# 明　細　書

## 発明の名称 ： 抗体含有製剤

## 技術分野

[0001] 本発明は血液凝固第IX因子（FIX）および／または活性化血液凝固第IX因子(FIXa)ならびに血液凝固第X因子（FX）の双方に結合し、血液凝固第VIII因子（FVIII）の機能を代替する二重特異性抗体を含有する製剤に関する。

## 背景技術

[0002] 血液凝固第IX因子（FIX）および／または活性化血液凝固第IX因子（FIXa）ならびに血液凝固第X因子（FX）の双方に結合し、FVIIIの機能を代替する二重特異性抗体が見出された（非特許文献１、２、特許文献１、２、３）。二重特異性抗体であるEmicizumab（ACE910）はFVIIIの機能を代替することで、FVIII欠損及び機能異常による凝固反応の低下を改善するため、血友病A患者を対象とした臨床試験が行われている。

これまで抗体の溶液製剤は数多く開発されており、これまで抗体の高濃度の溶液製剤ではヒスチジンやアルギニンを用いた製剤（特許文献４）、ヒスチジン－アスパラギン酸塩緩衝液を用いた製剤（特許文献５）が報告されている。一方で、バッファーとしてヒスチジン／ヒスチジン－HClを用いたアミロイドβ（Aβ）を含む安定な液体薬学的抗体製剤（特許文献６）が報告されている。

しかしながら、前記二重特異性抗体を含む溶液製剤で会合体形成及び／又は電荷的ヘテロ成分が抑制された安定した溶液製剤はまだ報告されていない。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0003] 特許文献1：WO2005/035756

特許文献2：WO2006/109592

特許文献3：WO2012/067176

特許文献4：WO2002/030463

特許文献5：WO2011/090088

特許文献6：WO2013/131866

## 非特許文献

[0004] 非特許文献1：Nat Med. 2012; 18(10):1570-74

非特許文献2：PLoS One. 2013; 8(2):e57479.

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、FIXおよび／またはFIXaならびにFXの双方に結合し、FVIIIの機能を代替する二重特異性抗体であるEmicizumab（ACE910）を含有する、安定な溶液製剤を提供することである。

## 課題を解決するための手段

[0006] 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、前記二重特異性抗体を20～180 mg/mLを含み、10 mM～40 mM ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、0.2～1 mg/mL Poloxamer 188、100 mM～300 mM アルギニン、pH4.5～6.5である溶液製剤とすることで、会合体形成及び／又は電荷的ヘテロ成分が抑制された安定な抗体含有溶液製剤となしうることを見いだし、本発明を完成した。

[0007] すなわち、本発明は以下のものを提供する。

〔１〕20～180 mg/mLの、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：1、2、3（Q499のH鎖CDR）に記載のH鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含むH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：4、5、6（J327のH鎖CDR）に記載のH鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含むH鎖、第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：7、8、9（L404のL鎖CDR）に記載のL鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む共通L鎖からなる二重特異性抗体、

10 mM ～40 mM ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、

0.2～1 mg/mL Poloxamer 188、

100 mM ～300 mM アルギニン、

を含み、pHは4.5～6.5である抗体溶液製剤。

〔２〕前記二重特異性抗体は、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：11に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、および第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：12に記載の共通L鎖からなる二重特異性抗体である、〔１〕の抗体溶液製剤。

〔３〕Poloxamer 188の濃度は0.5 mg/mLである、〔１〕または〔２〕の抗体溶液製剤。

〔４〕pHが6.0である、〔１〕～〔３〕のいずれかの抗体溶液製剤。

〔５〕ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液の濃度は20 mMである、〔１〕～〔４〕のいずれかの抗体溶液製剤。

〔６〕アルギニン濃度は150 mMである、〔１〕～〔５〕のいずれかの抗体溶液製剤。

〔７〕塩化物イオンおよび酢酸イオンを実質的に含まない、〔１〕～〔６〕のいずれかの抗体溶液製剤。

〔８〕20～180 mg/mLの、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：11に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、および第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：12に記載の共通L鎖からなる二重特異性抗体、

20 mM L-ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、

0.5 mg/mL Poloxamer 188

150 mM L-Arginine

を含み、pHは6である抗体溶液製剤。

〔９〕皮下投与に用いられる、〔１〕～〔８〕のいずれかの抗体溶液製剤。

〔１０〕血友病A治療に用いられる、〔１〕～〔９〕のいずれかの抗体溶液製剤。

〔１１〕抗体含有溶液製剤において抗体を安定化する方法であって、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、Poloxamer 188及びアルギニンを添加することを含み、ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液濃度が10 mM ～40 mM、Poloxamer 188の濃度が0.2～1 mg/mL 、アルギニン濃度が100 mM ～300 mMとする、前記方法。

〔１２〕抗体含有溶液製剤において抗体の会合化（会合体形成）を抑制する方法であって、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、Poloxamer 188及びアルギニンを添加することを含み、ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液濃度が10 mM ～40 mM、Poloxamer 188の濃度が0.2～1 mg/mL 、アルギニン濃度が100 mM ～300 mMとする、前記方法。

〔１３〕抗体含有製剤において電荷的ヘテロ成分を低減する方法であって、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液を添加することを含み、ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液濃度が10 mM ～40 mMとする、前記方法。

## 発明の効果

[0008] 本発明により、安定性に優れた抗体含有製剤が提供される。また本発明により、溶液状態の製剤における会合体生成及び／又は電荷的ヘテロ成分が抑制された抗体含有製剤を提供することが可能となった。

## 図面の簡単な説明

[0009] [図1]実施例８に係る振とう実験後の不溶性異物を示す写真である（a: 0 mg/mL Poloxamer188, b: 0.5 mg/mL Poloxamer188）。

[図2]実施例８に係る振とう実験後および凍結融解後の不溶性微粒子数（微粒子数/mL）を示すグラフである。

## 発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0011] 本発明は、FIXおよび／またはFIXaならびにFXの双方に結合し、FVIIIの機能を代替する二重特異性抗体であるEmicizumab（ACE910）を20～180 mg/mLを含み、10 mM～40 mM ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、0.2～1 mg/mL Poloxamer 188、100 mM～300 mM アルギニン、pH4.5～6.5である溶液製剤を提供する。

[0012] 前記二重特異性抗体であるEmicizumab（ACE910）は以下に記載したとおりである。

[0013] 第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：1、2、3（Q499のH鎖CDR）に記載のH鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含むH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：4、5、6（J327のH鎖CDR）に記載のH鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含むH鎖、第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：7、8、9（L404のL鎖CDR）に記載のL鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む共通L鎖からなる二重特異性抗体（Q499-z121/J327-z119/L404-k）。

