



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201008595 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：098139141

(22)申請日：中華民國 95 (2006) 年 12 月 19 日

(51)Int. Cl.：

*A61K9/08 (2006.01)*

*A61K9/19 (2006.01)*

*A61K47/26 (2006.01)*

*A61K39/395 (2006.01)*

(30)優先權：2005/12/20

美國

60/752,150

(71)申請人：必治妥美雅史谷比公司 (美國) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (US)

美國

(72)發明人：黛莉 曼妮莎 M DALI, MANISHA M. (US)；達賀門 查理斯 E DAHLHEIM, CHARLES E. (US)；波沙迪亞 桑塔 BORSADIA, SUNITA (US)；納瑞葛卡 維傑 H NARINGREKAR, VIJAY H. (US)；甘地 拉傑西 B GANDHI, RAJESH B. (US)；尼如卡 曼爵 NERURKAR, MANOJ (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：2 共 107 頁

(54)名稱

安定之蛋白質調配物

STABLE PROTEIN FORMULATIONS

(57)摘要

本發明大致係關於包括 CTLA4Ig 分子之安定之調配物，其包含用於經由包含(例如)諸如靜脈內(IV)及皮下(SC)之途徑之各種途徑來投藥以用於治療免疫系統疾病及誘發耐受性的凍乾及液體調配物。

```

1  AGCTTCACCA ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG
      M G V L L T Q R T L
      製瘤素M信號序列 →
41  CTC AGT CTG GTC CTT GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG
      L S L V L A L L F P S M A

80  AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC CAG CCT GCT GTG GTA CTG
      S M A M H V A Q P A V V L
      人類CTLA4 →
119  GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT GTG TGT GAG TAT
      A S S R G I A S F V C E Y

158  GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG ACA GTG
      A S P G K A T E V R V T V

197  CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG
      L R Q A D S Q V T E V C A

236  GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT
      A T Y M M G N E L T F L D

275  GAT TCC ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG
      D S I C T G T S S G N Q V

314  AAC CTC ACT ATC CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA
      N L T I Q G L R A M D T G

353  CTC TAC ATC TGC AAG GTG GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA
      L Y I C K V E L M Y P P P

392  TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA ACC CAG ATT TAT GTA
      Y Y L G I G N G T Q I Y V

431  ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAT CAG GAG CCC
      I D P E P C P D S D Q E P
      人類IgG1鉸鏈 →
470  AAA TCT TCT GAC AAA ACT CAC ACA TCC CCA CCG TCC CCA
      K S S* D K T H T S* P P S* P
      人類IgG1 CH2域 →
509  GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA TCG TCA GTC TTC CTC TTC
      A P E L L G G S* S V F L F
548  CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC
      P P K P K D T L M I S R T

```

圖1A





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201008595 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：098139141

(22)申請日：中華民國 95 (2006) 年 12 月 19 日

(51)Int. Cl.：

*A61K9/08 (2006.01)*

*A61K9/19 (2006.01)*

*A61K47/26 (2006.01)*

*A61K39/395 (2006.01)*

(30)優先權：2005/12/20

美國

60/752,150

(71)申請人：必治妥美雅史谷比公司 (美國) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (US)

美國

(72)發明人：黛莉 曼妮莎 M DALI, MANISHA M. (US)；達賀門 查理斯 E DAHLHEIM, CHARLES E. (US)；波沙迪亞 桑塔 BORSADIA, SUNITA (US)；納瑞葛卡 維傑 H NARINGREKAR, VIJAY H. (US)；甘地 拉傑西 B GANDHI, RAJESH B. (US)；尼如卡 曼爵 NERURKAR, MANOJ (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：2 共 107 頁

(54)名稱

安定之蛋白質調配物

STABLE PROTEIN FORMULATIONS

(57)摘要

本發明大致係關於包括 CTLA4Ig 分子之安定之調配物，其包含用於經由包含(例如)諸如靜脈內(IV)及皮下(SC)之途徑之各種途徑來投藥以用於治療免疫系統疾病及誘發耐受性的凍乾及液體調配物。

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明大致係關於包括 CTLA4Ig 分子之安定之調配物，其包含用於經由包含(例如)諸如靜脈內(IV)及皮下(SC)之途徑之各種途徑來投藥的凍乾及液體調配物。

### 【先前技術】

在過去20年中，重組DNA技術已使許多蛋白質療法商業化。由於藉由大多數其他途徑之不良生物可用性、在臨床投藥期間更好之控制及更快之醫藥學發展，因而大多數傳遞蛋白質藥物之習知途徑已為靜脈內(IV)投藥。對需要頻繁及長期投藥之產品而言，更要求皮下(SC)傳遞途徑作為替代。當與預填充注射器及自動注射器裝置技術結合時，SC傳遞容許在家投藥及改善之投藥順應性。

由於可由SC途徑給與小體積(<1.5 ml)，因而使用大於1 mg/kg或每劑量大於100 mg之高劑量之治療常需要開發濃度超過100 mg/ml之調配物。對在更高濃度下具有聚集傾向之蛋白質而言，獲得該等高濃度調配物為開發之挑戰。甚至對IV傳遞途徑而言，當可投與大體積時，每毫升數十毫克之蛋白質濃度可為高劑量療法所需的且其可對一些蛋白質之安定性提出挑戰。

控制蛋白質可溶性之原則比小合成分子之彼等原則更複雜，且因此克服蛋白質可溶性問題採取不同策略。操作上，蛋白質之可溶性可藉由在共溶質存在下蛋白質之最大量來描述，藉以溶液仍為明顯澄清的(亦即，不展示蛋白

質沈澱、結晶或凝膠)。蛋白質可溶性對離子強度、鹽形態、pH值、溫度及某些賦形劑之依賴已由Arakawa等人於 *Theory of protein solubility*, *Methods of Enzymology*, 114:49-77, 1985 中 ; Schein於 *Solubility as a function of protein structure and solvent components*, *BioTechnology* 8(4):308-317, 1990 中 ; Jenkins於 *Three solutions of the protein solubility problem*, *Protein Science* 7(2):376-382, 1998 中 ; 及其他, 藉由整體水表面張力及蛋白質與水及離子之結合相對自身締合之改變而以機械學說明。蛋白質與特定賦形劑或鹽之結合經由蛋白質構形之改變或遮蔽涉及自身相互作用之某些胺基酸而影響可溶性。蛋白質亦藉由某些鹽、胺基酸及糖而優先水合(且安定為更緊密之構形), 導致其變化之可溶性。

需要雙分子碰撞之聚集預期為蛋白質溶液中之主要降解路徑。濃度與聚集形成之關係視聚集體之尺寸以及締合機制而定。蛋白質聚集可產生共價締合(例如二硫化物-連接)或非共價締合(可逆的或不可逆的)。藉由非共價締合之不可逆聚集通常經由藉由改變蛋白質之原生構形之熱方法、機械方法或化學方法而暴露之疏水性區域而發生。蛋白質聚集可影響(例如)歸因於免疫原性之蛋白質活性、藥物動力學及安全性。

最小化聚集之典型方法為限制蛋白質之遷移率以降低碰撞數量。用適當賦形劑之冷凍乾燥可藉由降低蛋白質遷移率及藉由限制構形可撓性來改善蛋白質抵抗聚集之安定

性，並附加因移除水而最小化水解反應之利益。添加包含凍乾保護劑之適當賦形劑可防止在冷凍乾燥處理期間以及在最終產品之儲存期間形成聚集體。有效保護之關鍵參數為凍乾保護劑與蛋白質之莫耳比。通常，需要300:1或更大之莫耳比以提供尤其用於室溫儲存之適合之安定性。然而，該等比率亦可導致黏度之不良增加。

冷凍乾燥容許設計具有適當安定性及張力之調配物。儘管等張性對SC投藥而言並非必需，但希望其最小化投藥後之疼痛。親液膠體之等張性難以達到，因為蛋白質及賦形劑皆在復水處理期間濃縮。若最終蛋白質濃度以大於100 mg/ml為目標，則500:1之賦形劑:蛋白質莫耳比將產生高張性製劑。若欲獲得等張性調配物，則選擇賦形劑:蛋白質之較低莫耳比將產生可能較不安定之調配物。

由於蛋白質構形之不安定性質及與其自身、與表面及與特定溶質相互作用之傾向，確定可達到之最高蛋白質濃度仍根據經驗實施。

可自SC調配物受益之受治者之實例為患有需要頻繁及長期投藥之病狀之彼等者，諸如患有免疫系統疾病、類風濕性關節炎及與移植物移植相關之免疫病症之受治者。用於治療類風濕性關節炎之市售蛋白質藥品包含HUMIRA<sup>®</sup>、ENBREL<sup>®</sup>及REMICADE<sup>®</sup>。

HUMIRA<sup>®</sup>(Abbott)係作為用於皮下投藥之無菌、無防腐劑溶液而供應於單用、1 ml預填充玻璃注射器中。HUMIRA<sup>®</sup>之溶液為澄清且無色的，具有約5.2之pH值。各

注射器傳遞0.8 ml(40 mg)之藥品。各0.8 ml之HUMIRA<sup>®</sup>含有40 mg阿達木單抗(adalimumab)、4.93 mg氯化鈉、0.69 mg二水合磷酸二氫鈉、1.22 mg二水合磷酸氫二鈉、0.24 mg檸檬酸鈉、1.04 mg檸檬酸單水合物、9.6 mg甘露醇、0.8 mg聚山梨醇酯80及注射用水，USP。氫氧化鈉按需要添加以調節pH值。

ENBREL<sup>®</sup>(Amgen)係作為用於皮下注射之無菌、無防腐劑溶液而供應於單用預填充1 ml注射器中。ENBREL<sup>®</sup>之溶液為澄清且無色的並在pH 6.3±0.2下調配。各ENBREL<sup>®</sup>單用預填充注射器含有0.98 ml之50 mg/ml依那西普(etanercept)溶液，以及10 mg/ml蔗糖、5.8 mg/ml氯化鈉、5.3 mg/ml L-精胺酸鹽酸鹽、2.6 mg/ml單水合磷酸二氫鈉及0.9 mg/ml無水磷酸氫二鈉。當小瓶經復水且按推薦來投與時，投與1個50 mg/ml預填充注射器之ENBREL<sup>®</sup>提供相當於2個25 mg凍乾ENBREL<sup>®</sup>小瓶之劑量。ENBREL<sup>®</sup>多用小瓶含有無菌、白色、無防腐劑、凍乾粉末。用1 ml所供應之無菌注射用製菌水(Sterile Bacteriostatic Water for Injection)(BWFI)，USP(含有0.9%苜醇)之復水產生pH值為7.4±0.3之多用、澄清及無色溶液，其含有25 mg依那西普、40 mg甘露醇、10 mg蔗糖及1.2 mg緩血酸胺(tromethamine)。

REMICADE<sup>®</sup>(Centocor)係供應為用於靜脈內輸注之無菌、白色、凍乾粉末。用10 ml之注射用無菌水，USP復水後，所得pH值為約7.2。各單用小瓶含有100 mg英利昔單

抗(infliximab)、500 mg蔗糖、0.5 mg聚山梨醇酯80、2.2 mg單水合磷酸二氫鈉及6.1 mg二水合磷酸氫二鈉。不存在防腐劑。

用於治療與移植物移植相關之免疫病症之市售蛋白質藥品包含SIMULECT<sup>®</sup>及ZENAPAX<sup>®</sup>。

藥品SIMULECT<sup>®</sup>(Novartis)為無菌冷凍乾燥物，其可以6 ml無色玻璃小瓶使用且可以10 mg及20 mg濃度使用。各10 mg小瓶含有待於2.5 ml之注射用無菌水，USP中復水之10 mg巴利昔單抗(basiliximab)、3.61 mg磷酸二氫鉀、0.50 mg磷酸氫二鈉(無水)、0.80 mg氯化鈉、10 mg蔗糖、40 mg甘露醇及20 mg甘胺酸。各20 mg小瓶含有待於5 ml之注射用無菌水，USP中復水之20 mg巴利昔單抗、7.21 mg磷酸二氫鉀、0.99 mg磷酸氫二鈉(無水)、1.61 mg氯化鈉、20 mg蔗糖、80 mg甘露醇及40 mg甘胺酸。不添加防腐劑。

ZENAPAX<sup>®</sup>(Roche Laboratories)，25 mg/5 ml係供應為用於進一步稀釋及靜脈內投藥之澄清、無菌、無色濃縮物。每毫升之ZENAPAX<sup>®</sup>含有5 mg達利珠單抗(daclizumab)及3.6 mg單水合磷酸二氫鈉、11 mg七水合磷酸氫二鈉、4.6 mg氯化鈉、0.2 mg聚山梨醇酯80，且可含有鹽酸或氫氧化鈉以將pH值調節至6.9。不添加防腐劑。

CTLA4Ig分子藉由抑制CD28-B7相互作用來干擾T細胞共刺激。因此，CTLA4Ig分子可提供用於諸如類風濕性關節炎及與移植物移植相關之免疫病症之免疫系統疾病的治

療用途。

需要用於治療免疫系統病症之包括CTLA4Ig分子之安定、有效方便調配物。

### 【發明內容】

本發明提供用於藉由向受治者投與CTLA4Ig分子來治療免疫系統疾病之調配物，該等CTLA4Ig分子在B7-陽性細胞上與B7分子結合，進而抑制內因性B7分子在T-細胞上結合CTLA4及/或CD28。

本發明之凍乾調配物包括CTLA4Ig分子且該蛋白質與凍乾保護劑之重量比為至少1:2。凍乾保護劑較佳為糖，更佳為雙糖，最佳為蔗糖或麥芽糖。凍乾調配物亦可包括選自由緩衝劑、界面活性劑、膨化劑及防腐劑組成之選項單中之一種或多種組份。

在某些實施例中，適用於安定凍乾藥品之蔗糖或麥芽糖之量係使蛋白質與蔗糖或麥芽糖之重量比為至少1:2者，較佳係使蛋白質與蔗糖或麥芽糖之重量比為1:2至1:5者，更佳係使蛋白質與麥芽糖或蔗糖之重量比為約1:2者。

本發明之皮下(SC)用調配物包括於水性載劑中、與有安定化作用之量之糖組合的蛋白質濃度為至少100 mg/ml之CTLA4Ig分子，較佳與有安定化作用之量之糖組合的蛋白質濃度為至少125 mg/ml之CTLA4Ig分子。糖之量較佳係使蛋白質與糖之重量比為至少1:1.1者。安定劑之用量較佳不大於會造成不良黏度或不適合經由SC注射器投藥之量。糖較佳為雙糖，最佳為蔗糖。SC調配物亦可包括選自由緩衝

劑、界面活性劑及防腐劑組成之選項單中之一種或多種組份。

在某些實施例中，適用於安定化含CTLA4Ig分子之SC藥品之蔗糖之量係使蛋白質與蔗糖之重量比為至少1:1者，較佳係使蛋白質與蔗糖之重量比為1:1.3至1:5者，更佳係使蛋白質與蔗糖之重量比為約1:1.4者。

本發明之液體調配物包括於水性載劑中、與有安定化作用之量之糖組合的蛋白質濃度為至少20 mg/ml之CTLA4Ig分子，較佳與有安定化作用之量之糖組合的蛋白質濃度為至少25 mg/ml之CTLA4Ig分子。較佳地，糖之量係使蛋白質與糖之重量比為至少1:1者。糖較佳為雙糖，最佳為蔗糖。液體調配物亦可包括選自由緩衝劑、界面活性劑及防腐劑組成之選項單中之一種或多種組份。

在某些實施例中，適用於安定化液體藥品之蔗糖之量係使蛋白質與蔗糖之重量比為至少1:1者，較佳係使蛋白質與蔗糖之重量比為1:2至1:10者，更佳係使蛋白質與蔗糖之重量比為約1:2者。

在本發明之另一實施例中，提供一種製品，其含有藥品且較佳提供其用途之說明。

本發明進一步提供藉由投與本發明之CTLA4Ig分子調配物來治療免疫系統疾病及誘發耐受性之方法。

### 【實施方式】

如本文中所以利用：

"安定之"調配物或藥品為其中在儲存後其中之CTLA4Ig

分子基本保持其物理及化學安定性及完整性之調配物或藥品。CTLA4Ig分子調配物之安定性可在經選擇之時間週期後，在經選擇之溫度下量測。舉例而言，在冷凍乾燥及儲存後，聚集形成之增加為凍乾CTLA4Ig分子調配物不安定之指示器。除聚集形成外，在整個存放期期間，原始澄清度、顏色及氣味之保持為用以監測CTLA4Ig分子溶液之安定性之指示器。HMW物質為多聚體(亦即，四聚體、六聚體等)，其具有比CTLA4Ig分子二聚體更高之分子量。通常"安定之"藥品可為其中當調配物在2-8°C下儲存1年時，如藉由高分子量物質之百分比(% HMW)之增量所量測，聚集增量小於約5%且較佳小於約3%之藥品。較佳地，所製造之藥品包括小於約25%之HMW物質，較佳小於約15%之HMW物質，更佳小於約10%之HMW物質，最佳小於約5%之HMW物質。

CTLA4Ig分子之單體、二聚體及HMW物質可藉由尺寸排外層析法(SEC)來分離。SEC係基於分子尺寸來分離分子。分離係藉由分子沿管柱長度方向遷移時之差異分子排外法或包含法來達成。因此，解析度作為管柱長度之函數增加。CTLA4Ig分子樣品可使用配備串聯之TSK Gel<sup>®</sup> G3000SWXL(300 mm×7.8 mm)及TSK Gel<sup>®</sup> G3000SWXL(40 mm×6.0 mm)管柱(Tosoh Bioscience, Montgomery, PA)之2695 Alliance HPLC(Waters, Milford, MA)來分離。在10 mg/ml(20 µl等分試樣)下之樣品係在1.0 ml/min之流動速率下，使用由0.2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.9% NaCl，pH 6.8組成之移

動相來分離。在 280 nm 之吸光度下，使用 Water's 2487 雙波長偵測器來監視樣品。使用該系統，HMW 物質具有 7.5 min±1.0 min 之滯留時間。積分各峰之峰下面積。% HMW 物質藉由將 HMW 峰面積除以總峰面積來計算。

