

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5231810号
(P5231810)

(45) 発行日 平成25年7月10日(2013.7.10)

(24) 登録日 平成25年3月29日(2013.3.29)

| (51) Int.Cl. | F I |
|--------------------------|------------------|
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 M |
| A 6 1 K 9/19 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 D |
| A 6 1 K 47/18 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 N |
| A 6 1 K 47/22 (2006.01) | A 6 1 K 9/19 |
| | A 6 1 K 47/18 |

請求項の数 20 (全 27 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|-----------|----------------|
| (21) 出願番号 | 特願2007-552013 (P2007-552013) | (73) 特許権者 | 000003311 |
| (86) (22) 出願日 | 平成18年12月27日(2006.12.27) | | 中外製薬株式会社 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/JP2006/326121 | | 東京都北区浮間5丁目5番1号 |
| (87) 国際公開番号 | W02007/074880 | (74) 代理人 | 100140109 |
| (87) 国際公開日 | 平成19年7月5日(2007.7.5) | | 弁理士 小野 新次郎 |
| 審査請求日 | 平成21年12月2日(2009.12.2) | (74) 代理人 | 100075270 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2005-379245 (P2005-379245) | | 弁理士 小林 泰 |
| (32) 優先日 | 平成17年12月28日(2005.12.28) | (74) 代理人 | 100096013 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国(JP) | | 弁理士 富田 博行 |
| 前置審査 | | (74) 代理人 | 100092967 |
| | | | 弁理士 星野 修 |
| | | (74) 代理人 | 100091638 |
| | | | 弁理士 江尻 ひろ子 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体含有安定化製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の成分：

A) 抗体

B) アルギニン、ヒスチジン、セリン、プロリン及びそれらの塩からなる群から選ばれる1以上のアミノ酸

C) 緩衝剤としての塩類及び

D) 界面活性剤

から実質的に構成される抗体含有凍結乾燥製剤であって、

タンパク質含有凍結乾燥製剤の製造時に凍乾前溶液に含まれる還元糖、非還元糖、糖アルコールまたは多糖類の合計の濃度が1 mg / mL以下であり、

アミノ酸又はその塩の含有量が、抗体1モルに対して270モル以上であり、

ここで「実質的に構成される」とは、任意の添加成分である懸濁剤、溶解補助剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、希釈剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、含硫還元剤、酸化防止剤等の通常製剤に添加される成分以外の成分を含まないことを意味する、前記抗体含有凍結乾燥製剤。

【請求項2】

凍結乾燥製剤の再溶解後の抗体濃度が10 mg / mL以上である請求項1に記載の製剤

【請求項3】

10

20

凍結乾燥製剤の再溶解後の抗体濃度が 50 mg / mL 以上である請求項 2 に記載の製剤。

【請求項 4】

凍結乾燥製剤の再溶解後の抗体濃度が 100 mg / mL 以上である請求項 3 に記載の製剤。

【請求項 5】

アミノ酸又はその塩の含有量が、抗体 1 モルに対して 380 モル以上である請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 6】

アミノ酸又はその塩の含有量が、抗体 1 モルに対して 540 モル以上である請求項 5 に記載の製剤。

10

【請求項 7】

再溶解後における溶液の pH が 4 ~ 8 である請求項 1 - 6 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 8】

再溶解後における溶液の pH が 5.0 ~ 7.5 である請求項 7 に記載の製剤。

【請求項 9】

抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である請求項 1 - 8 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 10】

抗体が抗 IL - 6 レセプター抗体である請求項 9 に記載の製剤。

20

【請求項 11】

アミノ酸又はその塩が、アルギニン及びヒスチジンからなる群から選ばれる 1 種以上のアミノ酸又はその塩である請求項 1 - 10 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 12】

アミノ酸又はその塩が、アルギニン又はその塩である請求項 11 に記載の製剤。

【請求項 13】

再溶解後における粘度が 20 mPa · s 以下である請求項 1 - 12 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 14】

再溶解後における粘度が 15 mPa · s 以下である請求項 13 に記載の製剤。

30

【請求項 15】

再溶解後における粘度が 12 mPa · s 以下である請求項 14 に記載の製剤。

【請求項 16】

以下の成分：

A) 抗体

B) アルギニン、ヒスチジン、セリン、プロリン及びそれらの塩からなる群から選ばれる 1 以上のアミノ酸

C) 緩衝剤としての塩類及び

D) 界面活性剤

から実質的に構成される抗体含有凍結乾燥製剤であって、

40

タンパク質含有凍結乾燥製剤の製造時に凍乾前溶液に含まれる還元糖、非還元糖、糖アルコールまたは多糖類の合計の濃度が 1 mg / mL 以下であり、

ここで「実質的に構成される」とは、任意の添加成分である懸濁剤、溶解補助剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、希釈剤、賦形剤、pH 調整剤、無痛化剤、含硫還元剤、酸化防止剤等の通常製剤に添加される成分以外の成分を含まないことを意味し、

また、製剤中の抗体濃度が 20mg/ml 以上のときはアミノ酸又はその塩を 25mg/ml 以上、抗体濃度が 30mg/ml 以上のときはアミノ酸又はその塩を 12.5mg/ml 以上、抗体濃度が 40mg/ml 以上のときはアミノ酸又はその塩を 6.25mg/ml 以上含んでいることを特徴とする、前記抗体含有凍結乾燥製剤。

【請求項 17】

50

製剤中の抗体濃度が30mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を25mg/ml以上、抗体濃度が40mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を12.5mg/ml以上含んでいることを特徴とする請求項16記載の製剤。

【請求項18】

アルギニン、ヒスチジン、セリン及びプロリンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩をリオプロテクタント或いは賦形剤として含む抗体含有凍結乾燥製剤の製造方法であって、アミノ酸又はその塩の含有量が、抗体1モルに対して270モル以上であり、還元糖、非還元糖、糖アルコールおよび多糖類の総濃度が1mg/mL未満である凍結乾燥前溶液を凍結乾燥する工程を含む、前記抗体含有凍結乾燥製剤の製造方法。

10

【請求項19】

アルギニン、ヒスチジン、セリン及びプロリンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩をリオプロテクタント或いは賦形剤として含み、かつ製剤中の抗体濃度が20mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を25mg/ml以上、抗体濃度が30mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を12.5mg/ml以上、抗体濃度が40mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を6.25mg/ml以上含んでいることを特徴とする抗体含有凍結乾燥製剤の製造方法であって、還元糖、非還元糖、糖アルコールおよび多糖類の総濃度が1mg/mL未満である凍結乾燥前溶液を凍結乾燥する工程を含む、前記抗体含有凍結乾燥製剤の製造方法。

【請求項20】

バイアル当たりの抗体重量と還元糖、非還元糖、糖アルコールおよび多糖類の総重量との比が1:0.5未満である請求項18または19に記載の製造方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は抗体含有製剤に関し、特に安定な凍結乾燥された高濃度抗体製剤に関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子組換え技術の発達によって、種々のタンパク質製剤が安定した供給量で提供されるようになった。これらの製剤は安定性を確保するため、凍結乾燥したタンパク質成分粉末とこれを溶解するための水溶性希釈液とを別途包装し、使用時に溶解する形態で提供されるか、あるいは安定性を向上させるための添加剤を加えたタンパク質溶液製剤の形で提供されている。

30

【0003】

近年、種々の抗体製剤が開発され実用に供されているが、多くの抗体製剤は静脈注射用製剤として用いられている。一方、医療現場のニーズにより、抗体含有製剤を自己注射可能な皮下注射用製剤として開発する要望が高くなっている。

【0004】

皮下注射用の抗体含有製剤を設計するにあたっては、1回あたりの抗体投与量が大量となる一方で(100~200mg-程度)、皮下注射では一般的に注射液量の制限があることから、投与液中の抗体の高濃度化が必要となる。そこで、凍結乾燥濃縮を利用した高濃度の抗体含有製剤の開発が求められている。

40

【0005】

特表2004-532798号/WO2002/030463/米国特許第6875432号は、塩及び/又はバッファーを含む粘度の減少した濃縮タンパク質製剤について開示するが、溶液粘度の低減効果についてのみ記載しており、安定性についての記載はない。

【0006】

また、特表2004-538287/WO2003/009817は、ヒスチジン緩衝液(pHは約5.5~約6.5)中に高濃度のIgG抗体、ポリソルベート、スクロース、および随時セリンおよび/またはマンニトールを含む水性調製物を凍結乾燥することにより調製される凍結乾燥医薬製剤を開

50

示する。しかし、この出願ではスクロースの安定化効果を主眼とするものであり、セリン及びヒスチジン添加による安定化効果については記載がない。

【 0 0 0 7 】

高濃度の抗体含有溶液は、タンパク質の巨大分子としての性質及び分子間相互作用により粘度の高い溶液を形成する傾向にある。さらに、凍結乾燥製剤の製造においては、そのケーキ形成や安定性を維持するために、通常、糖などの凍結乾燥保護剤（リオプロテクタント）を大量に添加した状態で凍結乾燥される。しかし、糖は分子間相互作用を増強し、粘度を増大させることになり、高い粘度の製剤は、調剤、シリンジへの吸引及び皮下注射を行うのが困難となる。したがって、糖類の添加を伴わずに、かつ安定な凍結乾燥製剤を製造する新規な方法が求められている。