[0014] さらに具体的には、前記二重特異性抗体は、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：13に記載のH鎖可変領域のアミノ酸配列を含むH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：14に記載のH鎖可変領域のアミノ酸配列を含むH鎖、および第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：15に記載のL鎖可変領域のアミノ酸配列を含む共通L鎖からなる二重特異性抗体である。

[0015] さらに具体的には、前記二重特異性抗体は、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：11に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、および第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：12に記載の共通L鎖からなる二重特異性抗体（Q499-z121/J327

-z119/L404-k）である。

このような抗体は、例えばWO2005/035756、WO2006/109592、WO2012/067176などに記載の方法に従って取得することができる。

[0016] 本発明の製剤に含まれる抗体濃度は特に制限されないが、抗体濃度は好ましくは、20 mg/mL～180mg/mlである。本発明の製剤に含まれる抗体濃度は、例えば20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL、120 mg/mL、150 mg/mL、180 mg/mLである。本発明の製剤に含まれる抗体濃度の上限は、特に限定されないが、通常、250 mg/mLである。

[0017] 本発明で使用される抗体は、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く、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。

[0018] なお、本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれるアミノ酸は翻訳後に修飾（例えば、N末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である）を受ける場合もあるが、そのようにアミノ酸が翻訳後修飾された場合であっても当然のことながら本発明で使用される抗体に含まれる。

[0019] 本発明において「FVIIIの機能を代替する」とは、FIXまたはFIXa、および、FXを認識し、FIXaによるFXの活性化を促進する（FIXaによるFXa産生を促進する）ことを意味する。FXa産生促進活性は、例えば、FIXa、FX、合成基質S-2222（FXaの合成基質）、リン脂質から成る測定系で評価することができる。このような測定系は、血友病A症例における疾患の重症度および臨床症状と相関性を示す(Rosen S, Andersson M, Blomba¨ck M et al. Clinical applications of a chromogenic substrate method for determination of FVIII activity. Thromb Haemost 1985; 54: 811-23)

[0020] 本発明において「共通L鎖」とは、異なる2種以上のH鎖とそれぞれ対を形成し、それぞれの抗原に対して結合能を示し得るL鎖である。ここで、「異なるH鎖」とは、好ましくは異なる抗原に対する抗体のH鎖を指すが、それに限定されず、アミノ酸配列が互いに異なっているH鎖を意味する。共通L鎖は、例

えばWO2006/109592に記載の方法に従って取得することができる。

[0021] なお本発明における「安定な抗体含有製剤」とは、当該製剤中に抗体等のタンパク質の会合体及び／又は電荷的ヘテロ成分が生成しにくい、即ち溶液中に不溶性会合体、可溶性会合体、電荷的ヘテロ成分などの生成を始めとする劣化反応が起こりにくい製剤を指す。

[0022] 電荷的ヘテロ成分とは、脱アミド、酸化や加水分解等によりタンパク質の表面電荷が主成分と異なる成分を差す。

[0023] 本発明におけるポリペプチドとは、通常、１０アミノ酸程度以上の長さを有するペプチド、およびタンパク質を指す。また、通常、生物由来のポリペプチドであるが、特に限定されず、例えば、人工的に設計された配列からなるポリペプチドであってもよい。また、天然ポリペプチド、あるいは合成ポリペプチド、組換えポリペプチド等のいずれであってもよい。さらに、上記のポリペプチドの断片もまた、本発明のポリペプチドに含まれる。

[0024] 「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二量体、多量体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、抗体誘導体および抗体修飾物であってもよい（Miller K et al. J Immunol. 2003, 170(9), 4854-61）。抗体は、マウス、ヒト、ヒト化、キメラであってもよく、または他の種由来であっても、人工的に合成したものであってもよい。本明細書中に開示される抗体は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgDおよびIgA）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスであり得る。免疫グロブリンは、任意の種（例えば、ヒト、マウスまたはウサギ）由来であり得る。尚、「抗体」、「免疫グロブリン」および「イムノグロブリン」なる用語は互換性をもって広義な意味で使われる。

[0025] 「二重特異性」抗体は、それぞれ異なるエピトープを認識する２つの可変領域を同一の抗体分子内に有する抗体をいう。二重特異性抗体は2つ以上の異なる抗原を認識する抗体であってもよいし、同一抗原上の異なる2つ以上のエ

ピトープを認識する抗体であってもよい。二重特異性抗体には、wholeの抗体だけでなく抗体誘導体が含まれていてもよい。

[0026] 抗体としては、遺伝子組換え技術を用いて産生した組換え型抗体を用いることができる。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ、または抗体を産生する感作リンパ球等の抗体産生細胞からクローニングし、ベクターに組み込んで、これを宿主（宿主細胞）に導入し産生させることにより得ることができる。

[0027] 二重特異性抗体はIgGタイプのものに限られないが、例えばIgGタイプ二重特異性抗体はIgG抗体を産生するハイブリドーマ二種を融合することによって生じるhybrid hybridoma(quadroma)によって分泌させることが出来る（Milstein C et al. Nature 1983, 305: 537-540）。また目的の二種のIgGを構成するL鎖およびH鎖の遺伝子、合計4種の遺伝子を細胞に導入することによって共発現させることによって分泌させることが出来る。

[0028] 本発明の抗体は当業者に公知の方法により製造することができる。具体的には、目的とする抗体をコードするDNAを発現ベクターへ組み込む。その際、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。その際には、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。

[0029] これにより得られた本発明の抗体は、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常の抗体の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば抗体を分離、精製することができる。

[0030] 本発明の製剤中のヒスチジン－アスパラギン酸塩緩衝液の好ましい態様は、ヒスチジンを遊離アミノ酸の状態で添加した水溶液等の溶液に、アスパラ

ギン酸を遊離アミノ酸の状態で含む、水溶液等の液体で滴定することによって調整される緩衝液である。またその逆の順番で添加して調整することも可能であり、さらには粉末によって直接滴定することも可能である。

[0031] 本発明者らは、前記二重特異性抗体を含有する試料の保存時の安定性を評価するために、凍結融解試験、熱加速試験、長期保存試験及び凍結保存試験等により種々の添加剤の効果を検討した。その結果、ヒスチジン緩衝液を用いることにより、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液に比べ、会合体生成及び／又は電荷的ヘテロ成分が抑制されることを見出した。