"復水"調配物為已藉由將凍乾調配物溶於水性載劑中以便 CTLA4Ig 分子溶於復水調配物中來製備之調配物。復水調配物適於向需要其之患者靜脈內投藥(IV)。

"等張"調配物為具有基本與人類血液相同之滲透壓之調配物。等張調配物通常具有約 250 至 350 mOsmol/KgH<sub>2</sub>O 之滲透壓。術語"高張性"係用以描述具有大於人類血液之滲透壓之滲透壓的調配物。等張力性可使用(例如)蒸氣壓型滲壓計或冰凍型滲壓計來量測。

術語"緩衝劑"係指一或多種組份，當將其添加至水溶液中時，其能保護溶液以防添加酸或鹼時或用溶劑稀釋後之 pH 變化。除磷酸鹽緩衝劑外，可使用甘胺酸鹽緩衝劑、碳酸鹽緩衝劑、檸檬酸鹽緩衝劑及其類似物，在該狀況下鈉離子、鉀離子或銨離子可用作平衡離子。

"酸"為在水溶液中產生氫離子之物質。"醫藥學上可接受之酸"包含在調配其之濃度及方式下為無毒之無機酸及有機酸。

"鹼"為在水溶液中產生氫氧根離子之物質。"醫藥學上可接受之鹼"包含在調配其之濃度及方式下為無毒之無機鹼及有機鹼。

"凍乾保護劑"為當與受關注之蛋白質組合時，防止或降

低冷凍乾燥及後續儲存後蛋白質之化學及/或物理不安定性之分子。

"防腐劑"為減少細菌作用且可視情況添加至本文中調配物中之藥劑。添加防腐劑可(例如)有助於多用(多劑量)調配物之製造。可能的防腐劑之實例包含氯化十八基二甲基苄基銨、氯化六羥季銨、氯化苯甲煙銨(氯化烷基苄基二甲基銨之混合物，其中烷基為長鏈化合物)及苄索氯銨。其他類型之防腐劑包含諸如酚之芳族醇、丁醇及苄醇、諸如對氧苯甲酸甲酯或對氧苯甲酸丙酯之對氧苯甲酸烷基酯、兒茶酚、間苯二酚、環己醇、3戊醇及間甲酚。

"界面活性劑"為含有疏水性部分(例如烷基鏈)及親水性部分(例如羧基及羧酸酯基)之表面活性分子。界面活性劑可添加至本發明之調配物中。適用於本發明之調配物之界面活性劑包含(但不限於)聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20或80)；泊洛沙姆(poloxamer)(例如泊洛沙姆188)；脫水山梨糖醇酯及衍生物；Triton；月桂硫酸鈉；辛基糖苷鈉；月桂基磺酸基碘絡酮、十四烷基磺酸基碘絡酮、亞油醯基磺酸基碘絡酮或硬脂醯基磺酸基碘絡酮；月桂基肌胺酸、十四烷基肌胺酸、亞油醯基肌胺酸或硬脂醯基肌胺酸；亞油醯基甜菜鹼、十四烷基甜菜鹼或十六烷基甜菜鹼；月桂醯胺丙基甜菜鹼、可可胺丙基甜菜鹼、亞油醯胺丙基甜菜鹼、肉豆蔻醯胺丙基甜菜鹼、棕櫚醯胺丙基甜菜鹼或異硬脂醯胺丙基甜菜鹼(例如月桂醯胺丙基)；肉豆蔻醯胺丙基二甲基胺、棕櫚醯胺丙基二甲基胺或異硬脂醯胺丙基二甲

基胺；甲基椰油醯基牛磺酸鈉或甲基油基牛磺酸二鈉；及 MONAQUAT™ 系列 (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.)、聚乙二醇、聚丙二醇及乙二醇與丙二醇之共聚物 (例如 Pluronics、PF68 等)。

"藥物"係指用於最終藥品之調配物中之起始物質。典型 CTLA4Ig 藥物組成包括 20 mg/ml 至 60 mg/ml 之蛋白質濃度，7 至 8 之 pH 值及小於 5% 之 % HMW 物質。

"經調配之本體溶液"係指在填充容器前之最終調配物，諸如在填充用於冷凍乾燥之小瓶前之經調配溶液或在填充用於 SC 注射之注射器前之經調配溶液。

"藥品"係指封裝於容器中之最終調配物，其可以 (諸如) 凍乾藥品形式在使用前復水；以 (諸如) 液體藥品形式在使用前進一步稀釋；或用作 (諸如) SC 溶液藥品。

術語 "CTLA4-Ig" 或 "CTLA4-Ig 分子" 或 "CTLA4Ig 分子" 可交替地使用且係指包括至少 1 個具有 CTLA4 細胞外域或其部分及免疫球蛋白恆定區或其部分之多肽之蛋白質分子。細胞外域及免疫球蛋白恆定區可為野生型，或突變的，或經修飾的，及為包含人類或小鼠之哺乳動物的。多肽可另外包括額外蛋白質域。CTLA4-Ig 分子可亦係指多肽之多聚體形式，諸如二聚體、四聚體及六聚體。CTLA4-Ig 分子亦能與 CD80 及 / 或 CD86 結合。

術語 "B7-1" 係指 CD80；術語 "B7-2" 係指 CD86；且術語 "B7" 係指 B7-1 及 B7-2 (CD80 及 CD86)。術語 "B7-1-Ig" 或 "B7-1Ig" 係指 CD80-Ig；術語 "B7-2-Ig" 或 "B7-2Ig" 係指

CD86-Ig。

在一實施例中，"CTLA4Ig"係指具有以下殘基之胺基酸序列之蛋白質分子：(i)SEQ ID NO:2之26-383、(ii)SEQ ID NO:2之26-382；(iii)SEQ ID NO:2之27-383或(iv)SEQ ID NO:2之27-382或視情況(v)SEQ ID NO:2之25-382或(vi)SEQ ID NO:2之25-383。在單體形式中，該等蛋白質可在本文中稱為"SEQ ID NO:2單體"或"具有SEQ ID NO:2序列"之單體。該等SEQ ID NO:2單體可二聚以便二聚體組合可包含(例如)：(i)及(i)；(i)及(ii)；(i)及(iii)；(i)及(iv)；(i)及(v)；(i)及(vi)；(ii)及(ii)；(ii)及(iii)；(ii)及(iv)；(ii)及(v)；(ii)及(vi)；(iii)及(iii)；(iii)及(iv)；(iii)及(v)；(iii)及(vi)；(iv)及(iv)；(iv)及(v)；(iv)及(vi)；(v)及(v)；(v)及(vi)；及(vi)及(vi)。該等不同二聚體組合亦可彼此締合以形成四聚體CTLA4Ig分子。該等單體、二聚體、四聚體及其他多聚體可在本文中稱為"SEQ ID NO:2蛋白質"或"具有SEQ ID NO:2序列"之蛋白質。(如SEQ ID NO:2所示之編碼CTLA4Ig之DNA係依據Budapest Treaty規定，由美國菌種保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209於1991年5月31日寄存，且已給與其ATCC寄存編號ATCC 68629；如SEQ ID NO:2所示之表現CTLA4Ig之中國倉鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary, CHO)細胞株係以ATCC識別號CRL-10762於1991年5月31日寄存)。如本文中所利用，"Abatacept"係指SEQ ID NO:2蛋白質。

在一實施例中，CTLA4-L104EA29Y-Ig(有時稱為"LEA29Y"或"L104EA29Y")為結構上相似於如SEQ ID NO:1所示之CTLA4-Ig分子之經遺傳工程化的融合蛋白質。L104EA29Y-Ig具有經修飾人類CTLA4之功能性細胞外結合域及IgG1類之人類免疫球蛋白之Fc域。兩種胺基酸修飾，亦即在為SEQ ID NO:2之位置130之位置104(L104E)處，白胺酸變為麩胺酸，及在為SEQ ID NO:2之位置55之位置29(A29Y)處，丙胺酸變為酪胺酸，係在CTLA4域之B7結合區中進行以產生L104EA29Y。SEQ ID NOS:3及4分別描述L104EA29Y-Ig之核苷酸及胺基酸序列，該L104EA29Y-Ig包括信號肽；以位置+27處之甲硫胺酸開始及以位置+150處之天冬胺酸結束，或以位置+26處之丙胺酸開始及以位置+150處之天冬胺酸結束之CTLA4的突變細胞外域；及Ig區。編碼L104EA29Y-Ig之DNA係依據Budapest Treaty規定，由美國菌種保藏中心(ATCC)於2000年6月20日寄存。已給與其ATCC寄存編號PTA-2104。L104EA29Y-Ig另外描述於2006年8月22日頒予之美國專利7,094,874中及WO 01/923337 A2中，其皆以引用之方式全部併入本文中。

哺乳動物細胞中之L104EA29Y-Ig之表現可造成N-末端變異及C-末端變異之產生，以便所產生之蛋白質可具有以下殘基之胺基酸序列：(i)SEQ ID NO:4之26-383、(ii)SEQ ID NO:4之26-382；(iii)SEQ ID NO:4之27-383或(iv)SEQ ID NO:4之27-382或視情況(v)SEQ ID NO:4之25-382或(vi)SEQ ID NO:4之25-383。在單體形式中，該等蛋白質可在本文

中稱為"SEQ ID NO:4單體"或"具有SEQ ID NO:4序列"之單體。該等蛋白質可二聚以便二聚體組合可包含(例如)：(i)及(i)；(i)及(ii)；(i)及(iii)；(i)及(iv)；(i)及(v)；(i)及(vi)；(ii)及(ii)；(ii)及(iii)；(ii)及(iv)；(ii)及(v)；(ii)及(vi)；(iii)及(iii)；(iii)及(iv)；(iii)及(v)；(iii)及(vi)；(iv)及(iv)；(iv)及(v)；(iv)及(vi)；(v)及(v)；(v)及(vi)；及(vi)及(vi)。該等不同二聚體組合亦可彼此締合以形成四聚體L104EA29YIg分子。該等單體、二聚體、四聚體及其他多聚體可在本文中稱為"SEQ ID NO:4蛋白質"或"具有SEQ ID NO:4序列"之蛋白質。如本文中所利用，"Belatacept"係指SEQ ID NO:4蛋白質。

#### **CTLA4-Ig單體及多聚體**

CTLA4-Ig分可含有(例如)呈單體、二聚體、三聚體、四聚體、五聚體、六聚體或其他多聚形式之CTLA4-Ig蛋白質。CTLA4-Ig分子可包括與具有至少一個CTLA4之細胞外域及一免疫球蛋白恆定區融合之蛋白質。(例如)相對於CTLA4細胞外域及免疫球蛋白恆定區序列，CTLA4-Ig分子可具有野生型或突變序列。可糖基化單獨或呈二聚體、四聚體或其他多聚體形式之CTLA4-Ig單體。

在一些實施例中，本發明提供具有至少一定百分比之二聚體或其他多聚體分子之CTLA4-Ig分子群體。舉例而言，本發明提供為大於90%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%之CTLA4-Ig二聚體之CTLA4-Ig分子群體。在一實施例中，本發明提供包括約95%至約99.5%之CTLA4-Ig二聚

體及約0.5%至約5%之CTLA4-Ig四聚體之CTLA4-Ig分子群體。在另一實施例中，CTLA4-Ig分子群體包括約98%之CTLA4-Ig二聚體、約1.5%之CTLA4-Ig四聚體及約0.5%之CTLA4-Ig單體。

在一實施例中，本發明提供CTLA4-Ig分子群體，其中該群體大體上不含CTLA4-Ig單體分子。大體上不含CTLA4-Ig單體分子可係指具有小於1%、0.5%或0.1%之單體之CTLA4-Ig分子群體。

在一實施例中，本發明提供CTLA4-Ig分子群體，其中該群體大體上不含比二聚體更大之CTLA4-Ig多聚體，諸如四聚體、六聚體等。大體上不含比二聚體更大之CTLA4-Ig多聚體分子可係指具有小於6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%之比二聚形式更大之CTLA4-Ig多聚體的CTLA4-Ig分子群體。

在一實施例中，CTLA4-Ig單體分子可具有(例如)以下各序列之胺基酸序列：(i)SEQ ID NO:2之26-383、(ii)SEQ ID NO:2之26-382、(iii)SEQ ID NO:2之27-383或(iv)SEQ ID NO:2之27-382或視情況(v)SEQ ID NO:2之25-382或(vi)SEQ ID NO:2之25-383。當在CHO細胞中表現包括SEQ ID NO:1之核酸序列之表現卡匣時，所表現之優勢單體形式具有甲硫胺酸之N-末端胺基酸殘基(SEQ ID NO:2之殘基27)，其對應於野生型人類CTLA4之N-末端胺基酸殘基。然而，因為SEQ ID NO:1亦包含製瘤素M信號序列(SEQ ID NO:1之核苷酸11-88)之編碼序列，所以自SEQ ID NO:1所表現之

蛋白質含有製瘤素M信號序列。該信號序列在蛋白質自細胞質輸出或自細胞之分泌出之過程期間，自所表現之蛋白質分裂。但分裂可造成N-末端變異，諸如與在胺基酸殘基26與27之間的分裂(產生殘基27之N-末端)相對，在胺基酸殘基25與26之間的分裂(產生殘基26之N-末端，亦即"Ala變異")，或在胺基酸殘基24與25之間的分裂(產生殘基24之N-末端，亦即"Met-Ala變異")。舉例而言，Met-Ala變異可以約1%存在於CTLA4-Ig分子之混合物中且Ala變異可以約8-10%存在於CTLA4-Ig分子之混合物中。另外，自SEQ ID NO:1所表現之蛋白質可由於不完全處理而具有C-末端變異。優勢C-末端為SEQ ID NO:2之殘基382處之甘胺酸。在CTLA4-Ig分子之混合物中，在C-末端處(SEQ ID NO:2之殘基383)具有離胺酸之單體可以(例如)約4-5%存在。

CTLA4-Ig單體分子可包括人類CTLA4之細胞外域。在一實施例中，細胞外域可包括SEQ ID NO:1之核苷酸89-463之核苷酸序列，其編碼SEQ ID NO:2之胺基酸27-151。在另一實施例中，細胞外域可包括人類CTLA4之突變序列。在另一實施例中，細胞外域可包括變成SEQ ID NO:1之核苷酸89-463之核苷酸改變以便進行保守胺基酸改變。在另一實施例中，細胞外域可包括至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%與SEQ ID NO:1之核苷酸89-463一致之核苷酸序列。

CTLA4-Ig單體分子可包括人類免疫球蛋白恆定區。該恆定區可為恆定區之一部分；該恆定區可具有野生型或突變

序列。恆定區可來自人類 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 或 IgE。恆定區可來自免疫球蛋白之輕鏈或重鏈。當恆定區係來自 IgG、IgD 或 IgA 分子時，恆定區可包括以下恆定區之一或多者：CL、CH1、鉸鏈、CH2 或 CH3。當恆定區係來自 IgM 或 IgE 時，恆定區可包括以下恆定區之一或多者：CL、CH1、CH2、CH3 或 Ca4。在一實施例中，恆定區可包括一或多個來自 IgG、IgD、IgA、IgM 或 IgE 之恆定區。

在一實施例中，CTLA4-Ig 單體分子包括經修飾之人類 IgG1 鉸鏈區 (SEQ ID NO:1 之核苷酸 464-508；SEQ ID NO:2 之胺基酸 152-166)，其中在 SEQ ID NO:2 之胺基酸殘基 156、162 及 165 處之絲胺酸已自存在於野生型序列中之半胱胺酸工程化。

在一實施例中，CTLA4-Ig 單體分子包括經修飾之人類 IgG1 CH2 區及野生型 CH3 區 (該經修飾之人類 IgG1 CH2 域具有 SEQ ID NO:1 之核苷酸 509-838 及 SEQ ID NO:2 之胺基酸 167-276；人類 IgG1 CH3 域具有 SEQ ID NO:1 之核苷酸 839-1159 及 SEQ ID NO:2 之胺基酸 277-383)。

在一實施例中，CTLA4-Ig 分子群體包括具有 2006 年 8 月 22 日頒予之美國專利第 7,094,874 號之圖 7、8 或 9 的任一或多者所示之序列及以公開案第 US20030083246 號及第 US20040022787 號公開之美國專利申請案 (其在此以引用之方式全部併入) 所示之序列的單體。

在一實施例中，CTLA4-Ig 四聚體分子包括 2 對 CTLA4-Ig

多肽或2個CTLA4-Ig多肽之二聚體，其中各多肽具有以下胺基酸序列之一：(i)SEQ ID NO:2之26-383、(ii)SEQ ID NO:2之26-382、(iii)SEQ ID NO:2之27-383或(iv)SEQ ID NO:2之27-382或視情況(v)SEQ ID NO:2之25-382或(vi)SEQ ID NO:2之25-383。多肽對或二聚體之各成員彼此共價地連接，且2對多肽彼此非共價地締合進而形成四聚體。該等四聚體分子能與CD80或CD86結合。

在另一實施例中，該等四聚體分子可以比CTLA4-Ig二聚體(其單體具有上述胺基酸序列之一)對CD80或CD86之結合親和力大至少2倍之親和力與CD80或CD86結合。在另一實施例中，該等四聚體分子可以比野生型CTLA4對CD80或CD86之結合親和性或親和力大至少2倍之親和力與CD80或CD86結合。該更大親和力可有助於治療免疫病症及如下文所述其他疾病中之更高功效。另外，更大或改善之親和力可產生藥物之更高效能之結果。舉例而言，包括CTLA4-Ig四聚體之治療組合物將具有比相同量之具有CTLA4-Ig單體之治療組合物更高之親和力及因此更高之效能。在另一實施例中，與CTLA4-Ig二聚體(其單體具有上述胺基酸序列之一)相比，該等四聚體分子可具有大至少2倍之對T細胞增殖之抑制。在另一實施例中，與野生型CTLA4分子相比，該等四聚體分子可具有大至少2倍之對T細胞增殖之抑制。

T細胞增殖可使用此項技術中已知之標準檢定來量測。舉例而言，評估T細胞增殖之最常見方式之一為經由TCR

之抗原或促進抗體來刺激T細胞且量測(例如)經滴定胸苷(3H-TdR)於增殖T細胞中之結合或藉由增殖T細胞而釋放至培養物中之細胞激素之量。可進而量測T細胞活化或增殖後，CTLA4-Ig分子之抑制效應。