10

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

本発明の目的は、糖類の添加を伴わず、かつ凍結乾燥濃縮を利用した高濃度の抗体含有製剤を製造する工程及び得られた高濃度の凍結乾燥製剤の保存時、及び再溶解時において、抗体の二量体や低分子量分解物などの生成が少ない安定な抗体製剤を提供することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは、アルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン及びスレオニンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩を添加することにより、賦形剤として糖類を添加しなくても高濃度の抗体含有凍結乾燥製剤となしうることを見だし本発明を完成した。

20

【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は以下のものを提供する。

(1) 賦形剤として還元糖、非還元糖、糖アルコールまたは多糖類を含まず、アルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン及びスレオニンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩を含む抗体含有凍結乾燥製剤。

(2) 凍結乾燥製剤の再溶解後の抗体濃度が10 mg / mL以上である(1)に記載の製剤。

30

(3) 凍結乾燥製剤の再溶解後の抗体濃度が50 mg / mL以上である(2)に記載の製剤。

(4) 凍結乾燥製剤の再溶解後の抗体濃度が100 mg / mL以上である(3)に記載の製剤。

(5) アミノ酸又はその塩の含有量が、抗体1モルに対して270モル以上である(1) - (4)のいずれかに記載の製剤。

(6) アミノ酸又はその塩の含有量が、抗体1モルに対して380モル以上である(5)に記載の製剤。

(7) アミノ酸又はその塩の含有量が、抗体1モルに対して540モル以上である(6)に記載の製剤。

40

(8) 再溶解後における溶液のpHが4 ~ 8である(1) - (7)のいずれかに記載の製剤。

(9) 再溶解後における溶液のpHが5 . 0 ~ 7 . 5である(8)に記載の製剤。

(10) 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である(1) - (9)のいずれかに記載の製剤。

(11) 抗体が抗IL - 6レセプター抗体である(10)に記載の製剤。

(12) アミノ酸又はその塩が、アルギニン、ヒスチジン及びリジンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩である(1) - (11)のいずれかに記載の製剤。

50

(13) アミノ酸又はその塩が、アルギニン又はその塩である(12)に記載の製剤。

(14) 再溶解後における粘度が20 mPa・s以下である(1)-(13)のいずれかに記載の製剤。

(15) 再溶解後における粘度が15 mPa・s以下である(14)に記載の製剤。

(16) 再溶解後における粘度が12 mPa・s以下である(15)に記載の製剤。

(17) アルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン及びスレオニンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩をリオプロテクタント或いは賦形剤として含む抗体含有凍結乾燥製剤であって、製剤中の抗体濃度が20mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を25mg/ml以上、抗体濃度が30mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を12.5mg/ml以上、抗体濃度が40mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を6.25mg/ml以上含んでいることを特徴とする前記抗体含有凍結乾燥製剤。

10

(18) 製剤中の抗体濃度が30mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を25mg/ml以上、抗体濃度が40mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を12.5mg/ml以上含んでいることを特徴とする(17)に記載の製剤。

(19) アルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン及びスレオニンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩をリオプロテクタント或いは賦形剤として含む抗体含有凍結乾燥製剤の製造方法であって、還元糖、非還元糖、糖アルコールおよび多糖類の総濃度が20 mg/mL未満である凍結乾燥前溶液を凍結乾燥する工程を含む、前記抗体含有凍結乾燥製剤の製造方法。

(20) アルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン及びスレオニンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩をリオプロテクタント或いは賦形剤として含む抗体含有凍結乾燥製剤であって、バイアル当たりの抗体重量と還元糖、非還元糖、糖アルコールおよび多糖類の総重量との比が1:0.5未満である前記抗体含有凍結乾燥製剤。

20

(21) 賦形剤として還元糖、非還元糖、糖アルコールまたは多糖類を含まず、アルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン及びスレオニンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩を含むタンパク質含有凍結乾燥製剤。

(22) アルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン及びスレオニンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩をリオプロテクタント或いは賦形剤として含むタンパク質含有凍結乾燥製剤の製造方法であって、還元糖、非還元糖、糖アルコールおよび多糖類の総濃度が20 mg/mL未満である凍結乾燥前溶液を凍結乾燥する工程を含む、前記タンパク質含有凍結乾燥製剤の製造方法。

30

(23) アルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン及びスレオニンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩をリオプロテクタント或いは賦形剤として含むタンパク質含有凍結乾燥製剤であって、バイアル当たりのタンパク質重量と還元糖、非還元糖、糖アルコールおよび多糖類の総重量との比が1:0.5未満である前記タンパク質含有凍結乾燥製剤。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

40

本発明の製剤および方法に使用される抗体は、所望の抗原と結合する限り特に制限はなく、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。

【0012】

本発明で使用されるモノクローナル抗体としては、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ラクダ、サル等の動物由来のモノクローナル抗体だけでなく、キメラ抗体、ヒト化抗体、bispecific抗体など人為的に改変した遺伝子組み換え型抗体も含まれる。また、抗体の免疫グロブリンクラスは特に限定されるものではなく、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのIgG、IgA、IgD、IgE、IgMなどいずれのクラスでもよいが、IgG及びIgMが好ましい。

50

【 0 0 1 3 】

さらに本発明の抗体としてはwholeの抗体だけでなく、Fv、Fab、F(ab)₂などの抗体断片や、抗体の可変領域をペプチドリinker等のリンカーで結合させた1価または2価以上の一本鎖Fv (scFv、sc(Fv)₂やscFvダイマーなどのDiabody等)などの低分子化抗体なども含まれる。

【 0 0 1 4 】

上述した本発明の抗体は、当業者に周知の方法により作製することができる。

【 0 0 1 5 】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞(ハイブリドーマ)をスクリーニングすることによって作製できる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法(Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46)等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。

【 0 0 1 6 】

また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる(例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照)。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域(V領域)のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

【 0 0 1 7 】

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト化(Humanized)抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

【 0 0 1 8 】

ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework region; FR)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)

【 0 0 1 9 】

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローム細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を含む適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

10

【 0 0 2 0 】

抗体遺伝子を一旦単離し、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いることができる。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS, ミエローム、BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, (2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコチアナ (Nicotiana) 属、例えばニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli), 枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。

20

30

【 0 0 2 1 】

さらに、本発明の抗体は、その抗体断片や低分子化抗体、並びに抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片や低分子化抗体としてはFab、F(ab')₂、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させた一価又は二価以上のシングルチェーンFv(scFv、sc(Fv)₂など) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

40

【 0 0 2 2 】

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

【 0 0 2 3 】

50

本発明の製剤に含まれる抗体としては、抗組織因子抗体、抗IL-6レセプター抗体、HM1.24抗原モノクローナル抗体、抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体（抗PTHrP抗体）、抗グリピカン-3抗体、抗ガングリオシドGM3抗体、抗TPO受容体アゴニスト抗体、凝固第VIII因子代替抗体などを挙げることができるが、これに限定されない。

【0024】

再構成ヒト化抗体としては、ヒト化抗IL-6レセプター抗体（hPM-1）（国際特許出願公開番号WO92-19759を参照）、ヒト化抗HM1.24抗原モノクローナル抗体（国際特許出願公開番号WO98-14580を参照）、ヒト化抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体（抗PTHrP抗体）（国際特許出願公開番号WO98-13388を参照）、ヒト化抗組織因子抗体（国際特許出願公開番号WO99-51743を参照）、抗グリピカン-3ヒト化IgG1抗体（国際特許出願番号PCT/JP05/013103を参照）などが本発明で使用する好ましい抗体である。本発明で使用するヒト化抗体として特に好ましいのは、ヒト化抗IL-6レセプター抗体である。

10

【0025】

ヒトIgM抗体としては、抗ガングリオシドGM3組み換え型ヒトIgM抗体（国際特許出願公開番号WO05-05636を参照）などが好ましい。

【0026】

低分子化抗体としては、抗TPO受容体アゴニストDiabody（国際特許出願公開番号WO02-33072を参照）、抗CD47アゴニストDiabody（国際特許出願公開番号WO01-66737を参照）などが好ましい。

20

【0027】

本発明の抗体含有凍結乾燥製剤は、凍結乾燥製剤の再溶解後の抗体濃度が10mg/mL以上であるものが好ましく、さらには50mg/mL以上であるものが好ましく、さらには80mg/mL以上、特に凍結乾燥製剤の再溶解後の抗体濃度が100mg/mL以上であるものが好ましい。

【0028】

本発明の抗体含有製剤については、凍乾前の抗体濃度はいかなる濃度でもよい。しかし、本発明を、凍乾前より少ない容量の水を用いて凍結乾燥製剤を再溶解することにより高濃度溶液製剤を調製する、いわゆる凍乾濃縮技術を適用する場合には、凍乾前の抗体濃度は1mg/mL以上であるものが好ましく、さらには10mg/mL以上であるものが好ましく、特に凍乾前の抗体濃度が20mg/mL以上であるものが好ましい。また、凍乾濃縮技術における抗体の濃縮倍率は2～50倍であることが好ましく、さらには2～20倍であることが好ましく、特に抗体の濃縮倍率が2～6倍であることが好ましい。

30

【0029】

本発明の製剤に安定化剤として添加するアミノ酸としてはアルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン及びスレオニン及びそれらの塩からなる群から選ばれるアミノ酸であり、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-リジン、L-セリン、L-プロリン、グリシン、L-アラニン及びL-スレオニン及びそれらの塩からなる群から選ばれるアミノ酸が好ましい。特に好ましいアミノ酸は、L-アルギニン又はその塩である。

40

【0030】

本発明の製剤中に添加するアミノ酸の量は、アミノ酸の含有量が、抗体1モルに対して270モル以上であることが好ましく、抗体1モルに対して380モル以上であることがより好ましく、抗体1モルに対して540モル以上であることがさらに好ましい。