[0032] さらにその対イオン種として、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸を用いることにより、すなわち、緩衝液としてヒスチジン－アスパラギン酸塩緩衝液を用いることにより、会合体生成及び／又は電荷的ヘテロ成分が抑制されることを見出した。

[0033] 本発明の製剤におけるヒスチジン－アスパラギン酸塩緩衝液の濃度（量）は、10～100 mMであることが好ましく、10～40 mMであることがより好ましい。また、ヒスチジン－アスパラギン酸塩緩衝液の濃度（量）は例えば10 mM、20 mM、40 mMである。

[0034] さらに抗体含有製剤の安定化剤として報告されている塩化ナトリウムと比較して、アルギニンを添加することにより、より高い安定化効果（会合体生成抑制効果、電荷的ヘテロ成分抑制効果）を示すことも見出した。

[0035] 本発明の製剤におけるアルギニンの濃度（量）は、100 mM～300 mMであることが好ましい。また、アルギニンの濃度（量）は、例えば100 mM、150 mM、200 mM、300 mMである。

[0036] 本発明の製剤は、溶液のpHが4.5～6.5であることが好ましく、5.5～6.5であることがより好ましく、5.5～6であることがさらに好ましい。また、溶液のpHは例えば5.5、6である。

[0037] 本発明の製剤に含まれる界面活性剤は、例えばポリソルベート２０（ＰＳ２０）、プルロニックＦ－６８（ポロキサマー１８８：ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30)グリコール）であるが、特にポロキサマー１

８８が好ましい。本発明の製剤に対するポロキサマー１８８（Poloxamer 188またはPX188）の添加量は、好ましくは0.2 mg/mL～1 mg/mLである。また、製剤に対するポロキサマー１８８の添加量は、例えば、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL、0.8 mg/mL、1 mg/mLである。

[0038] 本発明で使用されるヒスチジンは、単品またはその誘導体のいずれを用いてもよく、特に、L-ヒスチジンが望ましい。本発明で使用されるアルギニンは、単品、その誘導体、その塩のいずれを用いてもよく、特に、L-アルギニンまたはその塩が望ましい。また、アルギニンの塩は、アスパラギン酸塩またはグルタミン酸塩が好ましい。

[0039] 本発明の製剤は、さらにアミノ酸を含有することができる。本発明にて用いられる好ましいアミノ酸は、天然アミノ酸またはアミノ酸誘導体であり、特に好ましいのはL-メチオニン、およびL-プロリンである。

[0040] 本発明の製剤は、さらに糖類を含有することができる。本発明にて用いられる好ましい糖類は、スクロース、トレハロース、メグルミン及びソルビトールである。

[0041] 本発明の製剤に対するアミノ酸または糖類の添加量は、一般には1 mM～1000 mMであり、好ましくは5 mM～500 mMであり、さらに好ましくは10 mM～300 mMである。

[0042] 本発明の製剤は、さらに無機塩を含有することができる。本発明にて用いられる好ましい無機塩は、マグネシウム塩及びカルシウム塩である。

[0043] さらに本発明の製剤は、緩衝液（緩衝剤）または安定化剤の対イオンとして、アスパラギン酸以外の陰イオンを含まないことが好ましい。そのような製剤の一態様として、例えば、塩化物イオンおよび酢酸イオンを実質的に含まない製剤を挙げることができる。「塩化物イオンおよび酢酸イオンを実質的に含まない」とは、例えば塩化物イオンおよび酢酸イオンが5 mM以下、より好ましくは2 mM以下、より好ましくは1 mM以下であることを意味する。安定化効果の小さい塩化物イオンおよび酢酸イオンを実質的に含まず、安定化効果の大きいアスパラギン酸を対イオンとして用いることで、浸透圧を上げ

ることなく安定性の高い抗体含有製剤を製造することが可能である。

[0044] また本発明の製剤には、必要に応じて、凍結保護剤、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。

[0045] 凍結保護剤として例えば、トレハロース、ショ糖、ソルビトール等の糖類を挙げることができる。

[0046] 溶液補助剤として例えば、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ことができる。

[0047] 等張化剤として例えば、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。

[0048] 保存剤として例えば、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。

[0049] 吸着防止剤として例えば、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。

[0050] 含硫還元剤として例えば、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。

[0051] 酸化防止剤として例えば、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。

[0052] 本発明の製剤の一つの実施態様は以下のとおりである。

20～180 mg/mLの、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：11に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、および第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：12に記載の共通L鎖からなる二重特異性抗体、

20 mM L-ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、

0.5 mg/mL Poloxamer 188

150 mM L-Arginine

を含み、pHは6である抗体溶液製剤。

また、

20～180 mg/mLの二重特異性抗体であるEmicizumab (ACE910) 、

20 mM L-ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、

0.5 mg/mL Poloxamer 188

150 mM L-Arginine

を含み、pHは6である抗体溶液製剤。

本発明の製剤の別の一つの実施態様は以下のとおりである。

20～180 mg/mLの、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：11に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、および第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：12に記載の共通L鎖からなる二重特異性抗体、

20 mM L-ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、

0.05 mg/mL PS20

150 mM L-Arginine

を含み、pHは6である抗体溶液製剤。

また、

20～180 mg/mLの二重特異性抗体であるEmicizumab（ACE910）、

20 mM L-ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、

0.05 mg/mL PS20

150 mM L-Arginine

を含み、pHは6である抗体溶液製剤。

[0053] 本発明の抗体含有製剤の投与は、任意の適切な経路を介して患者に投与することができる。例えば、ボーラスとしてまたは一定期間にわたる持続注入による静脈内、筋肉内、皮下による経路により患者に投与される。静脈内投与または皮下投与が好ましい。

[0054] Emicizumab（ACE910）の投与量は、例えば0.001～1000mg/kgであり、投与間隔は少なくとも1日以上である。

より具体的には、例えば初回用量1 mg/kgのEmicizumab（ACE910）を投与後、週一回の頻度で継続用量0.3 mg/kgのEmicizumab（ACE910）を投与することが出来る。また、例えば初回用量3 mg/kgのEmicizumab（ACE910）を投与後、週一回の頻度で継続用量1 mg/kgのEmicizumab（ACE910）を投与することが出来る。また、例えば初回用量3 mg/kgのEmicizumab（ACE910）を投与後、週1回の頻度で継続用量3 mg/kgのEmicizumab（ACE910）を投与することが出来る。