CTLA4-Ig分子之親和力為分子與包含CD80、CD86或CD80Ig或CD86Ig融合蛋白質之單配位體結合之強度。CTLA4-Ig對配位體之親和力可藉由使用(例如)基於表面電漿技術之結合相互作用分析(BIA)來量測。除量測結合強度外，其允許即時測定諸如締合及解離速率常數之結合動力學。由經薄金屬膜塗佈之玻璃載片組成之感應晶片係用相互作用物之一(亦即CTLA4-Ig或配位體之一)塗佈，表面基質係共價地附著於該感應晶片。容許含有另一相互作用物之溶液流經其表面。對表面之另一面引導連續光束且量測其反射角。CTLA4-Ig與配位體結合時，光束之共振角改變(因為其視靠近感應器之反應面之培養基的折射率而定，其亦直接與培養基中溶解物質之濃度相關)。隨後在電腦輔助下將其分析。

在一實施例中，CTLA4-Ig結合實驗可藉由於BIAcore器具(BIAcore AG, Uppsala, Sweden)上之表面電漿共振(SPR)來執行。CTLA4-Ig可藉由第一胺基共價偶合至於BIAcore感應晶片上之羧甲基化葡聚糖基質，進而將CTLA4-Ig固定至該感應晶片。或者，抗恆定區抗體可用以經由Ig片段將CTLA4-Ig間接固定至感應器。此後，向晶片中添加配位體以量測對配位體之CTLA4-Ig結合。親和力量測可(例如)如

van der Merwe, P.等人，J. Exp. Med. (1997) 185 (3):393-404中所述來執行。

亦可量測CTLA4-Ig分子之親和力。親和力可定義為在多個位點處兩個分子或細胞彼此結合強度之總和。親和力相異於親和性，親和性為分子上之一位點與其配位體結合之強度。不受理論所約束，CTLA4-Ig分子之更高親和力可產生藉由CTLA4-Ig分子對T細胞增殖及活化之抑制之增加效能。親和力可(例如)藉由2類固相檢定來量測：a)競爭抑制檢定及b)溶離檢定。在其兩者中，配位體係附著於固體支撐物。在競爭抑制檢定中，隨後將固定濃度之CTLA4-Ig分子連同不同濃度之游離配位體添加於溶液中，且測定抑制固相結合50%之配位體之量。需要之配位體愈少，親和力愈強。在溶離檢定中，將配位體添加於溶液中。獲得平衡狀態後，以不同濃度添加離液劑或變性劑(例如異硫氰酸鹽、尿素或二乙胺)以破壞CTLA4-Ig/配位體相互作用。其後，用ELISA測定抵抗溶離之CTLA4-Ig之量。親和力愈高，需要用以溶離特定量之CTLA4-Ig之離液劑愈多。CTLA4-Ig分子之異質混合物之相對親和力可表示為親和力指數(AI)，其等於需要用以溶離50%之所結合CTLA4-Ig分子之溶離劑的濃度。資料之改進分析可藉由測定不同濃度之溶離劑下所溶離之CTLA4-Ig百分比來進行。

#### **產生本發明之CTLA4Ig分子之方法**

可在原核細胞中表現CTLA4Ig分子。原核生物常藉由各種細菌菌株來表示。細菌可為革蘭氏陽性或革蘭氏陰性。

通常，諸如大腸桿菌 (*E. coli*) 之革蘭氏陰性細菌為較佳的。亦可使用其他微生物菌株。

上文所述之編碼 CTLA4Ig 分子之序列可插入經設計用於在諸如大腸桿菌之原核細胞中表現外來序列之載體中。該等載體可包含常用原核控制序列，其在本文中定義包含用於轉錄啟始、視情況具有操縱基因以及核糖體結合位點序列之啟動子，包含該等作為  $\beta$ -內醯胺 (青黴素酶) 及乳糖 (lac) 啟動子系統 (Chang 等人, (1977) *Nature* 198:1056)、色胺酸 (trp) 啟動子系統 (Goeddel 等人, (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057) 及  $\lambda$  衍生  $P_L$  啟動子及 N-基因核糖體結合位點 (Shimatake 等人, (1981) *Nature* 292:128) 之常用啟動子。

該等表現載體將亦包含複製起點及諸如給與對抗生素之抗力之  $\beta$ -內醯胺或新黴素 (neomycin) 磷酸轉移酶基因的可選擇標記，以便載體可在細菌中複製且載運質體之細胞可在諸如安比西林 (ampicillin) 或康黴素 (kanamycin) 之抗生素存在下生長時受選擇。

表現質體可經由包含 (但不限於)  $\text{CaCl}_2$ -震動 (Cohen, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110, 及 Sambrook 等人 (編), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 第二版, Cold Spring Harbor Press, (1989)) 及電穿孔之各種標準方法而引入原核細胞中。

根據本發明之實踐，真核細胞亦為適合之宿主細胞。真核細胞之實例包含任何動物細胞 (無論是否為初始的或永生化的)、酵母 (例如釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*))、

啤酒釀酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 及甲醇酵母 (*Pichia pastoris*) 及植物細胞。骨髓瘤、COS及CHO細胞為可用作宿主之動物細胞之實例。特定CHO細胞包含(但不限於)DG44(Chasin等人, 1986 *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-556 ; Kolkekar 1997 *Biochemistry* 36:10901-10909)、CHO-K1(ATCC第CCL-61號)、CHO-K1 Tet-On細胞株(Clontech)、命名為ECACC 85050302之CHO(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)、CHO純系13(GEIMG, Genova, IT)、CHO純系B(GEIMG, Genova, IT)、命名為ECACC 93061607之CHO-K1/SF(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)及命名為ECACC 92052129之RR-CHOK1(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)。說明性植物細胞包含煙草細胞(整個植物、細胞培養物或愈傷組織)、玉米細胞、黃豆細胞及水稻細胞。玉米種子、黃豆種子及水稻種子亦可接受。

編碼上文所述之CTLA4Ig分子之核酸序列亦可插入經設計用於在真核細胞中表現外來序列之載體中。載體之調節元素可根據特定真核宿主而變化。

適用於表現載體之常用真核控制序列包含與哺乳動物細胞相容之啟動子及控制序列, 諸如CMV啟動子(CDM8載體)及禽類肉瘤病毒(ASV)( $\pi$ LN載體)。其他常用啟動子包含來自猿病毒40(SV40)之早期及晚期啟動子(Fiers等人, (1973) *Nature* 273:113)或諸如得自多瘤病毒、腺病毒2及牛乳突瘤病毒之彼等啟動子之其他病毒啟動子。亦可使用諸如hMTII(Karin等人, (1982) *Nature* 299:797-802)之誘導性

啟動子。

在真核細胞中表現CTLA4Ig分子之載體亦可載運稱為強化子區之序列。該等載體在最佳化基因表現中為重要的且發現於啟動子區之上游或下游。

用於真核宿主細胞之表現載體之實例包含(但不限於)用於哺乳動物宿主細胞之載體(例如, BPV-1、pHyg、pRSV、pSV2、pTK2(Maniatis); pIRES(Clontech); pRc/CMV2、pRc/RSV、pSFV1(Life Technologies); pVPakc載體、pCMV載體、pSG5載體(Stratagene))、反轉錄病毒載體(例如pFB載體(Stratagene)、pCDNA-3(Invitrogen)或其經修飾形式, 腺病毒載體; 腺相關病毒載體、桿狀病毒載體、酵母載體(例如pESC載體(Stratagene))。

編碼CTLA4Ig分子之核酸序列可整合至真核宿主細胞之基因組中且可複製成宿主基因組複製物。或者, 載運CTLA4Ig分子之載體可含有容許染色體外複製之複製起點。

為在釀酒酵母中表現核酸序列, 可使用來自內因性酵母質體之複製起點, 2 $\mu$ 環狀物。(Broach, (1983) Meth. Enz. 101:307)。或者, 可使用來自酵母基因組之能促進自主複製之序列(參見(例如), Stinchcomb等人, (1979) Nature 282:39); Tschemper等人, (1980) Gene 10:157; 及Clarke等人, (1983) Meth. Enz. 101:300)。

用於酵母載體之轉錄控制序列包含用於合成醱解酵素之啟動子(Hess等人, (1968) J. Adv. Enzyme Reg. 7:149;

Holland等人，(1978) *Biochemistry* 17:4900)。此項技術中已知之額外啟動子包含提供於CDM8載體中之CMV啟動子(Toyama及Okayama, (1990) *FEBS* 268:217-221)；3-磷甘油酸激酶之啟動子(Hitzeman等人，(1980) *J. Biol. Chem.* 255:2073)及其他醣解酵素之彼等者。

其他啟動子為誘導性的，因為其可藉由環境刺激或細胞之生長介質來調節。該等誘導性啟動子包含來自以下各者之基因之彼等啟動子：熱休克蛋白(heat shock protein)、乙醇脫氫酶2、異細胞色素C、酸性磷酸酶、與氮分解代謝相關之酶及負責利用麥芽糖及半乳糖之酶。

調節序列亦可置放於編碼序列之3'末端。該等序列可用以安定信息RNA。該等終止子發現於若乾酵母衍生基因及哺乳動物基因中之編碼序列後之3'末轉譯區中。

用於植物及植物細胞之說明性載體包含(但不限於)土壤桿菌(*Agrobacterium*)T<sub>i</sub>質體、花椰菜嵌紋病毒(CaMV)及番茄金色花葉病毒(TGMV)。

哺乳動物細胞可藉由包含(但不限於)在磷酸鈣存在下之轉染、顯微注射、電穿孔之方法或經由用病毒載體之轉導來轉型。

用於將外來DNA序列引入植物及酵母基因組中之方法包含(1)機械方法，諸如將DNA顯微注射至單細胞或原生體中，在DNA存在下用玻璃珠渦漩細胞，或將經DNA塗佈之鎢球或金球射入細胞或原生體中；(2)藉由經由聚乙二醇處理或經受高電壓電脈衝(電穿孔)使細胞膜對巨分子可滲透

而引入DNA；或(3)使用融合至細胞膜之脂質體(含有cDNA)。

美國專利申請案美國公開案第20050019859號及美國專利申請案美國公開第20050084933號教示藉由動物或哺乳動物細胞培養產生本發明之蛋白質，尤其為重組糖蛋白產物之方法，且其以引用之方式併入本文。

細胞培養方法之蛋白質產生階段後，使用熟習此項技術者瞭解之技術自細胞培養基回收CTLA4Ig分子。詳言之，CTLA4Ig分子係作為所分泌之多肽而自培養基回收。

最初將培養基離心以移除細胞碎片及微粒。隨後用以下此項技術中良好建立之非限制性純化程序，將所要蛋白質自污染物DNA、可溶性蛋白質及多肽純化：SDS-PAGE；硫酸銨沉澱；乙醇沉澱；免疫親和性溶離或離子交換柱溶離；逆相HPLC；矽膠層析或諸如QAE或DEAE之陰離子交換樹脂層析；層析聚焦；使用(例如)Sephadex G-75™柱之凝膠過濾；及蛋白質A Sepharose™柱以移除諸如IgG之污染物。添加諸如苯基甲基磺醯基氟(PMSF)之蛋白酶抑制劑或蛋白酶抑制劑調和混合物(cocktail mix)亦可適用於抑制在純化期間之蛋白水解降解。熟習此項技術者將認識到適於例如糖蛋白之受關注蛋白質的純化方法可需要改變以說明在重組細胞培養中表現後蛋白質之特徵改變。

選用於糖蛋白之碳水化合物群之純化技術及方法亦在本發明之上下文中具有實用性。舉例而言，該等技術包含使用HPLC或陽離子交換樹脂或陰離子交換樹脂之離子交換

層析，其中視所選用之碳水化合物而定，收集更多鹼性或更多酸性溶離份。使用該等技術亦可造成污染物之伴隨移除。

純化方法可另外包括使病毒及/或反轉錄病毒失活及/或移除病毒及/或反轉錄病毒之額外步驟，該等病毒及/或反轉錄病毒可潛在地存在於哺乳動物細胞株之細胞培養基中。大量病毒清除步驟為可用的，其包含(但不限於)用以下各者來處理：諸如尿素或胍之離液劑、清潔劑、額外超濾/透濾步驟、諸如離子交換層析或尺寸排外層析法之習知分離、pH極值、加熱、蛋白酶、有機溶劑或其任一組合。

經純化之CTLA4Ig分子需要在儲存或進一步處理前之濃度及緩衝劑交換。Pall Filtron TFF系統可用以濃縮及用藥物所要之最終緩衝劑交換來自先前純化柱之溶離緩衝劑。

在一態樣中，已濃縮且經受透濾步驟之經純化之CTLA4Ig分子可填充至2 L Biotainer<sup>®</sup>瓶、50 L生物處理袋或任何其他適合之容器中。該等容器中之CTLA4Ig分子可在冷凍前，在2°C至8°C下儲存約60天。在2°C至8°C下，經純化之CTLA4Ig分子之延長儲存可使HMW物質之比例增加。因此，為長期儲存，CTLA4Ig分子可在儲存前，在約-70°C下冷凍且在約-40°C之溫度下儲存。冷凍溫度可自約-50°C至約-90°C變化。冷凍時間可變化且主要視含有CTLA4Ig分子之容器體積及加載於冷凍器中之容器數量而定。舉例而言，在一實施例中，CTLA4Ig分子係在2 L

Biotainer<sup>®</sup>瓶中。將少於4個2 L Biotainer<sup>®</sup>瓶加載於冷凍器中可需要約14至至少18小時之冷凍時間。加載至少4個瓶可需要約18至至少24小時之冷凍時間。具有經冷凍之CTLA4Ig分子之容器係在約-35°C至約-55°C之溫度下儲存。在約-35°C至約-55°C之溫度下之儲存時間可變化且可短至18小時。經冷凍之藥物可以用於藥品之調配物之控制方式來解凍。

共同申請中之2005年12月20日申請之美國專利申請案第60/752,267號及2006年10月5日申請之第06/849,543號教示藉由動物或哺乳動物細胞培養產生本發明之蛋白質，尤其為重組糖蛋白產物之方法且以引用之方式併入本文。

#### 本發明之凍乾調配物

本發明之凍乾調配物包括CTLA4Ig分子且該蛋白質與凍乾保護劑之重量比呈至少1:2。凍乾保護劑較佳為糖，更佳為雙糖，最佳為蔗糖或麥芽糖。凍乾調配物亦可包括選自由緩衝劑、界面活性劑、膨化劑及防腐劑組成之選項單中之一種或多種組份。

在調配物開發研究期間，評估各種賦形劑對CTLA4Ig分子之溶液狀態安定性及冷凍乾燥固體狀態安定性之作用。

在缺少安定劑之情況下，冷凍乾燥CTLA4Ig分子之不安定性明顯突出在調配物中包含凍乾保護劑之需要。初始篩檢研究展示，藥品在諸如麥芽糖及蔗糖之糖及諸如精胺酸及離胺酸之胺基酸存在下為安定的。諸如甘露醇之多元醇及諸如葡聚糖40之多糖對其安定性不利。較佳凍乾保護劑

為雙醣麥芽糖及蔗糖。

實例 VI 描述在 50°C 下儲存之冷凍乾燥 Abatacept 藥品在麥芽糖存在下之安定性研究。使用安定性指示尺寸排外層析法 (SE-HPLC) 檢定來監測高分子量 (HMW) 物質之增加。結果證實呈冷凍乾燥固體狀態形式之 CTLA4Ig 分子之安定性在麥芽糖存在下增強。

適用於安定凍乾藥品之蔗糖或麥芽糖之量係使蛋白質與蔗糖或麥芽糖之重量比為至少 1:2 者，較佳係使蛋白質與蔗糖或麥芽糖之重量比為 1:2 至 1:5 者，更佳係使蛋白質與麥芽糖或蔗糖之重量比為約 1:2 者。

若必要，則在冷凍乾燥前藉由添加醫藥學上可接受之酸及/或鹼來設定調配物之 pH 值。較佳醫藥學上可接受之酸為鹽酸。較佳鹼為氫氧化鈉。

在調配物開發期間，冷凍乾燥藥品之安定性係作為 pH 值之函數來研究。實例 VI 描述作為 pH 值之函數之冷凍乾燥 Abatacept 藥品的安定性研究。在冷凍乾燥前，將溶液 pH 值調節在 6 至 8 之間。使樣品處於安定狀態且使用安定性指示尺寸排外層析法 (SE-HPLC) 檢定，在各種時間點監測含配成溶液之產物之小瓶中高分子量物質之增加。在 2-8°C 之推薦儲存條件下，未觀察到 HMW 物質形成速率之顯著改變。另外，在早期開發期間所產生之溶液狀態安定性資料展示最大安定性之 pH 值介於 7 與 8 之間。可接受之凍乾藥品之 pH 值範圍為 7 至 8，較佳目標 pH 值為 7.5。

在另一態樣中，可以至少約 10 mM，較佳 10-200 mM 之

量添加鹽或緩衝劑組份。鹽及/或緩衝劑為醫藥學上可接受的且衍生自各種已知酸(無機酸及有機酸)與"成鹼"金屬或胺。除磷酸鹽緩衝劑外，可使用甘胺酸鹽緩衝劑、碳酸鹽緩衝劑、檸檬酸鹽緩衝劑及其類似物，在該狀況下鈉離子、鉀離子或銨離子可用作平衡離子。

"膨化劑"為增加凍乾混合物質量且有助於凍乾濾餅之物理結構(例如有助於產生維持開放微孔結構之大體上均勻之凍乾濾餅)之化合物。說明性膨化劑包含甘露醇、甘胺酸、聚乙二醇及山梨糖醇。本發明之凍乾調配物可含有該等膨化劑。

可視情況向本文中之調配物中添加防腐劑以減少細菌作用。添加防腐劑可(例如)有助於多用(多劑量)調配物之製造。

熟習此項技術者將視用於特定治療之所需劑量及投藥進度而選擇待填充至小瓶中之藥品之量。舉例而言，每小瓶之CTLA4Ig濃度可在50至300毫克/小瓶，較佳100至250毫克/小瓶之範圍變化。

凍乾Abatacept藥品之典型組成列於下文之表1中。

表 1

## 凍乾 abatacept(250 毫克/小瓶)藥品之組成

組份	量(毫克/小瓶) <sup>a</sup>
Abatacept	262.5
單水合麥芽糖	525
單水合磷酸二氫鈉 <sup>b</sup>	18.1
氯化鈉 <sup>b</sup>	15.3
鹽酸	調節至pH 7.5
氫氧化鈉	調節至pH 7.5