【0031】

本発明の高濃度の抗体含有凍結乾燥製剤においては、凍結乾燥製剤の再溶解後における溶液のpHが4～8であることが好ましく、凍結乾燥製剤の再溶解後における溶液のpHが5.0～7.5であることがより好ましく、5.5～7.2であることがさらに好ましい。

【0032】

50

上記製剤では、再溶解後における粘度が20 mPa・s以下であることが好ましく、再溶解後における粘度が15 mPa・s以下であることがより好ましく、再溶解後における粘度が12 mPa・s以下であることがさらに好ましい。

【0033】

本発明の製剤では、賦形剤として還元糖、非還元糖、糖アルコールまたは多糖類を添加しないことを特徴とする。通常、凍結乾燥製剤の賦形剤として還元糖、非還元糖、糖アルコールまたは多糖類をタンパク質含有製剤に添加する場合、凍乾前溶液として20 mg/mL以上必要である。従って、本発明における「賦形剤として還元糖、非還元糖、糖アルコールまたは多糖類を含まない」とは、タンパク質含有凍結乾燥製剤の製造時に凍乾前溶液に含まれる還元糖、非還元糖、糖アルコールまたは多糖類の合計の濃度が20 mg/mL未滿、好ましくは10 mg/mL以下、さらに好ましくは5 mg/mL以下、さらに好ましくは1 mg/mL以下、特に好ましくは実質的に含まないものを意味する。

10

【0034】

本発明はまた、アルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン及びスレオニンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩をリオプロテクタント或いは賦形剤として含む抗体含有凍結乾燥製剤であって、バイアル当たりの抗体重量と還元糖、非還元糖、糖アルコールおよび多糖類の総重量との比が1:0.5未滿である前記抗体含有凍結乾燥製剤を提供する。バイアル当たりの抗体重量と還元糖、非還元糖、糖アルコールおよび多糖類の総重量との比が好ましくは1:0.5未滿であり、より好ましくは1:0.25以下であり、さらに好ましくは1:0.125以下であり、さらに好ましくは1:0.025以下であり、最も好ましくは還元糖、非還元糖、糖アルコールおよび多糖類を含まない。

20

【0035】

ここで言う、還元糖としては、グルコース、フルクトース、マルトース、ラクトース；非還元糖としては、スクロース、トレハロース、ラフィノース、ネオトレハロース；糖アルコールとしては、マンニトール、ソルビトール、マルチトール、エリスリトール；多糖類としてはデキストラン、シクロデキストリン類（ α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン）、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースが挙げられる。

【0036】

本発明の製剤では、賦形剤として還元糖、非還元糖、糖アルコールまたは多糖類を添加しなくても、凍結乾燥工程中、凍結乾燥製剤の保存時、及び再溶解時において、抗体の二量体や低分子量分解物などの生成が少なく、良好なケーキ形成を行うことができ、安定な抗体製剤とすることが可能である。また、従来の凍結乾燥製剤に比べ糖類の添加量が顕著に少ない、或いは実質的に糖類が含まれないために、再溶解後の高濃度抗体含有溶液の粘度の上昇を抑えることができ、使い勝手のよい凍結乾燥製剤を得ることができる。

30

【0037】

本発明の製剤は、好ましくは以下の成分：

- A) 抗体
 - B) アルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン、スレオニン及びそれらの塩からなる群から選ばれる1以上のアミノ酸
 - C) 緩衝剤としての塩類及び
 - D) 界面活性剤
- から実質的に構成される。

40

【0038】

「実質的に構成される」とは、後述する任意の添加成分である懸濁剤、溶解補助剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、希釈剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、含硫還元剤、酸化防止剤等の通常製剤に添加される成分以外の成分を含まないことを意味する。

【0039】

本発明の製剤を製造するときは、抗体を含む凍結乾燥前調製液に、アルギニン、ヒスチ

50

ジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン、スレオニン及びそれらの塩からなる群から選ばれるアミノ酸を添加し、その後凍結乾燥を行う。これにより、賦形剤として通常用いられてきた糖類を使用することなく良好な凍乾ケーキが形成され、且つ凍結乾燥工程中における抗体の二量体生成も抑制することができる。

【0040】

本発明はさらに、アルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン及びスレオニンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩をリオプロテクタント或いは賦形剤として含む抗体含有凍結乾燥製剤であって、製剤中の抗体濃度が20mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を25mg/ml以上、抗体濃度が30mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を12.5mg/ml以上、抗体濃度が40mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を6.25mg/ml以上含んでいることを特徴とする前記抗体含有凍結乾燥製剤を提供する。製剤中の抗体濃度が30mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を25mg/ml以上、抗体濃度が40mg/ml以上のときはアミノ酸又はその塩を12.5mg/ml以上含んでいることが好ましい。

10

【0041】

本発明はまた、アルギニン、ヒスチジン、リジン、セリン、プロリン、グリシン、アラニン及びスレオニンからなる群から選ばれる1種または2種以上のアミノ酸又はその塩をリオプロテクタント或いは賦形剤として含む抗体含有凍結乾燥製剤の製造方法であって、還元糖、非還元糖、糖アルコールおよび多糖類の総濃度が20mg/ml未満である凍結乾燥前溶液を凍結乾燥する工程を含む、前記抗体含有凍結乾燥製剤の製造方法を提供する。凍結乾燥前溶液に含まれる還元糖、非還元糖、糖アルコールまたは多糖類の合計の濃度は好ましくは10mg/ml以下、さらに好ましくは5mg/ml以下、さらに好ましくは1mg/ml以下、特に好ましくは実質的に含まないものである。

20

【0042】

界面活性剤としては、非イオン界面活性剤、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル；デカグリセリルモノステアレート、デカグリセリルジステアレート、デカグリセリルモノリノレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビットテトラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル；ポリオキシエチレングリセリルモノステアレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレングリコールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル；ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（ポリオキシエチレン水素ヒマシ油）等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油；ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；ポリオキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のHLB6~18を有するもの；陰イオン界面活性剤、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10~18のアルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2~4でアルキル基の炭素原子数が10~18であるポリオキシエチレンアル

30

40

50

キルエーテル硫酸塩；ラウリルスルホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が 8 ~ 18 のアルキルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数 12 ~ 18 の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げるができる。本発明の製剤には、これらの界面活性剤の 1 種または 2 種以上を組み合わせる添加することができる。

【 0 0 4 3 】

好ましい界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル及びポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテルであり、特に好ましいのはポリソルベート 20、21、40、60、65、80、81、85 並びにプルロニック型界面活性剤であり、最も好ましいのはポリソルベート 20、80 及びプルロニック F - 68 (ポロキサマー 188) である。

10

【 0 0 4 4 】

本発明の抗体製剤に添加する界面活性剤の添加量は、一般には 0.0001 ~ 10% (w/v) であり、好ましくは 0.001 ~ 5% であり、さらに好ましくは 0.005 ~ 3% である。

【 0 0 4 5 】

緩衝剤としての塩類としては、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどを使用できる。また、緩衝剤としての酸類としては、リン酸、炭酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸などを使用できる。さらに緩衝剤として、Tris 類及び MES、MOPS のようなグッド緩衝剤を使用してもよい。

20

【 0 0 4 6 】

本発明の製剤には、必要に応じて、懸濁剤、溶解補助剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、希釈剤、賦形剤、pH 調整剤、無痛化剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を適宜添加することができる。

【 0 0 4 7 】

懸濁剤の例としては、メチルセルロース、ポリソルベート 80、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴム、トラガント末、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート等を挙げることができる。

30

【 0 0 4 8 】

溶液補助剤としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート 80、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、マグロゴール、ヒマシ油脂肪酸エチルエステル等を挙げるができる。

【 0 0 4 9 】

等張化剤としては例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム等を挙げることができる。

【 0 0 5 0 】

保存剤としては例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロロクレゾール等を挙げることができる。

40

【 0 0 5 1 】

吸着防止剤としては例えば、ヒト血清アルブミン、レシチン、デキストラン、エチレンオキサイド・プロピレンオキサイド共重合体、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。

【 0 0 5 2 】

含硫還元剤としては例えば、N - アセチルシステイン、N - アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、炭素原子数 1 ~ 7 のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等が挙げられる。

50

【0053】

酸化防止剤としては例えば、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤が挙げられる。

【0054】

本発明の抗体含有凍結乾燥製剤は通常非経口投与経路で、例えば注射剤(皮下注、静注、筋注など)、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与されるが、経口投与も可能である。皮下注射用としては、1回あたりの抗体投与量が大量となる一方で(100~200mg程度)、注射液量の制限があるため、本発明の製剤は皮下注射用として特に適している。

10

【0055】

本発明の製剤では、後述する実施例の結果から、特定アミノ酸を添加することにより、従来賦形剤として使用されてきた糖類を用いることなしに良好な凍結乾燥組成物を得ることができ、それにより特に凍結乾燥濃縮を利用した高濃度の抗体含有製剤を製造する場合に問題となっていた再溶解後溶液の粘度の低減化を図ることができる。さらに、凍結乾燥工程や得られた高濃度の凍結乾燥製剤の保存時、及び再溶解時において、抗体の二量体や低分子量分解物などの生成が少ない安定な抗体製剤を得ることができる。

