 7	0, 133	8, 98	100	0	0	0	0

【 0 5 1 2 】

【表 4 4】

表 3 9 :

PCS データ : 水中のアダリムマブ								
	Z-Ave d, nm	PD1	Pk1 d, nm	PK1 面積%	Pk2 d, nm	Pk2 面積%	Pk3 d, nm	Pk3 面積%
pH4 2mg/mL	3, 37	0, 219	3, 39	88, 8	73, 3	11, 2	0	0
pH4 50mg/mL	2, 24	0, 194	2, 65	97, 7	3300	2, 3	0	0
pH4 100, 5mg/mL	1, 81	0, 172	2, 02	97, 4	3390	2, 6	0	0
pH4 150, 5mg/mL	1, 32	0, 181	1, 64	100	0	0	0	0
pH4 219, 0mg/mL	0, 458	0, 217	4070	62	0, 621	38	0	0
pH4 251, 8mg/mL	0, 162	0, 263	0	0	0	0	0	0

10

pH5 2mg/mL	157	0, 468	1, 88	84, 3	181	10, 7	17	5
pH5 50mg/mL	32, 4	0, 17	1, 6	87, 7	15, 5	4, 8	186	4, 7
pH5 97, 4mg/mL	1, 32	0, 183	1, 52	97, 4	3290	2, 6	0	0
pH5 150, 7mg/mL	0, 931	0, 209	1, 36	98, 7	3710	1, 3	0	0
pH5 200, 2mg/mL	0, 335	0, 203	0	0	0	0	0	0
pH5 253, 0mg/mL	0, 107	0, 255	0	0	0	0	0	0

20

pH6 2mg/mL	30, 8	0, 382	2, 78	60, 9	273	30, 2	5070	5
pH6 50mg/mL	2, 78	0, 247	2, 68	86, 4	1600	7, 8	114	5, 8
pH6 100mg/mL	2, 01	0, 171	2, 48	100	0	0	0	0
pH6 146, 6mg/mL	0, 989	0, 219	1, 32	96, 9	3770	301	0	0
pH6 201, 8mg/mL	0, 355	0, 231	0	0	0	0	0	0
pH6 248, 5mg/mL	0, 108	0, 301	0	0	0	0	0	0

pH7 2mg/mL	3, 31	0, 211	3, 58	93, 9	1250	6, 1	0	0
pH7 50mg/mL	4, 16	0, 132	4, 84	100	0	0	0	0
pH7 100mg/mL	2, 89	0, 141	3, 39	100	0	0	0	0
pH7 146, 6mg/mL	1, 27	0, 212	1, 68	100	0	0	0	0
pH7 201, 8mg/mL	0, 346	0, 306	0	0	0	0	0	0
pH7 248, 5mg/mL	0, 0876	0, 497	0	0	0	0	0	0

30

pH8 2mg/mL	5, 59	0, 365	3, 15	67, 4	244	30, 2	26, 5	2, 4
pH8 50mg/mL	5, 62	0, 174	7	100	0	0	0	0
pH8 96, 1mg/mL	4, 28	0, 192	4, 81	96, 9	3640	3, 1	0	0
pH8 148, 5mg/mL	1, 43	0, 253	1, 68	93, 9	2910	6, 1	0	0
pH8 200, 6mg/mL	0, 398	0, 246	4920	100	0	0	0	0
pH8 230, 7mg/mL	0, 168	0, 3	0	0	0	0	0	0

40

【 0 5 1 3 】

## 【表 4 5】

表 4 0 :

pH	濃度 mg/mL	%凝集物	%単量体	%断片	面積 (mV)
4	100	0,28	67,95	31,76	45195,348
4	150	0,26	66,07	33,68	44492,803
4	200	0,30	64,59	35,11	52558,050
4	250	0,29	64,40	35,31	48491,299
5	100	1,46	98,44	0,11	48127,249
5	150	1,33	98,56	0,11	43226,397
5	200	1,39	98,50	0,11	43634,282
5	250	1,38	98,52	0,11	41643,062
6	100	2,00	97,90	0,10	44338,373
6	150	2,52	97,37	0,11	41899,182
6	200	2,52	97,37	0,11	43869,183
6	250	2,39	07,50	0,11	34969,456
7	100	2,78	97,12	0,10	46194,824
7	150	4,24	95,65	0,11	47443,014
7	200	3,61	96,29	0,10	41916,220
7	250	3,39	96,50	0,11	38185,208
8	100	3,24	96,65	0,12	42334,491
8	150	3,64	96,18	0,18	40305,890
8	200	3,63	96,25	0,13	40280,342
8	250	3,76	96,05	0,19	32067,297

10

20

## 【 0 5 1 4 】

( 実施例 1 8 )

J 6 9 5 粘度における pH の影響

交換媒体として水を用いた DF / UF 処理後に J 6 9 5 に対して粘度データを作成した。少なくとも 5 回の DF / UF 段階を使用して、J 6 9 5 DS ( 実施例 1 参照 ) を水に対して透析ろ過処理した。次に、プレート - プレート粘度計、100 rpm せん断速度、150  $\mu$ m gap、60 mm プレート直径 ( 装置 : Bohlin Geminim 粘度計 ( Malvern Instruments、Southborough、MA )、評価温度範囲 8 - 25 ) を用いて、様々な温度で粘度を測定した。

30

## 【 0 5 1 5 】

図 3 2 で見られるように、それぞれ 179 mg / mL 及び 192 mg / mL の濃度で、J 6 9 5 溶液の粘度は、12 で 70 cP 以下であり、20 で 40 cP 以下であり、25 で 30 cP 以下であった。

40

## 【 0 5 1 6 】

( 実施例 1 9 )

純水中の抗体の薬物動態 ( PK )

この研究の目的は、アフエリモマブでの皮下 ( s . c . ) 投与後の局所的忍容性及び PK における、製剤パラメータの潜在的な影響を評価すること ( 即ち、緩衝液及び塩などのイオン性賦形剤を用いた従来のタンパク質製剤に対する、水を含有する低イオン性タンパク質製剤 ) である。さらに、この製剤の全身的毒性及びトキシコキネティクスデータを調べた。使用したタンパク質濃度は 50 mg / mL から 200 mg / mL の範囲であり、イオン強度は 3 mOsm / kg から 300 mOsm / kg の範囲であった。

## 【 0 5 1 7 】

50

50及び200mg/kgの液体製剤のs.c.投与後のラットにおけるアフェリモマブの局所的忍容性及び毒性を評価するために、雄Sprague-Dawleyラットにおいて、アフェリモマブを用いて、単回(s.c.)投与の試行実験を行った(MAK195F-マウス抗ヒトTNF F(ab')<sub>2</sub>(Abbott Laboratories))。単回のs.c.投与の後、観察/回復期が続いた。循環アフェリモマブレベルを測定し、吸収及び半減期を評価するために、限定血液試料採取(limited blood sampling)を行った。投与された用量体積は1mL/kg体重であった。実験群には、次のものが含まれた。

## 【0518】

## 実験群

01 対照(ビヒクル)

02 50mg/mLアフェリモマブ、液体、標準的製剤

07 200mg/mLアフェリモマブ、液体、水溶液製剤

A群 観察期間2日間

B群 観察期間7日間

C群 観察期間14日間

群分け及びラット識別(1群あたりN=1)

## 【0519】

## 【表46】

## グループ分け及びラットの識別(N=1/グループ)

グループ	動物番号		
	グループA	グループB	グループC
01	1	2	3
02	4	5	6
07	19	20	21

## 【0520】

第1日、投与後15分、1、3、5及び24時間及び、その後少なくとも1日に1回、臨床兆候及び死亡について動物を繰り返し観察した。投与日(第1日)及び解剖日(それぞれ第3日、第15日又は第21日)及び妥当な場合は週に2回、体重を測定した。薬物分析用の血液試料を第1日(投与後4時間)及び妥当な場合は第2、3、5、8及び15日に回収した。解剖前に、採血し、血液学的及び臨床化学的パラメータを評価した。解剖前に、各動物の血液塗抹標本を調製した。解剖時、体腔の肉眼検査を行った。

## 【0521】

肝臓、腎臓、胸腺、脾臓及びリンパ節において器官重量測定を行った。注射部位において及び肝臓、腎臓、胸腺、脾臓及びリンパ節において、予備的な組織病理学検査を行った。

## 【0522】

計画された解剖まで、全動物がこの実験に対して生存した。水溶液製剤を投与されたラットでは、第14日から第15日に、頸部に痂皮が見られた。体重における試験項目関連の影響は観察されなかった。血液学的及び臨床化学的値は変動しやすかった。血液学又は臨床化学において、明らかに試験項目に関連する変化は識別されなかった。尿分析において試験項目に関連する変化は指摘されなかった。器官重量の測定の結果、器官重量は変動性が大きく、明らかに試験項目に関連する変化はなかった。

## 【0523】

総括的観察において、第3日に、水溶液製剤を受容したラットにおいて、注射領域の皮下の発赤が指摘された。その他の変化は全て、この血統及び齢のSprague-Dawleyラットで一般に見られる一連の自然な所見に属するものであった。

## 【0524】

顕微鏡的所見はつぎのとおりであった。

【0525】

- ・01、02群では所見なし
- ・07群において僅かな広汎性の皮下炎症
- ・病巣の皮下出血は、07群の全体的な病変における発赤と相関（第3日）（投与関連であると思われる。）

・局所反応における、pan-T、サブレッサー/細胞毒性T細胞/ナチュラルキラー細胞、pan-B細胞及びpan-マクロファージマーカーの予備的な免疫組織化学の結果から、主にマクロファージ及びナチュラルキラー細胞が皮下炎症/浸潤に関与したことが示される。従って、今までのところ、使用される製剤に対する局所的免疫原性反応に対する兆候はない。

10

【0526】

その他の変化は全て、この血統及び齢のSprague-Dawleyラットで一般に見られる一連の自然な所見に属するものであった。

【0527】

皮下投与後、アフェリモマブ吸収は速く、注射から0.2-3日後に最大血清レベルに到達すると思われる。試験した全ての試料におけるアフェリモマブの絶対的レベルは低かった。試料間で大きな変動が観察されたが、これは、試料採取頻度が限定され、使用した動物数が少なかったためであろう。殆どの試料において、5-8日後に、血清中でアフェリモマブは検出できなかった。この血清レベルの低下は、おそらく、F(ab')<sub>2</sub>の高クリアランスによるものである。殆どの試料に対して観察されたT1/2は、以前の観察と同じく、1-2日の範囲であった。低イオン性製剤の半減期が長い（7.8日）ということは、試料の持続的吸収を意味し得る。データを表41及び42で示す。

20

【0528】

【表47】

表41：MAK195Fの血漿曝露レベル

	時間 (日)	濃度 (µg/mL)			平均 (µg/mL)	STD
		ラット4	ラット5	ラット6		
50mg/kgの 液体標準 製剤	0.167	1.40	1.17	1.38	1.32	0.13
	2	0.76	0.97	0.66	0.80	0.16
	3	0.45	0.67	0.47	0.53	0.12
	5		LLOQ	LLOQ	LLOQ	
	8		LLOQ	LLOQ	LLOQ	
	15			LLOQ	LLOQ	

30

	時間 (日)	濃度 (µg/mL)			平均 (µg/mL)	STD
		ラット19	ラット20	ラット21		
200mg/kg の水製剤	0.167	1.27	3.01	3.17	2.48	1.05
	2	0.17	1.57	1.53	1.09	0.80
	3	LLOQ	1.54	1.56	1.55	0.02
	5		0.64	0.66	0.65	0.02
	8		0.40	0.37	0.38	0.02
	15			0.25	0.25	0.00

40

LLOQ=定量限界以下

【0529】

アフェリモマブ又は対象物質の何れでも、液体に対して凝集状態の所見はなかった。

50

## 【0530】

低イオン強度の製剤の場合、僅かなびまん性のs.c.注射部位の炎症が見られた。高タンパク質濃度（それぞれ50mg/mL及び200mg/mL）で、極微量から微量又は微量から中程度の何れかの炎症が見られた。幾分の局所的なs.c.出血が見られたが、これは、総体的な病変における発赤と相関し；これは、注射中の血管穿刺の結果であると思われた。水溶液製剤に対して、第3日に、注射部位における皮下発赤が幾分観察されたが、有害であるとは見なされなかった。全体的に、本製剤は、局所的に忍容性であった。

## 【0531】

下記表42において、水溶液製剤に対する従来の液体製剤のPKデータを示す。

10

## 【0532】

## 【表48】

表42：異なる製剤中での皮下投薬後のMAK195Fの薬物速度論パラメータ

用量 (mg/kg)	製剤	半減期 (日)	Tmax (日)	Cmax ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	AUC (日* $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	平均滞留時間 (日)	最後の 検出可 能な濃 度の時 間(日)	最後の 検出可 能な濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
50	液体	0.5	0.2	1.32	3.3	1.5	3	0.53
200	水製剤	5.9	0.2	2.48	11.8	7.5	15	0.25

20

## 【0533】

表42で見られるように、低イオン性製剤（即ち水中で処方されたアフエリモマブ）によって、検出可能な血清レベルの期間の延長が見られた。

## 【0534】

この実験において、低イオン性溶液（水）中のMAK195Fの絶対的観察レベルから、従来のMAK195F液体製剤中よりも、曝露性が良好となり、検出可能な血清レベル及び「半減期」が長くなった。

## 【0535】

F(ab')<sub>2</sub>分子に対する以前の観察と同じく、標準的製剤中で、アフエリモマブ半減期は1-2日の範囲であった。しかし、低イオン性製剤に対して一見長い半減期が観察された（7.8d）。従って、この製剤におけるMAK195Fの平均滞留時間は、試験された標準的製剤と比較してより長いようであった。

30

## 【0536】

（実施例20）

2.5(E)mg/l（抗IL-18抗体）のDF/UF

注射用水（以後、「水」と呼ぶ。）を用いた約4倍体積交換を利用して、2.5(E)mg/lバルク溶液（59.6mg/mL）の透析ろ過/限外ろ過（連続モード）を行った。保持液の、濁度、タンパク質濃度（OD280）、pH及び浸透圧を監視すること及びDL S測定によって、DF/UF操作を調節した。2.5(E)mg/lバルク溶液の賦形剤の減少を調節するために、DF/UF中に、透過液の浸透圧も監視した。

40

## 【0537】

材料及び方法

- 2.5(E)mg/lバルク製剤原料（メチオニン、ヒスチジン、ポリソルベート80は不含）（Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA）：全部で589.12g、溶液濃度59.6mg/mLの溶液が入った2本のPETGボトル。

## 【0538】

- Ampuwa（注射用水）（Fresenius Medical Care, Waltham, MA）。

50

## 【0539】

- 2 x Pellicon XL フィルターカセット、Millipore、PLCTK 30 kDa 膜、再生セルロースを含む Millipore Lab scale TFF DF / UF ユニット
- UV / VIS 分光光度計、Specord 50、280 nm 波長
- Biotrode プロブ番号 57 付きの、Metrohm pH メーター、タイプ 744
- 浸透圧計：Knauer、K-7400
- Paar の装置、DMA 4100 を用いた密度測定
- 層流ボックス Hereaus
- 濁度測定：Hach、2100 AN
- 粘度計：Paar、AMVn
- 重量計：Mettler Toledo、AT261 及び 33.45
- フィルター：Millex AP20 (グラスファイバー) 及び Minisart High Flow Filter (酢酸セルロース)、0.20 μm 孔サイズ。

10

## 【0540】

## 20.1 実験手順

2.5 (E) mg l DS 試料の融解：23 で循環水浴を用いて2時間以内に、凍結 DS を含有する 2 L PETG ボトルを融解した。融解した DS は透明で、僅かに乳白色であり、目に見える粒子はなかった。

20

## 【0541】

DF / UF による DS の濃縮：530 mL の DF / UF ユニットリザーバー体積限界のため、2.5 (E) mg l DS を 525 mL の最終体積に濃縮した。

## 【0542】

水を用いた DF / UF (緩衝液交換)：4 倍体積交換を利用して、DS (メチオニン、ヒスチジン、2.5 (E) mg l) を DF / UF に供した。表 4 3 は、実験を通じて使用された水の量を与え、表 4 4 は、実験パラメータを与える。

## 【0543】

## 【表 4 9】

表 4 3 : DF/UF 水容量交換

容量交換	使用した水の容量 (累積)
1 倍	576mL
2 倍	1152mL
3 倍	1728mL
4 倍	2304mL

30

## 【0544】

## 【表 5 0】

表 4 4 : DF/UF 操作のパラメータ交換

Lab scale TFF DF	設定
ポンプ速度	1.5-2
ポンプの圧力	20-30 psi
攪拌速度	約 3
実験期間	8 時間

40

## 【0545】

処理透過液約 200 mL ごとに透過液の浸透圧測定を行った。

## 【0546】

50

水に対するDF/UF後、2.5 (E) mg/l 溶液の体積は450 mLであり、タンパク質濃度は76.6 mg/mLであった。次に、基本的に水中で溶解された2.5 (E) mg/l を含有するこの溶液を濃縮した。

【0547】

表45：溶液濃縮に対するDF/UFプロセスパラメータ

【0548】

【表51】

表45：溶液濃縮に対するDF/UFプロセスのパラメータ

Labscale TFF DF	設定
ポンプ速度	1.5-2
ポンプの圧力	最大 30psi
攪拌速度	約 3
実験期間	51分
溶液の最終重量：	257.83g

10

【0549】

濃縮溶液（約130 mg/mL）を0.2 μmろ過に供した。この溶液を2-8℃に冷却し、次いで-80℃で保存した。

【0550】

20.2 2.5 (E) mg/l のDF/UF中に回収したデータ

【0551】

【表52】

表46：インプロセス対照データ

DF工程	容量 [mL]	時刻	温度溶液 /室温 [°C]	濁り [NTU]	pH	オスモル浸 透圧濃度 [mOsmol/kg]	濃度 [mg/mL]
2.5 (E)mg/l				14.5	5.91	150	59.6
01	0	08:00	19.0/24.1	N/A	5.91	125	65.2
1	575	10:02	24.4/24.4	10.1	5.92	50	70.1
2	1150	11:50	24.3/24.7	6.67	5.94	16	72.8
3	1730	13:50	25.0/24.8	6.55	5.97	6	74.6
約4	2200	15:35	25.8/25.5	10.1	5.97	5	76.7

30

【0552】

【表 5 3】

表 4 7 : 浸透物質のオスモル浸透圧濃度 (プロセスの間に分画及び測定)

試料番号	時刻	温度溶液/ 室温 [°C]	浸透物質 [mL]	浸透物質累 積[mL]	DF/UF 工程 の数	オスモル浸 透圧濃度 [mOsmol/kg]
0	07:35	N/A	90	N/A	N/A	125
1	08:00	19.0/24.1	200	200	0.3	124
2	08:50	23.0/24.1	200	400	0.7	82
3	09:27	24.0/24.2	200	600	1.0	53
4	10:12	24.4/24.4	200	800	1.4	37
5	10:50	24.5/24.3	200	1000	1.7	25
6	11:25	24.6/24.3	200	1200	2.1	16
7	12:10	24.7/24.3	230	1400	2.5	7
8	12:55	24.7/24.4	170	1600	2.8	4
9	13:25	24.8/24.4	200	1800	3.1	2
10	14:15	25.1/24.8	200	2000	3.5	0
11	14:55	25.8/25.5	200	2200	3.8	1

10

【 0 5 5 3 】

20

【表 5 4】

表 4 8 : 緩衝液交換後の 2.5(E)mg/l の濃度

時刻	溶液温度	リザーバ中の容量 [mL]	pH
15:54	25.9	450	5.94
16:02	26.1	400	5.96
16:07	26.1	375	5.96
16:20	26.2	350	5.96
16:28	26.3	300	5.98
16:35	26.5	275	5.98
16:45	26.5	250	5.99

30

【 0 5 5 4 】

【表 5 5】

表 4 9 : 濃縮された 2.5(E)mg/l 溶液の分析的特徴 (0.2 $\mu$ m ろ過の前及び後)

パラメータ	ロット	
	ろ過前	ろ過後
濁り [NTU]	15.4	9.58
オスモル浸透圧濃度 [mOsmol/kg]	6	N/A
密度 [g/mL]	1.0346	N/A
pH	5.99	N/A
動的粘度 (25°C) [mPas]	N/A	7.9998

10

【 0 5 5 5】

【表 5 6】

表 5 0 : DF/UF 間の動的光散乱データ (溶液中に存在する全ての試料の単量体の Dh の測定及び)

20

DLS データ	試料吸引					
	DV 1 倍	DV 2 倍	DV 3 倍	DV 4 倍	濃縮後	ろ過後
ピーク 1 直径単量体 強度[%] Z-平均 PdI	4.32 100.0 3.95 0.077	3.68 100.0 3.28 0.106	3.54 100.0 3.20 0.094	3.48 89.6 3.53 0.245	2.73 87.0 2.12 0.287	2.13 100.0 1.89 0.113
ピーク 2 直径[nm] 強度[%]	N/A	N/A	N/A	984 10.4	411 11.8	N/A
ピーク 3 直径[nm] 強度[%]	N/A	N/A	N/A	N/A	4260 1.2	N/A

30

【 0 5 5 6】

2 0 . 3 考 察

2.5 (E) mg/l (メチオニン、ヒスチジン中で緩衝化) がより高い濃度で基本的に水中で処方され得ることが実験から分かった (130 mg/mL で溶解限度は観察されず)。水を用いた 3 体積交換後、透過液及び保持液の浸透圧は 10 mOsmol/kg 以下であり、このことから、緩衝賦形剤が効果的に減少したことが分かった。2.5 (E) mg/l 溶液の乳白光は、水を用いた DF/UF 中で減少し (最適な外観)、これは濁度値の低下にも反映された (DS 出発溶液の比濁分析の濁度単位 (NTU) 14.5、3 倍体積交換後 6.55、4 倍体積交換後 10.5)。

40

【 0 5 5 7】

その他の抗体により見られるように、DLS により測定した場合の流体力学直径は、賦形剤減少により縮小した (不規則なブラウン運動に加えて分子間電荷 - 電荷反発作用、その結果、分子の運動性がより高くなり、Dh 値の計算値の低下につながる)。2.5 (E) mg/l 溶液の pH は、基本的に DF/UF 操作前 (pH 5.94) 後 (pH 5.99) で同じであった。

50

## 【0558】

DLS監視により示されるように、2.5 (E) mg/lは、DF/UF操作中、安定なままであった。高分子量試料の実質的な増加は検出されなかった。

## 【0559】

(実施例21)

水の中に製剤化されたアダリムマブの調製及びその安定性研究

以下の実施例は、上記実施例に記載されているプロセスから得られたアダリムマブを含む製剤の安定性について記載する。すなわち、アダリムマブは、水の中に首尾よく透析された。

## 【0560】

材料及び方法

純水を用いて、アダリムマブ溶液3323.6 g (71.3 mg/mL)を透析ろ過した。純水での7倍容積交換後(理論的賦形剤減少率、99.9%)、それぞれ、220及び63 mg/mLの最終標的濃度になるように、タンパク質溶液を希釈/限外ろ過した。DF/UF処理プロセス後のタンパク質の状態を監視するために、pH、浸透圧、粘度、伝導度、PCS、視覚的検査及びタンパク質濃度の測定(OD280)を行った。

## 【0561】

DF/UF処理プロセス後に、タンパク質溶液を滅菌ろ過し(0.22 µm Millipak-60及びMillipak-200膜フィルター)、その後、27.5 GRNA針及び無菌BD Hy Pak BSCF 4432/50停止装置が装着されたBD Hy Pak SCF<sup>TM</sup> 1 mL長注射器の中に充填した。充填容積は、約0.825 mL/注射器であった。

## 【0562】

充填後、それぞれ、2から8、25及び40で注射器を保存し、以下に図示されている試料吸引スキームに記されているように分析した。

## 【0563】

・アダリムマブ薬物物質(アダリムマブ吸光係数280 nm: 1.39 mL mg · cm): 薬物物質は、ポリソルベート80を含有しなかった。DS緩衝液、pH 5.38。

## 【0564】

・Ultraser t PES膜カセット(50 kDa及び30 kDaカットオフ)が装着されたSortorius Sartoccon Slice透析ろ過システム。Sartoccon Sliceシステムは、Sortorius Operating Instructionsに従って、周囲温度で連続モードにて作動させた。

## 【0565】

・pH電極  
・タンパク質濃度測定(280 nm波長)のために、PerkinElmer UV可視分光光度計Lambda 35を使用した。濃度測定のために、使い捨てUVキュベット、1.5 mL、セミマイクロ、ポリ(メタクリル酸メチル)(PMMA)を使用した。

## 【0566】

・DF/UF溶媒として、注射用無菌水Ph. Eur./USPを使用した。

## 【0567】

・浸透圧測定のために(400 mOsmol/kg NaCl校正溶液、Art. No. Y1241、Herbert Knauer GmbH、Berlin、Germanyを用いて校正)、Vogel Osmometer OM815を使用した。