<sup>a</sup>包含小瓶、針、注射器損失之5%裝填過量

<sup>b</sup>該等組份存在於abatacept藥物溶液中

凍乾 Belatacept 藥品之典型組成列於下文之表 2 中。

表 2

## 凍乾 Belatacept 100 毫克/小瓶藥品之組成

組份	量/小瓶(mg) <sup>a</sup>
Belatacept	110 <sup>a</sup>
蔗糖	220
單水合磷酸二氫鈉	15.18
氯化鈉	2.55
1N 氫氧化鈉	調節至pH 7.5
1N 鹽酸	調節至pH 7.5

<sup>a</sup>各小瓶含有復水溶液之小瓶、針及注射器滯留之10%裝填過量。

凍乾藥品係由水性載劑來配成溶液。本文中受關注之水性載劑為醫藥學上可接受的(對向人類投藥而言安全且無毒)且在冷凍乾燥後適用於製備液體調配物之水性載劑。說明性稀釋劑包含注射用無菌水(SWFI)、注射用製菌水(BWFI)、pH值緩衝劑(例如磷酸鹽緩衝生理食鹽水)、無菌生理食鹽水溶液、林格氏溶液(Ringer's solution)或右旋糖

溶液。

較佳地，本發明之凍乾藥品係用注射用無菌水，USP(SWFI)或0.9%氯化鈉注射液，USP來配成溶液。在配成溶液(即復水)期間，凍乾粉末迅速溶解，提供澄清、無色溶液。

通常，本發明之凍乾藥品係用10 ml之注射用無菌水，USP(SWFI)或0.9%氯化鈉注射液，USP來配成濃度約25 mg/ml之溶液。用0.9%氯化鈉注射液，USP將配成之溶液進一步稀釋至介於1與10 mg/ml之間的藥品濃度。注射用之經稀釋藥品為等張的且適於藉由靜脈內輸注而投藥。

在早期臨床開發期間，發現凍乾藥品之配成之溶液與常用於製備及投與非經腸產品之拋棄式矽化注射器不相容。具體言之，當儲存於該等注射器中大於10-15分鐘後，配成之藥品溶液形成線狀、凝膠狀顆粒。其他研究證實該不相容性係歸因於藥品與在該等注射器上用作潤滑劑之矽油(二甲基矽氧烷)的相互作用。該等顆粒之形成不影響藥品溶液在其使用時間內之效價。較佳使用不含聚矽氧之注射器將藥品配成溶液並將配成之溶液自小瓶轉移至靜脈注射袋。

或者，可將界面活性劑(例如)以其足夠量添加至調配物中以降低或防止配成之藥品溶液與矽化注射器之相互作用。

用於凍乾調配物之推薦儲存條件為2-8°C，推薦存放期為至少12個月。

### 製備凍乾調配物

凍乾藥品製造方法包含將經調配之散裝溶液分批進行冷凍乾燥、無菌過濾、填充至小瓶中，然後於冷凍乾燥室中冷凍該等小瓶，接著冷凍乾燥、加塞子及封蓋。

實例 III 及 IV 分別描述凍乾 Abatacept 及 Belatacept 藥品之製造。

通常將經調配之本體溶液設定在固定蛋白質濃度下以便所要小瓶填充體積可保持恆定。在添加凍乾保護劑期間，混合器速度控制在  $250 \pm 50$  rpm 以便最小化分批溶液中之發泡且確保凍乾保護劑在 10 至 20 分鐘內完全溶解。經調配之本體溶液可在冷凍乾燥前，在  $2-8^{\circ}\text{C}$  下或室溫及室光下儲存至少 32 小時。

由於 CTLA4Ig 分子之熱敏感性，因此最後不對經調配之本體溶液滅菌。經調配之本體溶液可使用兩個串聯之  $0.22 \mu\text{m}$  Millipore Millipak<sup>®</sup> 滅菌級過濾器來滅菌，隨後填充至用於冷凍乾燥之小瓶中。

選用於該產品之冷凍乾燥循環經優化以分別在乾燥之第一階段及第二階段期間具有有效昇華及蒸發，而不損害產品品質。

為在藥品之配成溶液期間輔助凍乾粉末之快速溶解且防止過量泡沫之形成，在冷凍乾燥循環結束時，在  $500 \pm 100$  微米室壓下塞堵凍乾小瓶。

熟習此項技術者將明白需要使容器裝填過量以便補償在製備及注射期間小瓶、針、注射器滯留量。舉例而言，各

小瓶之 Abatacept 藥品 (250 mg/ml) 含有 5% 過剩量之藥品以補償復水 (reconstitution) 及抽取時之損失。

### 液體皮下調配物

熟習此項技術者將認識到 IV 調配物對需要頻繁、長期治療之患者之不便。患者必須頻繁地來到醫院以經由可持續長達 1 小時之 IV 輸注來接受其藥物。因此，可在家自行投與之 SC 調配物將對該患者極為有益。

對皮下投藥而言，需要具有高蛋白質濃度之劑型。由於可由 SC 途徑給與小體積 (<1.5 ml)，因而使用大於 1 mg/kg (每劑量大於 100 mg) 之高劑量之治療需要開發濃度超過 100 mg/ml 之調配物。為優化在高濃度下抵抗形成高分子量物質之長期安定性，進行調配物開發研究以評估各種賦形劑對本發明之液體 SC 調配物之溶液狀態安定性的作用。

本發明之 SC 調配物包括於水性載劑中、與安定含量之糖組合的蛋白質濃度為至少 100 mg/ml 之 CTLA4Ig 分子，較佳與安定含量之糖組合的蛋白質濃度為至少 125 mg/ml 之 CTLA4Ig 分子。糖之量較佳係使蛋白質與糖之重量比為至少 1:1.1 者。安定劑較佳係以不大於可造成不良黏度或不適合經由 SC 注射器投藥之量之量來使用。糖較佳為雙糖，最佳為蔗糖。SC 調配物亦可包括選自由緩衝劑、界面活性劑及防腐劑組成之選項單中之一種或多種組份。

在包含糖、多糖、胺基酸、界面活性劑、聚合物、環狀葡聚糖、蛋白質等之各種安定劑存在下評估 SC 調配物之安

定性分佈。在所有受評估之賦形劑中，諸如蔗糖、甘露醇及海藻糖之糖具有抵抗形成高分子量物質之良好安定作用。

實例 V 及 VIII 分別描述在蔗糖存在下，在各種溫度下儲存各種時間週期之 SC Belatacept 及 Abatacept 藥品之安定性研究。使用安定性指示尺寸排外層析法 (SE-HPLC) 檢定來監測高分子量物質之增加。結果證實於 SC 調配物中之 TLA4Ig 分子之安定性在蔗糖存在下增強。在更高之蔗糖：蛋白質重量比下，藉由蔗糖之安定作用更好。基於該等研究，選擇以提供最佳安定性而不使 SC 溶液具有過度高滲壓之比率的蔗糖作為安定劑。

適用於安定 SC 藥品之蔗糖之量係使蛋白質與蔗糖之重量比為至少 1:1 者，較佳係使蛋白質與蔗糖之重量比為 1:1.3 至 1:5 者，更佳係使蛋白質與蔗糖之重量比為約 1:1.4 者。

若必要，則藉由添加醫藥學上可接受之酸及/或鹼來設定調配物之 pH 值。較佳醫藥學上可接受之酸為鹽酸。較佳鹼為氫氧化鈉。

在調配物開發期間，SC 藥品之安定性係作為 pH 值之函數來研究。實例 V 描述作為 pH 值之函數之 SC Belatacept 藥品的安定性研究。將 SC 調配物之 pH 值調節在 7 至 8.2 之間，使樣品處於安定狀態且使用安定性指示尺寸排外層析法 (SE-HPLC) 檢定，在各種時間點監測藥品之高分子量物質之增加。在 2-8°C 之推薦儲存條件下，3 個月後未觀察到 HMW 物質之形成速率之顯著改變。

除聚集外，脫醯胺作用為可在醱酵、收穫/細胞淨化、純化、藥物/藥品儲存期間及在樣品分析期間發生之肽及蛋白質的普通產物變異。脫醯胺作用為自形成可經歷水解之琥珀醯亞胺中間物之蛋白質失去 $\text{NH}_3$ 。琥珀醯亞胺中間物造成母肽之17 u之質量減少。隨後之水解造成18 u之質量增加。由於在含水條件下之不安定性，所以分離琥珀醯亞胺中間物係困難的。在1 u之質量增加時，該脫醯胺作用通常為可偵測的。天冬醯胺酸之脫醯胺作用產生天冬胺酸或異天冬胺酸。影響脫醯胺速率之參數包含pH值、溫度、溶劑介電常數、離子濃度、第一序列、局部多肽構形及第三結構。與肽鏈中之Asn相鄰之胺基酸殘基影響脫醯胺速率。在蛋白質序列中之Asn後之Gly及Ser造成對脫醯胺之更高敏感性。

初步實驗室規模安定性研究暗示使用pH 7.8之SC abatacept調配物，在24個月時，脫醯胺作用將超過肽圖譜測試方法之參考水平。在2-8°C及25°C，60%濕度下，6個月時之資料展示當與pH 7.8之SC abatacept樣品相比，pH 7.2下之脫醯胺速率較低且pH 8下之脫醯胺速率較高。實例IX及XII描述實驗室規模pH值研究，研究經設計以評估在6.3至7.2之pH值範圍中之SC藥品調配物之脫醯胺作用。

SC藥品之可接受之pH值範圍為6至8，較佳6至7.8，更佳6至7.2。

在另一態樣中，可以至少10 mM，較佳10-200 mM之量添加鹽或緩衝劑組份。鹽及/或緩衝劑為醫藥學上可接受

的且衍生自各種已知酸(無機酸及有機酸)與"成鹼"金屬或胺。除磷酸鹽緩衝劑外，可使用甘胺酸鹽緩衝劑、碳酸鹽緩衝劑、檸檬酸鹽緩衝劑及其類似物，在該狀況下鈉離子、鉀離子或銨離子可用作平衡離子。

實例 VIII 描述緩衝劑濃度對 Abatacept SC 藥品之作用。在 pH 7.5 下，在 100 mg/mL 之 abatacept 藥品濃度下，與 5 mM 磷酸鹽緩衝劑相比，在 10 mM 磷酸鹽緩衝劑中之安定性更好。此外，與 5 mM 緩衝劑相比，10 mM 磷酸鹽緩衝劑所提供之緩衝能力愈高，調配物之 pH 值控制愈好。

本文中受關注之水性載劑為醫藥學上可接受的(對向人類投藥而言安全且無毒)且適用於製備液體調配物之水性載劑。說明性載劑包含注射用無菌水(SWFI)、注射用製菌水(BWFI)、pH 值緩衝劑(例如磷酸鹽生理食緩衝鹽水)、無菌生理食鹽水溶液，林格氏溶液或右旋糖溶液。

可視情況向本文中之調配物中添加防腐劑以減少細菌作用。添加防腐劑可(例如)有助於多用(多劑量)調配物之製造。

如對凍乾藥品之討論，CTLA4Ig 分子不與標準注射器中所發現之聚矽氧相容，因為其與聚矽氧相互作用以形成可見微粒，進而限制患者使用不含聚矽氧之注射器。SC 調配物可視情況包括界面活性劑以防止在聚矽氧存在下形成可見微粒。

實例 V 及 VIII 描述諸如聚山梨醇酯 80 及泊洛沙姆 188 之界面活性劑分別對 belatacept 及 abatacept 藥品之溶液安定性之

作用且發現界面活性劑對於SC調配物中之CTLA4Ig分子之安定性不具有作用。評估不同含量之泊洛沙姆188且發現4 mg/ml至8 mg/ml，較佳8 mg/ml之濃度足以防止調配物中之聚矽氧相關微粒形成。

belatacept SC藥品，125 mg/ml(100毫克/小瓶)藥品之典型組成提供於下文之表3中。

表3

Belatacept SC藥品，125 mg/ml(100毫克/小瓶)之組成

組份	量(毫克/小瓶) <sup>b</sup>
Belatacept	140.0
蔗糖	190.4
泊洛沙姆188	8.96
單水合磷酸二氫鈉	0.371
無水磷酸氫二鈉	1.193
注射用水	足量至1.12 ml

<sup>b</sup> 包含小瓶、針、注射器損失之40%裝填過量

abatacept SC藥品，125 mg/ml(125毫克/小瓶)之典型組成提供於下文之表4中。

表4

Abatacept SC藥品，125 mg/ml(125毫克/小瓶)之組成

組份	量(毫克/小瓶) <sup>c</sup>
Abatacept	175
蔗糖	238
泊洛沙姆188	11.2
單水合磷酸二氫鈉	0.20
無水磷酸氫二鈉	1.36
注射用水	足量至1.4 ml

<sup>c</sup> 包含小瓶、針、注射器損失之40%裝填過量

填充至注射器中之abatacept SC藥品，125 mg/ml之典型

組成提供於下文之表5中。

表5

Abatacept SC藥品，125 mg/ml(125毫克/注射器)之組成

組份	量(毫克/注射器)
Abatacept	125
蔗糖	170
泊洛沙姆188	8.0
單水合磷酸二氫鈉	0.143
無水磷酸氫二鈉	0.971
注射用水	足量至1 ml

SC調配物之推薦儲存條件為2-8°C，推薦存放期為至少12個月。

使用梅特勒-托利多(Mettler-Toledo)密度計在周圍溫度下測定abatacept SC藥品及匹配安慰劑之密度。使用三份5 mL樣品來執行量測。發現abatacept SC調配物之密度為1.1 g/cc且發現安慰劑產品之密度為1.065 g/cc。通常，SC CTLA4Ig調配物之密度為約1.0 g/cc至約1.2 g/cc，較佳約1.0 g/cc至約1.15 g/cc，更佳約1.095 g/cc至約1.105 g/cc。

使用博力飛(Brookfield)流變儀在周圍溫度下測定abatacept SC調配物之黏度。對量測使用9.3 cps之參考標準。發現在125 mg/mL abatacept濃度下之SC藥品之黏度為13±2 cps。通常，在125 mg/mL下之SC CTLA4Ig調配物之黏度為約9至約20 cps，較佳約9至約15 cps，更佳12至約15 cps。

使用蒸氣壓方法來量測SC abatacept藥品及安慰劑調配物之滲透壓度。資料展示在125 mg/mL之濃度下，

abatacept SC調配物之滲透壓度為 $770\pm 25$  mOsm/kgH<sub>2</sub>O。通常，在125 mg/mL下之SC CTLA4Ig調配物之滲透壓度為約250至約800 mOsm/kgH<sub>2</sub>O，較佳約700至約800 mOsm/kgH<sub>2</sub>O，更佳約750至約800 mOsm/kgH<sub>2</sub>O。

### 製備SC調配物

開發用於SC調配物之製造方法通常包含與糖及界面活性劑混配，接著無菌滅菌過濾及填充至小瓶或注射器中，視情況先透濾(緩衝劑交換)及使用超濾單元濃縮藥物。

實例I及II分別描述SC Belatacept及Abatacept藥品之製造。

熟習此項技術者將明白需要使容器裝填過量以便補償在製備及注射期間小瓶、針、注射器滯留量。舉例而言，將40%過剩量之藥品併入SC液體調配物之各小瓶中以解決抽取損失且保證含有100 mg belatacept藥品之0.8 ml溶液可自小瓶抽取。

### 液體調配物

在特定情況下，諸如當患者在移植後，在醫院中經由IV途徑接受所有藥物時，IV調配物可為較佳投藥途徑。熟習此項技術者將認識到分別對製造商及保健專家而言，凍乾調配物之缺點及風險。對保健專家之與復水相關之風險及缺點包含污染、發泡及產品損失以及製備IV調配物所需之保健專家之時間。另外，製造商之設備成本及員工時間可藉由移除製造方法之冷凍乾燥步驟而降低。所有該等原因足以成為設計用於IV用途之液體調配物之動機。

欲開發之較佳液體調配物為模擬凍乾藥品所第一次配成之蛋白質濃度為約25 mg/ml者之調配物。隨後，由保健專家在使用時用0.9%氯化鈉注射液，USP將所採購之液體調配物進一步稀釋至1與10 mg/ml之間的所要藥品濃度。注射用之經稀釋藥品為等張的且適於藉由靜脈內輸注之投藥。

如上文所討論，液體調配物之長期安定性為蛋白質藥品之問題。為確認溶液抵抗形成高分子量物質之長期安定性，進行調配物開發研究以評估本發明之液體調配物之溶液狀態安定性。

本發明之液體調配物包括於水性載劑中、與有安定化作用之量之糖組合的蛋白質濃度為至少20 mg/ml之CTLA4Ig分子，較佳與有安定化作用之量之糖組合的蛋白質濃度為至少25 mg/ml之CTLA4Ig分子。較佳地，糖之量係使蛋白質與糖之重量比為至少1:1者。糖較佳為雙糖，最佳為蔗糖。液體調配物亦可包括選自由緩衝劑、界面活性劑及防腐劑組成之選項單中之一種或多種組份。

適用於安定液體藥品之蔗糖之量係使蛋白質與蔗糖之重量比為至少1:1者，較佳係使蛋白質與蔗糖之重量比為1:2至1:10者，更佳係使蛋白質與蔗糖之重量比為約1:2者。

若必要，則藉由添加醫藥學上可接受之酸及/或鹼來設定調配物之pH值。較佳醫藥學上可接受之酸為鹽酸。較佳鹼為氫氧化鈉。

在調配物開發期間，液體藥品之安定性係在7.5之目標

pH值下研究。實例 VII 描述在 7.5 之 pH 值下液體 Belatacept 藥品之安定性研究。將液體調配物之 pH 值調節在 7.5，使樣品處於安定狀態且使用安定性指示尺寸排外層析法 (SE-HPLC) 檢定，在各種時間點監測藥品之高分子量物質之增加。在 2-8°C 之推薦儲存條件下，未觀察到 HMW 物質形成速率之顯著改變。

除聚集外，脫醯胺作用及斷裂為可發生在醱酵、收穫/細胞淨化、純化、藥物/藥品儲存期間及在樣品分析期間發生之肽及蛋白質的產物變異。初步實驗室規模安定性研究暗示使用在 2-8°C 下儲存之 belatacept (20 mg/ml, pH 7.5)，在 24 個月時，脫醯胺作用將超過肽圖譜測試方法之參考水平 (升高大於 5% T26a 或 T26b (%T30) 最大值) 且斷裂超過 SDS-PAGE 測試方法之參考水平 (降低小於 96% 主帶最小值)。自液體調配物 (參見上述 SC 資料) 之資料展示本發明之調配物中所發現之脫醯胺速率隨調配物 pH 值之降低而降低。