【0056】

本発明を最も好ましい態様である抗体を用いて説明してきたが、本発明は抗体に限らず、その他のタンパク質にも応用することが可能である。本発明の製剤に使用するタンパク質は、例えば、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、エリスロポエチン(EPO)、トロンボポエチン等の造血因子、インターフェロン、IL-1やIL-6等のサイトカイン、組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)、ウロキナーゼ、血清アルブミン、血液凝固第VII因子、レプチン、インシュリン、幹細胞成長因子(SCF)などを含むが、これらに限定されない。

20

【0057】

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

30

【実施例】

【0058】

抗体試料

抗IL-6レセプターヒト化抗体は国際特許出願公開番号WO92/19759号公報の実施例10に記載されたヒトエロンゲーションファクターIプロモーターを利用し、特開平8-99902号公報の参考例2に記載された方法に準じて作成したヒト化抗体である。なお、実施例の表中ではMRAと記載することもある。

実施例1：凍結乾燥製剤に対して安定化効果を有する賦形剤種の選択

抗IL-6レセプターヒト化抗体を含む凍結乾燥製剤について、凍結乾燥工程前後及び製剤自体の安定化を目的として、安定化効果を有する賦形剤種の検討を行った。

40

【0059】

本検討では、以下の10種類の賦形剤について添加効果を評価するために、試料No.1~11の評価試料を調製した。各評価試料について、凍結乾燥前調製液の処方以下の通りである。

【0060】

【表 1】

[調製液（凍結乾燥前）処方]

| 試料 No. | 抗体 mg/mL | 賦形剤 | | ポリソルベ ート 80 mg/mL | リン酸緩 衝剤 mM | pH |
|-----------|-------------|------------|----------------|-------------------------|------------------|-----|
| | | 種類 | 添加量 (mg/mL) | | | |
| 1 | 40 | スクロー ス | 25 | 0.5 | 15 | 7.0 |
| 2 | 40 | トレハロ ース | 25 | 0.5 | 15 | 7.0 |
| 3 | 40 | ラフィノ ース | 25 | 0.5 | 15 | 7.0 |
| 4 | 40 | マンニト ール | 25 | 0.5 | 15 | 7.0 |
| 5 | 40 | デキスト ラン | 25 | 0.5 | 15 | 7.0 |
| 6 | 40 | アルギニ ン | 25 | 0.5 | 15 | 7.0 |
| 7 | 40 | ヒスチジ ン | 25 | 0.5 | 15 | 7.0 |
| 8 | 40 | グリシン | 25 | 0.5 | 15 | 7.0 |
| 9 | 40 | セリン | 25 | 0.5 | 15 | 7.0 |
| 10 | 40 | プロリン | 25 | 0.5 | 15 | 7.0 |
| 11 | 40 | - | - | 0.5 | 15 | 7.0 |

10

20

【0061】

各評価試料について、上記調製液を2mLずつガラスバイアルに充填し、以下の条件にて凍結乾燥を行い、凍結乾燥製剤を得た。

【0062】

【表 2】

凍結乾燥条件

| 工程 | 棚温 | 時間 | 真空度 |
|---------|------|-------|------|
| 初期凍結 | -50℃ | 約24hr | - |
| 一次乾燥 | -20℃ | 70hr | 10Pa |
| 二次乾燥(1) | 25℃ | 28hr | 6Pa |
| 二次乾燥(2) | 30℃ | 10hr | 6Pa |

30

【0063】

各評価試料について、凍結乾燥製剤の処方以下の通りである。

【0064】

【表 3】

[凍結乾燥製剤（凍結乾燥後）処方]

| 試料 No. | 抗体 mg/vial | 賦形剤 | | ポリソルベ ート 80 mg/vial | リン酸緩 衝剤 μmol/vial | pH |
|-----------|---------------|-------------|------------------|---------------------------|-------------------------|-----|
| | | 種類 | 添加量 (mg/vial) | | | |
| 1 | 80 | スクロース | 50 | 1 | 30 | 7.0 |
| 2 | 80 | トレハロース | 50 | 1 | 30 | 7.0 |
| 3 | 80 | ラフィノー ース | 50 | 1 | 30 | 7.0 |
| 4 | 80 | マンニトール | 50 | 1 | 30 | 7.0 |
| 5 | 80 | デキストラン | 50 | 1 | 30 | 7.0 |
| 6 | 80 | アルギニン | 50 | 1 | 30 | 7.0 |
| 7 | 80 | ヒスチジン | 50 | 1 | 30 | 7.0 |
| 8 | 80 | グリシン | 50 | 1 | 30 | 7.0 |
| 9 | 80 | セリン | 50 | 1 | 30 | 7.0 |
| 10 | 80 | プロリン | 50 | 1 | 30 | 7.0 |
| 11 | 80 | - | - | 1 | 30 | 7.0 |

【0065】

凍結乾燥工程中における安定性を評価するために、凍結乾燥前調製液及び凍結乾燥後サンプルの純度を、ゲルろ過クロマトグラフ法（SEC）及びイオン交換クロマトグラフ法（IEC）により評価した。分析条件は以下の通りである。

[ゲルろ過クロマトグラフ法]

調製液及び凍結乾燥後のサンプルについては、試料にpH 7.0 のリン酸緩衝液を加えて1 mL中に抗IL-6レセプターヒト化抗体を約1mg 相当量含む液を調製したものを各サンプルの測定溶液とする。

【0066】

凍結乾燥製剤のサンプルについては、製剤1バイアルに0.6mLの精製水を加えたものを各サンプルの測定溶液とする。

【0067】

各サンプルの測定溶液を、以下の分析条件にて試験を行い、全ピーク成分に対する二量体（Dimer）及び低分子量分解物（LMW）の成分量（%）を求める。なお、一部の試料において、二量体以上の分子量を持つ凝集体の生成を認めたと、その場合は凝集体と二量体の合計量を二量体量（%）として扱った。

【0068】

分析条件

カラム：TSKgel G3000SWxl 7.8 mm I.D. × 30 cm（東ソー）

移動相：pH7.0のリン酸緩衝液（300 mmol/L塩化ナトリウム及び0.05%アジ化ナトリウムを含むpH7.0の50 mmol/Lリン酸緩衝液）

試料注入量：抗IL-6レセプターヒト化抗体にして約60～120 μg

流量：1mL/min

検出波長：280nm

[イオン交換クロマトグラフ法]

調製液及び凍結乾燥後のサンプルについては、試料に精製水を加えて1mL中に抗IL-6レセプターヒト化抗体を約1mg 相当量含む液を調製したものを各サンプルの測定溶液とする。

【0069】

凍結乾燥製剤のサンプルについては、製剤1バイアルに0.6mLの精製水を加えたものを各

10

20

30

40

50

サンプルの測定溶液とする。

【0070】

各サンプルの測定溶液を、以下の分析条件にて試験を行い、全ピーク成分に対するPreピーク（主成分よりも短い保持時間で溶出されるピークの総和）の成分量（%）を求める。Preピークには、抗IL-6レセプターヒト化抗体の脱アミド体を中心とした複数の分解物が含まれ、Preピークの生成量が少ないことは本抗体の脱アミド化が抑制されていることを意味する。

【0071】

分析条件

カラム：PolyCAT A 10 cm×4.6 mm 粒子径 3 μm 孔径 150 nm (PolyLC)

移動相：A液：pH 6.1の25mmol/L MES緩衝液

B液：pH 6.1の25mmol/L MES緩衝液（250mM酢酸ナトリウム含む）

試料注入量：抗IL-6レセプターヒト化抗体にして約30～120 μg

流量：1mL/min

検出波長：280nm

評価結果を表1に示した。このように、アルギニン（試料No.6）、ヒスチジン（試料No.7）、セリン（試料No.9）及びプロリン（試料No.10）を添加した試料について、凍結乾燥前後における二量体の増加量が明らかに抑制されており、二量体生成抑制効果を確認することができた。これらの効果は一般的な凍結乾燥保護剤として知られているスクロース或いはトレハロースよりも高かった。なお、何れの試料についても、低分子量分解物はほとんど認められなかった。表1において、Dimerは二量体を、LMWは低分子量分解物を、Preは主成分よりも短い保持時間で溶出されるピークの総和をそれぞれ表す。

【0072】

【表4】

表1

| 試料No. | Dimer (%) | | | LMW (%) | | MRA Pre (%) | | |
|-------|-----------|-------|-------|---------|-------|-------------|-------|-------|
| | 調製液 | 凍結乾燥後 | (増加量) | 調製液 | 凍結乾燥後 | 調製液 | 凍結乾燥後 | (増加量) |
| 1 | 0.42 | 0.58 | 0.16 | 0.00 | 0.00 | 17.4 | 17.0 | -0.4 |
| 2 | 0.32 | 0.54 | 0.22 | 0.00 | 0.05 | - | - | - |
| 3 | 0.33 | 0.58 | 0.25 | 0.00 | 0.00 | - | - | - |
| 4 | 0.42 | 1.05 | 0.63 | 0.00 | 0.00 | 17.6 | 17.6 | 0.0 |
| 5 | 0.60 | 8.37 | 7.77 | 0.00 | 0.00 | 17.6 | 21.3 | 3.7 |
| 6 | 0.35 | 0.36 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 17.0 | 17.0 | 0.0 |
| 7 | 0.70 | 0.68 | -0.02 | 0.00 | 0.00 | 17.0 | 16.4 | -0.6 |
| 8 | 0.33 | 2.84 | 2.51 | 0.00 | 0.00 | 17.3 | 18.2 | 0.9 |
| 9 | 0.33 | 0.35 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 17.7 | 17.7 | 0.0 |
| 10 | 0.38 | 0.45 | 0.07 | 0.00 | 0.00 | 17.5 | 17.7 | 0.2 |
| 11 | 0.35 | 1.86 | 1.51 | 0.00 | 0.07 | - | - | - |