[0055] 本発明の抗体含有製剤は、FVIIIおよび/または活性化血液凝固第VIII因子(FVIIIa)の活性の低下ないし欠損によって発症および/または進展する疾患に用いることができ、例えば血友病A、FVIII/FVIIIaに対するインヒビターが出現している血友病A、後天性血友病A、フォンビルブランド病等に用いることができるが、これら疾患に特に制限されない。

[0056] 本発明の別の一つの実施態様は、抗体含有溶液製剤において抗体を安定化

する方法である。好ましくは、抗体含有溶液製剤において抗体を安定化する方法であって、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、Poloxamer 188及びアルギニンを添加することを含む、前記方法である。

[0057] また、本発明の別の一つの実施態様は、抗体含有溶液製剤において抗体の会合化（会合体形成）を抑制する方法である。好ましくは、抗体含有溶液製剤において抗体の会合化（会合体形成）を抑制する方法であって、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、Poloxamer 188及びアルギニンを添加することを含む、前記方法である。

[0058] また、前記、抗体を安定化する方法及び抗体の会合化（会合体形成）を抑制する方法においては、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、Poloxamer 188及びアルギニンを添加することを含み、抗体濃度が20～180 mg/mL、ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液濃度が10 mM ～40 mM、Poloxamer 188の濃度が0.2～1 mg/mL 、アルギニン濃度が100 mM ～300 mM 及びpHが4.5～6.5とすることが好ましく、さらに抗体濃度が20～180 mg/mL、ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液濃度が20 mM、Poloxamer 188の濃度が0.5 mg/mL 、アルギニン濃度が150 mM 及びpHが6とすることが好ましい。

[0059] 本発明の別の一つの実施態様は、抗体含有製剤において電荷的ヘテロ成分を低減する方法である。好ましくは、抗体含有製剤において電荷的ヘテロ成分を低減する方法であって、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液を添加することを含む、前記方法である。さらに好ましくは、抗体含有製剤において電荷的ヘテロ成分を低減する方法であって、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液を添加することを含み、ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液濃度が10 mM ～40 mM若しくは20 mMとすることを含む、前記方法である。

また、本発明の別の一つの実施態様は、抗体含有製剤において電荷的ヘテロ成分を低減する方法であって、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、Poloxamer 188及びアルギニンを添加することを含む、前記方法である。さらに好ましくは、抗体含有製剤において電荷的ヘテロ成分を低減する方法で

あって、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、Poloxamer 188及びアルギニンを添加することを含み、抗体濃度が20～180 mg/mL、ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液濃度が10 mM ～40 mM、Poloxamer 188の濃度が0.2～1 mg/mL 、アルギニン濃度が100 mM ～300 mM 及びpHが4.5～6.5とすることが好ましく、さらに抗体濃度が20～180 mg/mL、ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液濃度が20 mM、Poloxamer 188の濃度が0.5 mg/mL 、アルギニン濃度が150 mM 及びpHが6とすることが好ましい。

[0060] 前記、抗体を安定化する方法、抗体の会合化（会合体形成）を抑制する方法、及び電荷的ヘテロ成分を低減する方法においては、抗体は好ましくは二重特異性抗体であり、さらに好ましくはEmicizumab（ACE910）である。

[0061] 本明細書において用いる場合、「・・・を含む（comprising）」との表現により表される態様は、「本質的に・・・からなる（essentially consisting of）」との表現により表される態様、ならびに「・・・からなる（consisting of）」との表現により表される態様を包含する。

[0062] 本明細書に記載の数値は、例えば機器、測定条件、当業者の手技に起因して、一定の範囲内で変動し得るものであり、本発明の目的を達成できる範囲内であれば、例えば10%程度変動することはあり得る。

[0063] 本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書に参照として取り込まれる。

本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、下記の実施例に限定されるものではない。

## 実施例

[0064] 実施例１：ヒスチジンがヒト化IgG4抗体ACE910の熱加速保存中に及ぼす会合体抑制効果

（１）材料

ACE910は血液凝固第IX因子および血液凝固第X因子をそれぞれ認識するBispecific抗体であり、活性化血液凝固第VIII因子の機能代替により血友病Aの出血を予防することが期待されているヒト化IgG4抗体である。

[0065] （２）被験試料

ACE910 100mg/mL, 150 mmol/L NaCl, pH 6.0, 緩衝液として20 mmol/L Phosphate buffer、もしくは20 mmol/L Citrate buffer、もしくは20 mmol/L Acetate buffer、もしくは20 mmol/L Histidine bufferのいずれかを含む各調剤液を調製し、ガラスバイアルに5～15 μLずつ充填した。

このように調製したヒト化抗体含有溶液製剤を、25℃の恒温槽内に8週間静置した後、被験試料とした。

[0066] （３）ACE910の会合体量測定方法及び会合体量の算出方法

試料は、カラム（東ソーG3000SW$_{XL}$）を用い、50 mmol/Lリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）、300 mmol/L塩化ナトリウムを移動相に用い、流速0.5 mL/minで行ったサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）により会合体量を測定した。

検出されるピークの内，面積，高さ共に最大のものをモノマー体，モノマー体の前に検出されるピークの総称を会合体（HMWS）とした。

すべてのピークについて面積を算出し、以下の式に従って対象ピークのピーク面積比率を算出した。

$$\text{対象ピークのピーク面積比率(\%)} = \frac{\text{対象ピークのピーク面積}}{\text{対象ピークのピーク面積}+\text{その他のピーク面積の合計}} \times 100$$

[0067] （４）結果

得られた結果を表１に示す。

[0068] [表1]

２５℃保存後の会合体増加量（%）

| 処方 | ΔHMW(%) | | |
|---|---|---|---|
| | 25℃-2W | 25℃-4W | 25℃-8W |
| Phosphate | 0.20 | 0.27 | 0.41 |
| Citrate | 0.14 | 0.21 | 0.32 |
| Acetate | 0.24 | 0.38 | 0.63 |
| Histidine | 0.08 | 0.13 | 0.22 |

[0069] 表１から明らかなように、20 mmol/L ヒスチジンを添加した試料は、２５℃熱加速8週間後の試料において高い会合体抑制効果が得られた。

[0070] 実施例2：塩濃度およびアルギニンがヒト化IgG4抗体ACE910の熱加速保存中および凍結融解中に及ぼす会合体抑制効果

（１）材料

実施例1に記載した抗体を使用した。

[0071] （２）被験試料

ACE910 100mg/mL, 20 mmol/L Histidine, pH 6.0, 添加剤として50 mmol/L NaClもしくは75 mmol/L NaClもしくは150 mmol/L NaClもしくは150 mmol/L Arginineのいずれかを含む各調剤液を調製し、ガラスバイアルに5～15 μLずつ充填した。