液體藥品之可接受之 pH 值範圍為 6 至 8，較佳 6 至 7.8，更佳 6 至 7.2。

在另一態樣中，可以至少約 10 mM，較佳 10-200 mM 之量添加鹽或緩衝組份。鹽及/或緩衝劑為醫藥學上可接受的且衍生自各種已知酸 (無機酸及有機酸) 與 "成鹼" 金屬或胺。除磷酸鹽緩衝劑外，可使用甘胺酸鹽緩衝劑、碳酸鹽緩衝劑、檸檬酸鹽緩衝劑及其類似物，在該狀況下鈉離子、鉀離子或銨離子可用作平衡離子。

本文中受關注之水性載劑為醫藥學上可接受的(對向人類投藥而言安全且無毒)且適用於製備液體調配物之水性載劑。說明性載劑包含注射用無菌水(SWFI)、注射用製菌水(BWFI)、pH值緩衝劑(例如磷酸鹽生理食緩衝鹽水)、無菌生理食鹽水溶液，林格氏溶液或右旋糖溶液。

可視情況向本文中之調配物中添加防腐劑以減少細菌作用。添加防腐劑可(例如)有助於多用(多劑量)調配物之製造。

如對凍乾藥品之討論，CTLA4Ig分子不與標準注射器中所發現之聚矽氧相容，因為其與聚矽氧相互作用以形成可見微粒，進而限制保健專家使用不含聚矽氧之注射器。液體調配物可視情況包括界面活性劑以防止在聚矽氧存在下形成可見微粒。

Belatacept液體藥品，20 mg/ml(250毫克/小瓶)藥品之典型組成提供於下文之表6中。

表6

Belatacept液體藥品，20 mg/ml(250毫克/小瓶)之組成

組份	量 <sup>a</sup> (毫克/小瓶)
Belatacept	260
蔗糖	520
單水合磷酸二氫鈉	18.1
氯化鈉	15.3
鹽酸	調節至pH 7.5
氫氧化鈉	調節至pH 7.5
注射用水	足量至13 ml

<sup>a</sup>包含小瓶、針、注射器損失之4%裝填過量

液體調配物之推薦儲存條件為2-8°C，推薦存放期至少12個月。

### 製備液體調配物

液體藥品製造方法通常包含與糖及視情況界面活性劑混配，接著無菌過濾及填充至小瓶中，塞堵及封蓋。

通常將經調配之本體溶液設定在固定蛋白質濃度下以便所製小瓶填充體積可保持恆定。在向藥物中添加糖期間，混合器速度控制在 $250 \pm 50$  rpm下以便最小化分批溶液中之發泡且確保糖在10至20分鐘內完全溶解。經調配之本體溶液可在填充前，在2-8°C下或室溫及室光下儲存至少24小時。

由於CTLA4Ig分子之熱敏感性，因此最後不對本體溶液滅菌。本體溶液可使用兩個串聯之 $0.22 \mu\text{m}$  Millipore Millipak<sup>®</sup>滅菌級過濾器來滅菌，隨後填充至用於冷凍乾燥之小瓶中。

熟習此項技術者將明白需要使容器裝填過量以便補償在製備及注射期間小瓶、針、注射器滯留量。舉例而言，Belatacept藥品，20 mg/ml(250毫克/小瓶)之各小瓶含有4%過剩量之藥品以解決復水及抽取損失。

### 製品

在本發明之另一實施例中，提供一種含有藥品之製品且較佳提供其用途之說明。該製品包括一容器。適合容器包含(例如)瓶、小瓶、注射器及試管。該容器可自諸如玻璃、塑料或金屬之各種材料形成。

容器容納凍乾調配物或液體調配物。容器上之標籤或與容器相關之標籤可指示復水及/或使用之說明。舉例而言，標籤可指示將25 mg/ml belatacept藥品稀釋至如上文所述之蛋白質濃度。標籤可進一步指示SC調配物適用於或欲用於皮下投藥。容納調配物之容器可為多用小瓶，其容許重複投與(例如2-6次投與)(例如)皮下調配物。或者，容器可為含有(例如)皮下調配物之預填充注射器。

製品可進一步包括包含一(例如)用於凍乾調配物之適合載劑之第二容器。

製品可進一步包含自商業及使用者立場為理想之其他材料，其包含其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針、注射器及帶有使用說明之包裝插頁。

不含聚矽氧之注射器較佳(諸如)在復水凍乾藥品及/或將溶液自小瓶轉移至靜脈注射袋後用於不含界面活性劑之藥品且可與藥品小瓶共同封裝。

## 使用方法

本發明進一步提供治療免疫系統疾病或誘發耐受性之方法，其包括投與有效量之本發明之CTLA4Ig分子調配物。在特定實施例中，該等免疫系統疾病係藉由CD28-陽性細胞及/或CTLA4-陽性細胞與CD80/CD86-陽性細胞之相互作用來介導。在另一實施例中，抑制T細胞相互作用。免疫系統疾病包含(但不限於)自體免疫疾病、免疫增生性疾病及移植物相關病症。該等方法包括向受治者投與本發明之CTLA4Ig分子調配物以調節T細胞與CD80-陽性細胞及/或

CD86-陽性細胞之相互作用。移植物相關疾病之實例包含移植物抗宿主疾病(GVHD)(例如可由骨髓移植造成或造成誘發耐受性)，與移植物移植排斥反應、慢性排斥反應及包含實體器官、皮膚、胰島、肌肉、肝細胞、神經元之組織或細胞同種異體移植或異種移植相關之免疫病症。免疫增生性疾病之實例包含(但不限於)牛皮癬；T細胞淋巴瘤；T細胞急性淋巴母細胞白血病；睪丸血管中心性T細胞淋巴瘤；良性淋巴球性脈管炎；及自體免疫疾病，諸如狼瘡(例如紅斑狼瘡、狼瘡腎炎)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、原發性黏液水腫、葛瑞夫茲氏病(Graves' disease)、惡性貧血、自體免疫萎縮性胃炎、艾迪森氏病(Addison's disease)、糖尿病(例如胰島素依賴性糖尿病、I型糖尿病)、肺出血腎炎症候群(good pasture's syndrome)、重症肌無力、天疱瘡、克羅恩氏病(Crohn's disease)、交感神經眼炎、自體免疫葡萄膜炎、多發性硬化症、自體免疫溶血性貧血、特發性血小板減少、原發性膽汁性肝硬化症、慢性作用性肝炎、潰瘍性結腸炎、休格林氏症候群(Sjogren's syndrome)、風濕性疾病(例如類風濕性關節炎)、多發性肌炎、硬皮病及混合結締組織疾病。

本發明進一步提供一種抑制受治者之實體器官及/或組織移植排斥反應之方法，該受治者為移植組織之接受者。通常，在組織移植中，移植物之排斥反應係經由T細胞將其認作外來物，接著破壞移植物之免疫反應來起始。本發明之CTLA4Ig分子調配物可藉由抑制T淋巴細胞增殖及/或

細胞激素分泌而使組織破壞減少，且誘發抗原-特異性T細胞之不反應性，使得移植物被長期接受而無需全身性免疫抑止。此外，本發明之CTLA4Ig分子調配物可與包含(但不限於)以下各者之其他藥劑一起投與：皮質類固醇、環孢素(cyclosporine)、雷帕黴素(rapamycin)、黴酚酸嗎啉乙酯(mycophenolate mofetil)、硫唑嘌呤(azathioprine)、他克莫司(tacrolimus)、巴利昔單抗及/或其他生物劑。

本發明亦提供抑制受治者之移植物抗宿主疾病之方法。該方法包括向受治者單獨投與本發明之調配物，或將其連同可與IL-2、IL-4或 $\gamma$ -干擾素反應之其他另外配位體一起投與。舉例而言，本發明之CTLA4Ig分子SC調配物可向骨髓移植接受者投與以抑制供體T細胞之同種異體反應性。或者，可在移植之前使骨髓移植物中之供體T細胞耐受接受者之離體同種異體抗原。

藉由本發明之CTLA4Ig分子調配物來抑制T細胞反應亦可適用於治療自體免疫病症。許多自體免疫病症由不適當活化T細胞而造成，該等T細胞反應性抵抗自體抗原且促進疾病病理學中所涉及之細胞激素及自體抗體之產生。在患有或易得自體免疫病症之受治者中投與CTLA4Ig分子調配物可防止活化自體反應性T細胞且可減少或消除疾病症狀。該方法亦包括向受治者單獨投與本發明之調配物，或將其連同可與IL-2、IL-4或 $\gamma$ -干擾素反應之其他另外配位體一起投與。

本發明之調配物之最有效投藥模式及給藥方案視疾病之

嚴重性及進程、患者之健康及對治療之反應及治療醫師之判斷而定。根據本發明之實踐，治療受治者之有效量可介於約0.1與約10 mg/kg受治者體重之間。又，有效量可為介於約1與約10 mg/kg受治者體重之間的量。

本發明之CTLA4Ig分子調配物可以足以在受治者中阻斷內因性B7(例如CD80及/或CD86)分子結合其各別配位體之量及時間(例如時間長度及/或多次)來向受治者投與。阻斷內因性B7/配位體結合進而抑制B7-陽性細胞(例如CD80-陽性細胞及/或CD86-陽性細胞)與CD28-陽性細胞及/或CTLA4-陽性細胞之間的相互作用。CTLA4Ig分子之劑量視許多因素而定，其包含(但不限於)受感染之組織類型、所治療疾病之類型、疾病之嚴重性、受治者之健康及受治者對用藥劑治療之反應。因此，藥劑之劑量可視受治者及投藥模式而改變，美國專利申請案美國公開案第US 2003/0083246號及美國專利申請案美國公開案第US 2004/0022787號教示具有SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列之CTLA4Ig用於治療諸如類風濕性關節炎之風濕性疾病的劑量及投藥進度。所有均以引用之方式併入本文。

有效量之CTLA4Ig分子可視情況以每小時/天/週/月/年單次或多次而每天、每週、每月及/或每年向受治者投與。舉例而言，在一實施例中，有效量之CTLA4Ig分子可開始每兩週一次投與歷時1個月且隨後每月投與一次。

CTLA4Ig分子之有效量為約0.1至100 mg/kg受治者重量之量。在另一實施例中，有效量為約0.1至20 mg/kg受治者

重量之量。在一特定實施例中，CTLA4Ig之有效量為約2 mg/kg受治者重量之量。在另一特定實施例中，CTLA4Ig之有效量為約10 mg/kg受治者重量之量。在另一特定實施例中，CTLA4Ig之有效量為對體重小於60 kg之受治者而言500 mg，對體重在60-100 kg之間的受治者而言750 mg且對體重大於100 kg之受治者而言1000 mg。

2005年4月6日申請之美國專利申請案第60/668,774號及2006年4月6日申請之美國專利申請案第11/399,666號教示具有SEQ ID NO:4所示之胺基酸序列之LEA29YIg用於治療與移植物移植相關之免疫病症的劑量及投藥進度。所有均以引用之方式併入本文。

通常，本發明之CTLA4Ig分子調配物之劑量係以體重計，且投藥方案可藉由目標血清最低分佈來指定。通常，在移植後之前3至6個月期間，介於約3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與約30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間的本發明之LEA29YIg分子之目標最低血清濃度將足以維持同種異體移植物之功能，該濃度較佳介於約5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間。通常，在維持階段期間，本發明之LEA29YIg分子之目標最低血清濃度係介於約0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與約3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間，較佳介於約0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與約2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間。

本發明之LEA29YIg分子可以介於約0.1至約20.0 mg/kg患者重量之間，通常介於約1.0至約15.0 mg/kg之間之量來投與。舉例而言，L104EA29YIg可在早期階段期間，亦即移植後之高風險期，以10 mg/kg患者重量來投與，且遞減

至 5 mg/kg 患者重量用於維持劑量。

可經由 30 分鐘至一或多小時之靜脈內輸注來投與本發明之 CTLA4Ig 分子。或者，單次至多次皮下注射可傳遞所需劑量。通常，在治療之早期階段期間，利用 30 分鐘靜脈內輸注作為投藥途徑，而患者住院及/或定期訪問保健專家以進行監測。皮下注射為在維持階段期間所利用之典型投藥模式，進而藉由減少因靜脈內輸注而對保健專家之訪問來使患者返回其正常進度。

實例 10 描述凍乾 IV CTLA4Ig 調配物於健康受治者及患有類風濕性關節炎 (RA) 之患者中之藥物動力學。abatacept 於 RA 患者及健康受治者中之藥物動力學似乎為相當的。在 RA 患者中，在多次靜脈內輸注後，abatacept 之藥物動力學展示在 2 mg/kg 至 10 mg/kg 之劑量範圍內  $C_{max}$  及 AUC 之成比例增加。在 10 mg/kg 下，至第 60 天，血清濃度似乎以 24 mcg/mL (約 1 至約 66 mcg/mL) 之平均最低濃度 (範圍) 達到穩定狀態。在 RA 患者中以每月之時間間隔繼續重複 10 mg/kg 之治療後，未發生 abatacept 之全身性積聚。

本發明將藉由參考以下實例而更完全地理解。然而，其不應視作限制本發明之範疇。貫穿本揭示案之所有引用案在此均以引用之方式明確地併入。

### 實例 I

Belatacept SC, 125 mg/ml (100 毫克/小瓶) 藥品係調配成適於皮下投藥之無菌、非熱解性即用溶液。

Belatacept SC 藥品, 125 mg/ml (100 毫克/小瓶) 以 2.2 kg

規模(1500個小瓶)來製造。分批配方提供於下文之表7中。

表7

## 代表性分批配方

組份	每批之量(g)
Belatacept藥物 <sup>b</sup>	250.0
蔗糖	340.0
泊洛沙姆188	16.0
單水合磷酸二氫鈉	0.662
無水磷酸氫二鈉	2.13
注射用水	足量至2.2 kg
總分批量(kg)	2.2 kg <sup>a</sup>

<sup>a</sup>總分批量2.2 kg(2-L)。溶液之密度為1.10 g/ml(在20-25°C下)。

<sup>b</sup>Belatacept藥物：蛋白質濃度25 mg/ml、25 mM磷酸鈉、10 mM氯化鈉，pH 7.5，<5%之HMW物質

Belatacept SC藥品，125 mg/ml(100毫克/小瓶)藥品之製造方法包含本體藥物自pH 7.5之25 mM磷酸鈉、10 mM氯化鈉緩衝劑至pH 7.5之10 mM磷酸鈉緩衝劑之緩衝劑交換，接著藉由移除緩衝劑將蛋白質自約25 mg/ml濃縮至約150 mg/ml。緩衝劑交換係藉由對新pH 7.5之10 mM磷酸鈉緩衝劑5次透濾本體藥物來完成，接著藉由移除緩衝劑將蛋白質濃縮至約150 mg/ml。不銹鋼Pellicon迷你過濾器固持器(Millipore)配備不銹鋼壓力計及於進料口、保留物口及滲透物口上之膜閥。與Pellicon迷你模組一起使用之2個過濾盒裝配有0.1 m<sup>2</sup>面積之具有30 kDa標稱分子量截斷極限值之Biomax聚醚砜膜。過濾盒係根據製造商之推薦來安

裝。用於藥物之進料容器為具有磁攪拌桿之4公升玻璃容器。MasterFlex高效能聚矽氧管係用以將進料容器連接至過濾器固持器及用於滲透管線。藉由安裝於進料管線中之蠕動泵來提供進料流。隨後將蔗糖及泊洛沙姆188溶於濃縮蛋白質溶液中且由pH 7.5之10 mM磷酸鈉緩衝劑來調節最終分批重量。經由0.22微米無菌過濾器來過濾本體溶液且將其填充至無菌及去熱5-cc I型燧石玻璃小瓶中，用20 mm橡膠塞來塞堵且用20 mm鋁質易拉密封件來密封。Belatacept SC藥品，125 mg/ml(100毫克/小瓶)藥品之組成提供於下文之表8中。

表 8

Belatacept SC藥品，125 mg/ml(100毫克/小瓶)之組成

組份	量(毫克/小瓶) <sup>d</sup>
Belatacept	140.0
蔗糖	190.4
泊洛沙姆188	8.96
單水合磷酸二氫鈉	0.371
無水磷酸氫二鈉	1.193
注射用水	足量至1.12 ml

<sup>d</sup>包含小瓶、針、注射器損失之40%裝填過量

### 實例 II

Abatacept SC，125 mg/ml(125毫克/小瓶)藥品係調配成適於皮下投藥之無菌、非熱解性即用溶液。一批Abatacept SC藥品，125 mg/ml(125毫克/小瓶)藥品以5 L規模(3,500個小瓶)來製造。分批配方描述於下文之表9中。

表 9  
分批配方

組份	量(gm)
Abatacept藥物 <sup>a</sup>	625
蔗糖	850
泊洛沙姆188	40
單水合磷酸二氫鈉	0.715
無水磷酸氫二鈉	4.86
注射用水	足量至5.0 L
總分批量(L)	5.0

<sup>a</sup>Abatacept藥物：蛋白質濃度 50 mg/ml、25 mM磷酸鈉、50 mM氯化鈉，pH 7.5，<5%之HMW物質

如上文實例I中所述，Abatacept SC藥品，125 mg/ml(125毫克/小瓶)藥品之製造方法包含本體藥物自pH 7.5之25 mM磷酸鈉、50 mM氯化鈉至pH 7.8之10 mM磷酸鈉緩衝劑之緩衝劑交換，接著藉由移除緩衝劑將蛋白質自約50 mg/ml濃縮至約150 mg/ml。隨後將蔗糖及泊洛沙姆188溶於濃縮蛋白質溶液中且由pH 7.8之10 mM磷酸鈉緩衝劑來調節最終分批重量。經由0.22微米無菌過濾器來過濾本體溶液且將其填充至無菌及去熱5-cc I型燧石玻璃小瓶中，用20 mm橡膠塞來塞堵且用20 mm鋁質易拉密封件來密封。

Abatacept SC藥品，125 mg/ml(125毫克/小瓶)之組成提供於下文之表10中。

表 10

Abatacept SC, 125 mg/ml(125毫克/小瓶)藥品之組成

組份	量(毫克/小瓶) <sup>c</sup>
Abatacept	175
蔗糖	238
泊洛沙姆188	11.2
單水合磷酸二氫鈉	0.20
無水磷酸氫二鈉	1.36
注射用水	足量至1.4 ml