## 【0568】

・Anton Paar Operating Instructionsに従い、タンパク質溶液の粘度測定のために、Anton Paar Microviscosimeter、タイプAWVnを使用した。粘度は、20で評価した。

## 【0569】

・25に対して標準化された伝導度測定のために、InoLab Cond Lev

10

20

30

40

50

e 1 2 W T W を使用した。

【 0 5 7 0 】

・標準的な方法を適用して、Z - 平均値の測定のために、Malvern Instruments Zetasizer nano ZS を使用した。球形粘度測定器 (Anton Paar Microviscosimeter, type AWVn, 25) を落とすことによって得られた粘度データを用いて、25 で測定を行った。

【 0 5 7 1 】

HPLC法

・アダリムマブ、SEC分析：Sephadex 200カラム (Pharmacia カタログ番号 175175-01)。移動相：20 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム、pH 7.5、0.5 mL / 分流速、周囲温度、検出UV 214 nm 及び 280 nm。Milli-Q水で各試料を1.0 mg / mLに希釈、試料注入量 50 µg (2回注入)。

10

【 0 5 7 2 】

・アダリムマブ、IEC分析：対応するガードカラム (p / n 0 5 4 9 9 4) 付きの Dionex、Propac WCX - 10カラム (p / n 0 5 4 9 9 3)。分離条件：移動相 A：10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.5；移動相 B：10 mMリン酸ナトリウム、500 mM塩化ナトリウム、pH 5.5。1.0 mL / 分の流速、周囲温度。Milli-Q水で1.0 mg / mLに各試料を希釈、試料注入量 100 µg、2回注入。

【 0 5 7 3 】

タンパク質濃度の計算

計算式：

【 0 5 7 4 】

【数 1 2】

$$E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\varepsilon \times d}$$

- 吸光係数

c - 濃度

d - 光が通過しなければならないキュベットの長さ

E - 吸光度

I<sub>0</sub> - 最初の光強度

I - 試料を通過した後の光強度

30

【 0 5 7 5 】

【数 1 3】

$$\varepsilon_{\text{Adalimumab}} = 1.39 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}$$

【 0 5 7 6 】

試料吸引スキーム

調製された溶液の試料を以下に列記されている温度で保存し、試験開始後の表記時点で吸引 (x) した。

40

【 0 5 7 7 】

【表 5 7】

温度	T0	1m	3m
5°C	—	X	X
25°C	X	X	X
40°C	—	X	X

50

【 0 5 7 8 】

【表 5 8】

検査パラメータ	検査法
目に見える粒子	類似の DAC (EA4. 43)
目に見えない粒子	類似の Ph. Eur. /USP EA4. 44
濁度	類似の Ph. Eur. (EA4. 42)
色 (視覚的)	Ph. Eur. (EA4. 50)
pH	Ph. Eur. (EA4. 24)
サイズ排除 HPLC	本文中に上記
陽イオン交換 HPLC	本文中に上記

10

【 0 5 7 9 】

アダリムマブの DF / UF 処理

表 5 1 は、透析ろ過後のアダリムマブ特性を記載する。

【 0 5 8 0 】

【表 5 9】

表 5 1

試料	タンパク質濃度 [mg/mL]	pH	浸透圧 [mosmol/kg]	粘度 [cP]	視覚的検査	伝導度 [ $\mu$ S/cm]	PCS [Z-平均 /d. nm]
高濃度	220	5.57	26	27.9	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない	1167	0.34
低濃度	63	5.44	5	1.8	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない	522	1.85

20

30

【 0 5 8 1 】

異なる温度での、透明性及び乳白光、液体の発色の度合い、SEC など、保存時のアダリムマブの特性が、付表 D に記載されている。

【 0 5 8 2 】

結論

上記実施例は、モノクローナル抗体アダリムマブに対する透析ろ過溶媒として、水 (無菌注射用水 Ph. Eur. / USP) を使用した透析ろ過 / 限外ろ過 (DF / UF) 実験を提供する。

【 0 5 8 3 】

DF / UF 交換溶媒として純水を使用することによって、アダリムマブを DF / UF 処理プロセスに供し、溶液の混濁、著しい乳白光又は濁度形成を誘導せずに、pH 5.57 にて高い濃度 (220 mg / mL) で、及び pH 5.44 にてより低い濃度 (63 mg / mL) で製剤化した。

40

【 0 5 8 4 】

2 から 8 、 25 及び 40 で 3 ヶ月間、DF / UF 実験から得られたアダリムマブを SCF 注射器中に保存した。得られたデータは、タンパク質の好ましい全体的な安定性を示している。

【 0 5 8 5 】

結論的には、DF / UF 交換溶媒として純水を使用してタンパク質を処理及び製剤化す

50

ることは実行可能である。理想的な100%の賦形剤膜透過率を仮定すると、約99.9%の最大賦形剤減少率を推定することができる。

【0586】

(実施例22)

非イオン性賦形剤を用いた、水の中に製剤化されたアダリムマブの安定性研究

以下の実施例は、さらなる非イオン性賦形剤を加えた水の中に抗体、すなわちアダリムマブを含有する製剤の安定性研究について記載する。

【0587】

材料及び方法

アダリムマブ材料は、実施例21(DF/UF処理プロセス)のものと同じであった。DF/UF処理プロセス後に、表52に表記されているように、タンパク質溶液を製剤化した。マニトール、ソルビトールなどの糖アルコールの群から得られる例として、マニトールを選択した。ショ糖、トレハロース、ラフィノース、マルトースなどの糖の群から得られる例として、ショ糖を選択した。ポリソルベート80、ポリソルベート20、プルロニックF86などのような非イオン性界面活性剤の群から得られる例として、ポリソルベート80を選択した。何れの製剤に対しても、約10.7mLを調製した。調製後、あらゆる製剤に対して、浸透圧、粘度及びPCS測定を行った。

【0588】

【表60】

表52

最終タンパク質濃度	マニトール (mg/mL)	ショ糖 (mg/mL)	ポリソルベート80 (%w/w)	試料名
50mg/mL	50	—	—	L150/01
50mg/mL	—	80	—	L150/02
50mg/mL	50	—	0.01	L150/03
50mg/mL	—	80	0.01	L150/04
50mg/mL	50	—	0.1	L150/05
50mg/mL	—	80	0.1	L150/06
50mg/mL	—	—	0.01	L150/07
50mg/mL	—	—	0.1	L150/08
200mg/mL	50	—	—	L1200/01
200mg/mL	—	80	—	L1200/02
200mg/mL	50	—	0.01	L1200/03
200mg/mL	—	80	0.01	L1200/04
200mg/mL	50	—	0.1	L1200/05
200mg/mL	—	80	0.1	L1200/06
200mg/mL	—	—	0.01	L1200/07
200mg/mL	—	—	0.1	L1200/08

—無菌注射用水中のポリソルベート80原液0.5%及び5%:

1:50の比で添加(アダリムマブ溶液10.5mLへ210 $\mu$ L、全ての試料中で等しいタンパク質濃度が確保されるようにするために、界面活性剤なしで製剤化された試料へ注射用水210 $\mu$ Lを添加)

—固体形態でマニトール/ショ糖を添加(それぞれ、525mg/840mg)

【0589】

調製物を滅菌ろ過し(Millex GV、Millipore、0.22 $\mu$ m、33

10

20

30

40

50

mm、Art. SLGV033RS)、続いて、27.5 GRNA 針及び無菌 BD Hyp Pak BSCF4432/50 停止装置が装着された BD Hyp Pak SCF<sup>TM</sup> 1 mL 長注射器の中に充填した。充填容積は、約 0.6 mL / 注射器であった。

【0590】

充填後、それぞれ、2 から 8、25 及び 40 で注射器を保存し、以下に図示されている試料吸引スキームに記されているように分析した。

【0591】

・アダリムマブ薬物物質 (アダリムマブ吸光係数 280 nm : 1.39 mL mg · cm) : 薬物物質は、ポリソルベート 80 を含有しなかった。DS 緩衝液、pH 5.38。

【0592】

- ・ pH 電極
- ・ DF / UF 溶媒として、注射用無菌水 Ph. Eur. / USP を使用した。

【0593】

・ マニトール、ポリソルベート 80 及び ショ糖 (全て、Ph. Eur. 品質に合致する。)

・ 浸透圧測定のために (400 mOsmol / kg NaCl 校正溶液、Art. No. Y1241、Herbert Knauer GmbH、Berlin、Germany を用いて校正)、Vogel Osmometer OM815 を使用した。

【0594】

・ Anton Paar Operating Instruction に従い、タンパク質溶液の粘度測定のために、Anton Paar Microviscosimeter、タイプ AWVn を使用した。粘度は、20 で評価した。

【0595】

・ Fluostar Optima、BMG Labtech (ウェルプレート中、344 nm での吸収測定、濁度の評価)

・ 標準的な方法を適用して、Z - 平均値の測定のために、Malvern Instruments Zetasizer nano ZS を使用した。球形粘度測定器 (Anton Paar Microviscosimeter、type AWVn、25) を落とすことによって得られた粘度データを用いて、25 で測定を行った。

【0596】

HPLC 法

・ アダリムマブ、SEC 分析 : Sephadex 200 カラム (Pharmacia カタログ番号 175175-01)。移動相 : 20 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.5、0.5 mL / 分の流速、周囲温度、検出 UV 214 nm 及び 280 nm。Milli-Q 水で各試料を 1.0 mg / mL に希釈、試料注入量 50 µg (2 回注入)。

【0597】

・ アダリムマブ、IEC 分析 : 対応するガードカラム付きの Dionex、Propac WCX-10 カラム。分離条件 : 移動相 A : 10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.5 ; 移動相 B : 10 mM リン酸ナトリウム、500 mM 塩化ナトリウム、pH 5.5。1.0 mL / 分の流速、周囲温度。Milli-Q 水で 1.0 mg / mL に各試料を希釈、試料注入量 100 µg、2 回注入。

【0598】

試料吸引スキーム

調製された溶液の試料を 5、25 及び 40 で保存し、研究開始から 1 分後に (5 及び 40) 又は T0 及び 1 分後 (25) に吸引した。試験パラメータは、適切な方法に従って測定した。例えば、色は視覚的に測定し、344 nm の吸収で濁度を測定した。

【0599】

当初製剤の性質決定

表 5 3 は、最初の製剤の浸透圧及び粘度を記載した。

【 0 6 0 0 】

【表 6 1】

表 5 3

ロット	組成	浸透圧 [mosmol]	粘度 [mPas]
L150/01	50mg/mL マニトール	309	1,9796
L150/02	80mg/mL ショ糖	272	2,1284
L150/03	50mg/mL マニトール ; 0.01%Tween 80	307	1,9843
L150/04	80mg/mL ショ糖 ; 0.01%Tween 80	269	2,1194
L150/05	50mg/mL マニトール ; 0.1%Tween 80	307	1,9980
L150/06	80mg/mL ショ糖;0.1%Tween 80	272	2,1235
L150/07	0.01% Tween 80	8	1,7335
L150/08	0.1% Tween 80	8	1,8162
L1200/01	50mg/mL マニトール	396	21,395
L1200/02	80mg/mL ショ糖	351	21,744
L1200/03	50mg/mL マニトール ; 0.01%Tween 80	387	21,233
L1200/04	80mg/mL ショ糖 ; 0.01%Tween 80	350	21,701
L1200/05	50mg/mL マニトール ; 0.1%Tween 80	387	21,592
L1200/06	80mg/mL ショ糖;0.1%Tween 80	355	21,943
L1200/07	0.01% Tween 80	27	21,296
L1200/08	0.1% Tween 80	28	21,889

【 0 6 0 1 】

1つの濃度の全製剤は、等しい粘度を示した。ショ糖を含有する製剤の粘度は僅かに高かった。水中に高度に濃縮された製剤（例 A、粘度 27.9 cP）と比べて、高度に濃縮された製剤の粘度が低いことは、ポリソルベート 80 原溶液又は普通の水を用いた試料の希釈によって説明される（実施例 21 における 220 mg/mL と比べて、約 215 mg/mL の最終濃度をもたらす。）。

【 0 6 0 2 】

表 5 4 は、各試料に対して測定された PCS データを記載する。

【 0 6 0 3 】

10

20

30

40

【表 6 2】

表 5 4

試料	PCS [Z-平均/d. nm]
L150/01	2.58
L150/02	2.22
L150/03	2.13
L150/04	2.22
L150/05	2.25
L150/06	2.55
L150/07	2.87
L150/08	1.94
L1200/01	0.50
L1200/02	0.43
L1200/03	0.36
L1200/04	0.38
L1200/05	0.37
L1200/06	0.41
L1200/07	0.35
L1200/08	0.36

10

20

【0604】

表 5 4 に提供されているデータは、z - 平均値が非イオン性賦形剤を含まない系 (63 mg/mL、1.85 d. nm、220 mg/mL、0.34 d. nm、実施例 21) におけるアダリムマブ溶液から得られた値と有意に異なることを示している。

【0605】

保存時のアダリムマブの性質決定

付表 E は、保存時のアダリムマブ安定性に関するデータを提供する。

30

【0606】

プラセボ溶液の伝導度

表 5 5 は、様々なアダリムマブ製剤の伝導度に対する非イオン性賦形剤の影響を記載する。全てのプラセボ溶液は、無菌注射用水 Ph. Eur. / USP を用いて調製された。

【0607】

【表 6 3】

表 5 5

マニトール (mg/mL)	シヨ糖 (mg/mL)	ポリソルベート 80 (%w/w)	伝導度 ( $\mu$ S/cm)
—	—	—	1.1
50	—	—	1.2
—	80	—	2.2
50	—	0.01	2.3
—	80	0.01	1.4
50	—	0.1	2.6
—	80	0.1	3.6
—	—	0.01	1.2
—	—	0.1	2.6

10

【 0 6 0 8】

## 結論

2 から 8 、 2 5 及び 4 0 で 1 ヶ月間、調製物を S C F 注射器中に保存した。保存研究から得られたデータは、検査した全ての製剤中でタンパク質の全体的な安定性が存在することを示した。安定性データは、実施例 2 1 から得られた試料の安定性と同等であった。非イオン性賦形剤を含有するプラセボ溶液の伝導度の測定は、幾つかの賦形剤に対して、数  $\mu$  S / c m の範囲の伝導度の僅かな増加を示す。P C S 測定は、非イオン性賦形剤を含まない系と比べて、水力学的直径の有意な増加を示さない。

20

【 0 6 0 9】

結論として、D F / U F 交換溶媒として純水を用いたタンパク質を処理すること及び非イオン性賦形剤を加えた製剤は、実行可能である。以下の組成の緩衝液中でも、P C S によってアダリムマブを評価した。1 0 m M リン酸緩衝液、1 0 0 m M 塩化ナトリウム、1 0 m M クエン酸緩衝液、1 2 m g / m L マニトール、0 . 1 % ポリソルベート 8 0、p H 5 . 2。アダリムマブ濃度は、それぞれ、5 0 m g / m L 及び 2 0 0 m g / m L であった。z 平均値は、それぞれ、5 0 m g / m L 製剤に対して 1 1 . 9 d . n m であり、2 0 0 m g / m L 製剤に対して 1 . 0 1 d . n m であった。従って、あるタンパク質濃度での水力学的直径がイオン強度に依存することが明確に示された（塩含有緩衝液中で、明確に直径が大きい）。

30

【 0 6 1 0】

(実施例 2 3)

非イオン性賦形剤を加えない水の中に製剤化された J 6 9 5 の調製

以下の実施例は、さらなる非イオン性賦形剤を加えた水の中での抗体（すなわち、アダリムマブ）を含有する製剤の調製について記載する。本実施例は、さらなる非イオン性賦形剤を加えた水の中に製剤化された J 6 9 5 の安定性（例えば、S E - H P L C 及び I E C によって測定される。）についても記載する。

40

【 0 6 1 1】

材料及び方法

純水を用い、S l i d e - A - L y z e r 透析カセットを適用して、異なる p H の 2 x 3 0 m L J 6 9 5 溶液（約 1 2 5 m g / m L ）を透析した。それぞれ、3 L の純水に対して、試料の透析を 3 回行った（理論的な賦形剤減少率、1 : 1 , 0 0 0 , 0 0 0）。V i v a s p i n 2 0 濃縮装置を使用することによって、2 0 0 m g / m L の最終標的濃度になるように、タンパク質溶液を限外ろ過した。処理プロセスの間及び後のタンパク質の状態を監視するために、p H、浸透圧、粘度、伝導度、P C S、視覚的検査、H P L C 及びタンパク質濃度の測定（O D 2 8 0）を行った。

50

## 【0612】

処理プロセス後、以下に表記されているように、タンパク質溶液を製剤化した。マニトール、ソルビトールなどの糖アルコールの群から得られる使用の例として、マニトールを選択した。ショ糖、トレハロース、ラフィノース、マルトースなどの糖の群から得られる使用の例として、ショ糖を選択した。ポリソルベート80、ポリソルベート20、ブルコニックF86などのような非イオン性界面活性剤の群から得られる使用の例として、ポリソルベート80を選択した。これらの製剤の各々に対して、0.5mLの容量を調製した。試料調製後のタンパク質の状態を監視するために、pH、浸透圧、視覚的検査及びHPLC分析を行った。

## 【0613】

10

## 【表64】

表56：様々なJ695製剤の説明

最終タンパク質濃度	マニトール (mg/mL)	ショ糖 (mg/mL)	ポリソルベート80 (%w/w)	試料名*
200mg/mL	50	—	—	LI200/01/5
200mg/mL	—	80	—	LI200/02/5
200mg/mL	50	—	0.01	LI200/03/5
200mg/mL	—	80	0.01	LI200/04/5
200mg/mL	50	—	0.1	LI200/05/5
200mg/mL	—	80	0.1	LI200/06/5
200mg/mL	—	—	0.01	LI200/07/5
200mg/mL	—	—	0.1	LI200/08/5
200mg/mL	50	—	—	LI200/01/6
200mg/mL	—	80	—	LI200/02/6
200mg/mL	50	—	0.01	LI200/03/6
200mg/mL	—	80	0.01	LI200/04/6
200mg/mL	50	—	0.1	LI200/05/6
200mg/mL	—	80	0.1	LI200/06/6
200mg/mL	—	—	0.01	LI200/07/6
200mg/mL	—	—	0.1	LI200/08/6

20

30

\*pH5と6の試料を区別するために、符号「/05」及び「/06」が全ての試料名に付加されている。

—無菌注射用水中のポリソルベート80原液0.5%及び5%:

1:50の比で添加 (J695溶液0.5mLへ10 $\mu$ L、全ての試料中で等しいタンパク質濃度が確保されるようにするために、界面活性剤なしで製剤化された試料へ注射用水10 $\mu$ Lを添加)

—固体形態でマニトール/ショ糖を添加 (それぞれ、25mg/40mg)

・J695薬物物質 (J695吸光係数280nm: 1.42mL/mg $\cdot$ cm): 薬物物質は、ポリソルベート80を含有しなかった。DS緩衝液、pH6.29。

40

## 【0614】

・pH電極

・透析溶媒として、無機物が除去され及び滅菌ろ過された水を使用した。

## 【0615】

・マニトール、ポリソルベート80及びショ糖、全てPh.Eur.品質に合致する

・浸透圧測定のために(400mOsmol/kgNaCl校正溶液、Art.No.Y1241、Herbert Knauer GmbH、Berlin、Germanyを用いて校正)、Vogel Osmometer OM815を使用した。

## 【0616】

50

・Anton Paar Operating Instructionに従い、タンパク質溶液の粘度測定のために、Anton Paar Microviscosimeter、タイプAWVnを使用した。粘度は、20 で評価した。

## 【0617】

・Fluostar Optima、BMG Labtech (ウェルプレート中、344nmでの吸収測定、濁度の評価)

・Eppendorf Centrifuge 5810R

・Slide-A-Lyzer透析カセット、Pierce Biotechnology (Cat No 66830)

・標準的なOperating Instructionに従って、Vivaspin 20濃縮装置、10kDa PES膜 (Vivascience, Product番号VS2001)を使用した

・タンパク質濃度測定 (280nm波長)のために、PerkinElmer UV可視分光光度計 Lambda 35を使用した。濃度測定のために、使い捨てUVキュベット、1.5mL、セミマイクロ、ポリ (メタクリル酸メチル) (PMMA)を使用した。

## 【0618】

・25 に対して標準化された伝導度測定のために、InoLab Cond Level 2WTW装置を使用した。

## 【0619】

・標準的な方法を適用して、Z-平均値の測定のために、Malvern Instruments Zetasizer nano ZSを使用した。球形粘度測定器 (Anton Paar Microviscosimeter, type AWVn, 25) を落とすことによって得られた粘度データを用いて、25 で測定を行った。

## 【0620】

HPLC法

・J695、SEC分析: Tosoh Bioscience G3000swx1カラム、7.8mm x 30cm、5µm (カタログ番号08541)。移動相: 211mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / 92mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH 7.0。0.25mL / 分の流速、周囲温度、検出UV 214nm及び280nm。Milli-Q水で各試料を2.0mg / mLに希釈、試料注入量20µg (2回注入)。

## 【0621】

・J695、IEC分析: 対応するガードカラム (p/n 054994) 付きのDionex、Propac WCX-10カラム (p/n 054993)。分離条件: 移動相A: 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH 6.0; 移動相B: 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、500mM NaCl、pH 6.0。1.0mL / 分の流速、35 温度。Milli-Q水で1.0mg / mLに各試料を希釈、試料注入量100µg。

## 【0622】

タンパク質濃度の計算

計算式:

## 【0623】

## 【数14】

$$E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\epsilon \times d}$$

- 吸光係数

c - 濃度

d - 光が通過しなければならないキュベットの長さ

E - 吸光度

I<sub>0</sub> - 最初の光強度

I - 試料を通過した後の光強度

【 0 6 2 4 】

【 数 1 5 】

$$\epsilon_{\text{Adalimumab}} = 1.42 \frac{mL}{mg \times cm}$$

【 0 6 2 5 】

Ｊ 6 9 5 の処理プロセス

何れかの非イオン性賦形剤を添加する前に、水中のＪ 6 9 5 を性質決定した。表 5 7 は、透析 / 限外ろ過の間のＪ 6 9 5 の性質決定の詳細を与える。

【 0 6 2 6 】

【表 6 5】

表 5 7

試料	タンパク質 濃度 [mg/mL]	pH	浸透圧 [mosmol/kg]	粘度 [cP]	視覚的 検査	伝導度 [ $\mu$ S/ cm]	PCS [Z-平均 /d. nm]
最初の材料	約 125mg/mL	6.29 (低 pH 試料 については、0.01M 塩酸を用 いて 4.77に 調整)	N/A	N/A	僅かに 乳白色、 目に見 える粒 子は実 質的に 存在し ない	N/A	N/A
透析後、 低 pH	42.5mg/mL	5.21	7	1.60	僅かに 乳白色、 目に見 える粒 子は実 質的に 存在し ない	602	1.5
透析後、 高 pH	56.9mg/mL	6.30	6	2.11	僅かに 乳白色、 目に見 える粒 子は実 質的に 存在し ない	500	2.7
濃縮後、 低 pH	206mg/mL	5.40	50	39.35	僅かに 乳白色、 目に見 える粒 子は実 質的に 存在し ない	1676	0.21
濃縮後、 高 pH	182mg/mL	6.48	39	47.76	僅かに 乳白色、 目に見 える粒 子は実 質的に 存在し ない	1088	0.21

【 0 6 2 7】

非イオン性賦形剤を有する製剤の性質決定

J 6 9 5 製剤に様々な非イオン性賦形剤を添加した後(表 5 6 中の記述参照)、各製剤を分析した。浸透圧及び視覚的検査から得られた結果及び pH が、下表 5 8 に記載されている。

10

20

30

40

50

【 0 6 2 8 】

【 表 6 6 】

表 5 8

試料	pH	浸透圧 [mosmol/kg]	視覚的検査
L1200/01/5	5.39	473	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/02/5	5.38	402	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/03/5	5.37	466	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/04/5	5.37	397	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/05/5	5.37	458	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/06/5	5.37	396	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/07/5	5.36	50	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/08/5	5.36	48	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/01/6	6.43	428	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/02/6	6.42	405	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/03/6	6.43	348	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/04/6	6.43	383	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/05/6	6.42	432	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/06/6	6.42	402	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/07/6	6.43	38	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない
L1200/08/6	6.43	39	僅かに乳白色、目に見える粒子は実質的に存在しない

【 0 6 2 9 】

H P L C データ

非イオン性賦形剤含有 J 6 9 5 製剤の各々も、S E - H P L C 及び I E X を用いて調べた。これらの分析から得られたデータが表 5 9 及び 6 0 に提供されており、処理プロセス及び製剤の間の J 6 9 5 安定性の概要を与える。