このように調製したヒト化抗体含有溶液製剤を25℃の恒温槽内に8週間静置した後、もしくは凍結融解（F/T）（5℃⇔-20℃）を10回繰り返した後、被験試料とした。

[0072] （３）ACE910の会合体量測定方法及び会合体量の算出方法

実施例1に記載した方法に従った。

[0073] （４）結果

得られた結果を表2に示す。

[0074] [表2]

２５℃保存後および凍結融解後の会合体増加量（%）

| 処方 | ΔHMW(%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 5F/T | 10F/T | 25℃-2W | 25℃-4W | 25℃-8W |
| 50mM NaCl | 1.00 | 2.07 | 0.09 | 0.16 | 0.26 |
| 75mM NaCl | 0.62 | 1.43 | 0.07 | 0.13 | 0.23 |
| 150mM NaCl | 0.11 | 0.28 | 0.08 | 0.13 | 0.22 |
| 150mM Arg | 0.03 | 0.05 | 0.03 | 0.06 | 0.11 |

[0075] 表2から明らかなように、150 mmol/L アルギニンを添加した試料は、２５℃熱加速8週間後の試料および凍結融解後の試料において高い会合体抑制効果が得られた。

[0076] 実施例3：アスパラギン酸がヒト化IgG4抗体ACE910の凍結融解中に及ぼす会合体抑制効果

（１）材料

実施例1に記載した抗体を使用した。

[0077] （２）被験試料

ACE910 100 mg/mL, 20 mmol/L Histidine, pH 6.0, 対イオンとして150 mmol/L NaClもしくは150 mmol/L Sodium L-Aspartic acidのいずれかを含む各調剤液を調製し、ガラスバイアルに5～15 μLずつ充填した。

このように調製したヒト化抗体含有溶液製剤を凍結融解（5℃⇔-20℃）を10回繰り返した後、被験試料とした。

[0078] （３）ACE910の会合体量測定方法及び会合体量の算出方法

実施例1に記載した方法に従った。

[0079] （４）結果

得られた結果を表3に示す。

[0080] [表3]

凍結融解後の会合体増加量（%）

| 処方 | ΔHMW(%) | |
|---|---|---|
| | 5F/T | 10F/T |
| NaCl | 0.11 | 0.28 |
| Na Aspartic acid | 0.05 | 0.13 |

[0081] 表3から明らかなように、アスパラギン酸を添加した試料は、凍結融解後の試料において高い会合体抑制効果が得られた。

[0082] 実施例4：pHがヒト化IgG4抗体ACE910の熱加速保存中に及ぼす会合体および電荷的ヘテロ成分抑制効果

（１）材料

実施例1に記載した抗体を使用した。

[0083] （２）被験試料

ACE910 100 mg/mL, 20 mmol/L Histidine-Aspartic acid, 150 mmol/L Arginine-Aspartic acid, pH 4.5もしくは5.0もしくは5.5もしくは6.0もしくは6.5もしくは7.0もしくは7.5を含む各調剤液を調製し、ガラスバイアルに5～15 μLずつ充填した。

このように調製したヒト化抗体含有溶液製剤を25℃の恒温槽内に8週間静置した後、被験試料とした。

[0084] （３）ACE910の会合体量測定方法及び会合体量の算出方法

実施例1に記載した方法に従った。

[0085] （４）ACE910の電荷的ヘテロ成分測定方法及び算出方法

試料は、カラム（YMC製BioPro QA-F）を用い、20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液（pH 7.8）を移動相Aに、20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液（pH7.8）、500 mmol/L 塩化ナトリウムを移動相Bに用い、流速0.5 mL/minで行ったイオン交換クロマトグラフィー（IEC）により電荷的ヘテロ成分量を測定した。

検出されるピークの内，面積，高さ共に最大のものをMain peak，Main peakの後に検出されるピークの総称をAcidic peakとした。

すべてのピークについて面積を算出し、以下の式に従って対象ピークのピーク面積比率を算出した。

$$\text{対象ピークのピーク面積比率(\%)} = \frac{\text{対象ピークのピーク面積}}{\text{対象ピークのピーク面積}+\text{その他のピーク面積の合計}} \times 100$$

[0086] （５）結果

得られた結果を表4に示す。

[0087] [表4]

25℃保存後の会合体増加量（%）およびAcidic peak-1増加量（%）

| 処方 | ΔHMW(%) | | | ΔAcidic-1(%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 25℃-2W | 25℃-4W | 25℃-8W | 25℃-2W | 25℃-4W | 25℃-8W |
| pH4.5 | 0.05 | 0.10 | 0.24 | 0.21 | 2.43 | 3.41 |
| pH5.0 | 0.09 | 0.11 | 0.20 | 0.46 | 0.86 | 2.57 |
| pH5.5 | 0.07 | 0.08 | 0.15 | 0.36 | 0.68 | 2.10 |
| pH6.0 | 0.07 | 0.11 | 0.17 | 0.38 | 0.47 | 3.23 |
| pH6.5 | 0.09 | 0.14 | 0.25 | 0.24 | 1.17 | 3.90 |
| pH7.0 | 0.13 | 0.17 | 0.30 | 1.25 | 2.44 | 5.39 |
| pH7.5 | 0.18 | 0.32 | 0.79 | 3.09 | 5.01 | 9.49 |

[0088] 表4から明らかなように、pH4.5～pH6.5、特にpH5.5およびpH6.0の試料は、25℃保存後の試料において高い会合体および電荷的ヘテロ成分抑制効果が得

られた。

[0089] 実施例5：ヒスチジン濃度がヒト化IgG4抗体ACE910の熱加速保存中に及ぼす会合体および電荷的ヘテロ成分抑制効果

（１）材料

実施例1に記載した抗体を使用した。

[0090] （２）被験試料

ACE910 100 mg/mL, 150 mmol/L Arginine, pH 6.0, Histidine-aspartic acid 5 mmol/Lもしくは10 mmol/Lもしくは20 mmol/Lもしくは40 mmol/Lを含む各調剤液を調製し、ガラスバイアルに5～15 μLずつ充填した。

このように調製したヒト化抗体含有溶液製剤を25℃の恒温槽内に8週間静置した後、被験試料とした。

[0091] （３）ACE910の会合体量測定方法及び会合体量の算出方法

実施例1に記載した方法に従った。

[0092] （４）ACE910の電荷的ヘテロ成分測定方法及び算出方法

実施例4に記載した方法に従った。

[0093] （５）結果

得られた結果を表5に示す。

[0094] [表5]