【0073】

次に、凍結乾燥製剤としての安定性を評価するために、各試料の熱加速試験（40℃ - 1ヶ月保存）を行った。そして、熱加速前後における抗体の純度を、SEC及びIECにより評価した。分析条件は上記の通りである。

【0074】

評価結果を表2に示した。このように、アルギニン（試料No.6）、ヒスチジン（試料No.7）、セリン（試料No.9）及びプロリン（試料No.10）を添加した試料について、40℃ - 1ヶ月間の加速による二量体増加量は1%未満であり、二量体生成抑制効果を確認することができた。何れの試料についても、低分子量分解物の生成はほとんど認められなかった。また、スクロース（試料No.1）、トレハロース（試料No.2）、ラフィノース（試料No.3）、マンニトール（試料No.4）、アルギニン（試料No.6）、ヒスチジン（試料No.7）、セリン（試料No.9）及びプロリン（試料No.10）を添加した試料について、IEC分析上におけるPr

eピークの増加をほとんど認めなかった。

【 0 0 7 5 】

【表 5】

表 2

| 試料No. | Dimer (%) | | | LMW (%) | | MRA Pre (%) | | |
|-------|-----------|---------|-------|---------|---------|-------------|---------|-------|
| | Initial | 40°C-1M | (増加量) | Initial | 40°C-1M | Initial | 40°C-1M | (増加量) |
| 1 | 0.82 | 2.92 | 2.10 | 0.00 | 0.07 | 17.3 | 18.3 | 1.0 |
| 2 | 0.87 | 4.06 | 3.19 | 0.05 | 0.00 | 16.8 | 18.0 | 1.2 |
| 3 | 0.96 | 4.67 | 3.71 | 0.00 | 0.00 | 16.8 | 18.8 | 2.0 |
| 4 | 1.24 | 4.06 | 2.82 | 0.00 | 0.00 | 17.4 | 18.5 | 1.1 |
| 5 | 8.72 | 38.89 | 30.17 | 0.00 | 0.00 | 21.3 | 37.5 | 16.2 |
| 6 | 0.42 | 0.97 | 0.55 | 0.00 | 0.00 | 17.0 | 17.2 | 0.2 |
| 7 | 0.72 | 1.19 | 0.47 | 0.00 | 0.00 | 16.7 | 16.8 | 0.1 |
| 8 | 2.93 | 10.09 | 7.16 | 0.00 | 0.12 | 17.9 | 22.6 | 4.7 |
| 9 | 0.40 | 1.32 | 0.92 | 0.00 | 0.00 | 17.8 | 19.0 | 1.2 |
| 10 | 0.56 | 1.69 | 1.13 | 0.00 | 0.00 | 17.6 | 18.8 | 1.2 |
| 11 | 2.76 | 18.31 | 15.55 | 0.07 | 0.00 | 17.2 | 23.0 | 5.8 |

10

【 0 0 7 6 】

実施例 2：凍結乾燥製剤におけるアルギニン及びスクロースの添加量が安定性に及ぼす影響

20

抗IL-6レセプターヒト化抗体を含む凍結乾燥製剤について、アルギニン及びスクロースの添加量が凍結乾燥工程前後及び製剤自体の安定化に及ぼす影響を評価した。

【 0 0 7 7 】

本検討では、アルギニン及びスクロースについて、それぞれ3水準の添加量からなる試料No.12～17の評価試料を調製した。各評価試料について、凍結乾燥前調製液の処方は以下の通りである。

【 0 0 7 8 】

【表 6】

[調製液（凍結乾燥前）処方]

30

| 試料No. | 抗体 mg/mL | スクロース mg/mL | アルギニン mg/mL | ポリソルベート 80 mg/mL | リン酸緩衝剤 mM | pH |
|-------|-------------|----------------|----------------|---------------------|--------------|-----|
| 12 | 40 | - | 25 | 0.5 | 15 | 6.0 |
| 13 | 40 | - | 17.5 | 0.5 | 15 | 6.0 |
| 14 | 40 | - | 12.5 | 0.5 | 15 | 6.0 |
| 15 | 40 | 50 | - | 0.5 | 15 | 6.0 |
| 16 | 40 | 35 | - | 0.5 | 15 | 6.0 |
| 17 | 40 | 25 | - | 0.5 | 15 | 6.0 |

【 0 0 7 9 】

各評価試料について、上記調製液を2mLずつガラスバイアルに充填し、実施例 1 と同様の条件にて凍結乾燥を行い、凍結乾燥製剤を得た。各評価試料について、凍結乾燥製剤の処方は以下の通りである。

40

【 0 0 8 0 】

【表 7】

[凍結乾燥製剤（凍結乾燥後）処方]

| 試料 No. | 抗体 Mg/vial | スクロ ース | アルギ ニン | ポリソルベ ート 80 | リン酸緩 衝剤 | pH |
|-----------|---------------|-----------|-----------|----------------|------------|-----|
| | | mg/vial | mg/vial | mg/vial | mg/vial | |
| 12 | 80 | - | 50 | 1 | 30 | 6.0 |
| 13 | 80 | - | 35 | 1 | 30 | 6.0 |
| 14 | 80 | - | 25 | 1 | 30 | 6.0 |
| 15 | 80 | 100 | - | 1 | 30 | 6.0 |
| 16 | 80 | 70 | - | 1 | 30 | 6.0 |
| 17 | 80 | 50 | - | 1 | 30 | 6.0 |

10

【0081】

凍結乾燥工程中における安定性を評価するために、凍結乾燥前調製液及び凍結乾燥後サンプルの純度を、実施例 1 と同様の SEC 及び IEC により評価した。

【0082】

評価結果を表 3 に示した。アルギニン添加試料は 17.5mg/mL（試料 No. 13）以上の添加量において、凍結乾燥前後における二量体生成抑制効果を確認することができた。一方、スクロース添加試料は 50mg/mL（試料 No. 14）以上の添加量においてのみ、同様の効果を確認できた。このように、スクロースよりもアルギニンの方が、凍結乾燥前後の安定化効果が優れていることが確認できた。なお、試料 No. 15 のスクロースの添加モル量は、試料 No. 12 のアルギニンの添加モル量と等しい。何れの試料についても、低分子量分解物は認められず、かつ Pre ピーク（IEC）の増加は認められなかった。

20

【0083】

【表 8】

表 3

| 試料No. | Dimer (%) | | | LMW (%) | | MRA Pre (%) | | |
|-------|-----------|-------|-------|---------|-------|-------------|-------|-------|
| | 調製液 | 凍結乾燥後 | (増加量) | 調製液 | 凍結乾燥後 | 調製液 | 凍結乾燥後 | (増加量) |
| 12 | 0.34 | 0.32 | -0.02 | 0.00 | 0.00 | 16.5 | 17.1 | 0.6 |
| 13 | 0.37 | 0.39 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 16.6 | 17.2 | 0.6 |
| 14 | 0.36 | 0.42 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 16.8 | 17.2 | 0.4 |
| 15 | 0.45 | 0.48 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 17.1 | 17.3 | 0.2 |
| 16 | 0.48 | 0.55 | 0.07 | 0.00 | 0.00 | 17.2 | 17.8 | 0.6 |
| 17 | 0.50 | 0.66 | 0.16 | 0.00 | 0.00 | 16.9 | 17.5 | 0.6 |

30

【0084】

次に、凍結乾燥製剤としての安定性を評価するために、各試料の熱加速試験（40 及び 25 - 1ヶ月保存）を行った。そして、熱加速前後における抗体の純度を、実施例 1 と同様の SEC 及び IEC により評価した。

【0085】

評価結果を表 4 に示した。アルギニン及びスクロースの何れについても添加量を増やすほど、40 及び 25 - 1ヶ月間の加速による高い二量体生成抑制効果を確認することができた。一方、少ない添加量における二量体増加量は、アルギニンの方が僅かに低かった。添加量の何れを問わず、低分子量分解物はほとんど認められず、かつ Pre ピーク（IEC）の増加は認められなかった。

40

【0086】

【表 9】

表 4

| 試料No. | Dimer (%) | | | | | LMW (%) | | |
|-------|-----------|---------|-------|---------|-------|---------|---------|---------|
| | Initial | 40°C-1M | (増加量) | 25°C-1M | (増加量) | Initial | 40°C-1M | 25°C-1M |
| 12 | 0.31 | 0.82 | 0.51 | 0.47 | 0.16 | 0.00 | 0.11 | 0.00 |
| 13 | 0.37 | 1.15 | 0.78 | 0.60 | 0.23 | 0.00 | 0.06 | 0.00 |
| 14 | 0.41 | 1.66 | 1.25 | 0.73 | 0.32 | 0.00 | 0.13 | 0.00 |
| 15 | 0.53 | 1.07 | 0.54 | 0.69 | 0.16 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 16 | 0.64 | 1.63 | 0.99 | 0.89 | 0.25 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 17 | 0.70 | 2.27 | 1.57 | 1.12 | 0.42 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

| 試料No. | MRA Pre (%) | | | | |
|-------|-------------|---------|-------|---------|-------|
| | Initial | 40°C-1M | (増加量) | 25°C-1M | (増加量) |
| 12 | 16.8 | 16.8 | 0.0 | 16.7 | -0.1 |
| 13 | 16.7 | 17.1 | 0.4 | 16.8 | 0.1 |
| 14 | 16.7 | 17.2 | 0.5 | 16.7 | 0.0 |
| 15 | 17.2 | 17.5 | 0.3 | 17.1 | -0.1 |
| 16 | 17.1 | 17.7 | 0.6 | 17.1 | 0.0 |
| 17 | 17.0 | 18.0 | 1.0 | 17.4 | 0.4 |