<sup>c</sup>包含小瓶、針、注射器損失之40%裝填過量

## 實例 III

Abatacept凍乾(250毫克/小瓶)藥品為適於靜脈內(IV)投藥之無菌、非熱解性親液膠體。各單用小瓶含有250 mg之abatacept, 其係在使用時由注射用無菌水, USP配成溶液且進一步由0.9%氯化鈉注射液, USP稀釋。

用於115公升分批量之分批配方描述於下文之表11中。

表 11

## 分批配方

組份	量(kg)
Abatacept藥物 <sup>a</sup>	4.6
單水合麥芽糖	9.2
鹽酸	調節至pH 7.5
氫氧化鈉	調節至pH 7.5
注射用水	足量至119.6 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>abatacept藥物：蛋白質濃度50 mg/ml、25 mM磷酸鈉、50 mM氯化鈉, pH 7.5, <5%之HMW物質

<sup>b</sup>經調配之本體溶液密度=約1.04 g/ml

將所需量之abatacept藥物添加至配備混合器之乾淨及無

菌不銹鋼混合容器中。在 $250\pm 50$  rpm下混合藥物溶液同時將溶液溫度維持在 $5-25^{\circ}\text{C}$ 之間。

將所需量之單水合麥芽糖粉末添加至該混配容器中。在 $15-25^{\circ}\text{C}$ 下，將溶液混合最少10分鐘。

若必要，則使用先前所製備之1 N氫氧化鈉溶液或1 N鹽酸溶液將溶液pH值調節至7.3-7.7。使用注射用水，USP使批量達到最終分批重量(最終足量)且將其混合最少8分鐘。對經調配之本體溶液取樣以測定pH值。

用1個 $0.45\text{-}\mu\text{m}$ 過濾器將經調配之本體溶液預過濾。在經 $0.45\text{-}\mu\text{m}$ 過濾器過濾後，對經調配之本體溶液取樣以測定生物負荷及細菌內毒素(BET)。

在填充前，用2個串聯之 $0.22\text{-}\mu\text{m}$ 過濾器將預過濾之經調配本體溶液無菌過濾。

填充經無菌過濾之經調配本體溶液且藉由全自動填充/塞堵機用20 nm-Daikyo灰色丁基塞部分地將其塞堵。將15-cc I型燧石管玻璃小瓶洗滌且滅菌/去熱。

將經填充及部分塞堵之藥品小瓶凍乾。在凍乾abatacept藥品期間所使用之冷凍乾燥循環的概述提供於下文之表12中。

表 12

## abatacept凍乾藥品之冷凍乾燥循環

製程參數	處理中之控制
加載溫度	5±3°C
冷凍(變溫式存放)	2.5小時內，自5°C至-45°C
冷凍	在-45±3°C下保持4小時
第一乾燥(變溫式存放)	2小時內，自-45°C至-19°C
初級乾燥(真空)	100±20微米
初級乾燥	在-19±2°C下保持84小時
中間乾燥(變溫式存放)	2小時內，自-19°C至0°C
中間乾燥	在0±3°C下保持8小時
第二乾燥(變溫式存放)	2.5小時內，自0°C至30°C
第二乾燥(真空)	100±20微米
第二乾燥	在30°C下保持12小時
塞堵	30±3°C
塞堵(真空)	500±100微米
卸載前之儲存	在20±3°C下保持至少4小時

凍乾循環結束時，使用經無菌過濾之氮將室壓升高至500微米且在真空下執行小瓶塞堵。經塞堵之小瓶在凍乾器內保留至少4小時。在經HEPA過濾之空氣下，藉由封蓋機用20 mm鋁質、白色易拉密封件將經凍乾及塞堵之小瓶密封。藉由外部小瓶洗滌器用去離子水沖洗經密封之小瓶。在2至8°C下儲存經洗滌之藥品小瓶。

凍乾abatacept(250毫克/小瓶)藥品之組成列於下文之表13中。

表 13

## 凍乾 abatacept(250毫克/小瓶)藥品之組成

組份	量(毫克/小瓶) <sup>f</sup>
Abatacept	262.5
單水合麥芽糖	525
單水合磷酸二氫鈉 <sup>b</sup>	18.1
氯化鈉 <sup>b</sup>	15.3
鹽酸	調節至7.5
氫氧化鈉	調節至7.5

<sup>f</sup>包含小瓶、針、注射器損失之5%裝填過量

<sup>b</sup>該等組份存在於abatacept藥物溶液中

## 實例 IV

Belatacept凍乾(100毫克/小瓶)藥品為適於靜脈內(IV)投藥之無菌、非熱解性親液膠體。各單用小瓶含有100 mg之belatacept，其係用4.2 ml之注射用無菌水，USP來配成溶液以產生25 mg/ml之濃度。其可在使用時進一步用5%右旋糖注射液，USP或0.9%氯化鈉注射液，USP稀釋至低至1 mg/ml之濃度。

藥品製造之分批量可自20公升變化至120公升。用於分批量為66公升(12,000個小瓶)之代表性分批配方提供於下文之表14中。

表 14

分批量為 66 公升 (12,000 個小瓶) 之分批配方

組份	量(kg)
Belatacept 藥物 <sup>a</sup>	1.32
高純度，低內毒素蔗糖	2.64
單水合磷酸二氫鈉	0.18
氯化鈉	0.03
1N 氫氧化鈉/或 1N 鹽酸	調節 pH 值至 7.5
注射用水	足量至分批重量

<sup>a</sup>Belatacept 藥物：蛋白質濃度 25 mg/ml、25 mM 磷酸鈉、10 mM 氯化鈉，pH 7.5，<5% 之 HMW 物質

Belatacept 凍乾藥品係如上文實例 III 中所述來製造。

凍乾 belatacept 藥品，100 毫克/小瓶之組成列下文之表 15 中。

表 15

凍乾 BELATACEPT 100 毫克/小瓶藥品之組成

組份	量/小瓶(毫克)
Belatacept	110 <sup>a</sup>
高純度，低內毒素蔗糖	220
單水合磷酸二氫鈉	15.18
氯化鈉	2.55
1N 氫氧化鈉	調節至 pH 7.5
1N 鹽酸	調節至 pH 7.5

<sup>a</sup>各小瓶含有復水溶液之小瓶、針及注射器滯留之 10% 裝填過量。

## 實例 V

藉由使調配物在不同溫度下且歷時各種時間週期處於安定狀態來進行 Belatacept 藥品之 SC 液體調配物之安定性研究。

### 蔗糖之作用

進行調配物開發研究以評估各種含量之蔗糖對 belatacept 藥品之溶液安定性之作用。使樣品在  $-70^{\circ}\text{C}$ 、 $8^{\circ}\text{C}$  及  $25^{\circ}\text{C}$  / 60% 濕度條件下處於安定狀態且在各種時間點監測。所評估之蛋白質與蔗糖之比率為 1:1、1:1.7 及 1:1.75。belatacept 之高分子量 (HMW) 物質之形成用以確定溶液中之蛋白質安定性。結果展示於下文之表 16 中。

表 16

各種含量之蔗糖對 100 mg/ml 之 Belatacept 藥品的作用

儲存條件	時間/月	%高分子量物質			
		對照 <sup>a</sup>	1:1	1:1.75	1:1.7
初始	0	1.11	1.07	1.05	1.06
$-70^{\circ}\text{C}$	3	1.18	1.09	1.07	1.09
$8^{\circ}\text{C}$	1	1.22	1.10	1.08	1.07
	2	1.34	1.15	1.08	1.09
	3	NA	1.24	1.15	1.17
	6	1.78	1.39	1.23	1.24
	9	2.02	1.53	1.34	1.34
	12	2.06	1.49	1.26	1.24
$25^{\circ}\text{C}$ /60%相對濕度	0	1.11	1.07	1.05	1.06
	1	2.73	1.83	1.48	1.56
	2	3.98	2.41	1.84	1.87
	3	4.88	3.02	NA	2.23
	6	7.44	4.56	3.21	NA

<sup>a</sup>於 10 mM 磷酸鈉緩衝劑中之 Belatacept 藥品，100 mg/ml，pH 7.5

研究結果展示蔗糖與蛋白質比率之增加改善蛋白質安定性。選擇 1:1.36 (重量:重量) 之蛋白質與蔗糖之比率用於開發 SC 溶液，因為其提供最佳安定性而不使藥品具有過度高滲壓。

### 界面活性劑之作用

評估諸如聚山梨醇酯80及泊洛沙姆188之市售產品中各種界面活性劑對belatacept藥品之溶液安定性的作用。在4、6及8 mg/ml之含量下評估泊洛沙姆188且在1及2 mg/ml之最終調配物濃度下評估聚山梨醇酯80。使樣品在-70°C、8°C及25°C/60%濕度條件下處於安定狀態且在各種時間點監測。結果展示於下文之表17中。

表 17

各種含量及類型之界面活性劑對Belatacept藥品(100 mg/ml)之作用

儲存條件	時間/月	%高分子量物質					
		對照 <sup>a</sup>	泊洛沙姆188 mg/ml			聚山梨醇 酯80 mg/ml	
			4	6	8	1	2
初始	0	1.11	1.06	1.07	1.07	1.08	1.08
-70°C	3	1.18	1.09	NA	1.09	1.11	1.15
8°C	1	1.22	1.10	1.08	1.09	1.10	1.12
	2	1.34	1.09	1.10	1.11	1.12	1.12
	3	NA	1.19	1.18	1.18	1.21	1.28
	6	1.78	1.27	1.23	1.25	1.29	1.30
	9	2.02	1.34	1.33	1.34	1.42	1.40
	12	2.06	1.28	1.25	1.27	1.38	1.36
25°C/60%相對濕度	0	1.11	1.06	1.07	1.07	1.08	1.08
	1	2.73	1.52	1.52	1.52	1.55	1.55
	2	3.98	1.91	1.89	1.89	1.99	1.97
	3	4.88	2.31	2.29	2.24	2.56	2.50
	6	7.44	3.39	4.05	NA	3.89	3.90

<sup>a</sup>蛋白質:蔗糖(1:1.7), 100 mg/ml, pH 7.5

界面活性劑之作用之結果暗示, 界面活性劑對belatacept藥品溶液之安定性不具有顯著作用。在所評估之泊洛沙姆

188之含量中，發現8 mg/ml之濃度足以防止在調配物中形成聚矽氧相關微粒。

### pH值之作用

評估作為pH值之函數之Belatacept SC(125 mg/ml，蛋白質:蔗糖1:1.36，8 mg/ml Pluronic F68)藥品的安定性。用1N氫氧化鈉或1N鹽酸將溶液pH值調節在7至8.2之間。使樣品在2-8°C及25°C/60%相對濕度條件下處於安定狀態且在各種時間點監測。分析測試包含pH值及SE-HPLC以監測高分子量(HMW)物質之增加。該等結果概述於下文之表18中。

表 18

### pH值對Belatacept SC藥品之作用\*

條件	時間/月	%高分子量物質			
		pH 7.0	pH 7.4	pH 7.8	pH 8.2
初始	0	1.31	1.18	1.16	1.28
2-8°C	1	1.34	1.23	1.25	1.44
	2	1.42	1.29	1.31	1.56
	3	1.48	1.35	1.36	1.59
25°C/60%相對濕度	1	2.09	2.62	2.13	2.52
	2	7.04	5.68	5.89	6.40
	3	9.98	6.13	NA	7.81

\*蛋白質:蔗糖(1:1.36)，125 mg/ml，+8 mg/ml Pluronic F68

在2-8°C之推薦儲存條件下，未觀察到HMW物質之形成速率之顯著改變。另外，溶液狀態安定性資料展示最大安定性之pH值介於7與8之間。基於此，選擇7-8之pH值範圍，並選擇7.5之目標pH值用於該調配物。

### 滲透壓度

使用蒸氣壓方法在不同蛋白質濃度下及自調配物方法之分離步驟量測於各種緩衝劑中之belatacept藥品溶液之滲透壓度。該等結果概述於下文之表19中。

表 19

於各種緩衝劑中及在各種濃度下之Belatacept藥品溶液之滲透壓度測定

Belatacept/緩衝劑/賦形劑	蛋白質濃度 (mg/ml)	磷酸鈉	氯化鈉	滲透壓度 (mOsm/kg)
Belatacept API, 原態	25	25 mM	10 mM	89
Belatacept, 透濾步驟	25	10 mM	—	40
Belatacept, 透濾/濃縮步驟	138	10 mM	—	58
於水中之Belatacept	25	—	—	17
於水中之Belatacept	100	—	—	27
Belatacept:蔗糖(1:1)	100	10 mM	—	424
Belatacept:蔗糖(1:1.7)	100	10 mM	—	737
Belatacept:蔗糖(1:1.75)	100	10 mM	—	769
Belatacept:蔗糖(1:2)	100	10 mM	—	870
Belatacept:蔗糖(1:1.36)	125	10 mM	—	770

攪動/震盪之作用

在 100 mg/ml 及 125 mg/ml 之濃度下測定攪動對 belatacept SC 藥品之溶液安定性之作用。在 2-8°C 下，在腕臂式震盪器之速度 3 下震盪於 5 cc 管式小瓶中含有約 1 ml 之溶液等分試樣。藉由將震盪器置放於 2-8°C 之冷室中來維持震盪器之溫度。以適當時間間隔抽取樣品且檢定 pH 值及視覺外觀且同時亦在攪動 30 天後評估樣品之生物活性。

當在 2-8°C 下攪動時，在 100 mg/ml 及 125 mg/ml 濃度下攪動長達 30 天之樣品未展示 HMW 物質含量、SDS-PAGE 分佈、肽圖譜、B7 結合檢定、pH 值、外觀或蛋白質濃度之改變。

### 多次冷凍/解凍之作用

在具有範圍為7.0至8.2之pH值的樣品中研究多次冷凍及解凍對belatacept SC藥品調配物之安定性之作用。將在pH 7.0、7.4、7.8及8.2之belatacept SC藥品調配物(125 mg/ml)之約10 µl等分試樣分配於30 ml Nalgene PETG容器中。藉由在-70°C下儲存小瓶，接著在周圍溫度下(25°C)解凍10分鐘來執行多次冷凍及解凍。重複該循環歷時5天。在各冷凍/解凍循環後，分析小瓶內含物之pH值、% HMW物質及外觀。

在5次冷凍/解凍循環期間，未在樣品中觀察到pH值、外觀或%高分子量物質內含物之改變。

### 推薦儲存條件

Belatacept SC藥品，100毫克/小瓶(125 mg/ml)之推薦儲存條件為2-8°C，推薦存放期為12個月。

### 注射器-能力研究

在2-8°C條件下，用belatacept SC藥品(125 mg/ml)執行注射器-能力研究。評估具有1 ml及0.5 mL注射器之各種針號。注射器填充時間及傳遞力係記錄於下文之表20中。

表 20

在 2-8°C 下之 Belatacept SC 藥品，125 mg/ml 注射器能力  
研究

注射器尺寸	針號	填充時間(秒)	傳遞力
1 mL	27G 1/2"	25	中等
1 mL 樁針(胰島素)	28G 1/2"	52	中等
1 mL 樁針(胰島素)	29G 1/2"	50	中等
0.5 mL 樁針(胰島素)	30G	42(對 1 mL 而言為 94)	高

基於展示於表 20 中之注射器-能力研究結果。推薦 21 口徑 × 1½ 吋無菌皮下注射針用於自小瓶抽取該產品且 27 口徑 × ½ 吋針用於後續給藥。

#### 實例 VI

藉由使調配物在不同溫度下處於安定狀態且歷時各種時間週期來進行 Abatacept 藥品之凍乾調配物之安定性研究。

#### 麥芽糖之作用

進行調配物開發研究以評估各種含量之麥芽糖對 abatacept 藥品之安定性之作用。使樣品在 50°C 下處於安定狀態且在各種時間點監測。所評估之蛋白質與麥芽糖之比率為 1:1、1:2 及 1:5。abatacept 之高分子量 (HMW) 物質之形成用以確定固體狀態下之蛋白質安定性。結果展示於下文之表 21 中。

表 21

在 50°C 下麥芽糖對 Abatacept 藥品之冷凍乾燥固體狀態

安定性之作用

時間(週)	根據SE-HPLC之高分子量物質含量(面積%)			
	無麥芽糖	藥物與麥芽糖之重量比		
		1:1	1:2	1:5 <sup>a</sup>
初始	0,9	0.7	0.6	2.0
2	5,4	3.7	2.0	NA
4	8.0	5.9	2.7	2.4
6	10.2	6.8	3.3	NA
8	11.7	7.5	3.9	2.9

<sup>a</sup>在以 50 毫克/小瓶之濃度之早期開發期間評估具有 1:5 藥物與麥芽糖之重量比之藥品的安定性。用於該研究之藥物批量不同於用於該表中之其他結果之彼者。其原因為在該等樣品中之高分子量物質之不同初始含量。

結果證實呈冷凍乾燥固體狀態形式之 abatacept 藥品之安定性在麥芽糖存在下增強。另外，適用於安定 abatacept 之麥芽糖之最小量測定為 1:2 蛋白質與麥芽糖之重量比。

#### pH 值之作用

評估作為 pH 值之函數之凍乾 Abatacept 藥品 (250 毫克/小瓶，蛋白質:麥芽糖 1:2) 的安定性。用 1N 氫氧化鈉或 1N 鹽酸將溶液 pH 值調節在 6 至 8 之間。使樣品在 2-8°C 條件下處於安定狀態且在各種時間點監測。分析測試包含 pH 值及 SE-HPLC 以監測高分子量 (HMW) 物質之增加。該等結果概

述於下文之表22中。

表 22

pH值對高分子量(HMW)物質形成速率之作用

時間(月)	根據SE-HPLC在各種pH值下之HMW物質含量(面積%)				
	6.0 <sup>a</sup>	6.5 <sup>a</sup>	7.0	7.5	8.0
初始	0.6	0.6	2.0	2.0	2.0
1	0,5	0.6	2,0	2.0	2.0
2	0.7	0.7	2.0	2,0	2.0
3	0,7	0.7	2.1	2.1	2.1
6	NA	NA	1.8	1.7	1.8
12	0.8	0.8	1.9	1.8	1.9

<sup>a</sup>用於pH 6.0及6.5樣品之藥物批量不同於用於pH 7.0、7.5及8.0樣品之彼者。其原因為在該等樣品中之高分子量物質之不同初始含量。