25℃保存後の会合体増加量（%）およびAcidic peak-1増加量（%）

| Histidine濃度 | ΔHMW(%) | | | ΔAcidic-1(%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 25℃-2W | 25℃-4W | 25℃-8W | 25℃-2W | 25℃-4W | 25℃-8W |
| 5 mmol/L | 0.04 | 0.09 | 0.17 | 0.87 | 3.01 | 9.19 |
| 10 mmol/L | 0.02 | 0.05 | 0.14 | 0.39 | 1.50 | 7.09 |
| 20 mmol/L | 0.01 | 0.04 | 0.12 | 0.06 | 1.04 | 7.11 |
| 40 mmol/L | 0.01 | 0.02 | 0.07 | 0.52 | 1.13 | 6.74 |

[0095] 表5から明らかなように、Histidine-aspartic acid 10 mmol/L以上含む試料は、25℃保存後の試料において高い会合体および電荷的ヘテロ成分抑制効果が得られた。

[0096] 実施例6：アルギニン濃度がヒト化IgG4抗体ACE910の凍結融解および熱加速保

存および凍結保存中に及ぼす会合体抑制効果

（１）材料

実施例1に記載した抗体を使用した。

[0097] （２）被験試料

ACE910 100 mg/mL, 20 mmol/L Histidine-aspartic acid, pH 6.0, Arginine 75 mmol/Lもしくは100 mmol/Lもしくは150 mmol/Lもしくは200 mmol/Lもしくは300 mmol/Lを含む各調剤液を調製し、ガラスバイアルに5～15 μLずつ充填した。

このように調製したヒト化抗体含有溶液製剤を凍結融解（5℃⇔-20℃）を10回繰り返した後、もしくは25℃の恒温槽内に8週間静置した後、もしくは-20℃の恒温槽内に6カ月間静置した後、被験試料とした。

[0098] （３）ACE910の会合体量測定方法及び会合体量の算出方法

実施例1に記載した方法に従った。

[0099] （４）結果

得られた結果を表6に示す。

[0100] [表6]

凍結融解後および25℃保存後および-20℃保存後の会合体増加量（%）

| Arginine 濃度 | ΔHMW(%) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5F/T | 10F/T | 25℃-2W | 25℃-4W | 25℃-8W | -20℃ -3M | -20℃ -6M |
| 75 mmol/L | 0.10 | 0.10 | 0.02 | 0.06 | 0.17 | 0.19 | 0.53 |
| 100 mmol/L | 0.04 | 0.04 | 0.01 | 0.04 | 0.12 | 0.08 | 0.02 |
| 150 mmol/L | 0.01 | 0.01 | -0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.00 | 0.00 |
| 200 mmol/L | 0.01 | 0.01 | -0.01 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | -0.01 |
| 300 mmol/L | 0.00 | 0.00 | -0.02 | -0.02 | 0.00 | 0.00 | -0.01 |

[0101] 表6から明らかなように、Arginine 100 mmol/L以上含む試料は、凍結融解後および25℃保存後および-20℃保存後の試料において高い会合体抑制効果が得られた。

[0102] 実施例7：ポロキサマー188がヒト化IgG4抗体ACE910の5℃保存中に及ぼす不溶性異物および不溶性微粒子生成抑制効果

（１）材料

実施例1に記載した抗体を使用した。

[0103] （２）被験試料

ACE910 80 mg/mL, 20 mmol/L Histidine-Aspartic acid, 150 mmol/L Arginine, pH 6.0、添加剤として0 mg/mL Poloxamer 188もしくは0.2 mg/mL Poloxamer 188もしくは0.5 mg/mL Poloxamer 188もしくは1.0 mg/mL Poloxamer 188もしくは0.05 mg/mL Polysorbate20もしくは1.0 mg/mL Polysorbate20を含む各調剤液を調製し、ガラスバイアルに1.0 mLずつ充填した。

このように調製したヒト化抗体含有溶液製剤を5℃冷蔵室内に5カ月間静置した後、被験試料とした。

[0104] （３）不溶性異物観測方法

試料をバイアル用目視検査台の試料台に載せ，試料台を回転させた後バイアルを観察し，不溶性異物の有無を確認した。

[0105] （４）不溶性微粒子測定法

液中微粒子計測器（Hach Ultra Analytics, Model9703）を用いて液中不溶性微粒子数を計測した。

[0106] （５）結果

得られた結果を表7に示す。

[0107]

[表7]

5°C保存後の不溶性微粒子数（微粒子数/mL）および不溶性異物検出率（%）

| PX188 | | 0.2mg/mL | | | | 0.5mg/mL | | | | 1.0mg/mL | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Initial | 1M | 3M | 5M | Initial | 1M | 3M | 5M | Initial | 1M | 3M | 5M |
| 液中不溶性微粒子数（微粒子数/mL） | ≥ 5μm | 31 | — | 61 | 188 | 9 | — | 18 | 27 | 7 | — | 7 | 43 |
| | ≥ 10μm | 5 | — | 4 | 15 | 5 | — | 3 | 2 | 5 | — | 3 | 5 |
| | ≥ 25μm | 1 | — | 1 | 1 | 1 | — | 0 | 0 | 0 | — | 1 | 1 |
| 不溶性異物検出率（異物本数/検査本数） | | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |

| PS20 | | 0.05 mg/mL | | | | 1.0 mg/mL | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Initial | 1M | 3M | 5M | Initial | 1M | 3M | 5M |
| 液中不溶性微粒子数（微粒子数/mL） | ≥ 5μm | 13 | — | 36 | 89 | 24 | — | 238 | 411 |
| | ≥ 10μm | 5 | — | 3 | 10 | 9 | — | 49 | 66 |
| | ≥ 25μm | 0 | — | 0 | 0 | 1 | — | 3 | 2 |
| 不溶性異物検出率（異物本数/検査本数） | | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 5/5 | 5/5 |

[0108] 表7から明らかなように、PS20を0.05 mg/mL含む試料、Poloxamer 188を0.2 mg/mL以上含む試料は、5℃保存後の試料において高い不溶性異物および不溶性微粒子生成抑制効果が得られた。