10

【 0 0 8 7 】

実施例 3 : アルギニンを含む凍結乾燥製剤における製剤 pH が安定性に及ぼす影響

抗 IL-6 レセプターヒト化抗体及びアルギニンを含む凍結乾燥製剤について、製剤 pH が凍結乾燥工程前後及び製剤自体の安定化に及ぼす影響を評価した。

20

【 0 0 8 8 】

本検討では、製剤 pH が 5.5 ~ 7.0 となる範囲について、試料 No. 18 ~ 21 の評価試料を調製した。各評価試料について、凍結乾燥前調製液の処方は以下の通りである。

【 0 0 8 9 】

【表 10】

[調製液 (凍結乾燥前) 処方]

| 試料 No. | 抗体 mg/mL | アルギニン mg/mL | ポリソルベート 80 mg/mL | リン酸緩衝剤 mM | pH |
|--------|----------|-------------|------------------|-----------|-----|
| 18 | 40 | 25 | 0.5 | 15 | 7.0 |
| 19 | 40 | 25 | 0.5 | 15 | 6.5 |
| 20 | 40 | 25 | 0.5 | 15 | 6.0 |
| 21 | 40 | 25 | 0.5 | 15 | 5.5 |

30

【 0 0 9 0 】

各評価試料について、上記調製液を 2mL ずつガラスバイアルに充填し、実施例 1 と同様の条件にて凍結乾燥を行い、凍結乾燥製剤を得た。各評価試料について、凍結乾燥製剤の処方は以下の通りである。

【 0 0 9 1 】

【表 11】

[凍結乾燥製剤 (凍結乾燥後) 処方]

| 試料 No. | 抗体 mg/vial | アルギニン Mg/vial | ポリソルベート 80 mg/vial | リン酸緩衝剤 μ mol/vial | pH |
|--------|------------|---------------|--------------------|-----------------------|-----|
| 18 | 80 | 50 | 1 | 30 | 7.0 |
| 19 | 80 | 50 | 1 | 30 | 6.5 |
| 20 | 80 | 50 | 1 | 30 | 6.0 |
| 21 | 80 | 50 | 1 | 30 | 5.5 |

40

50

【 0 0 9 2 】

凍結乾燥工程中における安定性を評価するために、凍結乾燥前調製液及び凍結乾燥後サンプルの純度を、実施例 1 と同様のSEC及びIECにより評価した。

【 0 0 9 3 】

評価結果を表 5 に示した。調製液の二量体量はpHが低い試料ほど少なかったが、凍結乾燥前後における二量体生成は何れのpHにおいても認められなかった。なお、何れの試料についても、低分子量分解物は認められず、かつPreピーク (IEC) の増加は認められなかった。

【 0 0 9 4 】

【表 1 2】

10

表 5

| 試料No. | Dimer (%) | | | LMW (%) | | MRA Pre (%) | | |
|-------|-----------|-------|-------|---------|-------|-------------|-------|-------|
| | 調製液 | 凍結乾燥後 | (増加量) | 調製液 | 凍結乾燥後 | 調製液 | 凍結乾燥後 | (増加量) |
| 18 | 0.42 | 0.44 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 16.5 | 17.2 | 0.7 |
| 19 | 0.36 | 0.35 | -0.01 | 0.00 | 0.00 | 16.9 | 17.3 | 0.4 |
| 20 | 0.34 | 0.32 | -0.02 | 0.00 | 0.00 | 16.5 | 17.1 | 0.6 |
| 21 | 0.35 | 0.32 | -0.03 | 0.00 | 0.00 | 17.5 | 16.6 | -0.9 |

【 0 0 9 5 】

次に、凍結乾燥製剤としての安定性を評価するために、各試料の熱加速試験 (40 及び 25 - 1ヶ月保存) を行った。そして、熱加速前後における抗体の純度を、実施例 1 と同様のSEC及びIECにより評価した。

20

【 0 0 9 6 】

評価結果を表 6 に示した。調製液の二量体量の差に起因して、加速前の二量体量はpHが低い試料ほど少なかった。しかし、40 及び25 - 1ヶ月間の加速による二量体増加量は何れのpHにおいても同等であった。また、何れのpHにおいても、低分子量分解物はほとんど認められず、かつPreピーク (IEC) の増加は認められなかった。

【 0 0 9 7 】

【表 1 3】

30

表 6

| 試料No. | Dimer (%) | | | | | LMW (%) | | |
|-------|-----------|---------|-------|---------|-------|---------|---------|---------|
| | Initial | 40°C-1M | (増加量) | 25°C-1M | (増加量) | Initial | 40°C-1M | 25°C-1M |
| 18 | 0.44 | 0.95 | 0.51 | 0.61 | 0.17 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 19 | 0.34 | 0.82 | 0.48 | 0.50 | 0.16 | 0.00 | 0.05 | 0.00 |
| 20 | 0.31 | 0.82 | 0.51 | 0.47 | 0.16 | 0.00 | 0.11 | 0.00 |
| 21 | 0.31 | 0.82 | 0.51 | 0.47 | 0.16 | 0.00 | 0.05 | 0.00 |

| 試料No. | MRA Pre (%) | | | | |
|-------|-------------|---------|-------|---------|-------|
| | Initial | 40°C-1M | (増加量) | 25°C-1M | (増加量) |
| 18 | 17.0 | 17.2 | 0.2 | 17.0 | 0.0 |
| 19 | 16.8 | 17.0 | 0.2 | 16.9 | 0.1 |
| 20 | 16.8 | 16.8 | 0.0 | 16.7 | -0.1 |
| 21 | 16.5 | 16.6 | 0.1 | 16.5 | 0.0 |

40

【 0 0 9 8 】

実施例 4 : アルギニンを含む凍結乾燥製剤における抗体含量が安定性に及ぼす影響

抗IL-6レセプターヒト化抗体及びアルギニンを含む凍結乾燥製剤について、高含量化の可能性を見極めるために、抗体含量が凍結乾燥工程前後及び製剤自体の安定化に及ぼす影響を評価した。

【 0 0 9 9 】

本検討では、製剤中抗体含量が80及び240mg/vialとなるように、試料No.22~23の評価試料を調製した。各評価試料について、凍結乾燥前調製液の処方以下の通りである。

【 0 1 0 0 】

50

【表 1 4】

[調製液 (凍結乾燥前) 処方]

| 試料 No. | 抗体 mg/mL | アルギニン mg/mL | ポリソルベート 80 mg/mL | リン酸緩衝剤 mM | pH |
|--------|----------|-------------|------------------|-----------|-----|
| 22 | 40 | 25 | 0.5 | 15 | 6.0 |
| 23 | 40 | 25 | 0.5 | 15 | 6.0 |

【0101】

各評価試料について、試料No.22については2mLずつ、試料No.23については6mLずつ上記調製液をガラスバイアルに充填し、以下の条件にて凍結乾燥を行い、凍結乾燥製剤を得た。

10

【0102】

【表 1 5】

凍結乾燥条件

| 工程 | 棚温 | 時間 | 真空度 |
|---------|------|-------|------|
| 初期凍結 | -50℃ | 約24hr | - |
| 一次乾燥 | -20℃ | 105hr | 10Pa |
| 二次乾燥(1) | 25℃ | 28hr | 6Pa |
| 二次乾燥(2) | 30℃ | 10hr | 6Pa |

20

【0103】

各評価試料について、凍結乾燥製剤の処方は以下の通りである。

【0104】

【表 1 6】

[凍結乾燥製剤 (凍結乾燥後) 処方]

| 試料 No. | 抗体 mg/vial | アルギニン mg/vial | ポリソルベート 80 mg/vial | リン酸緩衝剤 μ mol/vial | pH |
|--------|------------|---------------|--------------------|-----------------------|-----|
| 22 | 80 | 50 | 1 | 30 | 6.0 |
| 23 | 240 | 150 | 3 | 90 | 6.0 |

30

【0105】

凍結乾燥工程中における安定性を評価するために、凍結乾燥前調製液及び凍結乾燥後サンプルの純度を、実施例1と同様のSECにより評価した。

【0106】

評価結果を表7に示した。何れの含量においても、凍結乾燥前後における二量体は増加しておらず、かつ低分子量分解物は認められなかった。

【0107】

【表 1 7】

表 7

| 試料No. | Dimer (%) | | | LMW (%) | |
|-------|-----------|-------|-------|---------|-------|
| | 調製液 | 凍結乾燥後 | (増加量) | 調製液 | 凍結乾燥後 |
| 22 | 0.34 | 0.32 | -0.02 | 0.00 | 0.00 |
| 23 | 0.46 | 0.43 | -0.03 | 0.00 | 0.00 |

【0108】

次に、凍結乾燥製剤としての安定性を評価するために、各試料の熱加速試験(40 及び

50

25 - 1ヶ月保存)を行った。そして、熱加速前後における抗体の純度を、実施例1と同様のSECにより評価した。

【0109】

評価結果を表8に示した。40℃及び25℃-1ヶ月間の加速による二量体増加量は何れの含量においても同等であった。また、含量の何れを問わず、低分子量分解物はほとんど認められなかった。