【 0 6 3 0 】

10

20

30

40

【表 67】

表 59 : 様々な J695 製剤の SE-HPLC 結果

試料名	総凝集物 [%]	単量体 [%]	総断片 [%]
pH5	0,608	98,619	0,773
125mg/mL	0,619	98,598	0,783
最初の材料	0,614	98,608	0,778
pH6	0,427	98,809	0,764
125mg/mL	0,392	99,005	0,603
最初の材料	0,409	98,907	0,683
pH5	0,654	98,604	0,742
42.5mg/mL	0,677	98,560	0,763
透析後	0,666	98,582	0,753
pH6	0,748	98,541	0,711
56.9mg/mL	0,739	99,597	0,665
透析後	0,743	98,569	0,688
pH5	0,913	98,416	0,671
206mg/mL	0,923	98,356	0,721
水中	0,918	98,386	0,696
pH5	0,928	98,312	0,760
50mg/mL マニトール	0,926	98,339	0,736
L1200/01/5	0,927	98,325	0,748
pH5	0,925	98,319	0,755
80mg/mL ショ糖	0,929	98,332	0,738
L1200/02/5	0,927	98,326	0,747
pH5、50mg マニトール	0,942	98,326	0,732
0.01% Tween 80	0,942	99,300	0,758
L1200/03/5	0,942	98,313	0,745
pH5、80mg ショ糖	0,944	98,315	0,741
0.01% Tween 80	0,944	98,339	0,717
L1200/04/5	0,944	98,327	0,729
pH5、50mg マニトール	0,941	98,348	0,711
0.1% Tween 80	0,967	98,299	0,734
L1200/05/5	0,954	98,323	0,722
pH5、50mg マニトール	0,944	98,346	0,710
0.1% Tween 80	0,948	98,340	0,712
L1200/06/5	0,946	98,343	0,711
pH5、50mg マニトール	0,946	98,348	0,706
0.1% Tween 80	0,953	99,328	0,719
L1200/07/5	0,949	98,338	0,713
pH5、50mg マニトール	0,987	98,313	0,701
0.1% Tween 80	0,994	98,283	0,723
L1200/08/5	0,991	98,298	0,712

10

20

30

40

pH6	1,091	98,169	0,739
182mg/mL	1,075	98,221	0,703
水中	1,083	98,195	0,721
pH6	0,998	98,350	0,652
50mg/mL マニトール	1,002	98,364	0,634
L1200/01/6	1,000	98,357	0,643
pH6	1,028	98,243	0,729
80mg/mL ショ糖	0,983	98,355	0,662
L1200/02/6	1,006	98,299	0,695
pH6、50mg マニトール	1,005	98,322	0,673
0.01% Tween 80	1,008	99,317	0,676
L1200/03/6	1,006	98,319	0,674
pH6、80mg ショ糖	0,987	98,363	0,649
0.01% Tween 80	0,987	98,321	0,692
L1200/04/6	0,987	98,342	0,671
pH6、50mg/mL マニトール	0,996	98,326	0,678
0.1% Tween 80	0,996	98,338	0,666
L1200/05/6	0,996	98,332	0,672
pH6、80mg ショ糖	0,998	98,305	0,697
0.1% Tween 80	0,984	98,345	0,671
L1200/06/6	0,991	98,325	0,684
pH6	1,000	98,325	0,675
0.01% Tween 80	0,994	99,347	0,659
L1200/07/6	0,997	98,336	0,667
pH6	1,003	98,314	0,682
0.01% Tween 80	0,998	99,338	0,664
L1200/08/6	1,001	98,326	0,673

10

20

【表 6 8】

表 6 0 : 様々な J695 製剤の IEX 結果

試料名	総凝集物 [%]	単量体 [%]	総断片 [%]
pH5	4,598		3,303
125mg/mL	4,599		3,177
最初の材料	4,599	92,162	3,240
pH6	4,597		3,159
125mg/mL	4,629		3,156
最初の材料	4,613	92,229	3,158
pH5	4,706		3,177
42.5mg/mL	4,725		3,205
透析後	4,715	92,094	3,191
pH6	4,739		3,182
56.9mg/mL	4,752		3,167
透析後	4,746	92,080	3,174
pH5	4,655		3,167
206mg/mL	4,676		3,210
水中	4,666	92,146	3,189
pH5	4,721		3,321
50mg/mL マニトール	4,733		3,356
L1200/01/5	4,727	91,935	3,338
pH5	4,715		3,299
80mg/mL ショ糖	4,687		3,338
L1200/02/5	4,701	91,981	3,318
pH5、50mg マニトール	4,767		3,246
0.01% Tween 80	4,736		3,253
L1200/03/5	4,752	91,999	3,250
pH5、80mg ショ糖	4,751		3,257
0.01% Tween 80	4,742		3,229
L1200/04/5	4,746	92,011	3,243
pH5、50mg マニトール	4,780		3,420
0.1% Tween 80	4,720		3,394
L1200/05/5	4,750	91,843	3,407
pH5、50mg マニトール	4,756		3,421
0.1% Tween 80	4,894		3,375
L1200/06/5	4,825	91,777	3,398
pH5、50mg マニトール	4,813		3,425
0.1% Tween 80	4,757		3,413
L1200/07/5	4,785	91,796	3,419
pH5、50mg マニトール	4,769		3,361
0.1% Tween 80	4,842		3,335
L1200/08/5	4,806	91,646	3,348

10

20

30

40

pH6	4,882		3,452
182mg/mL	4,886		3,451
水中	4,884	91,654	3,451
pH6	4,843		3,456
50mg/mL マニトール	4,833		3,393
L1200/01/6	4,838	91,737	3,425
pH6	4,923		3,407
80mg/mL ショ糖	4,896		3,491
L1200/02/6	4,909	91,642	3,449
pH6、50mg マニトール	4,864		3,423
0.01% Tween 80	4,899		3,392
L1200/03/6	4,882	91,711	3,408
pH6、80mg ショ糖	4,870		3,320
0.01% Tween 80	4,928		3,369
L1200/04/6	4,899	91,756	3,345
pH6、50mg/mL マニトール	4,905		3,385
0.1% Tween 80	4,922		3,489
L1200/05/6	4,914	91,649	3,437
pH6、80mg ショ糖	4,973		3,443
0.1% Tween 80	4,962		3,335
L1200/06/6	4,968	91,644	3,389
pH6	4,934		3,413
0.01% Tween 80	4,899		3,392
L1200/07/6	4,916	91,681	3,402
pH6	4,884		3,410
0.01% Tween 80	4,934		3,366
L1200/08/6	4,909	91,703	3,386

10

20

## 【 0 6 3 2 】

30

## 結論

上記実施例は、モノクローナル抗体 J 6 9 5 に対する透析溶媒として水（無機物が除去され及び滅菌ろ過された水）が使用された実験を提供する。

## 【 0 6 3 3 】

交換溶媒として純水を使用することによって、J 6 9 5 が透析及び濃縮処理プロセスに供され、溶液の混濁、著しい乳白光又は濁度形成を誘導せずに、pH 5 . 4 0 及び 6 . 4 6 にて、高い濃度（それぞれ、2 0 6 及び 1 8 2 m g / m L ）で製剤化した。

## 【 0 6 3 4 】

処理プロセス実験から得られた J 6 9 5 を性質決定し、様々な非イオン性賦形剤とともに製剤化した。得られたデータは、検査された製剤中でのタンパク質の好ましい全体的な安定性を示している。

40

## 【 0 6 3 5 】

結論的には、交換溶媒として純水を使用してタンパク質を処理すること及び非イオン性賦形剤との製剤化は実行可能である。理想的な 1 0 0 % の賦形剤膜透過率を仮定すると、約 9 9 . 9 % の最大賦形剤減少率を推定することができる。

## 【 0 6 3 6 】

## （実施例 2 4 ）

水の中に製剤化されたアダリムマブの注射可能性

実施例 2 1 から得られた製剤（6 3 及び 2 2 0 m g / m L アダリムマブ）を、シリンジを空にする際の力の測定に供した。それぞれ、2 0 0 m g / m L 、 1 5 0 m g / m L 及び

50

100 mg/mL になるようにアダリムマブの 220 mg/mL 試料を希釈し、同じく評価した。80 mm/分の一定の供給速度で Zwick Z 2.5 / TN 1 S を使用した。最後に、20 で、Anton Paar Microviscosimeter、タイプ AWV n を用いて、製剤の粘度データを評価した。以下のデータ群は、注射器を空にする際の滑り力に対して、針及び注射器の直径の両者が著しい影響を有することを示唆する。驚くべきことに、63 mg/mL のより低濃縮製剤 (20 で粘度 1.8 cP) と等しい枯渇力を加えることによって、220 mg/mL で高度に濃縮された溶液 (20 で粘度 27.9 cP) を送達することができる。

【0637】

【表69】

10

表61：異なるパッケージ系中のアダリムマブ溶液に対して得られた滑り力の値

アダリムマブ濃度 (粘度)	27.5G の RNS 針、 BD HyPak BSCF 4432/50 ストッパが装着され た BD HyPak SCF™ 1mL 長注射器	以下のものが装着された D HyPak SCF™ 1mL 長注射器			27G 針 × 1/2' ' (Sterican) が装着された 1mL の Soft-Ject® Tuberkulin 注射器 (BD HyPak 注 射器より小 さい直径)
		25G × 5/8' ' 針 (Sterican) BD HyPak BSCF 4432/50 ストッパ	26G × 1/2' ' 針 (Sterican) BD HyPak BSCF 4432/50 ストッパ	27G × 1/2' ' 針 (Sterican) BD HyPak BSCF 4432/50 ストッパ	
63mg/mL (1.8cP)	3.9N	—	—	—	—
100mg/mL (2.9cP)	3.30N	1.02N	1.33N	1.69N	1.00N
150mg/mL (7.4cP)	4.63N	1.16N	1.58N	2.93N	1.33N
200mg/mL (15/7cP)	7.25N	2.16N	3.24N	6.25N	2.55N
220mg/mL (27.9cP)	14.5N	2.99N	3.97N	9.96N	3.16N

20

30

【0638】

上記は、タンパク質の高い濃度を用いた場合でさえ、このような製剤が、注射器を用いた投与 (例えば、皮下) に資することを示唆する。

【0639】

実施例 25 から 28

実施例 25 から 28 は、水の中に製剤化された抗体を含有する様々な抗体製剤 (実施例 26 から 28 において、低イオン強度タンパク質製剤と称される。) の凍結 / 融解安定性実験を記載する。凍結状態と液体状態の間に最大 4 回、様々なタンパク質製剤を行き来させることによって、多数の抗体の凍結融解挙動を評価した。凍結は、温度制御された - 80 凍結装置を用いて行い、融解は、25 の温度制御された水槽を用いて行った。これらの実験の系列に対して、それぞれ抗体溶液約 25 mL を 30 mL の PETG 貯蔵庫中に充填した。

40

【0640】

目に見えない粒子の形成は、医薬タンパク質製剤における主要な安全上の関心事である。目に見えないタンパク質粒子は、製品の性質決定及び品質確保プログラムの一環として評価及び定量される可溶性凝集物及び化学的に修飾された種などの他の分解産物と同等又

50

はより大きな程度まで、臨床成績に悪影響を与える可能性を有すると考えられる ( Carpenter, J F et al. Commentary: Overlooking subvisible particles in therapeutic protein products: baps that may compromise product quality. J. Pharm. Sci., 2008)。以下に列記されている実施例に示されているように、本発明の製剤中で製剤化されたときに、驚くべきことに、とりわけ、目に見えない粒子の形成に関して、多数の抗体が安定であった。

【0641】

(実施例25)

水の中に及び非イオン性賦形剤とともに製剤化されたアダリムマブの凍結/融解安定性  
以下の実施例は、水製剤中及びその中に非イオン性賦形剤が添加された水製剤中の抗体  
(例えば、アダリムマブ)の安定性を記載する。実施例21及び22から得られた試料の  
アリコート凍結/融解実験に供し、SE-HPLCによって分析した。以下の組成の緩  
衝液中でアダリムマブを使用する凍結/融解実験から得られたSE-HPLCの結果とデ  
ータを比較した。10mMリン酸緩衝液、100mM塩化ナトリウム、10mMクエン酸  
緩衝液、12mg/mLマニトール、0.1%ポリソルベート80、pH5.2。この後  
者の緩衝液中のアダリムマブ濃度は、それぞれ、50mg/mL及び200mg/mLで  
あった。-80℃まで凍結し、凍結装置中に8時間保存し、室温で1時間融解し、その後  
、試料を吸引することによって、Eppendorfキャップ中で凍結/融解サイクルを  
行った。各製剤を5サイクル(すなわち、以下の表に記載されているサイクル0、1、2  
、3、4及び5)に供した。

10

20

【0642】

HPLC法

アダリムマブ、SEC分析: Sephadex 200カラム(Pharmacia カ  
タログ番号175175-01)。移動相: 20mMリン酸ナトリウム、150mM塩化  
ナトリウム、pH7.5、0.5mL/分の流速、周囲温度、検出UV214nm及び2  
80nm。Milli-Q水で各試料を1.0mg/mLに希釈、試料注入量50µg(  
2回注入)。

【0643】

凍結/融解サイクルの際のアダリムマブの性質決定

表62は、凍結/融解実験の間のアダリムマブの純度を記載する。試料の組成に関して  
は、実施例21及び22を参照されたい。

30

【0644】

【表 70】

表 62 :

凍結/融解—低イオン性アダリムマブ—50mg/mL  
サイクル

	単量体の割合[%]							
	LI 50/01	LI 50/02	LI 50/03	LI 50/04	LI 50/05	LI 50/06	LI 50/07	LI 50/08
0	99.605	99.629	99.632	99.626	99.619	99.626	99.653	99.655
1	99.743	99.768	99.639	99.759	99.731	99.725	99.686	99.689
2	99.715	99.726	99.571	99.661	99.721	99.721	99.601	99.619
4	99.668	99.689	99.632	99.678	99.532	99.724	99.491	99.542
5	99.627	99.771	99.539	99.772	99.525	99.773	99.357	99.445

10

サイクル

	凝集物の割合[%]							
	LI 50/01	LI 50/02	LI 50/03	LI 50/04	LI 50/05	LI 50/06	LI 50/07	LI 50/08
0	0.106	0.104	0.119	0.136	0.139	0.145	0.158	0.159
1	0.149	0.134	0.153	0.150	0.149	0.166	0.206	0.201
2	0.192	0.178	0.320	0.242	0.178	0.184	0.319	0.261
4	0.213	0.185	0.239	0.187	0.357	0.170	0.393	0.353
5	0.301	0.151	0.384	0.150	0.398	0.150	0.568	0.484

20

サイクル

	断片の割合[%]							
	LI 50/01	LI 50/02	LI 50/03	LI 50/04	LI 50/05	LI 50/06	LI 50/07	LI 50/08
0	0.289	0.267	0.249	0.238	0.242	0.229	0.189	0.186
1	0.108	0.098	0.108	0.091	0.120	0.108	0.107	0.130
2	0.093	0.097	0.108	0.097	0.100	0.094	0.080	0.119
4	0.119	0.126	0.130	0.135	0.120	0.106	0.116	0.105
5	0.072	0.078	0.078	0.078	0.077	0.077	0.075	0.071

30

凍結/融解—低イオン性アダリムマブ—200mg/mL

サイクル

	単量体の割合[%]							
	LI 50/01	LI 50/02	LI 50/03	LI 50/04	LI 50/05	LI 50/06	LI 50/07	LI 50/08
0	99.294	99.296	99.348	99.333	99.313	99.349	99.320	99.290
1	99.286	99.267	99.259	99.256	99.120	99.254	98.999	99.126
2	99.305	99.311	99.249	99.214	99.296	99.288	99.149	99.128
4	99.303	99.272	99.261	99.301	99.296	99.283	99.004	99.061
5	99.320	99.322	99.330	99.331	99.327	99.333	98.939	98.949

サイクル	凝集物の割合[%]							
	LI 50/01	LI 50/02	LI 50/03	LI 50/04	LI 50/05	LI 50/06	LI 50/07	LI 50/08
0	0.489	0.509	0.491	0.484	0.492	0.488	0.515	0.575
1	0.590	0.574	0.584	0.586	0.680	0.582	0.785	0.718
2	0.604	0.604	0.616	0.630	0.607	0.607	0.731	0.736
4	0.591	0.592	0.612	0.581	0.604	0.596	0.868	0.836
5	0.593	0.586	0.583	0.596	0.597	0.589	0.985	0.981

サイクル	断片の割合[%]							
	LI 50/01	LI 50/02	LI 50/03	LI 50/04	LI 50/05	LI 50/06	LI 50/07	LI 50/08
0	0.218	0.196	0.161	0.183	0.195	0.163	0.165	0.135
1	0.124	0.159	0.157	0.159	0.200	0.164	0.216	0.157
2	0.091	0.085	0.135	0.156	0.097	0.105	0.120	0.136
4	0.106	0.136	0.127	0.118	0.100	0.121	0.128	0.103
5	0.087	0.092	0.087	0.073	0.075	0.078	0.076	0.070

## 凍結／融解—市販及び水の中のアダリムマブ

サイクル	単量体の割合[%]			
	実施例 A から、低 濃度	実施例 A から、高 濃度	標準、50mg/mL	標準、200mg/mL
0	99.733	99.286	99.374	99.227
1	99.689	99.212	99.375	99.215
2	99.614	99.130	99.370	99.218
4	99.489	99.029	99.361	99.196
5	99.430	98.945	99.362	99.177

サイクル	凝集物の割合[%]			
	実施例 A から、低 濃度	実施例 A から、高 濃度	標準、50mg/mL	標準、200mg/mL
0	0.186	0.635	0.358	0.502
1	0.226	0.706	0.359	0.516
2	0.304	0.780	0.364	0.513
4	0.428	0.888	0.372	0.535
5	0.485	0.971	0.373	0.553

サイクル	断片の割合[%]			
	実施例 A から、低 濃度	実施例 A から、高 濃度	標準、50mg/mL	標準、200mg/mL
0	0.080	0.079	0.268	0.272
1	0.085	0.083	0.266	0.269
2	0.082	0.090	0.266	0.269
4	0.083	0.083	0.267	0.270
5	0.085	0.085	0.265	0.269

## 【 0 6 4 5 】

## 結論

上記実施例は、水（無菌注射用水 P h . E u r . / U S P ）中に D F / U F 処理され、

10

20

30

40

50

様々な非イオン性賦形剤とともに製剤化されたアダリムマブを凍結/融解サイクルに供した実験を提供する。(表62に記載されている)得られたデータは、検査した全ての製剤中でタンパク質の好ましい全体的な安定性を示す。全ての製剤は、サイクルが継続するにつれて、凝集物又は断片の最小限の量とともに、98.5%を超える単量体種を5回の凍結/融解サイクル後に含有していた。

#### 【0646】

(実施例26)

低イオン性1D4.7溶液の凍結/融解安定性

透析(slide-a-lyzerカセットを使用、製造業者Pierce、Rockford、IL)の使用説明書に従って使用)によって、1D4.7タンパク質(抗IL12/抗IL23IgG1)を水の中に製剤化し、2mg/mL濃度、pH6での反復凍結/融解(f/t)処理(-80/25の水槽)の間に安定であることが示された。非経口タンパク質製剤の開発において一般に使用される緩衝液及び賦形剤を用いて、データを様々な製剤(2mg/mLタンパク質、pH6)のデータと比較した。水の中に製剤化された1D4.7の安定性は確立された緩衝液系(例えば、20mMヒスチジン、20mMグリシン、10mMホスファート又は10mMシトラート)中に製剤化された1D4.7の安定性を上回り、タンパク質製剤を安定化させるために一般的に使用される様々な賦形剤、例えば、10mg/mLマニトール、10mg/mLソルビトール、10mg/mLショ糖、0.01%ポリソルベート80又は20mMNaClと組み合わせられた普遍的緩衝液(10mMホスファート、10mMシトラート)を基礎とする1D4.7製剤の安定性さえ上回ることが見出された。

#### 【0647】

タンパク質の安定性を監視するために、SEC、DLS及び粒子計数分析を適用し、1から200µmの測定範囲を有する粒子計数システム(粒子カウンターModel Syringe, Markus Klotz GmbH, Bad Liebenzell, Germany)を用いて、粒子計数を行った。実験の詳細は、以下のとおりである。

#### 【0648】

- 上に列記されている製剤と比較される、水の中に製剤化された1D4.7

- 4凍結/融解サイクルを適用

- 30mLのPETG貯蔵庫、約20mL充填、2mg/mLタンパク質、pH6

- T0、T1(すなわち、1回のf/t工程後)、T2、T3及びT4での試料採取

- 分析:視覚的検査、SEC、DLS、目に見えない粒子の測定

図33は、1µmを超える目に見えない粒子の形成によって反映される、反復f/tサイクル(-80/25)の間の1D4.7の安定性を示す。普遍的緩衝液(10mMシトラート、10mMホスファート)中に、1D4.7を製剤化し、次いで、以下の様々な賦形剤を検査した。ソルビトール(10mg/mL)、マニトール(10mg/mL)、ショ糖(10mg/mL)、NaCl(100mM)及びポリソルベート80(0.01%)。1D4.7は、(透析によって)賦形剤が全く添加されていない水の中にも製剤化した(図33の「水」)。材料の取り扱い、f/t及び試料の吸引が粒子の搭載に対して及ぼし得る影響を調べるために、注射用水は、f/tサイクル及び目に見えない粒子の検査にも供した。

#### 【0649】

f/tの際の水の中に製剤化された1D4.7の安定性は、タンパク質製剤中に典型的に使用される賦形剤とともに製剤化された1D4.7溶液の安定性を上回った。マニトール、ショ糖及びソルビトールは、凍結乾燥保護剤及び/又は凍結保護剤として作用することが知られており、ポリソルベート80は、それぞれ、空気-水及び氷-水などの疎水性-親水性界面への曝露に際してタンパク質の物理的安定性を増加させることが広く知られている非イオン性賦形剤である。

#### 【0650】

まとめると、驚くべきことに、水の中に製剤化された1D4.7溶液は、凍結融解プロ

セスの際の医薬タンパク質の安定性を監視するために典型的に適用される様々な分析法（例えば、SEC、視覚的検査、動的光散乱、特に、光掩蔽（light obscuration））、を用いて分析すると、安定であるように見受けられた。

#### 【0651】

（実施例27）

低イオン性13C5.5溶液の凍結/融解安定性

水の中に製剤化された13C5.5（抗IL-13IgG1）は、2mg/mLの濃度、pH6で、反復凍結/融解処理プロセス（-80 / 25 水槽）の間に安定であることが示された。データを他の製剤（2mg/mLタンパク質、pH6）と比較し、水中に製剤化された13C5.5の安定性が非経口タンパク質製剤中でしばしば使用される緩衝液系（例えば、20mMヒスチジン、20mMグリシン、10mMホスファート又は10mMシトレート）中に製剤化された13C5.5の安定性を上回り、タンパク質製剤中で一般的に使用される様々な賦形剤（例えば、10mg/mLマニトール、10mg/mLソルビトール、10mg/mLショ糖、0.01%ポリソルベート80、20mMNaCl、200mMNaCl）と組み合わせられた普遍的緩衝液（10mMホスファート、10mMシトレート）を基礎とする13C5.5製剤の安定性さえ上回ることが見出された。

10

#### 【0652】

試料の調製、実験の処理プロセス、試料吸引及び試料の分析は、上の実施例に概説されているのと同様に行った。

#### 【0653】

- 上に列記されている製剤と比較される、水の中に製剤化された13C5.5
- 4凍結/融解サイクルを適用
- 30mLのPETG貯蔵庫
- 2mg/mL、pH6
- T0、T1、T2、T3及びT4での試料採取
- 分析：視覚的検査、SEC、DLS、目に見えない粒子の測定

20

図34は、>10µmを超える目に見えない粒子の形成によって反映される、反復f/tサイクル（-80 / 25）の間の13C5.5の安定性を示す。10mMリン酸緩衝液、10mMクエン酸緩衝液、20mMグリシン緩衝液及び20mMヒスチジン緩衝液の何れかの中に、13C5.5を製剤化した。（透析によって）賦形剤が全く添加されていない本発明の製剤中にも、13C5.5を製剤化した。材料の取り扱い、f/t及び試料の吸引が粒子の搭載に対して及ぼし得る影響を評価するために、注射用水は、f/tサイクル及び目に見えない粒子の検査にも供した（ブランクと称する。）。

30

#### 【0654】

f/tの際の水の中に製剤化された13C5.5の安定性は、タンパク質製剤中に典型的に使用される緩衝液中に製剤化された13C5.5溶液の安定性を上回った。適用した他の分析法（例えば、SEC、視覚的検査など）でも、水の中に製剤化された13C5.5溶液の不安定性は観察されなかった。