在2-8°C之推薦儲存條件下，未觀察到HMW物質形成速率之顯著改變。另外，在早期開發期間所產生之溶液狀態安定性資料展示最大安定性之pH值介於7與8之間。

實例 VII

藉由使調配物在不同溫度下且歷時各種時間週期處於安定狀態來進行belatacept(20 mg/ml)藥品之液體調配物之安定性研究。

蔗糖之作用

進行調配物開發研究以評估各種含量之蔗糖對20 mg/ml之belatacept液體藥品的溶液安定性之作用。使樣品在8°C、25°C/60%濕度及30°C/60%濕度條件下處於安定狀態且在各種時間點監測。所評估之蛋白質與蔗糖之比率為

1:1、1:2、1:5及1:10蛋白質:蔗糖比率，belatacept為20 mg/mL。belatacept之高分子量(HMW)物質之形成用以確定溶液中之蛋白質安定性。概述該等研究之結果且展示於下文之表23中。

表 23

各種含量之蔗糖對液體 belatacept 藥品，20 mg/ml 的作用

條件	時間/月	%高分子量物質			
		1:1	1:2	1:5	1:10
初始	0	0.37	0.37	0.39	0.37
8°C	1	0.39	0.39	0.38	0.36
	2	0.40	0.41	0.38	0.37
	3	0.43	0.39	0.36	0.36
	4	0.44	0.42	0.40	0.37
	6	0.58	0.47	0.41	0.39
	9	0.54	0.45	0.42	0.39
	12	0.52	0.45	0.44	0.51
25°C/60%相對濕度	1	0.61	0.62	0.66	0.50
	2	1.25	0.99	0.58	0.53
	3	1.40	1.00	0.80	0.57
	4	1.72	1.40	1.10	0.74
	6	4.29	2.70	2.09	1.18
	9	—*	5.59	4.15	2.33
30°C/60%相對濕度	0.5	1.13	0.91	0.75	0.54
	1	1.77	2.03	1.25	0.84
	2	3.01	2.90	1.78	1.10
	3	4.32	11.24	5.55	1.75

\*樣品由於蒸發不可用於分析

研究結果展示蔗糖與蛋白質與率之增加改善蛋白質安定性。選擇1:2(重量:重量)之蛋白質與蔗糖之比率用於開發液體溶液，因為其提供最佳安定性而不使藥品具有過度高滲壓。

### 安定性研究

製備三批液體 beatacept 且使其在 2-8°C 及 25°C /60% 相對濕度條件下處於安定狀態且在各種時間點監測。蛋白質與蔗糖之重量比為 1:2。beatacept 之高分子量 (HMW) 物質之形成用以確定液體調配物中之蛋白質安定性。安定性資料概述於下文之表 24 中。

表 24

液體 beatacept 藥品之安定性

條件	時間月	Belatacept 藥物 (25 mg/mL) 對照	蛋白質:蔗糖(1:2), 20 mg/mL, pH 7.5% HMW 物質		
			第1批	第2批	第3批
初始	0	0.40	0.37	0.43	0.91
5°C	1	0.44	0.39	0.45	0.90
	2	0.47	0.41	0.46	0.90
	3	0.47	0.39	0.62	0.91
	4	0.54	0.42	NA	0.92
	6	0.63	0.47	0.57	0.94
	9	0.64	0.45	0.51	1.0
	12	0.64	0.45	0.56	NA
25°C/60%相對濕度	1	0.61	0.62	0.60	1.04
	2	1.25	0.99	0.90	1.23
	3	1.40	1.00	1.18	1.53
	4	1.72	1.40	1.60	1.79
	6	4.29	2.70	3.09	2.44

資料展示在 2-8°C 下 12 個月內，與無蔗糖之 Belatacept 藥物中 0.2% 增加相比，液體調配物中之高分子量物質之增加僅為 0.1%。該等結果亦指示添加蔗糖確實有助於減少高分子量物質之形成。

### 實例 VIII

藉由使調配物在不同溫度下且歷時各種時間週期處於安定狀態來進行Abatacept藥品之SC調配物之安定性研究。

#### 緩衝劑濃度之作用

評估作為緩衝劑濃度之函數之SC Abatacept藥品(100 mg/ml)的安定性。緩衝系統為5或10 mM磷酸鹽緩衝劑。使樣品在2-8°C及30°C/60%相對濕度條件下處於安定狀態且在各種時間點監測。分析測試包含pH值及SE-HPLC以監測高分子量(HMW)物質之增加。該等結果概述於下文之表25中。

表 25

#### 緩衝濃度對Abatacept藥品(100 mg/ml, pH 7.5)之作用

儲存條件	時間/月	%高分子量物質	
		於10 mM磷酸鹽緩衝劑中	於5 mM磷酸鹽緩衝劑中
初始	0	1.30	1.47
2-8°C	1	1.49	1.74
	2	1.60	1.98
	3	1.73	2.23
30°C/60%相對濕度	0	1.30	1.47
	0.5	8.73	14.39
	1	14.63	23.24
	2	25.26	32.25

在pH 7.5下，在100 mg/mL之abatacept濃度下，與5 mM磷酸鹽緩衝劑相比，在10 mM磷酸鹽緩衝劑中之abatacept SC藥品之安定性更好。此外，與5 mM緩衝劑相比，10 mM磷酸鹽緩衝劑所提供之緩衝能力愈高，調配物之pH值控制愈好。基於該等資料，選擇10 mM磷酸鹽緩衝劑用於調配物開發。

## 糖之作用

進行調配物開發研究以評估各種糖對 abatacept SC 藥品之溶液安定性之作用。使樣品在 2°C、8°C 及 30°C /60% 濕度條件下處於安定狀態且在各種時間點監測。所評估之糖為蔗糖、海藻糖及甘露醇。abatacept 之高分子量 (HMW) 物質之形成用以確定溶液中之蛋白質安定性。結果展示於下文之表 26 中。

表 26

各種糖對 100 mg/ml, pH 7.5 之 Abatacept SC 藥品之作用

儲存條件	時間/月	%高分子量物質			
		對照 <sup>a</sup>	1:1 蔗糖	1:1 海藻糖	1:1 甘露醇 <sup>b</sup>
初始	0	1.30	1.18	1.20	1.20
2-8°C	1	1.49	1.37	1.38	1.25
	2	1.60	1.40	1.41	1.26
	3	1.73	1.45	1.48	1.60
	6	2.10	1.54	N/A	N/A
	11.5	2.57	N/A	N/A	N/A
30°C/60%相對濕度	0	1.30	1.18	1.20	1.30
	0.5	8.73	4.31	4.34	3.59
	1	14.63	7.20	8.09	5.72
	2	25.26	11.97	14.21	10.14

<sup>a</sup>於 10 mM 磷酸鈉緩衝劑中之 Abatacept 藥品，100 mg/ml，pH 7.5

<sup>b</sup>pH 7.8 之甘露醇調配物

研究結果展示與無糖對照相比，所有 3 種糖蔗糖、海藻糖及甘露醇向 abatacept 供應更好的安定性。在 30°C 之加速條件下之研究結果展示與蔗糖及海藻糖相比，甘露醇向

abatacept供應更好的安定性。蔗糖稍好於海藻糖。在冷卻下，藉由所有3種糖之安定性並非顯著不同。選擇蔗糖作為糖之選擇，因為甘露醇調配物具有蔗糖調配物之2倍張力。選擇蔗糖用於安定將容許添加同樣2倍蔗糖以在相同比率下達到與甘露醇相同之張力，但達成抵抗聚集之更大安定性。選擇1:1.36(重量:重量)之蛋白質:蔗糖之比率用於開發SC藥品，因為其提供最佳安定性而不使藥品具有過度高滲壓。

### 蔗糖之作用

進行調配物開發研究以評估各種含量之蔗糖對abatacept SC藥品之溶液安定性之作用。使樣品在2°C-8°C及30°C/60%濕度條件下處於安定狀態且在各種時間點監測。所評估之蛋白質與蔗糖之比率為1:1及1:2。abatacept之高分子量(HMW)物質之形成用以確定溶液中之蛋白質安定性。結果展示於下文之表27中。

表 27

各種含量之蔗糖對 100 mg/ml，pH 7.5 之 Abatacept SC  
藥品的作用

儲存條件	時間/月	%高分子量物質		
		對照 <sup>a</sup>	1:1	1:2
初始	0	1.30	1.18	1.17
2-8°C	1	1.49	1.37	1.33
	2	1.60	1.40	1.21
	3	1.73	1.45	1.23
	6	2.10	1.54	1.29
	11.5	2.57	N/A	N/A
30°C/60%相對濕度	0	1.30	1.18	1.17
	0.5	8.73	4.31	2.41
	1	14.63	7.20	3.69
	2	25.26	11.97	6.59

<sup>a</sup>於 10 mM 磷酸鈉緩衝劑中之 Abatacept 藥品，100 mg/ml，pH 7.5

研究結果展示蔗糖與蛋白質與率之增加改善蛋白質安定性。選擇 1:1.36(重量:重量)之蛋白質:蔗糖之比率用於開發 RTU 溶液，因為其提供最佳安定性而不使藥品具有過度高滲壓。

#### 界面活性劑之作用

評估諸如聚山梨醇酯 80(Tween<sup>®</sup> 80)及泊洛沙姆 188(Pluronic<sup>®</sup> F68)之市售產品中各種界面活性劑對 abatacept SC 藥品之溶液安定性的作用。在 4 及 8 mg/ml 之含量下評估泊洛沙姆 188 且在 1 及 2 mg/ml 之最終調配物濃度下評估聚山梨醇酯 80。使樣品在 2-8°C 及 25°C /60% 濕度條件下處於安定狀態且在各種時間點監測。結果展示於下

文之表 28 中。

表 28

各種含量及類型之界面活性劑對 125 mg/ml 之 abatacept  
SC 藥品的作用

儲存條件	時間/月	%高分子量物質				
		對照 <sup>a</sup>	泊洛沙姆 188 mg/ml		聚山梨醇酯 80 mg/ml	
			4	8	1	2
初始	0	1.05	1.05	1.06	1.07	1.10
2-8°C	1	0.98	0.99	0.99	1.01	1.02
	2	1.02	1.03	1.04	1.05	1.07
	3	1.06	1.07	1.08	1.08	1.09
	6	1.23	1.27	1.28	1.25	1.32
	9	1.30	1.35	1.36	1.34	1.36
25°C/60%相對 濕度	0	1.05	1.05	1.06	1.03	1.04
	1	1.92	1.94	1.92	1.97	2.02
	2	2.69	2.71	2.68	2.75	2.80
	3	3.74	3.92	3.67	3.84	3.84
	5	5.12	5.16	5.03	5.05	5.03

<sup>a</sup>蛋白質:蔗糖(1:1), 125 mg/ml, pH 7.8

界面活性劑之作用之結果暗示，界面活性劑對 abatacept SC 藥品之安定性不具有顯著負作用。在所評估之泊洛沙姆 188 之含量中，發現 8 mg/ml 之濃度足以防止在調配物中形成聚矽氧相關微粒。

### 滲透壓度

使用蒸氣壓方法在不同蛋白質濃度下及自調配物方法之分離步驟量測於各種緩衝劑中之 abatacept 之滲透壓度。該等結果概述於下文之表 29 中。

表 29

於各種緩衝劑中及在各種濃度下之 Abatacept SC 溶液之

## 滲透壓度測定

Abatacept/緩衝劑/賦形劑	蛋白質濃度 (mg/ml)	磷酸鈉	氯化鈉	滲透壓度 (mOsm/kg)
Abatacept藥物	50	25 mM	50 mM	151
Abatacept, 透濾步驟	50	10 mM	–	32
Abatacept, 透濾/濃縮步驟	155	10 mM	–	49
10 mM pH 7.8之磷酸鹽緩衝劑	–	10	–	35
於水中之Abatacept	100	10 mM	–	51
Abatacept:蔗糖(1:1)	100	10 mM	–	567
Abatacept:蔗糖(1:1.75)	100	10 mM	–	766
Abatacept:蔗糖(1:2)	100	10 mM	–	913
Abatacept:蔗糖(1:1.36)	125	10 mM	–	782

## 攪動/震盪之作用

在100 mg/ml及125 mg/ml之濃度下測定攪動對abatacept SC藥品之溶液安定性之作用。在2-8°C下，在腕臂式震盪器之速度3下震盪於5 cc管小瓶中含有約1 ml之溶液等分試樣。藉由將震盪器置放於2-8°C之冷室中來維持震盪器之溫度。以適當時間間隔抽取樣品且檢定pH值及視覺外觀且同時亦在攪動30天後評估樣品之生物活性。

當在2-8°C下攪動時，在100 mg/ml及125 mg/ml濃度下攪動長達30天之樣品未展示HMW物質含量、SDS-PAGE分佈、肽圖譜、B7結合檢定、pH值、外觀或蛋白質濃度之改變。

## 推薦儲存條件

abatacept SC藥品，125毫克/注射器(125 mg/ml)之推薦儲存條件為2-8°C，推薦存放期為至少12個月。

## 實例IX

脫醯胺作用及聚集為2種可觀察到之CTLA4Ig分子之降

解路徑。該實驗方案概括經設計用以評估在6.3-7.2之pH值範圍中，尤其pH 6.3、6.6、6.9、7.2之SC藥品調配物的實驗室規模pH值安定性研究。該研究之目的為識別最佳低pH值調配物，就脫醯胺作用及形成高分子量物質而言，該調配物將獲得CTLA4Ig SC調配物之最少18個月之存放期。用於該研究之SC藥品調配物描述於下文表30中。

表 30

## 在 pH 6.9 下之 SC 藥品調配物組成

成份	量mg/1.0 ml
Abatacept	125
蔗糖	170
泊洛沙姆188	8
單水合磷酸二氫鈉	0.638
無水磷酸氫二鈉	0.475
注射用水	足量1.0 mL

Abatacept SC藥品將在pH 6.3、6.6、6.9、7.2下調配。藥品如上文所述用蔗糖及泊洛沙姆188來調配且最後一批之濃度將用10 mM磷酸鹽緩衝劑(pH 6.9)來調節。pH值將使用1N HCl分別滴定降至6.3及6.6。或者，pH值將使用1N NaOH滴定升至6.9、7.2及7.65。將藥品填充至1 mL長Physiolis™注射器中(1.0 ml填充體積)且使其在2-8°C、15°C、25°C(60%濕度)及35°C下處於安定狀態。應藉由覆蓋或插入棕色避光袋中而始終保護樣品避免光照。

將在0、2、4、6、12、18、24個月時及視情況9個月時對在2-8°C下儲存之藥品取樣。在1、2、4、6個月時及視情況9個月時對在15°C下儲存之藥品取樣。在1、2、4及6

個月時對在 25°C 及 60% 濕度下儲存之藥品取樣。在 1、2 及 4 個月時對在 35°C 下儲存之藥品取樣。將測試在 2-8°C 下儲存之樣品之外觀(僅初始樣品及最後樣品)、pH 值(僅初始、第 4 個月及最後樣品)、A280(僅初始、第 4 個月及最後樣品)、尺寸排除 HPLC、SDS-PAGE、胰蛋白酶消化肽圖譜(TPM)、Biacore B7 結合(僅初始、第 4 個月及最後樣品或按需要取樣)及等電聚焦(IEF)(僅初始樣品及最後樣品)。將測試在 15°C 及 25°C 及 60% 濕度下儲存之樣品之 A280(僅初始、4 個月時及最後樣品)、尺寸排除 HPLC、SDS-PAGE 及胰蛋白酶消化肽圖譜(TPM)。將測試在 35°C 下儲存之樣品之尺寸排除 HPLC、SDA-PAGE 及胰蛋白酶消化肽圖譜(TPM)。

將使用非常規測試方法以在初始時間點、4 個月時、12 個月時及研究結束時進一步鑑定樣品之安定性。若觀察到趨勢或非預期結果，則亦可使用該等方法中的一些以測試特定樣品。非常規方法包含：使用多角度光散射之尺寸排除層析法(SEC-MALS)、動力學結合(SPR)、質譜法、CD、AUC、差示掃描熱量測定計(DSC)、FFF、FTIR、尺寸排除 HPLC(變性)及 SDS-PAGE(銀染色)。

### 實例 X

將 PK 子研究併入 2B 階段、多中心、隨機化、雙盲、安慰劑對照研究中以評估向患有活性類風濕性關節炎同時接受甲胺喋呤之受治者靜脈內投與之 2 種不同劑量的 abatacept 之安全性及臨床功效。在該平行設計研究中，受

治者接受2種不同劑量(2及10 mg/kg)之 abatacept 或與 MTX 組合之安慰劑。Abatacept 係如共同申請中之2005年12月20日申請之美國專利申請案第60/752,267中號所述來製造，該申請案教示藉由動物或哺乳動物細胞培養產生本發明之蛋白質，尤其為重組糖蛋白產物之方法，且如本文中所述，將其以於含有200 mg之 abatacept 之個別小瓶中的凍乾形式供應。在第1、15及30天且其後每30天歷時1年向受治者投與IV Abatacept。多劑量PK來自血清濃度相對時間之資料，該資料在第60天與第90天之間的給藥時間間隔期間自登記至位點-特異性PK子研究中之受治者得到。對PK子研究中之受治者而言，在第60天給藥前收集血液樣品，且對PK分佈而言，在第60天開始30分鐘時(對應於 abatacept 輸注結束)、輸注開始後4小時及其後每週一次直至第90天收集血液樣品。登記總共90位受治者參與PK子研究。然而，在第60天至第90天之給藥時間間隔之間的完整PK分佈係自29位受治者(15位受治者以2 mg/kg給藥；14位受治者以10 mg/kg給藥)獲得。

PK參數之概述呈現於表31中。研究之結果展示TAU=30天時， $C_{max}$ 及AUC(TAU)以與劑量成比例方式增加。對以1:5之比率增加之標稱劑量而言， $C_{max}$ 之幾何平均值以1:5.2之比率增加，而AUC(TAU)之幾何平均值以1:5.0之比率增加。另外，T-HALF、CLT及Vss值似乎不依賴劑量。在該等RA受治者中，平均T-HALF、CLT及Vss值在13天左右分別為約0.2 mL/h/kg及約0.07 L/kg。小Vss指示 abatacept 主

要受細胞外流體體積限制。基於在第一次輸注後2週及4週，隨後在其後每月一次給藥之給藥模式，abatacept之穩定狀態條件由第三個月劑量達到。又，由於該給藥模式，血清濃度在治療之最初2個月期間大於穩定狀態最低濃度。第60、90及180天之最低( $C_{min}$ )值之比較指示在每月給藥後，abatacept似乎不積聚。接受2及10 mg/kg abatacept之月IV劑量之所有受治者的平均 $C_{min}$ 穩定狀態值分別在4.4至6.7 mcg/mL及22.0至28.7 mcg/mL之間的範圍變化。