[0109] 実施例8：ポロキサマー188がヒト化IgG4抗体ACE910の振とうストレスおよび凍結融解保存中に及ぼす不溶性異物および不溶性微粒子生成抑制効果

（１）材料

実施例1に記載した抗体を使用した。

[0110] （２）被験試料

ACE910 150 mg/mL, 20 mmol/L Histidine-Aspartic acid, 150 mmol/L Arginine-Aspartic acid, pH 6.0、添加剤として0 mg/mL Poloxamer 188もしくは0.2 mg/mL Poloxamer 188もしくは0.5 mg/mL Poloxamer 188もしくは0.8 mg/mL Poloxamer 188もしくはを含む各調剤液を調製し、ガラスバイアルに0.9 mLずつ充填した。

このように調製したヒト化抗体含有溶液製剤を室温において振とう試験機を用いて200 stroke/minの速度で24時間振とうした後、もしくは凍結融解（5℃⇔-20℃）を10回繰り返した後、被験試料とした。

[0111] （３）不溶性異物観測方法

実施例7に記載した方法に従った。

[0112] （４）不溶性微粒子測定法

実施例7に記載した方法に従った。

[0113] （５）結果

得られた結果を表8および図1,2に示す。

[0114]

[表8]

振とう後および凍結融解保存後の不溶性異物検出率（%）

| Poloxamer 188 濃度 | 不溶性異物検出率（%）（異物本数/検査本数） | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Initial | 振とう 30 分 | 振とう 24 時間 | 凍結融解 |
| 0 mg/mL | 0% (0/10) | 50% (5/10) | 100% (10/10) | 0% (0/10) |
| 0.2 mg/mL | 0% (0/10) | 0% (0/10) | 0% (0/10) | 0% (0/10) |
| 0.5 mg/mL | 0% (0/10) | 0% (0/10) | 0% (0/10) | 0% (0/10) |
| 0.8 mg/mL | 0% (0/10) | 0% (0/10) | 0% (0/10) | 0% (0/10) |

[0115] 表8および図１，2から明らかなように、Poloxamer 188を0.2 mg/mL以上含む試料は、振とうストレスおよび凍結融解保存後の試料において高い不溶性異物および不溶性微粒子生成抑制効果が得られた。

[0116] 実施例9：ヒト化IgG4抗体ACE910濃度の熱加速保存中および凍結融解保存中に及ぼす安定性

（１）材料

実施例1に記載した抗体を使用した。

（２）被験試料

20 mmol/L Histidine-Aspartic acid, 150 mmol/L Arginine-Aspartic acid, pH6.0, 0.5 mg/mL Poloxamer 188、ACE910として20 mg/mL ACE910もしくは30 mg/mL ACE910もしくは40 mg/mL ACE910もしくは120 mg/mL ACE910もしくは150 mg/mL ACE910もしくは180 mg/mL ACE910を含む各調剤液を調製し、ガラスバイアルに0.65 mLずつ充填した。

このように調製したヒト化抗体含有溶液製剤を40℃の恒温槽内に8週間静置した後、もしくは凍結融解（25℃⇔-20℃）を5回および10回繰り返した後、被験試料とした。

[0117] （３）ACE910の会合体量測定方法及び会合体量の算出方法

実施例1に記載した方法に従った。

[0118] （４）ACE910の電荷的ヘテロ成分測定方法及び算出方法

試料は、カラム（Waters製TSKgel Q-STAT）を用い、50 mmol/L Tris-HCl緩衝液（pH 8.0）を移動相Aに、50 mmol/L Tris-HCl 緩衝液（pH8.0）、200 mmol/L 塩化ナトリウムを移動相Bに用い、流速0.5 mL/minで行った陰イオン交換クロマトグラフィー（AIEC）により電荷的ヘテロ成分量を測定した。

検出されるピークの内，面積，高さ共に最大のものをMain peak，Main peakの前に検出されるピークの総称をBasic peak、Main peakの後に検出されるピークの総称をAcidic peakとした。

また、カラム（Thermo Scientific製ProPac WCX-10G）を用い、9.6 mmol/L Tris，6.0 mmol/L piperazine，11.0 mmol/L imidazole緩衝液（pH 6.0）を移動相Aに、9.6 mmol/L Tris，6.0 mmol/L piperazine，11.0 mmol/L imidazole，100 mmol/L NaCl緩衝液（pH 10.1）を移動相Bに用い、流速0.5 mL/minで行った陽イオン交換クロマトグラフィー（CIEC）により電荷的ヘテロ成分量を測定した。

検出されるピークの内，面積，高さ共に最大のものをBiAb peak，BiAb peakの前に検出されるピークの総称をPre peak、BiAb peakの後に検出されるピークの総称をPost peakとした。

すべてのピークについて面積を算出し、以下の式に従って対象ピークのピーク面積比率を算出した。

$$\text{対象ピークのピーク面積比率(\%)} = \frac{\text{対象ピークのピーク面積}}{\text{対象ピークのピーク面積}+\text{その他のピーク面積の合計}} \times 100$$

[0119] （５）結果

得られた結果を表9に示す。尚、SEはサイズ排除クロマトグラフィーの結果、AEは陰イオン交換クロマトグラフィーの結果、CEは陽イオン交換クロマトグラフィーの結果を示す。

[0120]

[表9]