#### 【0655】

図35は、>1µmを超える目に見えない粒子の形成によって反映される、反復f/tサイクル（-80 / 25）の間の13C5.5の安定性を示す。普遍的緩衝液（10mMシトレート、10mMホスファート）中に及び以下の様々な賦形剤（ソルビトール（10mg/mL）、マニトール（10mg/mL）、ショ糖（10mg/mL）、NaCl（200mM）、NaCl（20mM）及びポリソルベート80（0.01%））と組み合わせられた普遍的緩衝液中に13C5.5を製剤化した。13C5.5は、比較のために（透析によって）賦形剤が全く添加されていない水（純水）の中にも製剤化された。材料の取り扱い、f/t及び試料の吸引が粒子の搭載に対して及ぼし得る影響を評価するために、注射用水は、f/tサイクル及び目に見えない粒子の検査にも供した。

40

#### 【0656】

f/tの際の水の中に製剤化された13C5.5の安定性は、タンパク質製剤中に典型的

50

に使用される賦形剤とともに製剤化された13C5.5溶液の安定性を上回った。マニトール、ショ糖及びソルビトールは、凍結乾燥保護剤及び/又は凍結保護剤として作用することが知られており、ポリソルベート80は、それぞれ、空気-水及び氷-水などの疎水性-親水性界面への曝露に際してタンパク質の物理的安定性を増加させることが広く知られている非イオン性賦形剤である。本発明の製剤中に製剤化された13C5.5試料中の目に見えない粒子の少ない数は、驚くほど低いレベルであることが見出され、このような製剤の高い安全性及び安定性の可能性を示している。

【0657】

適用した他の分析法(例えば、SEC、視覚的検査など)でも、水の中に製剤化された13C5.5溶液の不安定性は観察されなかった。

10

【0658】

f/t操作後の13C5.5溶液のDLS分析は、上述のように行った。DLS分析から得られた結果は、0.01% Tween-80を加えた13C5.5溶液が、ただ1回のf/t工程後に、著しい高分子量(HMW)凝集物形態を含有するのに対して、3回のf/t工程の適用後にさえ、水中の13C5.5はHMW凝集体形態を含有していなかった。

【0659】

まとめると、驚くべきことに、水の中に製剤化された13C5.5溶液は、凍結融解処理プロセスの際の医薬タンパク質の安定性を監視するために典型的に適用される様々な分析法(例えば、SEC、視覚的検査、動的光散乱、特に、光掩蔽)、を用いて分析すると、安定であるように見受けられた。

20

【0660】

(実施例28)

低イオン性7C6溶液の凍結/融解安定性

水の中に製剤化された7C6(抗アミロイド IgG1)は、2mg/mLの濃度、pH6で、反復凍結/融解処理プロセス(-80/30水槽)の間に安定であることが示された。データを他の製剤(2mg/mLタンパク質、pH6)と比較し、水中に製剤化された7C6の安定性が非経口タンパク質製剤中でしばしば使用される緩衝液系中に製剤化された7C6の安定性を上回り、タンパク質製剤中で一般的に使用される様々な賦形剤と組み合わされた普遍的緩衝液(10mMホスファート、10mMシトラート)を基礎とする7C6製剤の安定性さえ上回ることが見出された。

30

【0661】

凍結/融解実験の間に7C6の物理的安定性を維持する能力に関して、以下の容積組成を調べた。

【0662】

- ホスファート緩衝液、15mM
- シトラート緩衝液、15mM
- スクシナート緩衝液、15mM
- ヒスチジン緩衝液、15mM
- アルギニン緩衝液、15mM
- 低イオン性タンパク質製剤、賦形剤添加せず
- 普遍的緩衝液、ソルビトール(10mg/mL)
- 普遍的緩衝液、マニトール(10mg/mL)
- 普遍的緩衝液、ショ糖(10mg/mL)
- 普遍的緩衝液、トレハロース(10mg/mL)
- 普遍的緩衝液、0.01%(w/w)ポリソルベート80

40

試料の調製、実験の処理プロセス、試料の吸引及び試料の分析は、実施例26及び27に概説されているのと極めて似た方法で行った。

【0663】

- 上に列記されている製剤と比較される、水の中に製剤化された7C6

50

- 4 凍結 / 融解サイクルを適用
- 30 mL の P E T G 貯蔵庫、約 20 mL 充填
- 2 mg / mL、pH 6
- T 0、T 1、T 2、T 3 及び T 4 での試料採取
- 分析：以下の方法によって、A 抗体の安定性を評価した。

## 【0664】

- タンパク質溶液の視覚的検査は、光掩蔽測定のために試料が充填されたポリプロピレン丸底管の中で行った。混濁、濁度及び粒子形成など、タンパク質の物理的不安定性を示唆する兆候に関して、黒及び白の両背景に対してタンパク質溶液を注意深く検査した。

## 【0665】

- 動的光散乱 ( e Z e t a s i z e r N a n o Z S , M a l v e r n I n s t r u m e n t s , A I 9 4 9 4 ; H e l l m a 精度セルを搭載、suprasil 石英、タイプ 105.251-QS、光路 3 mm、センター Z 8.5 mm、少なくとも 60 µL 試料充填、PP 丸底管での光掩蔽測定からの残存試料を DLS 測定のために使用した。)。自動化された測定 ( 1 測定 / 試料 ) を行った。

## 【0666】

- 光掩蔽分析。層気流条件下で、5 mL の丸底管の中に試料 3.5 mL を充填し、最初の 0.8 mL の濯ぎの後、n = 3 モード ( 0.8 mL / 一回の測定 ) で、測定を行った。

## 【0667】

- UV<sub>214</sub> / UV<sub>280</sub> 及び多角光散乱と組み合わされたサイズ排除クロマトグラフィー。移動相：100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、pH 7.0 ( 無水リン酸水素二ナトリウム 49.68 g 及び無水硫酸ナトリウム 99.44 g を、Milli-Q 水の約 3300 mL 中に溶かし、1 M リン酸を用いて、7.0 になるように pH を調整し、3500 mL の容積になるように Milli-Q 水を充填し、膜フィルターを通じて、溶液をろ過した。)。SEC カラム、TSK ゲル G3000SW ( カタログ番号 08541 )、7.8 mm x 30 cm、TSK ゲルガード ( カタログ番号 08543 ) と組み合わされた 5 µm 6.0 mm x 4.0 cm、7 µm。流量 0.3 mL / 分、注入容量 20 µL ( 20 µg の試料と等しい )、カラム温度室温、自動試料採取装置の温度 2 から 8、実行時間 50 分、グラジエントイソクラティック、10% イソプロピルアルコールによるピストンの濯ぎ、紫外線吸収を介した検出、ダイオードアレイ検出装置：波長 214 nm、ピーク幅 > 0.1 分、バンド幅：8 nm、参照波長 360 nm、バンド幅 100 nm。

## 【0668】

図 36 は、1 µm を超える目に見えない粒子の形成によって反映される、反復 f / t サイクル ( - 80 / 25 ) の間の 7C6 の安定性を示す。多くの製剤に関して、f / t の際の水中に製剤化された 7C6 の安定性は、タンパク質製剤中に典型的に使用される緩衝液中に製剤化された 7C6 溶液の安定性を上回った。適用された他の分析法 ( 例えば、SEC、視覚的検査、動的光散乱 ) を用いて、水の中に製剤化された 7C6 溶液の不安定性は観察されなかった。

## 【0669】

驚くべきことに、f / t の際の水中に製剤化された 7C6 の安定性は、タンパク質製剤中で典型的に使用される賦形剤とともに製剤化された 7C6 の安定性を上回った。マニトール、ショ糖及びソルビトールは、凍結乾燥保護剤及び / 又は凍結保護剤として作用することが知られており、ポリソルベート 80 は、それぞれ、空気 - 水及び氷 - 水などの疎水性 - 親水性界面への曝露に際してタンパク質の物理的不安定性を増加させることが広く知られている非イオン性賦形剤である。本発明の製剤中に製剤化された 7C6 試料中の目に見えない粒子の少ない数は、驚くほど低いレベルであることが見出され、このような製剤の高い安全性及び安定性の可能性を示している。

## 【0670】

まとめると、驚くべきことに、水の中に製剤化された 7C6 溶液は、凍結融解処理プロ

10

20

30

40

50

セスの際の医薬タンパク質の安定性を監視するために典型的に適用される様々な分析法（例えば、SEC、視覚的検査、動的光散乱、特に、光掩蔽）、を用いて分析すると、安定であるように見受けられた。

【0671】

（実施例29）

水の中に製剤化されたJ695の調製及びその安定性研究

材料及び方法

精製された水を用いて、J695の427.1g(80mg/mL)を40mg/mLに希釈した。精製された水での5倍容積交換後(理論的賦形剤減少率、99.3%)、100mg/mLの標的濃度になるように、タンパク質溶液を限外ろ過した。DF/UF処理プロセス後のタンパク質の状態を監視するために、pH、浸透圧、密度、視覚的検査及びタンパク質濃度の測定(OD280)を行った。

10

【0672】

DF/UF処理プロセス後に、60mLのPETG瓶(Nalgene)の中にタンパク質溶液を滅菌ろ過し(0.22µmSterivexGV膜フィルター)、その後、-80で3ヶ月間保存した。

【0673】

37での融解後、溶液を滅菌ろ過し(0.22µmSterivexGV膜フィルター)、無菌BD Hypak Physiologis SCF<sup>TM</sup> 1mL長注射器29G、1/2インチ、5ベベル角度、RNS TPEの中に充填し、無菌BD Hypak SCF<sup>TM</sup> 1mLW4023/50Flur Daikyoストッパーで閉鎖した。充填容量は、1,000mL/注射器であった。

20

【0674】

充填後、それぞれ、2から8及び40で注射器を保存し、以下に図示されている試料吸引スキームに記載されているように分析した。

【0675】

・J695薬物物質(280nmでの吸光係数:1.42mLmg·cm):薬物物質、pH6.0は、ポリソルベート80を含有しなかった。

【0676】

・Ultraser tPES膜カセット(50kDaカットオフ)が装着されたSartorius Sartoclon Slice透析ろ過システム。Sartoclon Sliceシステムは、Sartorius Operating Instructionに従って、周囲温度で連続モードにて作動させた。

30

【0677】

・pH電極  
・タンパク質濃度測定(280nm波長)のために、PerkinElmer UV可視分光光度計Lambda 25を使用した。濃度測定のために、使い捨てUVキュベット、1.5mL、セミミクロを使用した。

【0678】

・DF/UF溶媒として、0.22µmろ過された精製水を使用した。

40

【0679】

・密度測定のために、Anton Paar Density Meter DMA 4100を使用した

・浸透圧測定のために(400mOsmol/kg NaCl較正溶液、Art.No. Y1241、Herbert Knauer GmbH、Berlin、Germanyを用いて較正)、Knauer Osmometer Type MLを使用した。

【0680】

分析法

・J695、SEC分析: Superdex 200カラム(Pharmacia)。移動相: 92mMリン酸水素二ナトリウム、211mM硫酸ナトリウム、pH7.0、0.

50

75 mL / 分の流速、周囲温度、検出UV 214 nm。移動相で各試料を2.0 mg / mLに希釈、試料注入量20 µg (2回注入)。

【0681】

・J695、IEC分析：対応するガードカラム付きのDionex、Propac WCX-10カラム。分離条件：移動相A：20 mMリン酸水素二ナトリウム及び20 mM酢酸ナトリウム、pH 7.0；移動相B：20 mMリン酸水素二ナトリウム、400 mM塩化ナトリウム、pH 5.0。1.0 mL / 分の流速、周囲温度。Milli-Q水で1.0 mg / mLに各試料を希釈、試料注入量100 µg、2回注入。

【0682】

・J695、SDS-PAGE分析：Novexアクリルアミドスラブゲル(非還元条件に対して8から16%、還元条件に対して12%、Invitrogen)、Coomassie染色(Invitrogen)。10倍原溶液(Invitrogen)から作製されたTris-Glycine緩衝液を用いて、還元(-メルカプトエタノール)及び非還元条件下で分離。

10

【0683】

・J695、緩衝液成分の定量

・マニトール：ReproGelCaカラム(Dr. Maisch, Germany)による分離及びRI検出、移動相：脱イオン水、0.6 mL / 分の流速、20 µLの試料注入。外部校正標準曲線を用いて、定量を行った。

【0684】

・ヒスチジン及びメチオニン：OPA(オルト-フタル酸アルデヒド)でのアミノ酸の蛍光標識及びReproSilODS-3カラム(Dr. Maisch, Germany)によるHPLC分離及び420 nmでの蛍光検出(330 nmでの吸光)、移動相A：70%クエン酸(10.51 g / L)緩衝液、pH 6.5、30%メタノール、移動相B：メタノール、1.0 mL / 分の流速、20 µLの試料注入。外部校正標準曲線を用いて、定量を行った。

20

【0685】

・J695、PCS分析：4.3875 mPasの溶液粘度、1.450のタンパク質の屈折率及び1.335の緩衝溶液の屈折率を仮定し、173°の角度で、A Malvern Instruments Zetasizer nano ZSを用いて、25で、使い捨てのプラスチックキュベット中において、100 mg / mLで希釈せずに行った。それぞれ、20スキャン、20秒の平均結果が報告されている。

30

【0686】

タンパク質濃度の計算

計算式：

【0687】

【数16】

$$E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\varepsilon \times d}$$

40

- 吸光係数

c - 濃度

d - 光が通過しなければならないキュベットの長さ

E - 吸光度

$I_0$  - 最初の光強度

I - 試料を通過した後の光強度

【0688】

【数 17】

$$\epsilon_{J695} = 1.42 \frac{mL}{mg \times cm}$$

【0689】

試料吸引スキーム

調製された溶液の試料を以下に列記されている温度で保存し、試験開始後の表記時点で吸引（×）した（表 63）。検査パラメータ及び方法は、表 64 に記載されている。

【0690】

【表 71】

10

表 63

温度	T0	1m	3m	6m
5°C	X	X	X	X
40°C		X	X	X

【0691】

【表 72】

表 64

20

試験パラメータ	試験法
概観	視覚的検査
目に見える粒子	類似の DAC EA4. 43)
目に見えない粒子	類似の Ph. Eur. /USP EA 4. 44
透明性	Ph. Eur. (EA4. 42)
色 (視覚)	Ph. Eur. (EA4. 50)
pH	Ph. Eur. (EA 4. 24)
サイズ排除 HPLC	上記参照
陽イオン交換 HPLC	上記参照
SDS-PAGE	上記参照
PCS	上記参照

30

【0692】

J 695 の DF / UF 処理プロセス

表 65 は、透析ろ過後の J 695 の状態を提供する。

【0693】

【表 73】

表 65

40

試料	タンパク質濃度 [mg/mL]	pH	オスモル浸透圧濃度 [osmol/kg]	視覚的検査
DF/UF 後	107	6.4	10	僅かに乳白光、僅かに黄色、目に見える粒子は実質的に存在しない

【0694】

DF / UF 後に、DF の有効性を評価するために当初の緩衝液成分の濃度を定量的に監視した。全ての結果は、対応する分析法の実際の検出限界を下回る（表 66 参照）ことが見出された（マニトールに対して、RI を有する HPLC 並びに、それぞれ、OPA 標識

50

後のメチオニン及びヒスチジンに対して、蛍光検出)。

【0695】

【表74】

表66

試料	メチオニン [mg/mL]	ヒスチジン [mg/mL]	マニトール [mg/mL]
DF/UF 前	0.669	0.586	18.36
DF/UF 後	<0.13	<0.14	<3.20

【0696】

【表 75】

保存時の J695 の性質決定 表 67 は、保存時に、100mg/mL での J695 DF/UF の安定性を裏付ける。

検査基準	記述	検査の期間 [月]	保存条件 [°C/%RH]	
			+5	+40/75
外観	溶液	最初	適合	
		1	適合	適合
		3	適合	適合
		6	適合	適合
透明性	報告の結果、 参照懸濁液 acc. to Ph. Eur. と比較	最初	<RSII	
		1	—	—
		3	<RSII	<RSII
		6	<RSII	<RSIII
粒状物のきょう雑 目に見える粒子	報告の結果 視覚的スコア (検査した試料の 数)	最初	2.0 (1)	
		1	2.0 (1)	3.0 (1)
		3	1.6 (5)	1.0 (5)
		6	1.1 (9)	1.6 (9)
粒状物のきょう雑 目に見えない粒子	>10 μm: <6000 粒 子/容器	最初	290	
		>10 μm >25 μm	16	
	>25 μm: <600 粒 子/容器	1	—	—
		>10 μm >25 μm	—	—
	3	—	—	
	>10 μm >25 μm	—	—	
	6	124	54	
>10 μm >25 μm	1	3		
サイズ排除 HPLC	報告の結果 (%) 凝集物 (A) 単量体 (M) 断片 (F)	最初	0.9	
		A	98.9	
		M	0.2	
		F		
		1	0.8	2.3
		A	99.0	97.1
		M	0.1	0.6
		F		
		3	1.0	3.4
		A	98.8	95.1
		M	0.1	1.4
		F		
		6	1.4	5.5
A	98.4	85.6		
M	0.1	8.9		
F				

10

20

30

40

検査基準	記述	検査の期間 [月]	保存条件 [°C/%RH]	
			+5	+40/75
SDS-PAGE (非還元条件)	主なバンドパターンは、参照標準のものと同等である。	最初	適合	
		1	適合	適合
		3	適合	適合
		6	適合	適合
SDS-PAGE (還元条件)	主なバンドパターンは、参照標準のものと同等である。	最初	適合	
		1	適合	適合
		3	適合	適合
		6	適合	適合
PCS	Z-平均 [nm] 及び PDI に対する報告結果	最初	0.9 0.23	
		1	0.9 0.23	1.0 0.23
		3	0.9 0.23	1.1 0.24
		6	0.9 0.23	1.3 0.29
陽イオン交換 HPLC	報告の結果 (%) 酸性種 (A) 主なイソフォーム (M) 塩基性種 (B)	最初	5.9 91.5 2.5	
		1	5.6 92.0 2.4	10.6 98.9 0.5
		3	5.7 92.1 2.1	14.4 85.0 0.6
		6	6.0 91.6 2.3	29.6 69.4 1.0

10

20

30

## 【0697】

## 結論

上記実施例は、モノクローナル抗体 J 6 9 5 に対する透析ろ過溶媒として、水 (0.2 μmろ過された精製水) が使用された透析ろ過/限外ろ過 (DF/UF) 実験を提供する。

40

## 【0698】

J 6 9 5 は、DF/UF 交換溶媒として純水を用いる DF/UF 処理プロセスに供され、溶液の混濁、著しい乳白光又は濁度形成を誘導せずに、約 pH 6.4 にて、高い濃度 (100 mg/mL) で製剤化した。

## 【0699】

DF/UF 実験から得られた J 6 9 5 を、最長 6 ヶ月間、2 から 8 及び 40 で、SCF 注射器中に保存された。得られたデータは、タンパク質の好ましい全体的な安定性を示している。

## 【0700】

50

結論的には、DF / UF 交換溶媒として純水を使用してタンパク質を処理し及び製剤化することは実行可能である。理想的な 100 % の賦形剤膜透過率を仮定すると、約 99 . 3 % の最大賦形剤減少率を推定することができる。DF / UF 後に、賦形剤濃度は実際の検出限界を下回るといった証拠が、特定の方法によって与えられる。

## 【 0 7 0 1 】

( 実施例 3 0 )

高濃度アダリムマブ水溶液の凍結融解特性及び安定性検査 - 均一性及び物理的安定性  
低イオン性アダリムマブ溶液の調製

2 L の P E T G 瓶中の薬物物質 ( D S ) 材料 1 . 6 L を、水槽中において、25 °C で融解し、均質化し、透析ろ過交換溶媒として注射用水を用いる DF / UF に供した。以下のパラメータを適用することによって、Satorius Sartoclon Slice 装置を用いた連続モードで、透析ろ過を行った。

10

## 【 0 7 0 2 】

- ポンプ出力 : 8 %
- 圧力注入口 : 最大 1 バール ( 0 . 8 バール )
- 膜 : 2 x P E S 、カットオフ 5 0 k D

透析ろ過の間、浸透圧を 8 m O s m o l / k g まで低下させるのに、5 倍容量交換が十分であった。

## 【 0 7 0 3 】

透析ろ過後の前 ( S E C 、 O D 2 8 0 によるタンパク質濃度、p H 、浸透圧及び密度 ) 及び透析ろ過後 ( O D 2 8 0 によるタンパク質濃度、p H 、浸透圧及び密度 ) に、イン - プロセス - 対照 ( I P C ) 試料を吸引した。I P C 試料は、無菌でなかった。

20

## 【 0 7 0 4 】

透析ろ過後に、水の中に製剤化された約 7 0 m g / m L アダリムマブを、注射用水で 5 0 m g / m L になるように希釈し、5 . 2 になるように、p H 値を調整した。

## 【 0 7 0 5 】

水 p H 5 . 2 の中に製剤化されたアダリムマブ 5 0 m g / m L の 1 . 6 L を 2 L の P E T G 瓶中に再充填した。1 0 0 m g / m L になるように濃度を増加させるために、アダリムマブ溶液の残りの容積を DF / UF に供した。

## 【 0 7 0 6 】

水 p H 5 . 3 の中に製剤化されたアダリムマブ 1 0 0 m g / m L を滅菌ろ過し、そのうち 0 . 8 m L を 1 L の P E T G 瓶の中に充填した。

30

## 【 0 7 0 7 】

分析

- サイズ排除クロマトグラフィー ( S E C )
- p H - 測定
- 浸透圧測定
- 密度測定
- O D 2 8 0 によるタンパク質濃度
- 光学的外観
- イオン交換クロマトグラフィー ( I E C )

40

アダリムマブ 1 L 容器の凍結 / 融解実験

1 L の P E T G 溶液中で水の中に製剤化されたアダリムマブ 1 0 0 ° m g / m L を 2 から 8 °C になるように予め冷却し、次いで、- 8 0 °C で凍結し、1 2 時間を越える凍結サイクル。水槽中において、25 °C で、1 L の P E T G 瓶中の凍結された試料を連続的に融解した。融解の間、凍結された溶液の瓶を、最大液体レベルまで水槽中に浸した。均質化せずに、並びに 1 5 及び 3 0 回、上下を逆さまにすることによる均質化後に、融解直後に以下の試料を吸引した。

## 【 0 7 0 8 】

【表 7 6】

表 6 8 : 試料吸引スキーム

	各瓶の反転	試料	分析検査
1	0	5mL 上部	タンパク質含量、オスモル浸透圧濃度、pH、密度、SEC
2	0	5mL 中央	
3	0	5mL 下部	
4	15	5mL 上部	タンパク質含量、オスモル浸透圧濃度、pH、密度、SEC
5	15	5mL 中央	
6	15	5mL 下部	
7	30	5mL 上部	タンパク質含量、オスモル浸透圧濃度、pH、密度、SEC
8	30	5mL 中央	
9	30	5mL 下部	

10

【 0 7 0 9 】

アダリムマブ溶液の性質決定

水の中に製剤化されたアダリムマブ 50 mg / mL 及び 100 mg / mL は、毎回透明で、淡黄色、非乳白光で、緩やかな動きの後に波状パターンがないように見受けられた。

【 0 7 1 0 】

また、凍結及び融解した後、水中に製剤化されたアダリムマブは、（融解直後に並びに 15 及び 30 回上下を逆さまにした後に）外観を変化させなかった。

20

【 0 7 1 1 】

融解直後に、及び融解直後の試料吸引の間、溶液中に針を浸した直後に、瓶を緩やかな動きの後に、僅かな波状パターンが見られた。

【 0 7 1 2 】

市販の緩衝液中のアダリムマブを用いた類似の実験とは異なり、水中のアダリムマブ溶液 50 mg / mL は、タンパク質濃度、密度及び浸透圧の勾配を一切示さなかった。

【 0 7 1 3 】

アダリムマブ溶液 100 mg / mL も、タンパク質濃度、密度、浸透圧の勾配を一切示さなかった。

30

【 0 7 1 4 】

安定性は、それぞれ、- 30 及び - 80 での 6 ヶ月の保存後に評価した。

【 0 7 1 5 】

以下では、各分析データが概説されている。

【 0 7 1 6 】

【表 7 7】

表 6 9 : アダリムマブ 50 及び 100mg/mL、凍結/融解処理プロセス前

	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	オスモル浸透圧 mOsmol/kg	タンパク質 含量 (重量) Mg/mL	目に見えない粒子		
					1mL >=1 μm	1mL >=10 μm	1mL >=25 μm
50mg/mL、 水中	5.18	1.0121	5	49.3	7953	5	0
100mg/mL、 水中	5.32	1.0262	12	99.8	154	4	2