【0110】

【表18】

表8

| 試料No. | Dimer (%) | | | | | LMW (%) | | |
|-------|-----------|--------|-------|--------|-------|---------|--------|--------|
| | Initial | 40℃-1M | (増加量) | 25℃-1M | (増加量) | Initial | 40℃-1M | 25℃-1M |
| 22 | 0.31 | 0.82 | 0.51 | 0.47 | 0.16 | 0.00 | 0.11 | 0.00 |
| 23 | 0.43 | 0.97 | 0.54 | 0.61 | 0.18 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

【0111】

実施例5：凍結乾燥製剤の凍乾ケーキ形成性を指標とした賦形剤種及び添加量の選択

抗IL-6レセプターヒト型化抗体を含む凍結乾燥製剤について、賦形剤種が凍乾ケーキ形成性に及ぼす影響を確認するために、実施例1で評価した試料(試料No.1~11)における凍乾ケーキの縮み(シュリンク)の有無を目視にて評価した。なお、凍乾ケーキの縮みが半径1mm以上認められたものを「シュリンクあり」とした。

【0112】

得られた結果を表9に示す。賦形剤を加えなかった試料については、凍乾ケーキのシュリンク傾向が認められた。一方、デキストランを除く全ての賦形剤において、凍乾ケーキのシュリンク傾向は認められず、ケーキ形状は良好であった。

【0113】

【表19】

表9

| 試料No. | MRA mg/vial | 賦形剤 | | ポリソルベート80 mg/vial | リン酸緩衝剤 μmol/mL | pH | ケーキ形状 |
|-------|----------------|--------|---------------|----------------------|-------------------|-----|---------|
| | | 種類 | 添加量 (mg/vial) | | | | |
| 1 | 80 | スクロース | 50 | 1 | 30 | 7.0 | シュリンクなし |
| 2 | 80 | トレハロース | 50 | 1 | 30 | 7.0 | シュリンクなし |
| 3 | 80 | ラフィノース | 50 | 1 | 30 | 7.0 | シュリンクなし |
| 4 | 80 | マンニトール | 50 | 1 | 30 | 7.0 | シュリンクなし |
| 5 | 80 | デキストラン | 50 | 1 | 30 | 7.0 | シュリンクあり |
| 6 | 80 | アルギニン | 50 | 1 | 30 | 7.0 | シュリンクなし |
| 7 | 80 | ヒスチジン | 50 | 1 | 30 | 7.0 | シュリンクなし |
| 8 | 80 | グリシン | 50 | 1 | 30 | 7.0 | シュリンクなし |
| 9 | 80 | セリン | 50 | 1 | 30 | 7.0 | シュリンクなし |
| 10 | 80 | プロリン | 50 | 1 | 30 | 7.0 | シュリンクなし |
| 11 | 80 | - | - | 1 | 30 | 7.0 | シュリンクあり |

【0114】

次に、実施例2で評価した試料(試料No.12~17)を用いて、アルギニン及びスクロースの添加量が凍乾ケーキの形成性に及ぼす影響を評価した。

【0115】

得られた結果を表10に示す。アルギニンでは50 mg/vial以上の添加量において(調製液濃度25 mg/mL)、スクロースでは100 mg/vial以上の添加量において(調製液濃度50 mg/mL)、シュリンク傾向は認められず、凍乾ケーキ形状は良好であった。

【0116】

10

20

30

40

【表 2 0】

表 1 0

| 試料No. | MRA mg/vial | スクロース mg/vial | アルギニン mg/vial | ポリソルベート80 mg/vial | リン酸緩衝剤 μmol/mL | pH | ケーキ形状 |
|-------|----------------|------------------|------------------|----------------------|-------------------|-----|---------|
| 12 | 80 | - | 50 | 1 | 30 | 6.0 | シュリンクなし |
| 13 | 80 | - | 35 | 1 | 30 | 6.0 | シュリンクなし |
| 14 | 80 | - | 25 | 1 | 30 | 6.0 | シュリンクなし |
| 15 | 80 | 100 | - | 1 | 30 | 6.0 | シュリンクなし |
| 16 | 80 | 70 | - | 1 | 30 | 6.0 | シュリンクなし |
| 17 | 80 | 50 | - | 1 | 30 | 6.0 | シュリンクなし |

10

【 0 1 1 7】

実施例 6：アルギニンを含む凍結乾燥製剤の凍乾ケーキ形成性を指標としたアルギニン添加量の最適化

抗IL-6レセプターヒト化抗体及びアルギニンを含む凍結乾燥製剤について、抗体含量及びアルギニン添加量が凍乾ケーキ形成性に及ぼす影響を評価した。

【 0 1 1 8】

本検討では、製剤中抗体含量が40～160mg/vialとなるように、試料No.24～48の評価試料を調製した。各評価試料について、凍結乾燥前調製液の処方は以下の通りである。

【 0 1 1 9】

【表 2 1】

20

〔調製液（凍結乾燥前）処方〕

| 試料 No. | 抗体 mg/mL | アルギニン mg/mL | ポリソルベート 80 mg/mL | リン酸緩衝 剤 mM | pH |
|--------|-------------|----------------|------------------------|------------------|-----|
| 24 | 20 | 0 | 0.15 | 19 | 6.0 |
| 25 | 20 | 6.25 | 0.15 | 19 | 6.0 |
| 26 | 20 | 12.5 | 0.15 | 19 | 6.0 |
| 27 | 20 | 25 | 0.15 | 19 | 6.0 |
| 28 | 20 | 50 | 0.15 | 19 | 6.0 |
| 29 | 30 | 0 | 0.23 | 19 | 6.0 |
| 30 | 30 | 6.25 | 0.23 | 19 | 6.0 |
| 31 | 30 | 12.5 | 0.23 | 19 | 6.0 |
| 32 | 30 | 25 | 0.23 | 19 | 6.0 |
| 33 | 30 | 50 | 0.23 | 19 | 6.0 |
| 34, 44 | 40 | 0 | 0.31 | 19 | 6.0 |
| 35, 45 | 40 | 6.25 | 0.31 | 19 | 6.0 |
| 36, 46 | 40 | 12.5 | 0.31 | 19 | 6.0 |
| 37, 47 | 40 | 25 | 0.31 | 19 | 6.0 |
| 38, 48 | 40 | 50 | 0.31 | 19 | 6.0 |
| 39 | 60 | 0 | 0.46 | 19 | 6.0 |
| 40 | 60 | 6.25 | 0.46 | 19 | 6.0 |
| 41 | 60 | 12.5 | 0.46 | 19 | 6.0 |
| 42 | 60 | 25 | 0.46 | 19 | 6.0 |
| 43 | 60 | 50 | 0.46 | 19 | 6.0 |

30

【 0 1 2 0】

各評価試料について、試料No.24～43については2mLずつ、試料No.44～48については4mLずつ上記調製液をガラスバイアルに充填し、実施例 1 と同様の条件にて凍結乾燥を行い、各10本ずつの凍結乾燥製剤を得た。各評価試料について、凍結乾燥製剤の処方は以下の通りである。

【 0 1 2 1】

40

【表 2 2】

[凍結乾燥製剤（凍結乾燥後）処方]

| 試料 No. | 抗体 mg/vial | アルギニン mg/vial | ポリソルベート 80 mg/vial | リン酸緩衝 剤 μ mol/vial | pH |
|--------|---------------|------------------|--------------------------|------------------------------|-----|
| 24 | 40 | 0 | 0.31 | 38 | 6.0 |
| 25 | 40 | 12.5 | 0.31 | 38 | 6.0 |
| 26 | 40 | 25 | 0.31 | 38 | 6.0 |
| 27 | 40 | 50 | 0.31 | 38 | 6.0 |
| 28 | 40 | 100 | 0.31 | 38 | 6.0 |
| 29 | 60 | 0 | 0.46 | 38 | 6.0 |
| 30 | 60 | 12.5 | 0.46 | 38 | 6.0 |
| 31 | 60 | 25 | 0.46 | 38 | 6.0 |
| 32 | 60 | 50 | 0.46 | 38 | 6.0 |
| 33 | 60 | 100 | 0.46 | 38 | 6.0 |
| 34 | 80 | 0 | 0.61 | 38 | 6.0 |
| 35 | 80 | 12.5 | 0.61 | 38 | 6.0 |
| 36 | 80 | 25 | 0.61 | 38 | 6.0 |
| 37 | 80 | 50 | 0.61 | 38 | 6.0 |
| 38 | 80 | 100 | 0.61 | 38 | 6.0 |
| 39 | 120 | 0 | 0.92 | 38 | 6.0 |
| 40 | 120 | 12.5 | 0.92 | 38 | 6.0 |
| 41 | 120 | 25 | 0.92 | 38 | 6.0 |
| 42 | 120 | 50 | 0.92 | 38 | 6.0 |
| 43 | 120 | 100 | 0.92 | 38 | 6.0 |
| 44 | 160 | 0 | 1.22 | 77 | 6.0 |
| 45 | 160 | 25 | 1.22 | 77 | 6.0 |
| 46 | 160 | 50 | 1.22 | 77 | 6.0 |
| 47 | 160 | 100 | 1.22 | 77 | 6.0 |
| 48 | 160 | 200 | 1.22 | 77 | 6.0 |

10

20

【 0 1 2 2】

各試料について10本の凍結乾燥製剤における凍乾ケーキの縮み（シュリンク）の有無を実施例5と同様にして目視にて評価し（評価者：3名）、凍乾ケーキの縮みが1 mm以内のものを良品とし、その比率を凍乾ケーキ良品率とした。評価結果として各試料の凍乾ケーキの良品率を表11に示した。