40℃保存後および凍結融解後の会合体量（%）および電荷的ヘテロ成分量（%）

| ACE910 conc. (mg/mL) | | 20 | 30 | 40 | 120 | 150 | 180 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SE-HPLC % HMWS | Initial | 0.10 | 0.11 | 0.11 | 0.13 | 0.14 | 0.14 |
| | 2 weeks 40° C | 0.14 | 0.15 | 0.16 | 0.26 | 0.28 | 0.31 |
| | 4 weeks 40° C | 0.16 | 0.17 | 0.20 | 0.34 | 0.38 | 0.44 |
| | 5 cycles F/T | 0.11 | 0.11 | 0.12 | 0.13 | 0.14 | 0.14 |
| | 10 cycles F/T | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.13 | 0.13 | 0.14 |
| SE-HPLC % Monomer | Initial | 99.90 | 99.89 | 99.89 | 99.87 | 99.86 | 99.86 |
| | 2 weeks 40° C | 99.86 | 99.85 | 99.84 | 99.74 | 99.72 | 99.69 |
| | 4 weeks 40° C | 99.84 | 99.83 | 99.80 | 99.66 | 99.62 | 99.56 |
| | 5 cycles F/T | 99.89 | 99.89 | 99.88 | 99.87 | 99.86 | 99.86 |
| | 10 cycles F/T | 99.89 | 99.89 | 99.89 | 99.87 | 99.87 | 99.86 |
| AE-HPLC % Basic region | Initial | 16.1 | 16.2 | 16.1 | 16.3 | 16.0 | 16.3 |
| | 2 weeks 40° C | 14.3 | 14.6 | 14.4 | 14.5 | 14.5 | 14.5 |
| | 4 weeks 40° C | 12.7 | 12.8 | 12.8 | 12.8 | 12.7 | 12.7 |
| | 5 cycles F/T | 16.1 | 16.2 | 16.4 | 16.5 | 16.5 | 16.5 |
| | 10 cycles F/T | 15.9 | 16.0 | 16.2 | 16.4 | 16.5 | 16.4 |
| AE-HPLC % Main | Initial | 71.7 | 71.6 | 71.8 | 71.5 | 72.1 | 71.6 |
| | 2 weeks 40° C | 65.0 | 64.6 | 64.7 | 64.5 | 63.9 | 64.4 |
| | 4 weeks 40° C | 58.3 | 57.8 | 57.8 | 57.2 | 57.3 | 57.5 |
| | 5 cycles F/T | 72.3 | 72.2 | 72.0 | 71.6 | 71.6 | 71.6 |
| | 10 cycles F/T | 72.7 | 72.4 | 72.1 | 71.5 | 71.6 | 71.7 |
| AE-HPLC % Acdic region | Initial | 12.1 | 12.2 | 12.1 | 12.2 | 11.9 | 12.1 |
| | 2 weeks 40° C | 20.7 | 20.8 | 20.9 | 20.9 | 21.6 | 21.1 |
| | 4 weeks 40° C | 29.0 | 29.4 | 29.4 | 30.0 | 30.0 | 29.8 |
| | 5 cycles F/T | 11.6 | 11.6 | 11.6 | 11.9 | 11.9 | 12.0 |
| | 10 cycles F/T | 11.5 | 11.6 | 11.7 | 12.1 | 12.0 | 11.9 |
| CE-HPLC % Pre-peaks | Initial | 3.2 | 3.2 | 3.3 | 3.3 | 3.3 | 3.3 |
| | 2 weeks 40° C | 3.6 | 3.8 | 3.8 | 3.7 | 3.7 | 3.7 |
| | 4 weeks 40° C | 4.3 | 4.3 | 4.3 | 4.3 | 4.2 | 4.3 |
| | 5 cycles F/T | 3.4 | 3.0 | 3.2 | 3.1 | 3.0 | 3.1 |
| | 10 cycles F/T | 3.1 | 3.2 | 2.8 | 3.1 | 3.1 | 3.1 |
| CE-HPLC % BiAb | Initial | 96.8 | 96.8 | 96.7 | 96.6 | 96.6 | 96.6 |
| | 2 weeks 40° C | 96.4 | 96.2 | 96.3 | 96.3 | 96.3 | 96.2 |
| | 4 weeks 40° C | 95.6 | 95.7 | 95.6 | 95.7 | 95.8 | 95.8 |
| | 5 cycles F/T | 96.6 | 97.0 | 96.8 | 96.9 | 97.0 | 96.9 |
| | 10 cycles F/T | 96.8 | 96.7 | 97.2 | 96.8 | 96.9 | 96.9 |
| CE-HPLC % Post-peaks | Initial | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| | 2 weeks 40° C | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 4 weeks 40° C | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 5 cycles F/T | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10 cycles F/T | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

[0121] 表9から明らかなように、ACE910 20 mg/mL～ACE910 180 mg/mLの試料を比較して、40℃保存後および凍結融解後において同等の十分な安定性を有していた。

## 産業上の利用可能性

[0122] 本発明の抗体溶液製剤は、従来の製剤と比べて、溶液状態での安定性に優れた製剤であり、低温、常温、または高温での保存後および凍結融解後の抗体分子等のタンパク質の会合体生成が抑制されることを特徴とする。このように劣化反応が起こりにくい本発明の抗体溶液製剤は、例えば、皮下投与による血友病Aの治療に用いることができる。

# 請求の範囲

[請求項1] 20～180 mg/mLの、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：1、2、3（Q499のH鎖CDR）に記載のH鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含むH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：4、5、6（J327のH鎖CDR）に記載のH鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含むH鎖、第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：7、8、9（L404のL鎖CDR）に記載のL鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む共通L鎖からなる二重特異性抗体、
10 mM ～40 mM ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、
0.2～1 mg/mL Poloxamer 188 、
100 mM ～300 mM アルギニン、
を含み、pHは4.5～6.5である抗体溶液製剤。

[請求項2] 前記二重特異性抗体は、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：11に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、および第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：12に記載の共通L鎖からなる二重特異性抗体である、請求項１に記載の抗体溶液製剤。

[請求項3] Poloxamer 188の濃度は0.5 mg/mLである、請求項１または２に記載の抗体溶液製剤。

[請求項4] pHが6である、請求項１～３のいずれかに記載の抗体溶液製剤。

[請求項5] ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液の濃度は20 mMである、請求項１～４のいずれかに記載の抗体溶液製剤。

[請求項6] アルギニン濃度は150 mMである、請求項１～５のいずれかに記載の抗体溶液製剤。

[請求項7] 塩化物イオンおよび酢酸イオンを実質的に含まない、請求項１～６

のいずれかに記載の抗体溶液製剤。

[請求項8] 20～180 mg/mLの、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：11に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、および第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：12に記載の共通L鎖からなる二重特異性抗体、

20 mM L-ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、

0.5 mg/mL Poloxamer 188

150 mM L-Arginine

を含み、pHは6である抗体溶液製剤。

[請求項9] 皮下投与に用いられる、請求項１～８のいずれかに記載の抗体溶液製剤。

[請求項10] 血友病A治療に用いられる、請求項１～９のいずれかに記載の抗体溶液製剤。

[請求項11] 抗体含有溶液製剤において抗体を安定化する方法であって、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、Poloxamer 188及びアルギニンを添加することを含み、ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液濃度が10 mM ～40 mM、Poloxamer 188の濃度が0.2～1 mg/mL 、アルギニン濃度が100 mM ～300 mMとする、前記方法。

[請求項12] 抗体含有溶液製剤において抗体の会合化（会合体形成）を抑制する方法であって、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液、Poloxamer 188及びアルギニンを添加することを含み、ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液濃度が10 mM ～40 mM、Poloxamer 188の濃度が0.2～1 mg/mL 、アルギニン濃度が100 mM ～300 mMとする、前記方法。

[請求項13] 抗体含有製剤において電荷的ヘテロ成分を低減する方法であって、溶液中にヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液を添加することを含み

、ヒスチジン-アスパラギン酸塩緩衝液濃度が10 mM ～40 mMとする、前記方法。