40

【 0 7 1 7 】

【表 7 8】

表 7 0 : アダリムマブ 50mg/mL、pH5.2、水の中に製剤化、凍結/融解処理プロセス後

回転	試料	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	オスモル 浸透圧 mOsmol/kg	タンパ ク質含 量 mg/mL	純度 (SEC) %	目に見えない粒子		
							1mL >=1 μm	1mL >=10 μm	1mL >=25 μm
0	上部	5.20	1.0119	6	48.7	99.597	—	—	—
0	中央	5.19	1.0120	8	49.4	99.576	—	—	—
0	下部	5.17	1.0120	6	49.8	99.649	—	—	—
15	上部	5.20	1.0120	4	49.7	99.649	—	—	—
15	中央	5.18	1.0120	5	49.2	99.678	—	—	—
15	下部	5.17	1.0120	4	49.1	99.637	—	—	—
30	上部	5.19	1.0120	5	49.7	99.647	1280	4	0
30	中央	5.17	1.0120	3	50.4	99.637	2055	13	0
30	下部	5.18	1.0120	6	48.9	99.611	3889	37	11

【 0 7 1 8 】

【表 7 9】

表 7 1 : アダリムマブ 100mg/mL、pH5.2、水の中に製剤化、凍結/融解処理プロセス後

回転	試料	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	オスモル 浸透圧 mOsmol/kg	タンパ ク質含 量 mg/mL	純度 (SEC) %	目に見えない粒子		
							1mL >=1 μm	1mL >=10 μm	1mL >=25 μm
0	上部	5.29	1.0259	13	98.7	99.424	—	—	—
0	中央	5.3	1.0262	16	99.9	99.468	—	—	—
0	下部	5.28	1.0262	14	101.2	99.48	—	—	—
15	上部	5.27	1.0261	13	98.9	99.511	—	—	—
15	中央	5.27	1.0261	16	97.7	99.466	—	—	—
—	下部	5.28	1.0261	15	97.0	99.483	—	—	—
30	上部	5.29	1.0261	16	96.6	99.439	231	58	49
30	中央	5.28	1.0261	16	97.0	99.467	169	21	9
30	下部	5.28	1.0261	16	99.3	99.476	131	3	1

【 0 7 1 9 】

## 【表 80】

表 72 : アダリムマブ 100mg/mL、pH5.2、水の中に製剤化、保存後の安定性

検査の時点	SEC 凝集物 単量体断片	IEC リジンイソフ ォームの合計	視覚的外観	目に見えない粒子 (1mL)		
				>1 $\mu$ m	>10 $\mu$ m	>25 $\mu$ m
T0	0,55 99,40 0,05	85,523	透明、粒状物 なし	155	3	1
T6月、 -80°C	0,47 99,39 0,14	82,124	透明、粒状物 なし	210	8	5
T6月、 -30°C	1,28 98,58 0,14	81,61	透明、粒状物 なし	171	71	51

10

## 【0720】

## 結論

凍結 / 融解処理プロセス後及び最長 6 ヶ月間の -30 又は -80 の保存後に、50 及び 100 mg/mL で水の中に製剤化されたアダリムマブの顕著な不安定性は、適用された分析法を用いて観察されなかった。

20

## 【0721】

## (実施例 31)

低イオン性製剤中でのアダリムマブの凍結及び融解プロセス - タンパク質含量を含むプロセス設計空間

## 溶液の調製

23 の循環する水槽中で、アダリムマブ BDS (バルク薬物物質) を融解した。限外ろ過 / 透析ろ過 (UF / DF) 法 (Pellicon「Mini」2) を使用して、容量を低下させる目的で、100 mg/mL の標的濃度になるように、溶液を上方濃縮 (up-concentrated) した。Biomax 10K ポリエーテルスルホンを有する Millipore Pellicon 2 接線流ミニカセットの 2 つのカセットを、Pellicon 2 ユニット中に取り付けた。プロセスの開始時に、流速は 60 mL / 分で測定され、供給圧力は 21 psi であった。プロセスは、111.3 mg/mL のタンパク質濃度で停止された。

30

## 【0722】

透析のために、Spectra / Pro 分子多孔性膜チューブを使用した (直径 48 mm、18 mL / cm 容積、75 cm 長)。pH 5.2 のアダリムマブ 100 mg/mL の 8 L の容積を、8 つの透析管に移した。各管に、アダリムマブ 100 mg/mL の 1 L を充填した。溶液 4 L に等しい 4 つの管を、注射用水 36 L を加えた容器中に配置した。すなわち、1 : 10 の溶液交換倍数が達成された。新鮮な注射用水に対して容量が交換される前に、溶液を平衡に達成させた。1 : 100,000 の総溶液交換倍数に到達するまで、溶液交換を 5 回繰り返した。

40

## 【0723】

透析によって溶液を完全に交換した後、第二の UF / DF 工程によって上方濃縮した。第二の UF / DF 工程は、第一の工程と同様に実施した。低イオン性製剤中の 247.5 mg/mL アダリムマブの最終濃度が達成された。UF / DF は、ポリソルベート 80 を既に含有する出発材料を用いて行った。最終タンパク質溶液中に蓄積されるポリソルベート 80 は、0.1% より高いポリソルベート含量をもたらすと予測することができた。

## 【0724】

必要に応じて、タンパク質濃度レベルを低下させるために、247.5 mg/mL アダ

50

リムマブの上方濃縮されたバルク溶液をWFIで希釈した。200 mg/ml、175 mg/ml、150 mg/ml、140 mg/ml、130 mg/ml、120 mg/ml、100 mg/ml、80 mg/ml、50 mg/ml、40 mg/ml及び25 mg/ml。瓶の充填容量は、全ての実験に対して1600 mLであった。

#### 【0725】

##### 凍結操作

この評価では、一連の増加する凍結速度を使用した。超低温凍結装置下部棚<超低温凍結装置中央棚<超低温凍結装置上部棚<<ドライアイス。

#### 【0726】

-70 未満の凍結装置を実験のために使用した(収容容量20.2立方フィート(572リットル)。3つの棚を使用した。各々に、9つの2リットルPETG瓶を配置した。瓶は、凍結装置中に配置する前に、室温で保存した。凍結は、少なくとも48時間継続する。設計空間評価のために、増大する凍結速度を有する3つの位置を選択した。最も遅い凍結速度のために、下部棚の前方位置を使用した。中央棚上の中心位置で、より早い凍結速度を達成した。凍結装置設定中で最も早い凍結速度は、上部棚の後方/右位置で行われた。

10

#### 【0727】

ドライアイスによる凍結において、少なくとも8時間、ドライアイスによって、1つの瓶を完全に囲んだ。Styrofoamボックスでは、ドライアイスの層(約3から5cm厚)で底を覆った。ドライアイス層の上部に立てて、1つの瓶を配置した。その結果、瓶とstyrofoamボックスの内壁との間の空間は、蓋を除く全ての表面が被覆されるまで、ドライアイスで満たされた。凍結時間の後、瓶を取り出し、直ちに融解し、又は保存のために、-70 の凍結装置中に配置した。

20

#### 【0728】

##### 融解操作

この評価では、一連の融解速度を使用した。4 の冷却された空気<<水槽23 <水槽37。

#### 【0729】

##### 分析

試料を性質決定するために、以下の分析を行った。

30

#### 【0730】

- ・浸透圧
- ・伝導度
- ・pH
- ・密度
- ・直接のUV(280nm)によるタンパク質濃度

濃縮試験のために、1.2未満の吸光度が達成されるまで、水で試料を希釈した。1.39の280nmでのアダリムマブ分子に対する吸光係数を使用した。

#### 【0731】

##### アダリムマブ溶液の性質決定

ボトルマッピング研究によって、瓶容積中で勾配形成に対する僅かな傾向が明らかになった。特に、より遅い凍結及び融解速度に関して、瓶の底近くに、より高いタンパク質濃度が検出された。この現象は、伝導度、密度及び浸透圧データ中でも反映された。pHは、全ての検査条件において、実質的に一定であるように見受けられる。

40

#### 【0732】

超低温凍結装置中での瓶を基礎とする系に対する凍結及び融解の設計空間に関する以前の調査において、沈降の外見は、可能な稼動域の境界を決定する主な不具合の様式であることが見出された。この研究では、この境界は観察されなかったが、調査された設計空間は極めて幅広い範囲にわたっていた。この産物の独特の挙動は、この凍結及び融解プロセスの間に濃度勾配を形成する傾向が極めて低いことにも反映されている。以前の研究では

50

、産物及びプロセスに固有の勾配形成が、あるプロセス条件下での沈殿の出現の原因であると結論付けられた。その結果、プロセスの見地から、この系は、最大247.5 mg/mLのバルク薬物物質濃度まで、低イオン性製剤pH5中のアダリムマブに対して実行可能であることが決定された。驚くべきことに、調査されたアダリムマブ水製剤は、検査された他のアダリムマブ製剤と比べて、優れた性能を示した。

【0733】

表73：低イオン性製剤を含有する瓶中での融解直後(23 水槽)の100 mg/mLアダリムマブにおけるタンパク質濃度、伝導度、浸透圧、密度及びpHの分布

【0734】

【表81】

凍結融解条件：-70°C上部/23°C融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	40	11	0.61	5.43	1.021	78.0
2	210	14	0.67	5.43	1.024	92.2
3	225	15	0.70	5.43	1.0253	98.1
4	200	17	0.72	5.46	1.0259	103.9
5	175	18	0.73	5.43	1.0268	100.2
6	180	18	0.74	5.43	1.0275	100.9
7	230	20	0.80	5.46	1.0284	109.1
8	180	22	0.81	5.45	1.0294	111.2
9	150	21	0.82	5.44	1.0307	118.0

【0735】

【表82】

凍結融解条件：-70°C中央/23°C融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	30	8	0.54	5.43	1.0174	65.3
2	175	18	0.68	5.44	1.0235	91.3
3	200	17	0.70	5.44	1.0245	92.1
4	185	17	0.72	5.44	1.0249	102.9
5	200	18	0.71	5.43	1.0248	95.6
6	200	20	0.73	5.44	1.0262	96.6
7	175	20	0.74	5.44	1.0283	107.5
8	180	20	0.77	5.45	1.0306	116.1
9	200	26	0.82	5.44	1.0346	131.1

【0736】

10

20

30

40

【表 8 3】

凍結融解条件：-70°C下部/23°C融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	35	9	0.60	5.41	1.0195	73.2
2	200	13	0.68	5.41	1.0231	89.6
3	225	16	0.70	5.41	1.0241	93.2
4	180	15	0.71	5.41	1.0246	96.8
5	200	15	0.72	5.40	1.0249	95.7
6	200	19	0.73	5.41	1.0259	96.4
7	185	21	0.75	5.42	1.0272	102.6
8	200	26	0.79	5.41	1.0309	116.8
9	175	31	0.85	5.42	1.0372	141.5

10

【0737】

表74：低イオン性製剤を含有する瓶中での融解直後(23 水槽)の140 mg/mL アダリムマブにおけるタンパク質濃度、伝導度、浸透圧、密度及びpHの分布

【0738】

20

【表 8 4】

凍結融解条件：-70°C上部/23°C融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	50	36	0.87	5.43	1.0338	130.0
2	215	42	0.90	5.43	1.0354	139.9
3	170	54	0.91	5.43	1.0362	144.9
4	210	41	0.84	5.44	1.0365	141.5
5	200	40	0.93	5.43	1.0364	157.7
6	200	41	0.92	5.43	1.0364	140.0
7	190	41	0.92	5.43	1.0363	143.4
8	180	44	0.82	5.43	1.037	150.1
9	140	45	0.95	5.41	1.038	146.3

30

【0739】

【表 8 5】

凍結融解条件：-70°C中央/23°C融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	25	32	0.81	5.45	1.0284	112.0
2	175	34	0.84	5.44	1.0307	122.4
3	175	36	0.88	5.44	1.033	133.9
4	200	40	0.90	5.43	1.0342	134.6
5	220	40	0.92	5.43	1.0351	140.9
6	185	45	0.94	5.43	1.0369	143.6
7	210	47	0.97	5.43	1.0384	149.8
8	175	47	0.99	5.43	1.0399	160.3
9	190	48	1.01	5.43	1.0435	168.3

10

【0740】

【表 8 6】

凍結融解条件：-70°C下部/23°C融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	75	28	0.75	5.45	1.0257	88.7
2	180	34	0.82	5.46	1.029	11.6
3	175	34	0.84	5.44	1.0313	123.5
4	220	37	0.86	5.44	1.0322	118.8
5	165	38	0.89	5.45	1.0337	126.3
6	215	44	0.95	5.45	1.0374	137.6
7	210	49	1.00	5.45	1.0407	149.6
8	150	53	1.03	5.43	1.0429	154.9
9	180	60	1.06	5.44	1.0501	183.2

20

30

【0741】

表75：低イオン性製剤を含有する瓶中での融解直後（37℃水槽）の200mg/mLアダリムマブにおけるタンパク質濃度、伝導度、浸透圧、密度及びpHの分布

【0742】

【表 8 7】

凍結融解条件：-70℃上部/23℃融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	40	37	0.89	5.26	1.0573	197.5
2	210	35	0.96	5.24	1.0573	195.3
3	175	34	0.96	5.22	1.0578	200.3
4	210	36	0.88	5.27	1.0579	193.9
5	210	39	0.89	5.24	1.058	210.6
6	190	39	0.84	5.27	1.058	213.8
7	200	41	0.88	5.27	1.058	206.7
8	170	41	0.88	5.24	1.0581	196.6
9	160	39	0.89	5.29	1.0595	201.9

10

【0743】

【表 8 8】

凍結融解条件：-70℃中央/23℃融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	10	31	0.85	5.29	1.0485	170.2
2	185	35	0.89	5.31	1.0505	189.3
3	215	37	0.90	5.33	1.0518	191.7
4	185	38	0.89	5.27	1.0519	191.8
5	200	36	0.90	5.32	1.0528	196.3
6	200	48	0.90	5.28	1.0533	189.3
7	170	37	0.90	5.23	1.0536	193.1
8	215	39	0.91	5.33	1.0552	202.1
9	180	48	0.92	5.31	1.0613	225.5

20

30

【0744】

【表 8 9】

凍結融解条件：-70℃下部/23℃融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	50	22	0.96	5.27	1.0361	107.1
2	185	29	0.83	5.26	1.0422	163.0
3	180	38	0.88	5.27	1.0522	201.2
4	185	41	0.90	5.24	1.0535	198.9
5	180	44	0.92	5.28	1.0552	201.4
6	195	40	0.91	5.32	1.0558	201.7
7	180	40	0.91	5.32	1.0560	199.6
8	175	41	0.85	5.26	1.0568	206.2
9	190	48	0.91	5.3	1.0619	229.3

40

50

## 【 0 7 4 5 】

表 7 6 : 低イオン性製剤を含有する瓶中での融解直後 ( 2 3 水槽 ) の 2 4 7 . 5 m g / m L アダリムマブにおけるタンパク質濃度、伝導度、浸透圧、密度及び p H の分布

## 【 0 7 4 6 】

## 【表 9 0】

凍結融解条件 : - 7 0 ° C 上部 / 2 3 ° C 融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	65	46	0.98	5.28	1.0755	260.9
2	190	72	0.97	5.28	1.0751	270.8
3	190	56	0.97	5.28	1.0751	314.7
4	200	49	0.96	5.27	1.0751	274.8
5	200	58	0.96	5.27	1.0752	278.4
6	210	57	0.97	5.28	1.0752	275.0
7	210	76	0.96	5.28	1.0748	276.5
8	175	75	0.96	5.27	1.0754	274.5
9	150	62	0.97	5.28	1.0763	276.3

10

## 【 0 7 4 7 】

## 【表 9 1】

凍結融解条件 : - 7 0 ° C 中央 / 2 3 ° C 融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	80	37	0.95	5.29	1.0671	250.0
2	200	59	0.95	5.32	1.0704	251.3
3	175	51	0.97	5.31	1.0722	262.7
4	215	56	0.98	5.31	1.073	327.1
5	200	48	0.99	5.31	1.0739	267.7
6	200	67	0.98	5.31	1.0744	270.6
7	230	59	0.95	5.32	1.0753	273.2
8	175	70	0.96	5.32	1.0771	273.3
9	175	83	0.96	5.32	1.0825	289.6

30

## 【 0 7 4 8 】

【表 9 2】

凍結融解条件：-7 0°C下部/2 3°C融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	50	32	0.92	5.24	1.0632	215.3
2	220	59	0.95	5.27	1.069	221.7
3	175	72	0.96	5.27	1.0708	268.1
4	180	58	0.96	5.27	1.0725	260.7
5	210	63	0.96	5.27	1.0729	266.8
6	150	69	0.96	5.28	1.0744	280.3
7	225	50	0.96	5.29	1.0762	280.3
8	200	68	0.95	5.28	1.0789	288.6
9	180	70	0.95	5.29	1.0846	293.0

10

【0 7 4 9】

表 7 7 : ドライアイス凍結後の低イオン性製剤を含有する瓶中での融解直後 ( 2 3 水槽 ) の 2 4 7 . 5 mg / mL アダリムマブにおけるタンパク質濃度、伝導度、浸透圧、密度及び pH の分布

20

【0 7 5 0】

【表 9 3】

凍結融解条件：ドライアイス凍結/2 3°C融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	50	51	0.94	5.28	1.0643	258.9
2	210	68	0.94	5.29	1.0783	261.9
3	180	50	0.95	5.29	1.0702	251.7
4	190	69	0.95	5.29	1.0732	262.2
5	210	72	0.96	5.31	1.0738	274.4
6	225	63	0.95	5.3	1.0746	265.7
7	160	57	0.95	5.3	1.0747	261.9
8	190	63	0.95	5.31	1.0749	270.9
9	200	50	0.95	5.31	1.075	271.4

30

【0 7 5 1】

【表 9 4】

凍結融解条件：ドライアイス凍結／2から8℃融解

試料名	容量 mL	オスモル 浸透圧 mosm/kg	伝導度 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	アダリムマブ濃度 mg/mL
1	50	44	0.96	5.29	1.0665	263.1
2	190	53	0.96	5.31	1.0684	258.1
3	200	56	0.96	5.30	1.0691	247.6
4	200	58	0.96	5.30	1.0693	262.2
5	190	64	0.95	5.31	1.0695	243.2
6	200	61	0.95	5.3	1.0695	266.8
7	175	49	0.96	5.32	1.0697	256.2
8	200	50	0.95	5.31	1.0697	261.2
9	175	48	0.96	5.32	1.0704	247.1

【 0 7 5 2 】

【表 9 5】

## 付表 A:PCS データ

## アダリムマブ

濃度 [mg/mL]	濃度 [mg/mL] 平均値	z-平均 [nm]	z-平均 平均値[nm]	ピーク単量体 [nm]	ピーク単量体 平均値[nm]
9,35	9,35	2,08	2,08	2,55	2,55
23,40	23,27	2,30	2,47	2,81	2,87
22,70		2,77		3,01	
23,70		2,36		2,78	
34,80	34,20	1,56	1,55	1,85	1,87
35,70		1,54		1,82	
32,10		1,56		1,93	
35,40	36,10	1,61	1,63	1,92	1,92
36,10		1,64		1,93	
36,80		1,63		1,92	
42,10	43,00	1,75	1,75	2,12	2,12
45,60		1,78		2,15	
41,30		1,74		2,10	
60,20	57,40	2,06	2,02	2,27	2,37
55,90		2,04		2,45	
56,10		1,98		2,39	
63,20	65,87	2,11	2,24	2,52	2,67
71,70		2,49		2,89	
62,70		2,13		2,61	
73,40	75,13	2,38	2,41	2,83	2,89
75,60		2,51		3,01	
76,40		2,35		2,82	
78,60	78,07	2,53	2,55	2,99	2,99
78,80		2,62		3,01	
76,80		2,50		2,96	
90,40	95,73	2,80	2,85	3,35	3,41
107,40		2,99		3,55	
89,40		2,76		3,33	
96,20	94,77	2,88	2,86	3,50	3,50
96,00		2,91		3,61	
92,10		2,80		3,38	
201,00	206,63	4,52	4,82	5,22	5,74
227,50		5,04		6,12	
191,40		4,89		5,89	

10

20

30

40

【 0 7 5 3 】

【表 9 6】

J695

濃度 [mg/mL]	濃度 [mg/mL] 平均値	z-平均 [nm]	z-平均 平均値[nm]	ピーク単量体 [nm]	ピーク単量体 平均値[nm]
9, 99	9, 99	2, 28	2, 28	1, 66	1, 66
19, 31	19, 29	2, 05	2, 12	1, 81	1, 81
19, 26		2, 30		1, 79	
19, 29		2, 02		1, 84	
29, 59	29, 40	1, 78	1, 62	1, 10	1, 16
29, 7		1, 51		1, 15	
28, 91		1, 56		1, 22	
37, 97	37, 55	1, 51	1, 56	1, 22	1, 23
38, 02		1, 67		1, 22	
36, 65		1, 49		1, 24	
49, 15	46, 32	1, 64	1, 58	1, 31	1, 29
45, 95		1, 57		1, 30	
43, 87		1, 53		1, 26	
58, 75	56, 18	1, 60	1, 61	1, 49	1, 47
55, 02		1, 71		1, 38	
54, 76		1, 53		1, 53	
77, 69	77, 81	2, 64	2, 43	2, 73	2, 61
77, 62		2, 31		2, 57	
78, 13		2, 35		2, 52	
94, 45	97, 65	2, 11	2, 07	2, 05	2, 05
105, 06		2, 14		2, 05	
93, 45		1, 97		2, 04	
116, 37	114, 52	3, 69	2, 69	1, 95	2, 00
113, 92		2, 25		2, 06	
113, 27		2, 13		1, 99	
121, 21	133, 25	9, 78	9, 49	11, 50	11, 00
139, 8		9, 63		11, 10	
138, 73		9, 06		10, 40	
226, 67	217, 53	4, 94	5, 34	4, 72	4, 84
216, 1		6, 01		5, 25	
209, 83		5, 06		4, 55	

10

20

30

【 0 7 5 4 】

【表 97】

## ヒト血清アルブミン

濃度 [mg/mL]	濃度 [mg/mL] 平均値	z-平均 [nm]	z-平均 平均値[nm]	ピーク単量体 [nm]	ピーク単量体 平均値[nm]
9,88	9,88	14,90	14,90	2,32	2,32
22,94	22,89	8,26	8,29	1,2	1,18
22,73		8,28		1,18	
23,00		8,33		1,17	
36,78	36,47	7,40	7,44	1,22	1,23
37,33		7,80		1,24	
35,29		7,12		1,22	
45,97	46,06	7,09	6,92	1,27	1,25
47,61		6,54		1,24	
44,61		7,13		1,25	
58,47	58,56	5,94	6,13	1,3	1,31
62,69		6,04		1,31	
54,52		6,41		1,32	
61,89	60,31	5,83	6,14	1,33	1,32
59,76		6,57		1,34	
59,28		6,01		1,29	
75,37	76,24	5,58	5,46	1,4	1,40
83,69		5,14		1,45	
69,67		5,67		1,36	
92,90	85,87	5,30	5,14	1,49	1,47
84,22		5,05		1,49	
80,50		5,08		1,43	
115,93	112,74	4,78	4,94	1,68	1,61
110,00		5,04		1,58	
112,30		4,99		1,57	
182,79	177,69	9,85	9,13	2,27	2,19
178,24		9,29		2,21	
172,05		8,26		2,08	

10

20

30

【 0 7 5 5 】

【表 9 8】

## 付表 B:SEC データ

## アダリムマブ

濃度 [mg/mL]	平均濃度 [mg/mL]	単量体 [%]	平均 単量体 [%]	凝集物 [%]	平均 凝集物 [%]	断片 [%]	断片 [%]
9, 35	9, 35	99, 40	99, 40	0, 50	0, 50	0, 10	0, 10
23, 40	23, 27	99, 60	99, 57	0, 40	0, 40	0, 10	0, 10
22, 70		99, 50		0, 40		0, 10	
23, 70		99, 60		0, 40		0, 10	
34, 80	34, 20	99, 50	99, 47	0, 50	0, 47	0, 10	0, 10
35, 70		99, 40		0, 50		0, 10	
32, 10		99, 50		0, 40		0, 10	
35, 40	36, 10	99, 40	99, 40	0, 60	0, 53	0, 10	0, 10
36, 10		99, 40		0, 50		0, 10	
36, 80		99, 40		0, 50		0, 10	
42, 10	43, 00	99, 40	99, 33	0, 50	0, 57	0, 10	0, 10
45, 60		99, 30		0, 60		0, 10	
41, 30		99, 30		0, 60		0, 10	
60, 20	57, 40	99, 30	99, 30	0, 60	0, 60	0, 10	0, 10
55, 90		99, 30		0, 60		0, 10	
56, 10		99, 20		0, 60		0, 10	
63, 20	65, 87	99, 30	99, 27	0, 60	0, 67	0, 10	0, 10
71, 70		99, 20		0, 70		0, 10	
62, 70		99, 20		0, 70		0, 10	
73, 40	75, 13	99, 60	99, 23	0, 70	0, 70	0, 10	0, 10
75, 60		99, 30		0, 70		0, 10	
76, 40		99, 30		0, 70		0, 10	
78, 60	78, 07	99, 30	99, 30	0, 60	0, 60	0, 10	0, 10
78, 80		99, 30		0, 60		0, 10	
76, 80		99, 40		0, 60		0, 10	
90, 40	95, 73	99, 20	99, 13	0, 80	0, 80	0, 10	0, 10
107, 40		99, 10		0, 80		0, 10	
89, 40		99, 10		0, 80		0, 10	
96, 20	94, 77	99, 10	99, 03	0, 80	0, 87	0, 10	0, 10
96, 00		99, 00		0, 90		0, 10	
92, 10		99, 00		0, 90		0, 10	
201, 00	206, 63	98, 80	98, 80	1, 10	1, 10	0, 10	0, 10
227, 50		98, 80		1, 10		0, 10	
191, 40		98, 80		1, 10		0, 10	