30

【 0 1 2 3】

【表 2 3】

表 1 1

| 試料No. | 抗体 mg/mL | アルギニン mg/mL | 抗体 mg/vial | アルギニン mg/vial | 凍乾ケーキ 良品率(%) |
|-------|-------------|----------------|---------------|------------------|-----------------|
| 24 | 20 | 0 | 40 | 0 | 0.0 |
| 25 | 20 | 6.25 | 40 | 12.5 | 0.0 |
| 26 | 20 | 12.5 | 40 | 25 | 13.3 |
| 27 | 20 | 25 | 40 | 50 | 46.7 |
| 28 | 20 | 50 | 40 | 100 | 0.0 |
| 29 | 30 | 0 | 60 | 0 | 0.0 |
| 30 | 30 | 6.25 | 60 | 12.5 | 10.0 |
| 31 | 30 | 12.5 | 60 | 25 | 33.3 |
| 32 | 30 | 25 | 60 | 50 | 63.3 |
| 33 | 30 | 50 | 60 | 100 | 86.7 |
| 34 | 40 | 0 | 80 | 0 | 0.0 |
| 35 | 40 | 6.25 | 80 | 12.5 | 20.0 |
| 36 | 40 | 12.5 | 80 | 25 | 46.7 |
| 37 | 40 | 25 | 80 | 50 | 100.0 |
| 38 | 40 | 50 | 80 | 100 | 100.0 |
| 39 | 60 | 0 | 120 | 0 | 0.0 |
| 40 | 60 | 6.25 | 120 | 12.5 | 13.3 |
| 41 | 60 | 12.5 | 120 | 25 | 53.3 |
| 42 | 60 | 25 | 120 | 50 | 86.7 |
| 43 | 60 | 50 | 120 | 100 | 80.0 |
| 44 | 40 | 0 | 160 | 0 | 6.7 |
| 45 | 40 | 6.25 | 160 | 25 | 16.7 |
| 46 | 40 | 12.5 | 160 | 50 | 53.3 |
| 47 | 40 | 25 | 160 | 100 | 100.0 |
| 48 | 40 | 50 | 160 | 200 | 100.0 |

10

20

【 0 1 2 4 】

本評価の結果、良品率が30%以上、好ましくは40%以上、さらに好ましくは50%以上であれば、製品として実質的には特に問題なかった。

【 0 1 2 5 】

試料No.32, 33, 37, 38, 41, 42, 43, 46, 47, 48については、凍乾ケーキの縮みを認めない良品の割合が50%以上という良好な凍乾ケーキ形成性を示した。また、試料No.33, 37, 38, 42, 43, 47, 48については、凍乾ケーキの縮みを認めない良品の割合が80%以上という極めて良好な凍乾ケーキ形成性を示した。このように、凍乾ケーキ形成は調製液の抗体濃度が高いほど良好であり、抗体濃度が30 mg/mL以上の場合は、25 mg/mL以上のアルギニン添加で凍乾ケーキ良品率は50%以上となった。特に、抗体濃度が40 mg/mL以上の場合は、25 mg/mL以上のアルギニン添加で凍乾ケーキ良品率は80%以上となった。

30

実施例 7 : 凍結乾燥製剤再溶解液の粘度に賦形剤種類が及ぼす影響

抗IL-6レセプターヒト化抗体を含む凍結乾燥製剤について、賦形剤種類が再溶解液の粘度に及ぼす影響を評価した。

【 0 1 2 6 】

評価試料としては、実施例 1 で評価した試料のうち試料No.1,2,3,6,8,9,10を用い、凍結乾燥製剤に0.6mLの注射用水を添加することにより再溶解液を調製した。

40

【 0 1 2 7 】

各評価試料の再溶解液の粘度は、コーン - プレート型粘度計を用いて測定した。試験条件は以下のとおりである。

[粘度測定法]

再溶解液の粘度は、粘弾性測定装置Rheometer AR-1000 (TA Instruments, Inc.) を用いて測定した。

【 0 1 2 8 】

分析条件

Geometry ; Cone-and-plate system

50

(Angle 2 α , Diameter 40 mm, Truncation 61 μ m)

測定温度 ; 25

測定サイクル ;

| Steps | 所要時間 | Shear rate |
|------------------------|--------|------------------------|
| Conditioning step | 10 sec | - |
| Continuous ramp step 1 | 5 min | 1 300 [1/s]となるよう対数的に加速 |
| Peak hold step 1 | 15 sec | 300 [1/s]の一定値 |
| Continuous ramp step 2 | 5 min | 300 1 [1/s]となるよう対数的に減速 |

Continuous ramp step 1及びContinuous ramp step 2において、GeometryにかかるShear stressをモニターし、ニュートン流体の近似式から各ステップにおける粘度を算出した。なお、Continuous ramp step 1とContinuous ramp step 2における粘度の平均値を各試料の粘度とした。

【 0 1 2 9 】

各試料の粘度測定結果を表 1 2 に示した。糖類を賦形剤とした処方と比較して、アミノ酸を賦形剤とした処方は、添加量が等しいにもかかわらず低い粘度を示した。特に、アルギニンを追加した処方は、スクロース処方と比較して1 mPa・s以上の粘度低下を認めた。

【 0 1 3 0 】

【表 2 4】

表 1 2

| 試料No. | 抗体 mg/vial | 賦形剤 | | ポリソル ベート80 mg/vial | リン酸 緩衝剤 μ mol/vial | pH | 粘度 mPa・s |
|-------|---------------|--------|----------------|--------------------------|------------------------------|----|-------------|
| | | 種類 | 添加量 mg/vial | | | | |
| 1 | 80 | スクロース | 50 | 1 | 30 | 7 | 3.5 |
| 2 | 80 | トレハロース | 50 | 1 | 30 | 7 | 3.7 |
| 3 | 80 | ラフィノース | 50 | 1 | 30 | 7 | 3.7 |
| 6 | 80 | アルギニン | 50 | 1 | 30 | 7 | 2.3 |
| 8 | 80 | グリシン | 50 | 1 | 30 | 7 | 3 |
| 9 | 80 | セリン | 50 | 1 | 30 | 7 | 2.7 |
| 10 | 80 | プロリン | 50 | 1 | 30 | 7 | 2.9 |

【 0 1 3 1 】

実施例 8 : アルギニンを含む凍結乾燥製剤の再溶解液粘度に対する抗体濃度の影響

抗IL-6レセプターヒト化抗体及びアルギニンを含む凍結乾燥製剤について、再溶解液の粘度に対する抗体濃度の影響を評価した。

【 0 1 3 2 】

本検討では、実施例2で評価した試料のうち試料No. 12について、以下に示したように添加する注射水の量を変動させることにより、試料No. 49~53からなる抗体濃度の異なる再溶解液試料を調製した。また、抗IL-6レセプターヒト化抗体及びスクロースを含む凍結乾燥製剤である実施例2で評価した試料No. 16について、試料No.54として抗体濃度が約200 mg/mLとなるように調製した再溶解液試料の粘度を参考として測定した。粘度測定については、実施例7と同一の手法を用いた。

【 0 1 3 3 】

【表 2 5】

| 試料 No. | 抗体 mg/mL | アルギニン mg/mL | スクロース mg/mL | ポリソルベート 80 mg/mL | リン酸緩衝 剤 mM | pH |
|--------|-------------|----------------|----------------|------------------------|------------------|-----|
| 49 | 120 | 75 | 0 | 1.5 | 45 | 6.0 |
| 50 | 140 | 87.5 | 0 | 1.75 | 52.5 | 6.0 |
| 51 | 160 | 100 | 0 | 2 | 60 | 6.0 |
| 52 | 180 | 112.5 | 0 | 2.25 | 67.5 | 6.0 |
| 53 | 200 | 125 | 0 | 2.5 | 75 | 6.0 |
| 54 | 195 | 0 | 171 | 2.4 | 73 | 7.0 |

10

【 0 1 3 4 】

粘度測定結果を表 1 3 に示した。抗体濃度が増大すると共に粘度は増大したが、抗体濃度 200 mg/mL における粘度は 16.9 mPa・s となり、スクロースを含む抗体濃度 195 mg/mL の再溶解液と比較して低値を示した。このように、アルギニン処方とスクロース処方を比較すると、アルギニンの方が高モル濃度であるにもかかわらず高抗体濃度における粘度は低く、アルギニンは抗体溶液の粘度を低減させる可能性が示唆された。

【 0 1 3 5 】

【表 2 6】

表 1 3

| 試料No. | 抗体 mg/mL | アルギニン | | スクロース | | 粘度 mPa・s |
|-------|-------------|-------|-----|-------|-----|-------------|
| | | mg/mL | mM | mg/mL | mM | |
| 49 | 120 | 75 | 431 | 0 | 0 | 3.4 |
| 50 | 140 | 87.5 | 502 | 0 | 0 | 4.9 |
| 51 | 160 | 100 | 574 | 0 | 0 | 7.2 |
| 52 | 180 | 112.5 | 646 | 0 | 0 | 11.0 |
| 53 | 200 | 125 | 718 | 0 | 0 | 16.9 |
| 54 | 195 | 0 | 0 | 171 | 500 | 25.3 |

20

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 47/22

(72)発明者 森近 俊行
東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内

(72)発明者 亀岡 大介
東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 特開平05-065233(JP,A)
特開昭55-164630(JP,A)
米国特許第06887852(US,B1)
特開平11-080022(JP,A)
特表2004-532798(JP,A)
国際公開第2003/068259(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 9/19
A 6 1 K 47/18
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)