【 0 7 5 6 】

10

20

30

40

【表 9 9】

J695

濃度 [mg/mL]	平均濃度 [mg/mL]	単量体 [%]	平均 単量体 [%]	凝集物 [%]	平均 凝集物 [%]	断片 [%]	断片 [%]
9, 99	9, 99	99, 39	99, 39	0, 44	0, 44	0, 17	0, 17
19, 31	19, 29	99, 38	99, 38	0, 44	0, 44	0, 18	0, 19
19, 26		99, 37		0, 44		0, 20	
19, 29		99, 38		0, 44		0, 18	
29, 59	29, 40	99, 31	99, 33	0, 51	0, 50	0, 18	0, 18
29, 70		99, 32		0, 50		0, 18	
28, 91		99, 35		0, 48		0, 17	
37, 97	37, 55	99, 31	99, 29	0, 52	0, 52	0, 17	0, 19
38, 02		99, 27		0, 52		0, 21	
36, 65		99, 30		0, 51		0, 19	
49, 15	46, 32	99, 19	99, 20	0, 60	0, 60	0, 21	0, 20
45, 95		99, 20		0, 60		0, 20	
43, 87		99, 20		0, 61		0, 19	
58, 75	56, 18	99, 16	99, 16	0, 64	0, 64	0, 21	0, 21
55, 02		99, 17		0, 64		0, 20	
54, 76		99, 15		0, 63		0, 22	
77, 69	77, 81	99, 11	99, 10	0, 70	0, 70	0, 19	0, 20
77, 62		99, 09		0, 69		0, 22	
78, 13		99, 10		0, 70		0, 20	
94, 45	97, 65	99, 05	99, 06	0, 72	0, 71	0, 23	0, 22
105, 06		99, 06		0, 72		0, 21	
93, 45		99, 07		0, 70		0, 23	
116, 37	114, 52	98, 94	98, 91	0, 85	0, 88	0, 21	0, 22
113, 92		98, 91		0, 88		0, 22	
113, 27		98, 89		0, 90		0, 22	
121, 21	133, 25	98, 87	98, 89	0, 91	0, 90	0, 22	0, 22
139, 80		98, 89		0, 89		0, 22	
138, 73		98, 90		0, 89		0, 21	
226, 67	217, 53	98, 58	98, 57	1, 19	1, 21	0, 24	0, 22
216, 10		98, 58		1, 18		0, 24	
209, 83		98, 54		1, 25		0, 21	
201, 00	206, 63	98, 80	98, 80	1, 10	1, 10	0, 10	0, 23
227, 50		98, 80		1, 10		0, 10	
191, 40		98, 80		1, 10		0, 10	

【 0 7 5 7 】

10

20

30

40

【表 100】

## ヒト血清アルブミン

試料	ピーク 1		ピーク 2		ピーク 3		ピーク 4 (HAS)	
	面積 [mV]	面積 [%]	面積 [mV]	面積 [%]	面積 [mV]	面積 [%]	面積 [mV]	面積 [%]
試料 1 C=9, 88mg/mL	59, 710	2, 312	2, 975	0, 115	43, 159	1, 671	2477, 282	95, 902
試料 2 C=22, 94mg/mL	102, 785	2, 685	7, 859	0, 205	73, 588	1, 923	3643, 350	95, 187
試料 3 C=22, 73mg/mL	124, 226	3, 071	11, 038	0, 273	83, 310	2, 059	3826, 908	94, 597
試料 4 C=23, 00mg/mL	138, 353	3, 266	14, 525	0, 343	88, 429	2, 087	3994, 990	94, 304
試料 5 C=36, 78mg/mL	147, 465	3, 459	14, 537	0, 341	91, 304	2, 14	4010, 385	94, 059
試料 6 C=37, 33mg/mL	153, 956	3, 552	14, 707	0, 339	94, 093	2, 17	4071, 680	93, 938
試料 7 C=35, 29mg/mL	171, 478	3, 608	16, 064	0, 338	105, 244	2, 214	4459, 830	93, 839
試料 8 C=45, 97mg/mL	180, 027	3, 675	17, 392	0, 355	109, 717	2, 239	4592, 102	93, 731
試料 9 C=47, 61mg/mL	193, 325	3, 719	19, 206	0, 370	116, 474	2, 241	4868, 705	93, 670
試料 10 C=44, 61mg/mL	191, 512	3, 799	19, 167	0, 380	112, 261	2, 227	4718, 554	93, 594
試料 11 C=58, 47mg/mL	215, 044	4, 026	17, 870	0, 335	118, 481	2, 218	4989, 978	93, 421
試料 12 C=62, 69mg/mL	218, 072	4, 037	20, 088	0, 372	122, 251	2, 263	5041, 542	93, 328
試料 13 C=54, 52mg/mL	228, 014	4, 053	19, 957	0, 355	126, 583	2, 250	5251, 513	93, 343
試料 14 C=61, 89mg/mL	231, 235	4, 085	22, 518	0, 398	127, 330	2, 250	5279, 038	93, 267
試料 15 C=59, 76mg/mL	237, 894	4, 100	22, 939	0, 395	130, 352	2, 246	5411, 384	93, 258
試料 16 C=59, 28mg/mL	202, 103	4, 139	17, 178	0, 352	108, 780	2, 228	4554, 912	93, 282
試料 17 C=75, 37mg/mL	230, 552	4, 196	18, 565	0, 338	123, 207	2, 242	5122, 467	93, 224
試料 18 C=83, 69mg/mL	215, 365	4, 162	18, 136	0, 351	110, 152	2, 129	4830, 372	93, 358

10

20

30

40

試料	ピーク 1		ピーク 2		ピーク 3		ピーク 4 (HAS)	
	面積 [mV]	面積 [%]	面積 [mV]	面積 [%]	面積 [mV]	面積 [%]	面積 [mV]	面積 [%]
試料 2 1 C=84, 22mg/mL	233, 866	4, 316	21, 951	0, 405	116, 325	2, 147	5046, 183	93, 132
試料 2 2 C=80, 50mg/mL	221, 816	4, 461	18, 940	0, 381	111, 006	2, 232	4620, 655	92, 926
試料 2 3 C=115, 93mg/mL	223, 187	4, 783	16, 684	0, 358	104, 116	2, 231	4322, 732	92, 629
試料 2 4 C=110, 00mg/mL	209, 281	4, 718	18, 745	0, 423	96, 430	2, 174	4111, 363	92, 686
試料 2 5 C=112, 30mg/mL	172, 657	4, 537	15, 457	0, 406	80, 850	2, 125	3536, 192	92, 932
試料 2 6 C=182, 79mg/mL	178, 208	4, 950	15, 254	0, 424	80, 906	2, 247	3325, 648	92, 379
試料 2 7 C=178, 24mg/mL	194, 516	4, 814	17, 323	0, 429	90, 433	2, 238	3738, 717	95, 520
試料 2 8 C=172, 05mg/mL	79, 605	2, 103	12, 876	0, 340	74, 965	1, 981	3617, 238	95, 576

10

20

【 0 7 5 8 】

【表 1 0 1】

付表C：IECデータ

アダリムマブ

濃度 [mg/mL]	平均濃度 [mg/mL]	合計リジン [%]	平均合計 [%]
9, 35	9, 35	86, 09	86, 09
23, 40	23, 27	86, 15	86, 13
22, 70		86, 12	
23, 70		86, 13	
34, 80	34, 20	86, 15	86, 11
35, 70		86, 11	
32, 10		86, 06	
35, 40	36, 10	86, 03	86, 04
36, 10		86, 06	
36, 80		86, 03	
42, 10	43, 00	85, 98	85, 96
45, 60		85, 95	
41, 30		85, 95	
60, 20	57, 40	85, 97	85, 96
55, 90		85, 94	
56, 10		85, 97	
63, 20	65, 87	85, 96	85, 94
71, 70		85, 97	
62, 70		85, 90	
73, 40	75, 13	85, 99	85, 97
75, 60		85, 98	
76, 40		85, 95	
78, 60	78, 07	86, 00	85, 97
78, 80		85, 97	
76, 80		85, 94	
90, 40	95, 73	85, 96	85, 92
107, 40		85, 97	
89, 40		85, 83	
96, 20	94, 77	85, 93	85, 88
96, 00		85, 87	
92, 10		85, 84	
201, 00	206, 63	85, 88	85, 90
227, 50		85, 97	
191, 40		85, 84	

10

20

30

40

【 0 7 5 9 】

【表 1 0 2】

J695

	平均濃度 [mg/mL]	合計 ピーク 1-7 [%]	平均合計 ピーク 1-7 [%]	合計酸性 ピーク 1-7 [%]	平均合計 酸性 ピーク 1-7 [%]	合計 塩基性 ピーク 1-7 [%]	平均合計 塩基性 ピーク 1-7 [%]
9, 99	9, 99	89, 24	89, 24	10, 24	10, 24	0, 52	0, 52
19, 31	19, 29	89, 32	89, 28	10, 19	10, 21	0, 50	0, 51
19, 26		89, 23		10, 26		0, 52	
19, 29		89, 30		10, 19		0, 51	
29, 59	29, 40	89, 33	89, 30	10, 14	10, 17	0, 54	0, 53
29, 70		89, 26		10, 20		0, 54	
28, 01		89, 32		10, 16		0, 52	
37, 97	37, 55	89, 32	89, 30	10, 13	10, 15	0, 56	0, 55
38, 02		89, 27		10, 18		0, 55	
36, 65		89, 31		10, 15		0, 55	
49, 15	46, 32	89, 07	89, 10	10, 40	10, 37	0, 53	0, 53
45, 95		89, 12		10, 34		0, 54	
43, 87		89, 12		10, 36		0, 53	
58, 75	56, 18	89, 13	89, 17	10, 36	10, 31	0, 52	0, 53
55, 02		89, 21		10, 27		0, 52	
54, 76		89, 18		10, 29		0, 54	
77, 69	77, 81	89, 22	89, 17	10, 25	10, 29	0, 53	0, 54
77, 62		89, 09		10, 36		0, 55	
78, 13		89, 20		10, 26		0, 55	
94, 45	97, 65	89, 20	89, 16	10, 28	10, 30	0, 52	0, 54
105, 06		89, 12		10, 33		0, 55	
93, 45		89, 16		10, 29		0, 55	
116, 37	114, 52	89, 03	89, 08	10, 41	10, 36	0, 56	0, 55
113, 92		89, 15		10, 31		0, 54	
113, 27		89, 06		10, 37		0, 56	
121, 21	133, 25	89, 26	89, 13	10, 20	10, 33	0, 54	0, 55
139, 80		89, 07		10, 38		0, 56	
138, 73		89, 05		10, 40		0, 55	
226, 67	217, 53	88, 72	88, 78	10, 69	10, 63	0, 59	0, 59
216, 10		88, 82		10, 60		0, 58	
209, 83		88, 81		10, 60		0, 59	

10

20

30

40

【 0 7 6 0 】

【表 103】

付表D

検査項目	要素	検査の期間	63mg/mL	220mg/mL
			5°C	5°C
透明性及び乳白色	濁り	最初	3,6	8,0
		1ヶ月	3,5	8,0
		3ヶ月	3,5	7,4
液体の発色の度合い	Bスケール	最初	<B9	=B9
		1ヶ月	<B9	<B8
		3ヶ月	<B9	<B7
pH	単一の値	最初	5,3	5,4
		1ヶ月	5,3	5,4
		3ヶ月	5,3	5,4
粒状物のきょう雑:目に見える粒子	視覚スコア	最初	2,2	0,2
		1ヶ月	2,2	0,4
		3ヶ月	2,1	0,2
粒状物のきょう雑:目に見えない粒子	粒子>=10 $\mu$ m [/容器]	最初	181	357
		1ヶ月	423	290
		3ヶ月	216	1762
	粒子>=25 $\mu$ m [/容器]	最初	15	3
		1ヶ月	11	18
		3ヶ月	2	50
サイズ排除クロマトグラフィー (SE-HPLC)	主ピーク (凝集物) [%]	最初	0,2	0,5
		1ヶ月	0,2	0,6
		3ヶ月	0,2	0,7
	主ピーク (単量体) [%]	最初	99,8	99,4
		1ヶ月	99,7	99,3
		3ヶ月	99,7	99,2
	主ピーク (断片) [%]	最初	0,1	0,1
		1ヶ月	0,1	0,1
		3ヶ月	0,0	0,0
陽イオン交換 HPLC (CEX-HPLC)	第一の酸性領域 [%]	最初	2,2	2,2
		1ヶ月	2,2	2,2
		3ヶ月	2,1	2,0
	第二の酸性領域 [%]	最初	10,4	10,3
		1ヶ月	10,2	10,0
		3ヶ月	10,4	10,2
	リジン変形物の合計 [%]	最初	86,0	86,1
		1ヶ月	85,9	85,9
		3ヶ月	86,2	86,1
	リジン 1 とリジン 2 の間のピーク [%]	最初	0,8	0,8
		1ヶ月	1,0	1,0
		3ヶ月	0,8	0,8
	リジン 2 の後のピーク [%]	最初	0,5	0,6
		1ヶ月	0,7	0,9
		3ヶ月	0,5	0,8

【0761】

【表 104】

検査項目	要素	検査の期間	63mg/mL	220mg/mL
			25°C/60%相対湿度	25°C/60%相対湿度
透明性及び乳白色	濁り	最初	—	—
		1ヶ月	3,51	8,55
		3ヶ月	3,70	7,56
液体の発色の度合い	Bスケール	最初	—	—
		1ヶ月	<B9	<B8
		3ヶ月	<B9	<B7
pH	単一の値	最初	—	—
		1ヶ月	5,4	5,4
		3ヶ月	5,3	5,4
粒状物のきょう雑:目に見える粒子	視覚スコア	最初	—	—
		1ヶ月	2,5	0,7
		3ヶ月	3,4	0,0
粒状物のきょう雑:目に見えない粒子	粒子>=10μm [/容器]	最初	—	—
		1ヶ月	412	490
		3ヶ月	277	4516
	粒子>=25μm [/容器]	最初	—	—
		1ヶ月	10	14
		3ヶ月	7	128
サイズ排除クロマトグラフィー (SE-HPLC)	主ピーク (凝集物) [%]	最初	—	—
		1ヶ月	0,3	0,8
		3ヶ月	0,4	1,1
	主ピーク (単量体) [%]	最初	—	—
		1ヶ月	99,6	99,0
		3ヶ月	99,4	98,6
	主ピーク (断片) [%]	最初	—	—
		1ヶ月	0,2	0,2
		3ヶ月	0,2	0,2
陽イオン交換 HPLC (CEX-HPLC)	第一の酸性領域 [%]	最初	—	—
		1ヶ月	2,5	2,4
		3ヶ月	3,4	3,2
	第二の酸性領域 [%]	最初	—	—
		1ヶ月	11,7	11,4
		3ヶ月	15,3	14,9
	リジン変形物の合計 [%]	最初	—	—
		1ヶ月	83,6	83,8
		3ヶ月	79,2	79,2
	リジン 1 とリジン 2 の間のピーク [%]	最初	—	—
		1ヶ月	1,2	1,3
		3ヶ月	1,3	1,3
	リジン 2 の後のピーク [%]	最初	—	—
		1ヶ月	0,9	1,1
		3ヶ月	0,8	1,4

【 0 7 6 2 】

10

20

30

40

【表 105】

検査項目	要素	検査の期間	63mg/mL	220mg/mL
			40°C/75%相対湿度	40°C/75%相対湿度
透明性及び乳白色	濁り	最初	—	—
		1ヶ月	3,93	7,80
		3ヶ月	3,70	8,10
液体の発色の度合い	Bスケール	最初	—	—
		1ヶ月	=B9	=B8
		3ヶ月	<B8	<B7
pH	単一の値	最初	—	—
		1ヶ月	5,3	5,4
		3ヶ月	5,3	5,4
粒状物のきょう雑: 目に見える粒子	視覚スコア	最初	—	—
		1ヶ月	6,7	0,5
		3ヶ月	17,5	0,4
粒状物のきょう雑: 目に見えない粒子	粒子>=10μm [/容器]	最初	—	—
		1ヶ月	1088	518
		3ヶ月	166	612
	粒子>=25μm [/容器]	最初	—	—
		1ヶ月	16	14
		3ヶ月	11	30
サイズ排除クロマトグラフィー (SE-HPLC)	主ピーク (凝集物) [%]	最初	—	—
		1ヶ月	0,4	1,4
		3ヶ月	0,8	2,5
	主ピーク (単量体) [%]	最初	—	—
		1ヶ月	99,0	98,0
		3ヶ月	97,8	96,0
	主ピーク (断片) [%]	最初	—	—
		1ヶ月	0,6	0,6
		3ヶ月	1,4	1,5
陽イオン交換 HPLC (CEX-HPLC)	第一の酸性領域 [%]	最初	—	—
		1ヶ月	6,7	6,8
		3ヶ月	17,5	17,4
	第二の酸性領域 [%]	最初	—	—
		1ヶ月	25,1	23,6
		3ヶ月	40,9	38,6
	リジン変形物の合計 [%]	最初	—	—
		1ヶ月	64,5	62,0
		3ヶ月	36,0	36,0
	リジン 1 とリジン 2 の間のピーク [%]	最初	—	—
		1ヶ月	2,2	2,5
		3ヶ月	2,9	3,1
	リジン 2 の後のピーク [%]	最初	—	—
		1ヶ月	1,5	5,2
		3ヶ月	1,7	4,8

10

20

30

40

【 0 7 6 3 】

【表 106】

2 から 8 °C

検査項目	成分	検査の期間										検査の期間									
		L150 01 <sup>2</sup>	L150 02 <sup>2</sup>	L150 03 <sup>2</sup>	L150 04 <sup>2</sup>	L150 05 <sup>2</sup>	L150 06 <sup>2</sup>	L150 07 <sup>2</sup>	L150 08 <sup>2</sup>	L1200 01 <sup>2</sup>	L1200 02 <sup>2</sup>	L1200 03 <sup>2</sup>	L1200 04 <sup>2</sup>	L1200 05 <sup>2</sup>	L1200 06 <sup>2</sup>	L1200 07 <sup>2</sup>	L1200 08 <sup>2</sup>				
透過性及び乳白色	吸収 (340nm)	最初	0.096	0.096	0.095	0.100	0.104	0.105	0.099	0.107	0.181	0.187	0.182	0.192	0.184	0.197	0.191	0.199			
		1ヶ月	0.102	0.102	0.093	0.094	0.099	0.101	0.097	0.100	0.181	0.185	0.189	0.181	0.190	0.180	0.192	0.192			
		最終																			
PH	単一の値	最初	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5			
		1ヶ月	5.4	5.5	5.4	5.4	5.5	5.4	5.5	5.5	5.6	5.6	5.5	5.6	5.6	5.5	5.6	5.6	5.6		
		最終	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6		
		1ヶ月	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1.7	0.2	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.7		
		最終	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.7	99.7	99.7	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3		
		1ヶ月	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.3	99.3	99.2	99.3	99.2	99.2	99.2	99.2		
		最終	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1		
		1ヶ月	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		
		最終	3.8	3.7	3.7	3.7	3.7	3.9	3.8	3.8	3.7	3.8	3.6	3.6	4.5	3.9	2.7	2.7	2.8		
		1ヶ月	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.5	3.4	3.4	3.4	3.4	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5		
		最終	10.9	10.7	10.4	10.5	10.4	10.1	10.3	10.2	10.4	10.2	9.8	9.8	10.1	9.5	11.6	11.5	11.3		
		1ヶ月	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.1	9.0	9.1	9.1	9.1	9.0	9.1	9.1	9.1		
最終	83.8	84.2	84.4	84.3	84.4	84.6	84.4	84.6	84.6	84.6	85.2	85.2	83.9	85.2	84.4	84.3	84.5				
1ヶ月	86.0	86.0	86.0	86.0	86.0	85.9	86.1	86.0	86.3	86.1	86.1	86.2	86.0	86.0	86.0	86.1	86.1				
最終	0.9	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8				
1ヶ月	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8	0.7	0.6	0.6				
最終	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6				
1ヶ月	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7				

無色透明

無色透明

【 0 7 6 4 】

【表 107】

25℃

検査項目	成分	検査の期間	無色透明															
			LI50 01 <sup>2</sup>	LI50 02 <sup>2</sup>	LI50 03 <sup>2</sup>	LI50 04 <sup>2</sup>	LI50 05 <sup>2</sup>	LI50 06 <sup>2</sup>	LI50 07 <sup>2</sup>	LI50 08 <sup>2</sup>	LI200 01 <sup>2</sup>	LI200 02 <sup>2</sup>	LI200 03 <sup>2</sup>	LI200 04 <sup>2</sup>	LI200 05 <sup>2</sup>	LI200 06 <sup>2</sup>	LI200 07 <sup>2</sup>	LI200 08 <sup>2</sup>
透明性及び乳白色	吸収 (340nm)	最初	0.096	0.096	0.095	0.100	0.104	0.105	0.099	0.107	0.181	0.187	0.182	0.192	0.184	0.197	0.191	0.199
		1ヶ月	0.106	0.109	0.096	0.099	0.104	0.104	0.096	0.105	0.178	0.177	0.198	0.199	0.200	0.194	0.194	0.172
染色の感色い	視覚	最初	無色透明															
		1ヶ月	無色透明															
pH	値	最初	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5	5.6	5.5
		1ヶ月	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.5	5.6	5.6	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
サイズ排除クロマトグラフ (SE-HPLC)	主ピーク (凝集物) [%]	最初	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6
		1ヶ月	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	?	0.2	0.2	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9
サイズ排除クロマトグラフ (SE-HPLC)	主ピーク (断片) [%]	最初	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.7	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3
		1ヶ月	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	?	99.5	99.5	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	98.9
陽イオン交換クロマトグラフ (CEX-HPLC)	第一の酸性領域 [%]	最初	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
		1ヶ月	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	?	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
陽イオン交換クロマトグラフ (CEX-HPLC)	第二の酸性領域 [%]	最初	3.8	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.8	3.8	3.7	3.6	4.5	3.9	2.7	2.7	2.7	2.8
		1ヶ月	4.1	4.2	4.1	4.1	4.2	4.2	4.1	4.2	4.0	4.1	4.1	4.1	4.0	4.1	4.1	4.0
陽イオン交換クロマトグラフ (CEX-HPLC)	リジン1とリジン2の間のピーク [%]	最初	10.9	10.7	10.4	10.5	10.4	10.1	10.3	10.2	10.4	10.2	9.8	10.1	9.5	11.6	11.5	11.3
		1ヶ月	10.9	10.9	11.0	10.9	11.0	11.0	11.0	11.1	10.6	10.7	10.7	10.7	10.7	10.7	10.7	10.9
陽イオン交換クロマトグラフ (CEX-HPLC)	リジン1とリジン2の間のピーク [%]	最初	83.8	84.2	84.4	84.3	84.4	84.6	84.4	84.6	84.4	85.2	83.9	86.2	84.4	84.3	84.5	84.5
		1ヶ月	83.3	83.4	83.3	83.3	83.2	83.2	83.3	83.1	83.4	83.4	83.6	83.6	83.5	83.5	83.3	83.4
陽イオン交換クロマトグラフ (CEX-HPLC)	リジン2後のピーク [%]	最初	0.9	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
		1ヶ月	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	0.8	0.7	0.7	0.7	0.8	0.9	0.8
陽イオン交換クロマトグラフ (CEX-HPLC)	リジン2後のピーク [%]	最初	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
		1ヶ月	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9

【 0 7 6 5 】

【表 108】

40℃

検査項目	成分	検査の期間	黄色透明																	
			L150 01*	L150 02*	L150 03*	L150 04*	L150 05*	L150 06*	L150 07*	L150 08*	L1200 01*	L1200 02*	L1200 03*	L1200 04*	L1200 05*	L1200 06*	L1200 07*	L1200 08*		
透明度及び乳白色	吸収 (840nm)	検出	0.096	0.096	0.100	0.101	0.111	0.116	0.105	0.090	0.107	0.181	0.187	0.182	0.192	0.184	0.197	0.191	0.199	
		1ヶ月	0.100	0.110	0.099	0.101	0.111	0.116	0.105	0.090	0.107	0.181	0.204	0.202	0.199	0.205	0.218	0.209	0.224	
発色の割合	測定	検出																		
		1ヶ月																		
pH	単一の値	検出	5.40	5.41	5.40	5.40	5.40	5.40	5.40	5.41	5.41	5.37	5.56	5.55	5.66	5.65	5.54	5.55	5.52	
		1ヶ月	5.42	5.43	5.44	5.43	5.44	5.43	5.43	5.44	5.44	5.54	5.55	5.55	5.55	5.55	5.55	5.55	5.53	5.54
サイズ排除クロマトグラフ法 (SEC-HPLC)	主ピーク (標準物) [%]	検出	0.106	0.119	0.186	0.186	0.139	0.145	0.145	0.158	0.159	0.489	0.509	0.401	0.484	0.492	0.488	0.515	0.575	
		1ヶ月	0.324	0.336	0.322	0.334	0.347	0.349	0.349	0.411	0.444	1.308	1.343	1.331	1.340	1.341	1.374	1.453	1.621	
隣イオン交換クロマトグラフ法 (CEX-HPLC)	主ピーク (標準物) [%]	検出	99.605	99.629	99.632	99.626	99.619	99.626	99.626	99.663	99.655	99.294	99.296	99.348	99.333	99.313	99.349	99.320	99.290	
		1ヶ月	98.924	98.914	98.931	98.914	98.895	98.894	98.894	98.845	98.782	97.920	97.876	97.892	97.901	97.898	97.861	97.762	97.762	97.701
第一の脱水性領域 [%]	主ピーク (標準物) [%]	検出	0.289	0.267	0.249	0.238	0.242	0.239	0.239	0.189	0.186	0.218	0.196	0.161	0.163	0.163	0.163	0.165	0.135	
		1ヶ月	0.752	0.751	0.747	0.752	0.758	0.757	0.757	0.744	0.773	0.773	0.781	0.777	0.759	0.762	0.765	0.794	0.770	
第二の脱水性領域 [%]	第一の脱水性領域 [%]	検出	3.8	3.7	3.7	3.7	3.7	3.9	3.9	3.8	3.8	3.7	3.8	3.6	4.5	3.9	2.7	2.7	2.8	
		1ヶ月	5.4	5.3	5.3	5.3	5.4	5.8	5.8	5.4	5.5	5.3	5.6	5.3	5.6	5.3	5.6	5.3	5.4	
リジン変形物の合計 [%]	第二の脱水性領域 [%]	検出	10.9	10.7	10.4	10.5	10.4	10.1	10.1	10.3	10.2	10.4	10.2	10.2	9.8	10.1	9.5	11.6	11.5	11.3
		1ヶ月	29.8	29.8	29.7	29.7	29.8	29.8	29.8	30.2	30.7	29.6	29.9	28.5	28.7	28.7	28.6	29.9	29.1	29.2
リジン1とリジン2の間のピーク [%]	リジン変形物の合計 [%]	検出	83.8	84.2	84.4	84.3	84.4	84.6	84.6	84.4	84.6	84.4	84.6	85.2	83.9	85.2	84.4	84.3	84.5	
		1ヶ月	61.2	61.0	61.3	61.0	61.2	60.9	60.9	60.9	60.5	62.0	61.7	62.0	61.8	62.0	61.6	61.6	61.4	
リジン2後のピーク [%]	リジン1とリジン2の間のピーク [%]	検出	0.9	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	
		1ヶ月	2.3	2.1	2.3	2.2	2.2	2.2	2.2	2.1	2.0	2.2	2.0	2.2	2.0	2.2	2.0	2.0	2.0	
リジン2後のピーク [%]	リジン2後のピーク [%]	検出	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	
		1ヶ月	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.3	1.3	1.4	1.4	1.9	1.9	2.0	1.9	1.9	1.9	2.0	2.0	

【 0 7 6 6 】

10  
20  
30  
40  
50

均等物

当業者は、定型的な実験操作のみを用いて、本明細書に記載されている発明の具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識し、又は確認することができる。このような均等物は、以下の特許請求の範囲によって包含されるものとする。本願を通じて引用されている特許及び公開された特許出願は、参照により、本明細書に組み込まれる。

【図1】

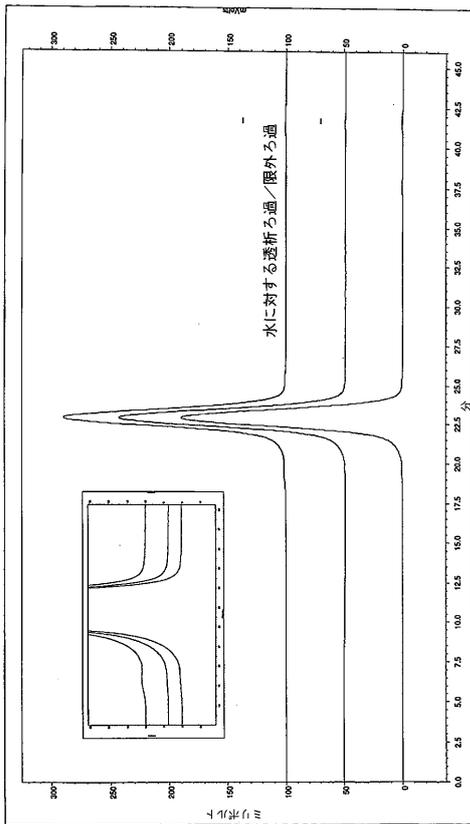


Figure 1

【図2】

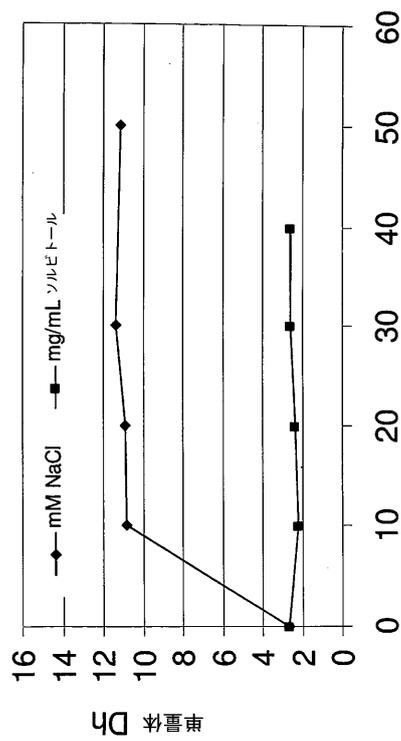


Figure 2

【 図 3 】

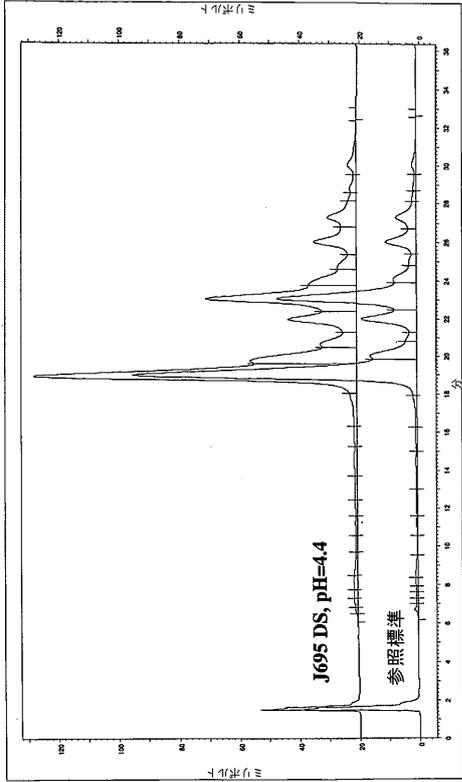


Figure 3

【 図 4 】

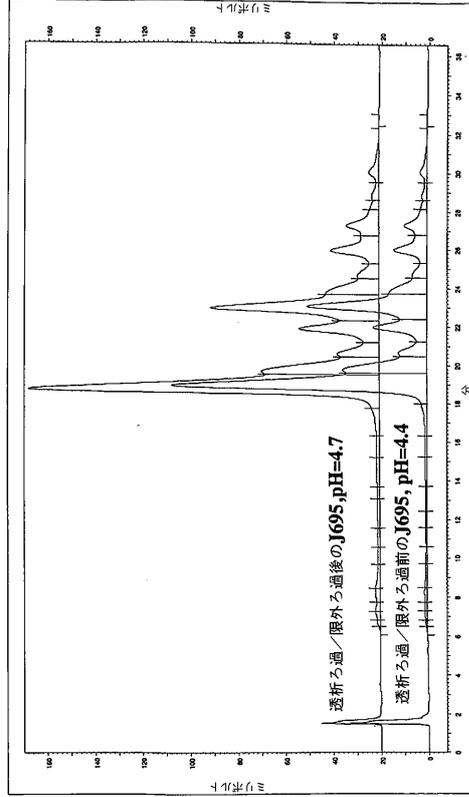


Figure 4

【 図 5 】

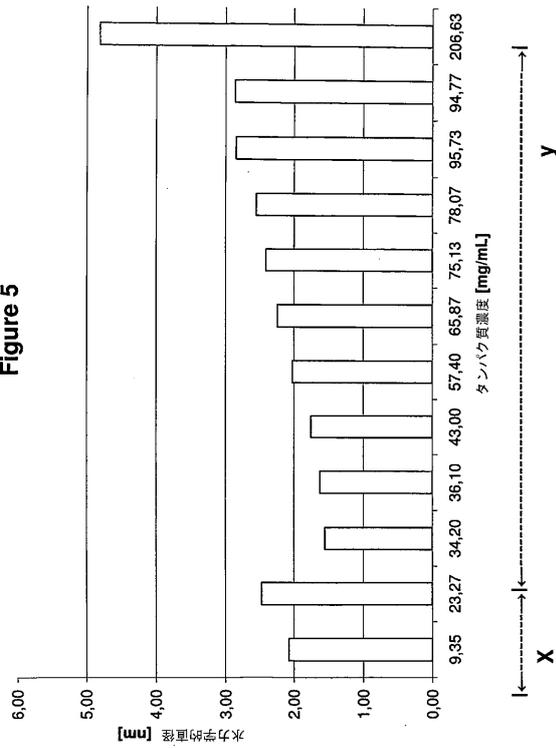


Figure 5

【 図 6 】

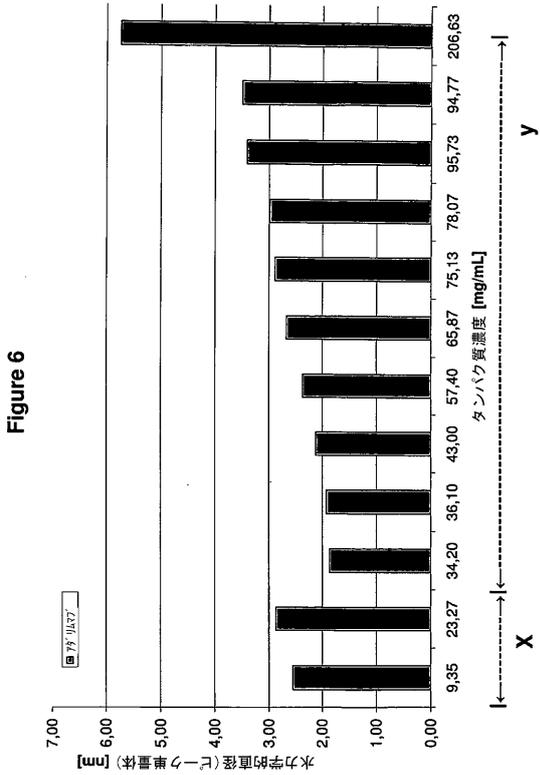
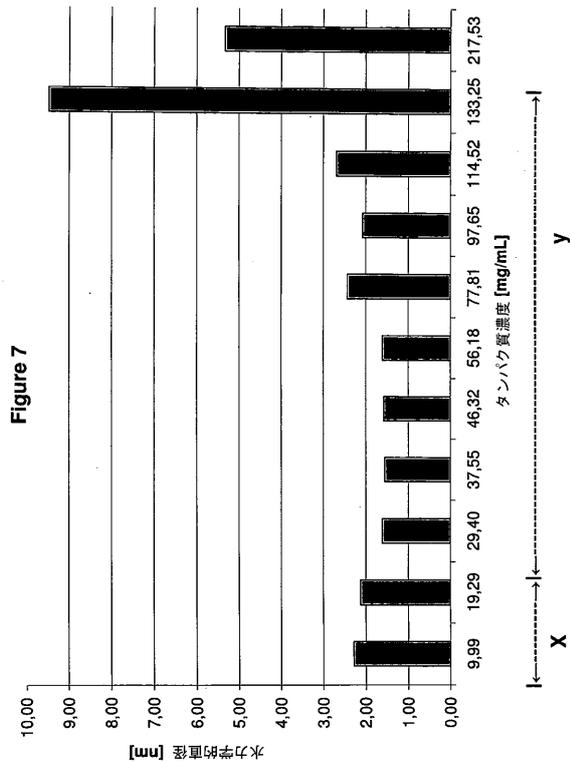
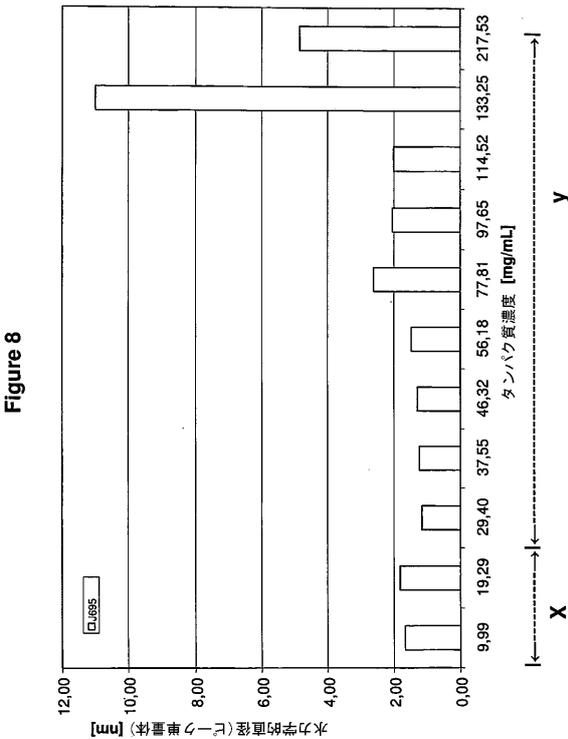


Figure 6

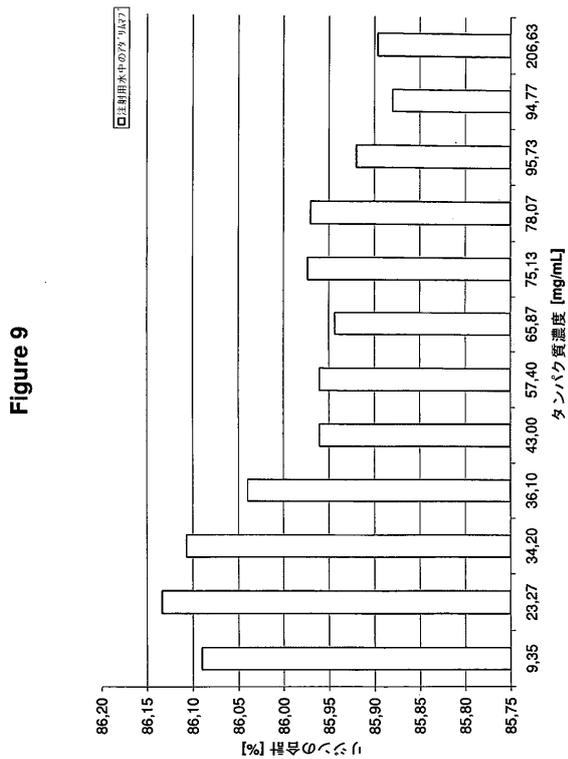
【 図 7 】



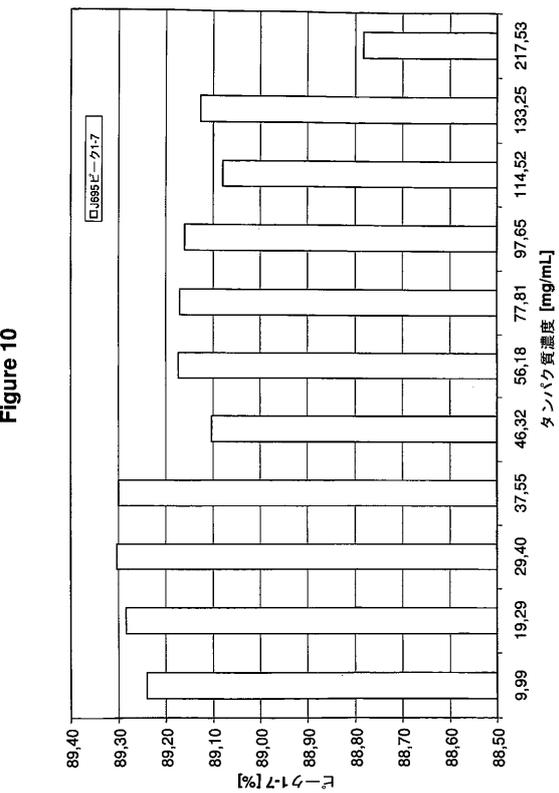
【 図 8 】



【 図 9 】

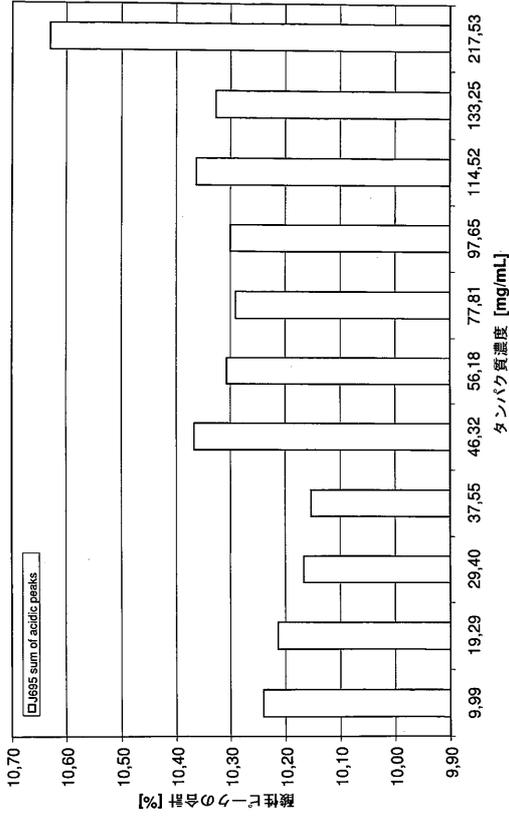


【 図 10 】



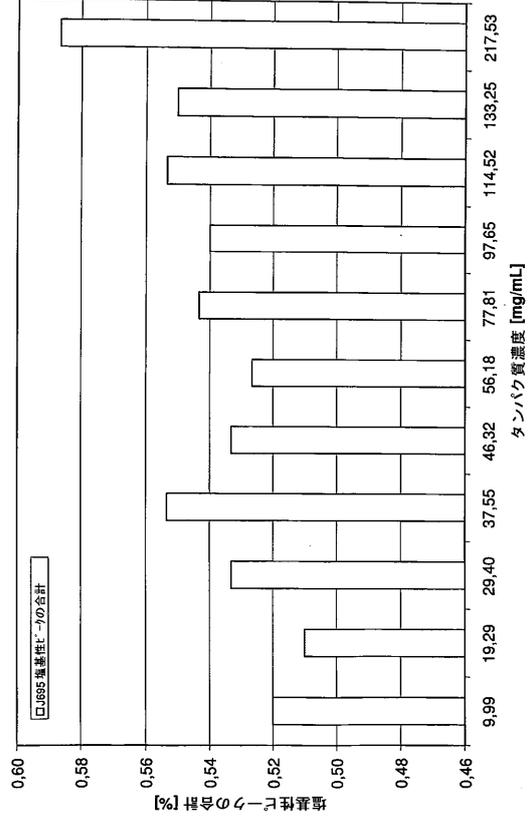
【 図 1 1 】

Figure 11



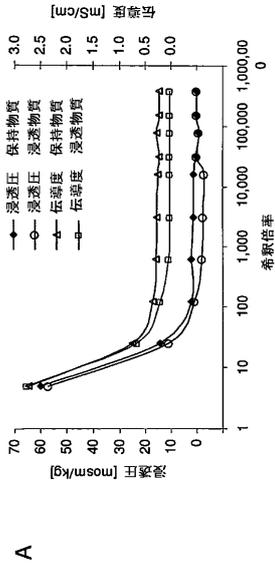
【 図 1 2 】

Figure 12



【 図 1 3 】

Figure 13

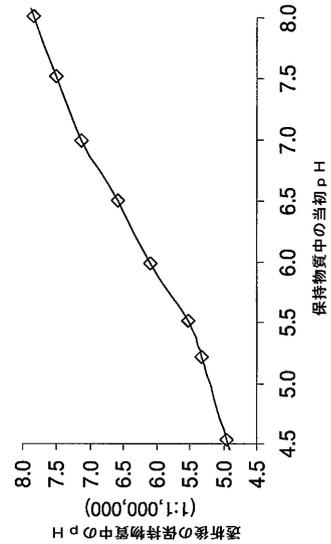


B

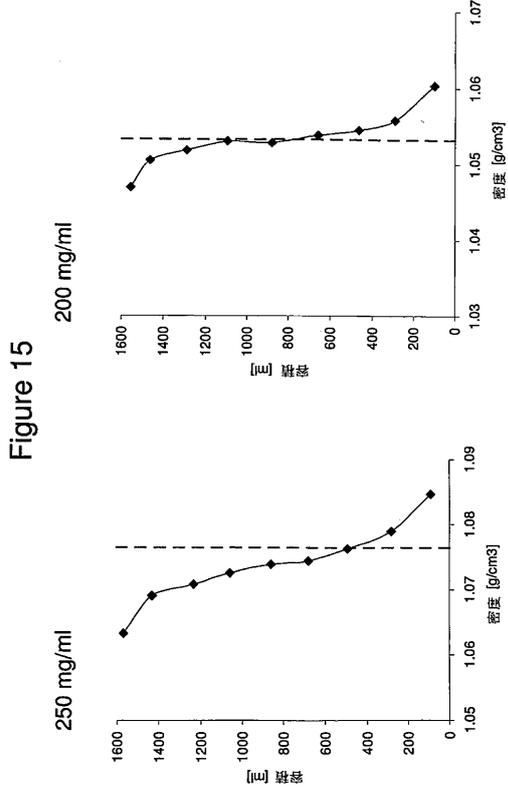
希釈/交換液率	最初の条件	5	25	125	625	3125	15625	31250	78125	156250	390625
保持物質 pH	5.26	5.37	5.35	5.36	5.40	5.44	5.56	5.44	5.59	5.59	5.62
保持物質浸透圧	305	60	14	2	1	1	0	-1	0	0	0
保持物質伝導度	11.7	2.74	0.74	0.34	0.27	0.25	0.23	0.26	0.22	0.22	0.22
浸透物質 pH	5.98	5.92	5.05	5.13	5.02	4.52	5.91	4.84	5.66	5.47	5.47
浸透物質浸透圧	1.0	57.0	10.8	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
浸透物質伝導度	0.01	2.77	0.66	0.19	0.04	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02

【 図 1 4 】

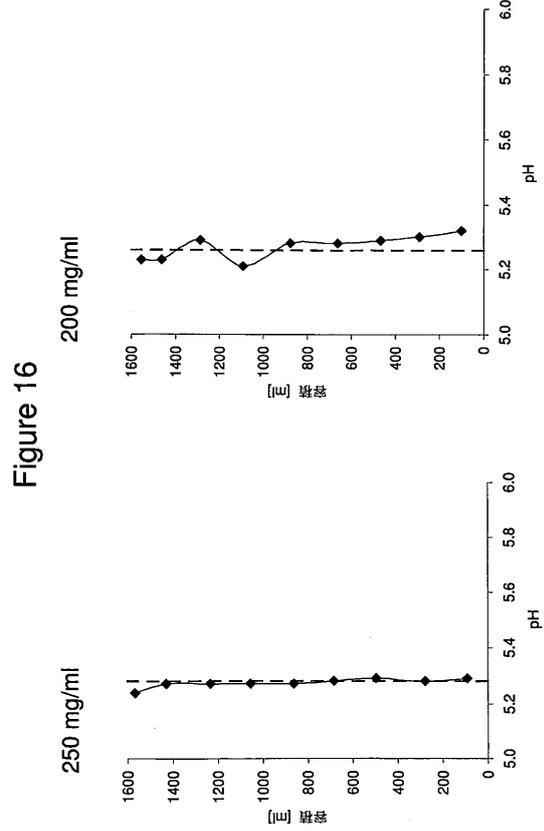
Figure 14



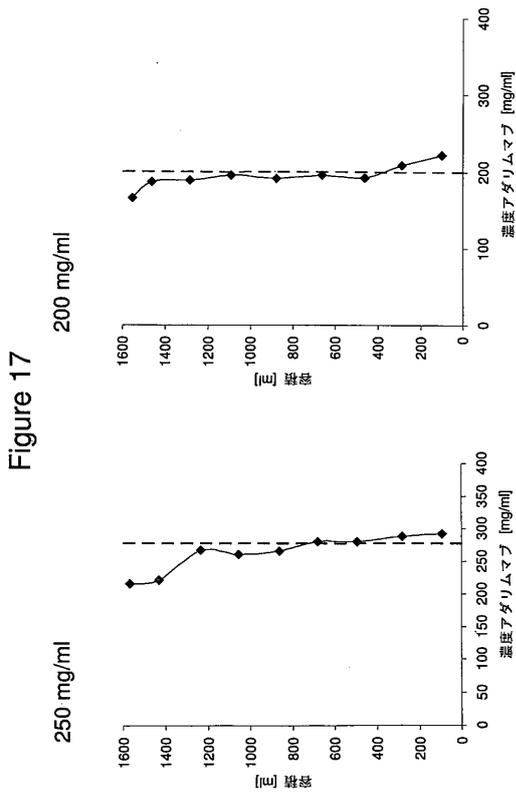
【 図 1 5 】



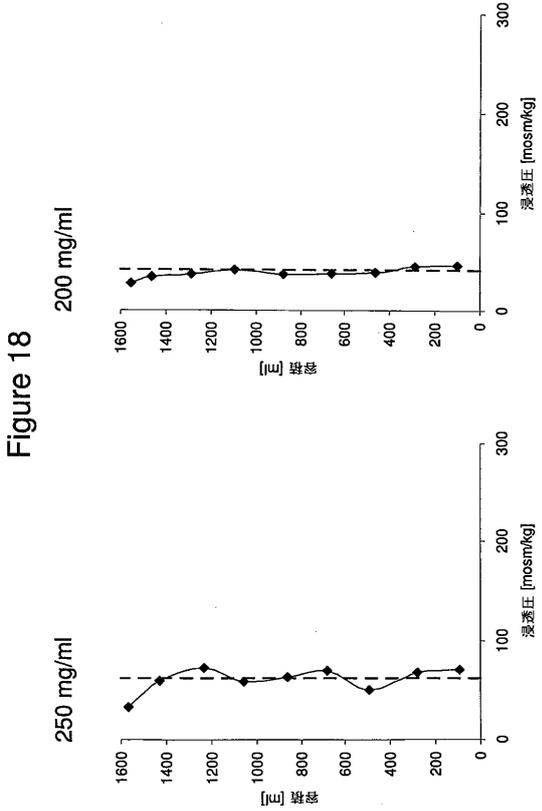
【 図 1 6 】



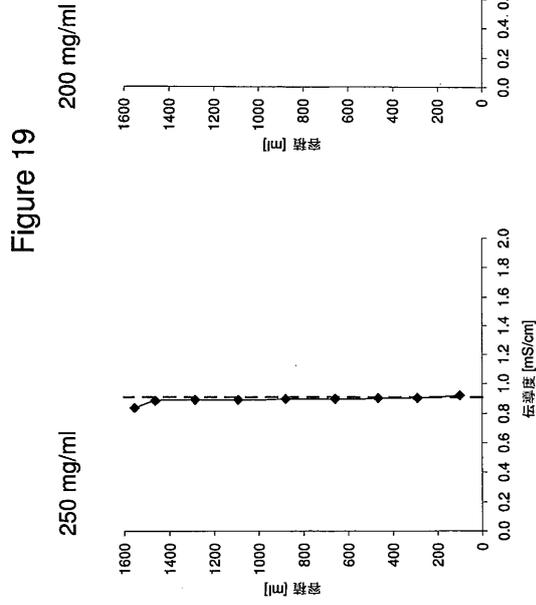
【 図 1 7 】



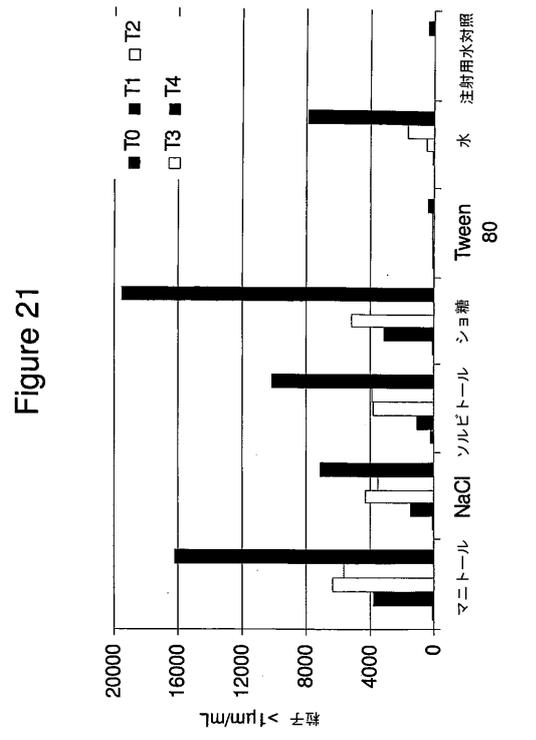
【 図 1 8 】



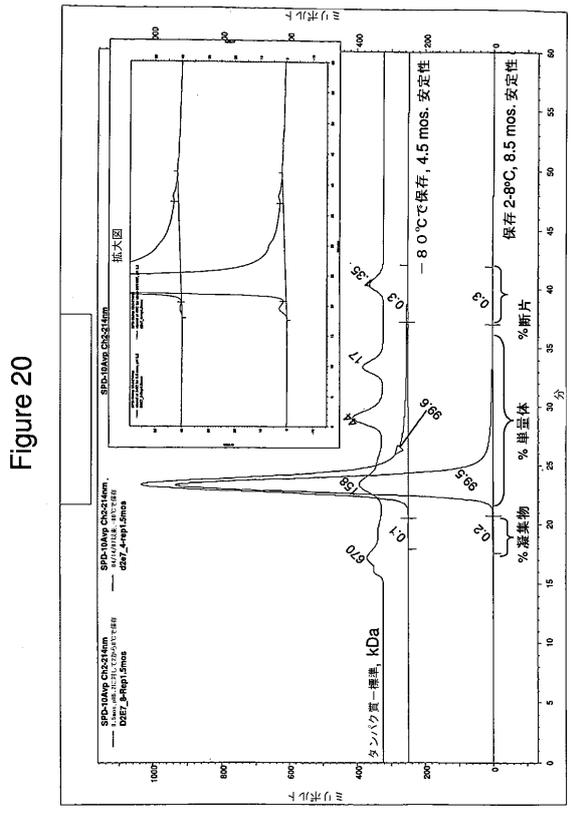
【 図 19 】



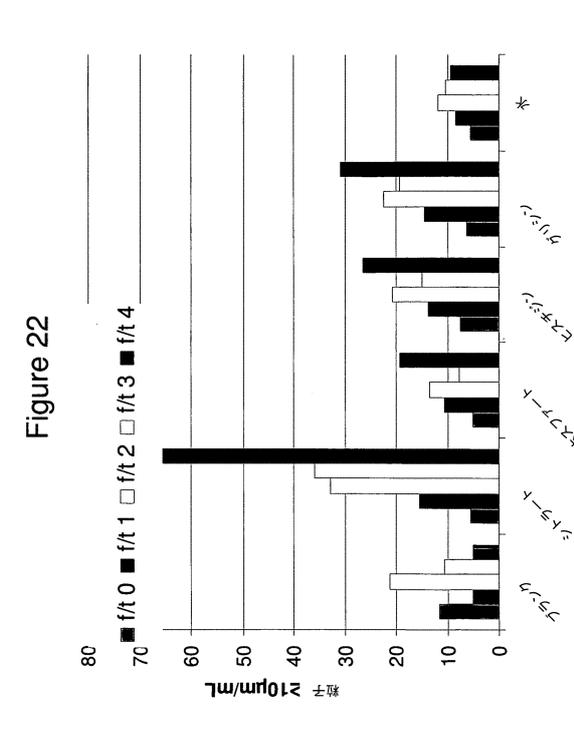
【 図 21 】



【 図 20 】

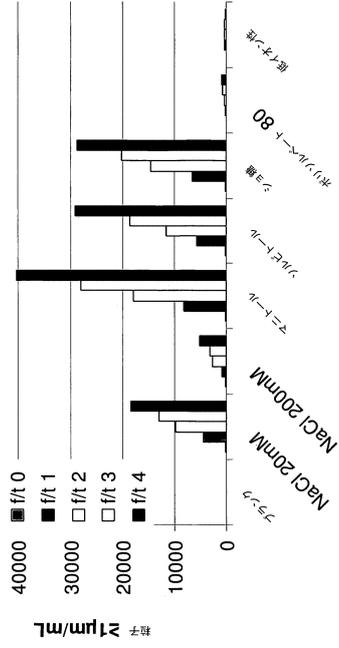


【 図 22 】



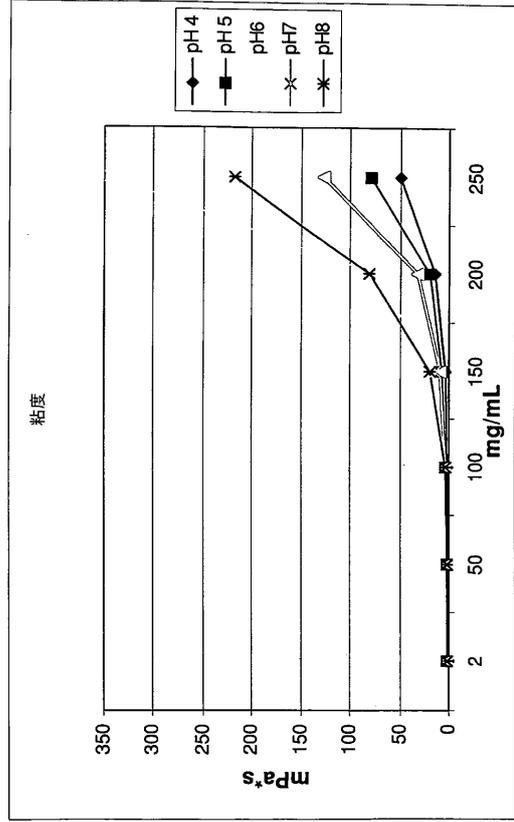
【 図 2 3 】

Figure 23



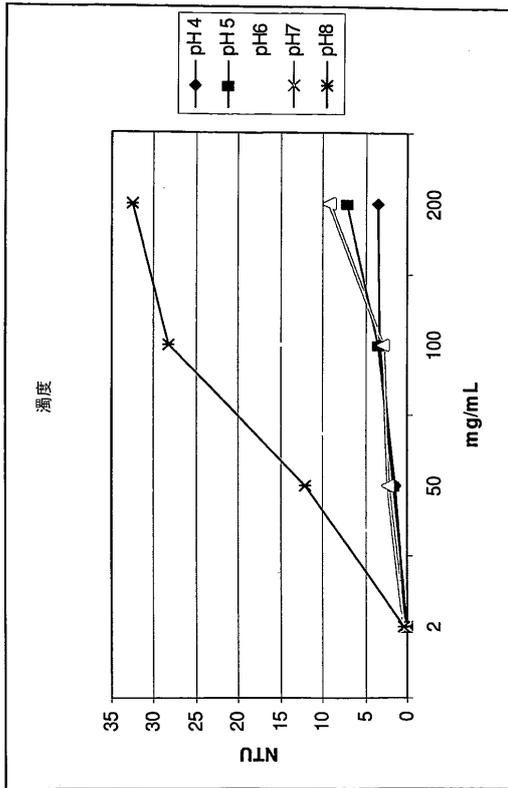
【 図 2 4 】

Figure 24



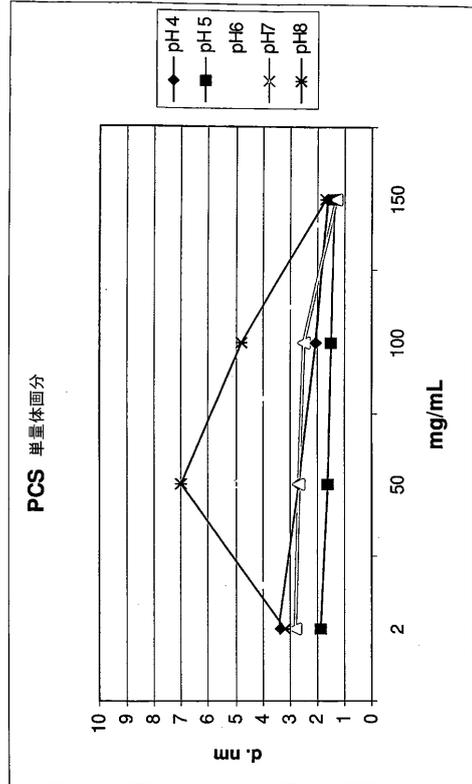
【 図 2 5 】

Figure 25



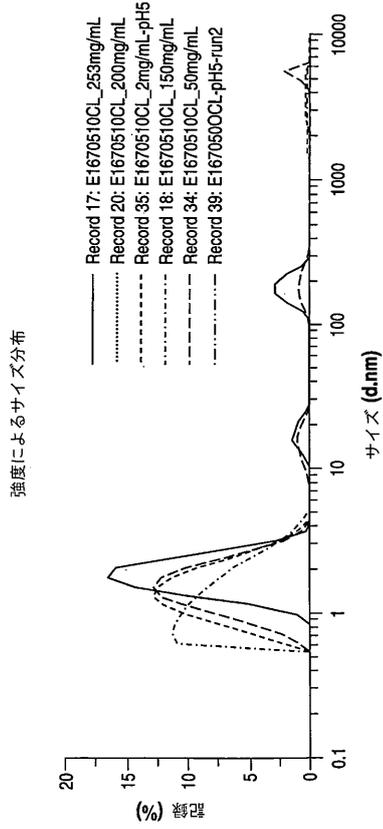
【 図 2 6 】

Figure 26



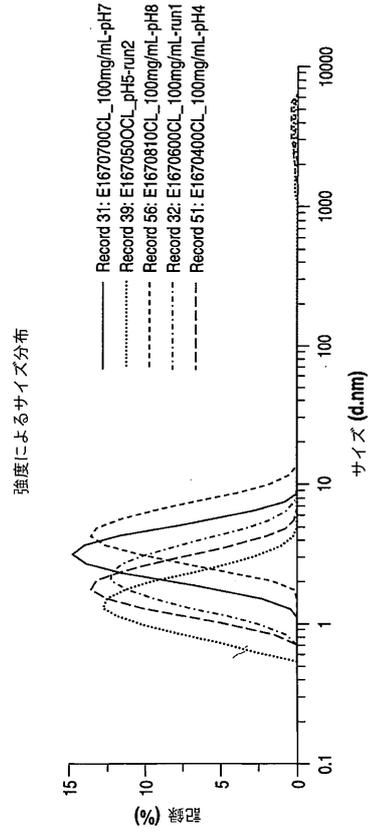
【 図 27 】

Figure 27



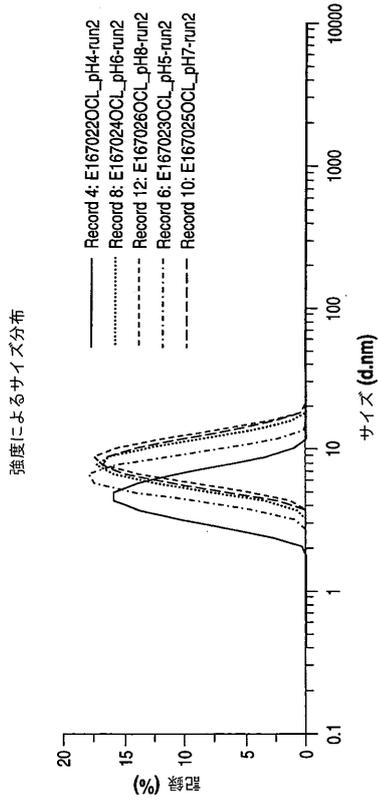
【 図 28 】

Figure 28



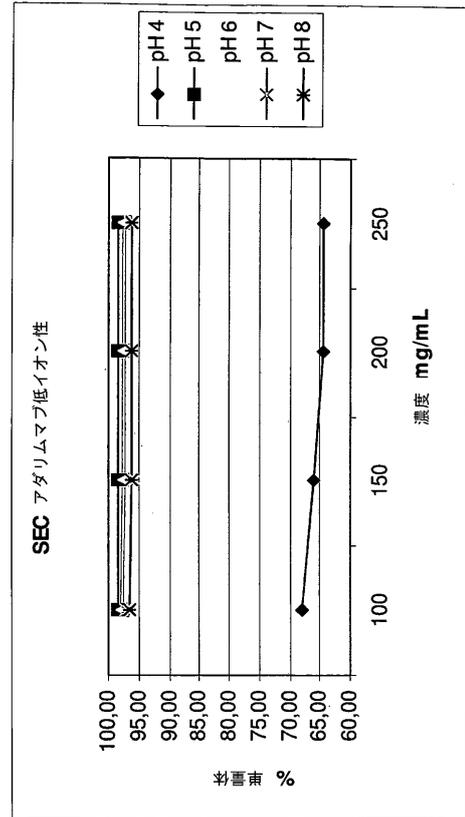
【 図 29 】

Figure 29



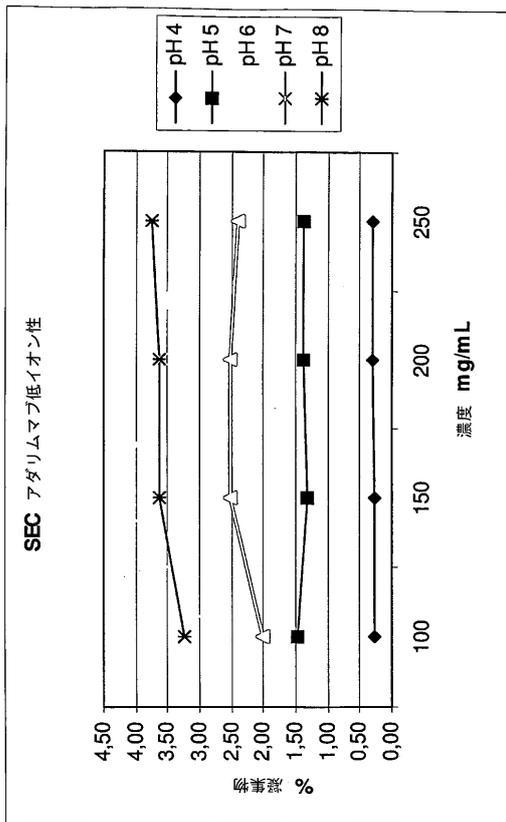
【 図 30 】

Figure 30



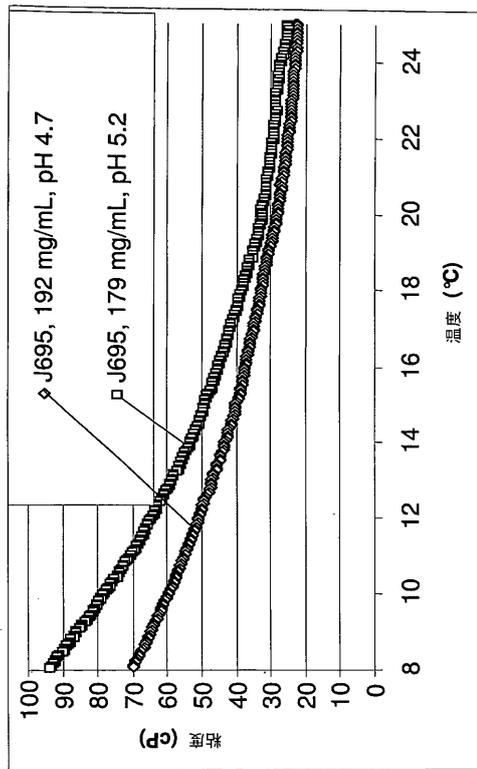
【 図 3 1 】

Figure 31



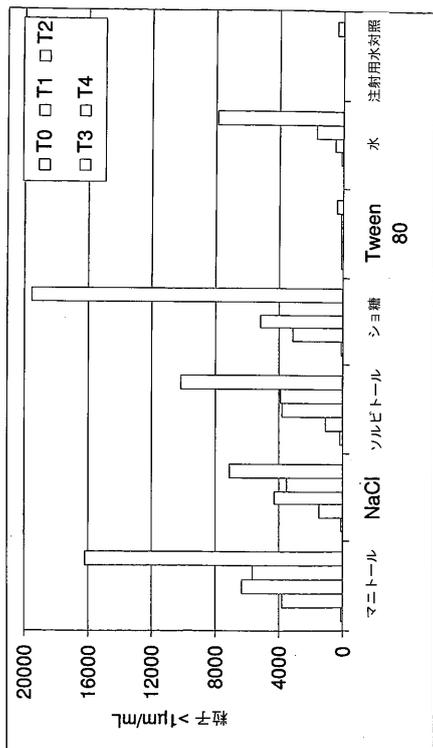
【 図 3 2 】

Figure 32



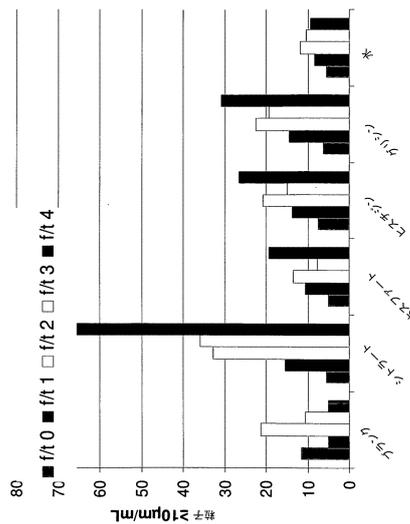
【 図 3 3 】

Figure 33



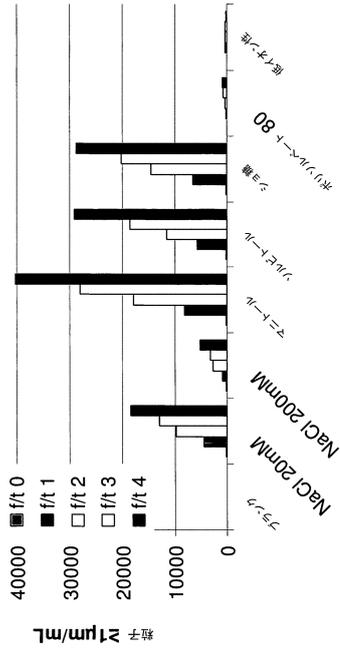
【 図 3 4 】

Figure 34



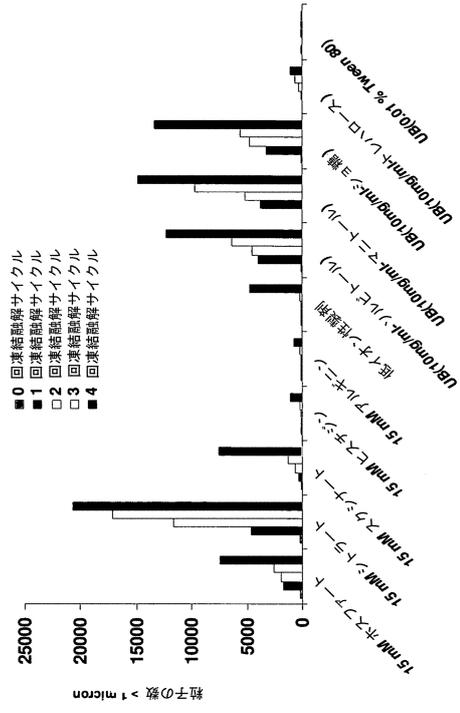
【 図 3 5 】

Figure 35



【 図 3 6 】

Figure 36



## フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I  
A 6 1 K 9/19 (2006.01) A 6 1 K 9/19
- (72)発明者 バルトル, アニカ  
ドイツ国、デー - 6 7 0 6 3 ・ ルートビヒスハーフェン、フリーゼンシュトラッセ・ 2 6
- (72)発明者 クラウゼ, ハンス - ユルゲン  
ドイツ国、デー - 6 7 2 6 9 ・ グルシュタット、ザンクト - キリアン - シュトラッセ・ 1 4
- (72)発明者 チエペ, マルクス  
ドイツ国、デー - 6 7 2 5 8 ・ ヘースハイム、リンデンベーク・ 4
- (72)発明者 カレッタ, カタリーナ  
ドイツ国、デー - 6 7 0 7 1 ・ ルートビヒスハーフェン、アドルフ - デイースターベーク - シュト  
ラーセ・ 1 0 7

審査官 光本 美奈子

- (56)参考文献 特表2002 - 517516 (JP, A)  
国際公開第2005 / 112893 (WO, A1)  
特表2007 - 503467 (JP, A)  
特表2006 - 504525 (JP, A)  
特表2007 - 522157 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- A 6 1 K 9 / 0 0 ~ 9 / 7 2  
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5  
A 6 1 K 4 7 / 0 0 ~ 4 7 / 4 8  
P u b M e d