表 31

## 在類風濕性關節炎受治者中之多PK研究之概述

研究實驗 方案(國家)	產品ID(批 號/貨號)	研究目標	研究設計	受治者 數目 (男性/ 女性)	年齡： (平均 值，範 圍)	治療劑量 (mg/kg)	Abatacept之藥物動力學參數					
							幾何平均值(%CV)		平均值(SD)		CLT (mL/h/kg)	V <sub>ss</sub> (L/kg)
							C <sub>max</sub> (µg/mL)	AUC(TAU) (µg h/mL)	T-HALF (天)	平均		
IM101100 (USA)PK子 研究階段II	C00157	評估靜脈 內投與劑 量之 abatacept之 功效、安 全性、多 劑量PK及 免疫原性 潛力	隨機化、 雙盲、安 慰劑對 照、多劑 量研究。 30分鐘IV 輸注	29 (18/11)	54 (34-83)	2.0 (N=15)	54.9	9573.5	13.5	0.23	0.07 (0.04)	
	(29)						(30)	(5.9)	(0.13)			
	C00196						284.2	47624.2	13.1	0.22		0.07
C98283						10.0 (N=14)	(31)	(5.3)	(0.09)	(0.03)		

研究單一10 mg/kg靜脈內輸注後在健康成年受治者中及多次10 mg/kg靜脈內輸注後在RA患者中abatacept之藥物動力學(參見表32)。

表 32

10 mg/kg靜脈內輸注後，健康受治者及RA患者中之藥物動力學參數(平均值，範圍)

PK參數	健康受治者(10 mg/kg單一劑量後)n=13	RA患者(10 mg/kg多劑量後 <sup>a</sup> )n=14
峰濃度(C <sub>max</sub> )[mcg/mL]	292(175-427)	295(171-398)
最終半衰期(t <sub>1/2</sub> )[天]	16.7(12-23)	13.1(8-25)
全身性清除(CL)[mL/h/kg]	0.23(0.16-0.30)	0.22(0.13-0.47)
分佈體積(V <sub>ss</sub> )[L/kg]	0.09(0.06-0.13)	0.07(0.02-0.13)

<sup>a</sup> 多次靜脈內輸注係在第1、15、30天及其後每月一次投與。

Abatacept於RA患者及健康受治者中之藥物動力學似乎為相當的。在RA患者中，在多次靜脈內輸注後，abatacept之藥物動力學展示在2 mg/kg至10 mg/kg之劑量範圍內C<sub>max</sub>及AUC之成比例增加。在10 mg/kg下，至第60天，血清濃度似乎以24(1-66)mcg/mL之平均最低濃度(範圍)達到穩定狀態。在RA患者中以每月之時間間隔繼續重複10 mg/kg之治療後，未發生abatacept之全身性積聚。

在RA患者中之群體藥物動力學分析揭示，存在隨體重增加朝向abatacept之更高清除率之趨勢。年齡及性別(當校正體重時)不影響清除率。共存之甲胺喋呤(MTX)、非類固醇消炎藥(NSAID)、皮質類固醇及TNF阻斷劑不影響abatacept清除率。

### Abatacept之血清檢定

藉由酶聯結免疫吸附劑分析法(ELISA)以總共25次分析運作來分析abatacept血清樣品。所有分析結果符合在樣品分析前所建立之接受準則，並指示ELISA方法對定量研究樣品中之abatacept為精確及準確的。血清中之abatacept之標準曲線參數及平均QC資料的概述呈現於表33中。abatacept之分析QC在運作之間及運作之中的變率分別為4.5%及3.5% CV。所觀察到之分析QC樣品之平均濃度自標稱值偏差小於±8.9%(表33)。

表 33

#### 人類血清中之Abatacept檢定之品質控制資料的概述

標稱濃度	低(3.000 ng/mL)	中(12.500 ng/mL)	高(24.000 ng/mL)
所觀察到之平均濃度	2.866	13.608	24.526
%偏差	-4.5	8.9	2.2
運作之間精度(% CV)	4.5	2.8	3.0
運作之中精度(% CV)	2.4	3.5	2.9
總變化(% CV)	5.1	4.5	4.2
n	75	75	75
運作次數	25	25	25

#### 實例 XI

該研究之目標為評估在健康受治者中，在50至150 mg之範圍內之單一SC劑量後belatacept之PK；評估所注射溶液之注射體積及濃度對皮下投與之belatacept之PK的作用；評估belatacept之單一SC劑量之安全性及耐受性(包含注射位點評估)；評估皮下投與之belatacept之免疫原性。

此為在健康受治者中之雙盲、隨機化、安慰劑對照、平

行組、單一劑量研究。總共42位受治者將隨機分成6個治療組中之一者。在具有7位受治者之各組中，受治者將在第1天以5:2之比率隨機接受belatacept或安慰劑之單一SC注射。受治者將需要達到重量 $\leq 100$  kg。6個治療組描述於表34中。

表 34 治療組

治療組	belatacept或安慰劑之劑量	注射體積	注射溶液濃度
1	50 mg	0.4 mL	125 mg/mL
2	75 mg	0.6 mL	125 mg/mL
3	100 mg	0.8 mL	125 mg/mL
4	150 mg	1.2 mL	125 mg/mL
5	50 mg	1.0 mL	50 mg/mL
6	75 mg	1.0 mL	75 mg/mL

受治者將經歷篩選評估以確定自第1天給藥起28天內之合格性。將允許受治者在給藥前一天(第-1天)進入臨床設施以用於包含MLR之基線評估。受治者將留在臨床設施中直至在第5天完成治療後評估，且其後將返回臨床設施以進行各研究訪問直至自研究排除。

在第1天，受治者將受隨機治療且將接受單一SC劑量之belatacept或安慰劑，且經歷詳細PK及免疫原性取樣。所有受治者將在其大腿前側接受SC注射。在研究藥物投藥後，調查員將評估注射位點之局部刺激及發炎徵象。

在整個研究中之選定時間執行身體檢查、生命徵象量測及臨床實驗室評估。將收集在研究藥物投藥後至多56天之血液樣品以進行PK分析及免疫原性評估。將在整個研究中監測受治者之AE。在研究期間，自各受治者抽取約265 mL之血液。

同時對所有劑量組進行給藥及追蹤。將無受治者接受比單一劑量更大之劑量。可替換未完成研究之受治者(除因AE而中斷之彼等者外)。

此為單一劑量研究。各受治者將經歷篩選期，其為在投與研究藥物前最多28天。各受治者將保留在研究中直至投與研究藥物後56天( $\pm 2$ 天)之最後訪問。經歷試驗之最後一位受治者之最後訪問將視為研究結束。

如本文中所述且如共同申請中之2006年10月5日申請之美國專利申請案第60/849543號中所述來製造之Belatacept 100毫克/小瓶(125 mg/mL)，為提供於用於使用適合尺寸之SC投藥用之習知注射器及針來抽取及投藥的玻璃小瓶中之即用型液體產品，其中該專利教示藉由動物或哺乳動物細胞培養產生本發明之蛋白質，尤其為重組糖蛋白產物之方法。足夠過量之belatacept併入各小瓶中以解決抽取損失以便可抽取含有100 mg之0.8 mL溶液用於SC投藥。

Belatacept注射液，100毫克/小瓶(125 mg/mL)不欲用於IV輸注。

由病史、身體檢查、12導程心電圖及臨床實驗室評估確定之健康受治者將有資格參與研究。該研究將包含男性及女性。在隨機化時，受治者必須為年齡至少18歲且重量 $\leq 100$  kg。女性受治者必須為非哺乳者，未懷孕且必須在研究期間在給藥前使用可接受之避孕方法至少1個月且在研究結束後使用可接受之避孕方法至多4週。具有生育可能之婦女必須在研究藥物之給藥前24小時內進行陰性血清

驗孕測試。將告知受治者對懷孕之潛在風險。男性受治者必須在研究期間使用足夠之避孕方法且在研究結束後使用足夠之避孕方法歷時至多4週以便將對其伴侶懷孕之風險降至最低。參見第5部分之包含及排除準則之詳細清單。

登記前4週內服用之藥物必須記錄於CRF上。除非由調查員所指定用於治療特定臨床事件之藥物，否則在研究期間除口服避孕藥外，不投與伴隨藥物(處方藥、非處方藥(over-the-counter)或中草藥)。任何伴隨療法必須記錄於CRF上。

belatacept SC注射後之PK將得自血清濃度相對時間之資料。所評估之單一劑量PK參數包含：

$C_{max}$	所觀察到之血清濃度最大值
$T_{max}$	所觀察到之血清濃度最大值的時間
AUC(0-T)	自時間0至最後可定量濃度之時間之血清濃度-時間曲線下面積
AUC(INF)	自時間0外推至無限時間之血清濃度-時間曲線下面積
半衰期	血清半衰期
CLT/F	表觀總體清除率
VSS/F	穩定狀態下之表觀分佈體積

個別受治者PK參數值將由非間隔方法，藉由Innaphase Corp, Philadelphia, PA之有效PK分析程式，eToolbox Kinetica程式來得到。亦將報導經劑量正規化之AUC。

將隨時間收集血清樣品且使用2種ELISA檢定來檢定

belatacept之抗體力價之存在。一種檢定評估對整個分子之反應且另一者僅評估對LEA29Y-T部分之反應。

接受研究藥物之所有受治者將包含於安全性及PD資料組中。將在任何小組中接受安慰劑之受治者集合至單一安慰劑治療組中用於除注射位點評估外之PD評估及安全性評估。來自接受belatacept之受治者之所有可用資料將包含於PK資料組中且將包含於概述統計及統計分析中。

基線視為第-1天。性別及種族之頻率分佈將由治療(注射體積及劑量)來製錶。年齡、體重及身高之概述統計將由治療來製錶。

將列出所有記錄之AE且由較佳項目、系統器官類別及治療來製表。將列出生命徵象及臨床實驗室測試結果且由治療來概述。將列出任何顯著身體檢查發現及臨床實驗室結果。注射位點評估(紅斑、發熱、腫脹、疼痛及搔癢)將由治療及嚴重度來製錶。將跨越劑量組集合安慰劑受治者且亦獨立地分析以評估注射位點。

概述統計之PK參數將由治療來製錶。將呈現 $C_{max}$ 、 $AUC(0-T)$ 及 $AUC(INF)$ 之幾何平均值及變化係數。將呈現 $T_{max}$ 之中值、最小值及最大值。將提供其他PK參數之平均值及標準差。為評估SC投藥後對劑量之依賴性，將提供 $C_{max}$ 及 $AUC(INF)$ 相對於劑量之散佈圖。將分析 $AUC(INF)$ 及 $C_{max}$ 交叉注射體積之散佈圖以評估此對belatacept之PK之作用。又，將在可適用時提供對固定體積而言之 $C_{max}$ 及 $AUC(INF)$ 相對劑量之散佈圖，及在劑量內之 $C_{max}$ 及

AUC(INF)相對體積之散佈圖。

概述統計將由治療及對抗 belatacept 及抗 LEA29Y-T 抗體值及其自基線(第1天-0小時)之改變的研究天數來製錶。為探查免疫原性與暴露之間的可能聯繫，將提供抗 belatacept 及抗 LEA29Y-T 抗體之改變相對 belatacept 濃度之圖。

PK及免疫原性血液取樣進度概括於表35中。

表 35

藥物動力學及免疫原性血液取樣進度

研究天數	時間(相對於給藥)小時:分鐘	PK	免疫原性
1	00.00 (給藥前)	X	X <sup>a</sup>
	01:00	X	
	02:00	X	
	06:00	X	
	12:00	X	
2	24:00	X	
	36:00	X	
3	48:00	X	
	60:00	X	
4	72:00	X	
	84:00	X	
5	96:00	X	
6	120:00	X	
7	144:00	X	
8	168:00	X	
14		X	X
21		X	
28		X	X
35		X	X
42		X	X
56		X	X

<sup>a</sup>第1天免疫原性(抗 belatacept 抗體)樣品必須在投與藥物前抽取。可在±2天內抽取第28、35、42及56天之樣品。

上文之表35列出評估PK所依據之取樣進度。經由直接靜脈穿刺或自生理食鹽水鎖(saline lock)將血液樣品(每樣品

約3 mL)收集於預標記、紅色及灰色頂部(SST)Vacutainer<sup>®</sup>管中。若使用生理食鹽水鎖系統進行血液收集，則應經由留置導管抽取約0.5 mL之血液且在獲得各PK樣品前丟棄。一旦獲得PK試樣，將使血液在室溫下在Vacutainer<sup>®</sup>管中凝結15-30分鐘。凝結後，必須在冷凍離心機(4°C)中，在1500 x g下，將樣品離心15分鐘。當離心完成時，應由吸管將來自各PK樣品時間點之至少0.5 mL之血清移出且轉移至預標記、螺旋蓋、聚丙烯、PK儲存及運輸管。必須使用乾淨吸管以等分用於各樣品時間點之血清。含有PK血清樣品之聚丙烯管可在-20°C或更冷之溫度下冷凍儲存最多1個月且隨後在-70°C下冷凍儲存。自樣品收集至冷凍血清所允許之時間為12小時。將使用敏感、有效酶免疫檢定(EIA)方法以量測血清中belatacept之濃度。

表35列出評估免疫原性所依據之取樣進度。將在第1、14、28、35、42及56天訪問時獲得血清樣品。第1天免疫原性(抗belatacept)樣品應在投與研究藥物前取出。將檢定樣品之抗belatacept及抗LEA29Y-T抗體之存在。對各試樣而言，經由直接靜脈穿刺或自生理食鹽水鎖(留置導管)將血液(每樣品約3 mL)收集於預標記、紅色及灰色頂部(SST)Vacutainer<sup>®</sup>管中。若使用生理食鹽水鎖系統進行血液收集，則應經由留置導管抽取約0.5 mL之血液且在獲得各免疫原性樣品前丟棄。一旦獲得試樣，將使血液在室溫下在Vacutainer<sup>®</sup>管中凝結15-30分鐘。凝結後，必須在冷凍離心機(4°C)中，在1500 x g下，將樣品離心15分鐘。當

離心完成時，應由吸管將至少 1 mL 之血清移出且轉移至預標記、螺旋蓋、聚丙烯、血清樣品儲存及運輸管。必須在  $-20^{\circ}\text{C}$  或更冷之溫度下冷凍儲存含有血清樣品之聚丙烯管。將使用 2 種敏感、有效酶聯結免疫吸附劑檢定 (ELISA) 方法以量測血清中 belatacept 之抗體力價。一種檢定評估整個分子之抗體力價且另一者僅評估 LEA29Y-T 部分之抗體力價。

### 實例 XII

脫醯胺作用、斷裂及聚集為可觀察到之 LEA29YIg 分子之降解路徑。該實驗方案概括經設計用以評估在 6.3-7.5 之 pH 值範圍中之 belatacept SC 藥品調配物的另一實驗室規模 pH 值安定性研究。該研究之目的為識別最佳 pH 值調配物，其將獲得 belatacept SC 調配物之最少 18 個月之存放期。

對該研究而言，belatacept SC 產品將在 pH 6.3、6.6、6.9、7.2 及 7.5 下調配。約 25 mg/mL 之 belatacept 藥物將先濃縮至約 100 mg/mL，隨後透濾至 pH 6.9 之 10 mM 磷酸鹽緩衝劑中，接著第二次濃縮以獲得  $>160$  mg/mL 之藥品中間物 (DPI)。該 DPI 將用蔗糖及泊洛沙姆 188 來調配且最終分批濃度將用 10 mM 磷酸鹽緩衝劑 (pH 6.9) 來調節。如研究設計中所概括，將經調配之本體物再分成 5 個子批次。子批次之 pH 值將使用 1N HCl 滴定降至 6.3 及 6.6。另外 2 個子批次之 pH 值將使用 1N NaOH 滴定升至 6.9、7.2 及 7.5。將產品批料填充至 1 mL 長 Physiolis™ 中。應藉由覆蓋或插入棕

色避光袋中而始終保護樣品避免光照。用於該研究之SC藥品調配物描述於下文表36中。

表 36

## 在 PH 6.9 下之 SC 藥品調配物組成

成份	每1.0 mL之量 (mg)
Belatacept	125
蔗糖	170
泊洛沙姆188	8
單水合磷酸二氫鈉	0.638
無水磷酸氫二鈉	0.475
注射用水	足量1.0 mL

在 0、2、4、6、12、18、24 個月時及視情況 9 個月時對在 2-8°C 下儲存之藥品取樣。在 1、2、4、6 個月時及視情況 9 個月時對在 15°C 下儲存之藥品取樣。在 1、2、4 及 6 個月時對在 25°C 及 60% 濕度下儲存之藥品取樣。在 1、2 及 4 個月時對在 35°C 下儲存之藥品取樣。將測試在 2-8°C 下儲存之樣品之外觀(僅初始樣品及最後樣品)、pH 值(僅初始、第 4 個月及最後樣品)、A280(僅初始、第 4 個月及最後樣品)、尺寸排外-HPLC、SDS-PAGE、胰蛋白酶消化肽圖譜(TPM)、Biacore B7 結合(僅初始、第 4 個月及最後樣品或按需要取樣)及等電聚焦(IEF)(僅初始樣品及最後樣品)。將測試在 15°C 及 25°C 同時 60% 之濕度下儲存之樣品之 A280(僅初始、4 個月時及最後樣品)、尺寸排外-HPLC、SDS-PAGE 及胰蛋白酶消化肽圖譜(TPM)。將測試在 35°C 下儲存之樣品之尺寸排外-HPLC、SDA-PAGE 及胰蛋白酶消化肽圖譜(TPM)。

將使用非常規測試方法以在初始時間點、4個月時、12個月時及研究結束時進一步表徵安定性樣品。若觀察到趨勢或非預期結果，則亦可使用該等方法中之一些以測試特定樣品。非常規方法包含：使用多角度光散射之尺寸排外層析法(SEC-MALS)、動力學結合(SPR)、質譜法、CD、AUC、差示掃描熱量測定計(DSC)、FFF、FTIR、尺寸排外-HPLC(變性)及SDS-PAGE(銀染色)。

### 【圖式簡單說明】

圖1表示CTLA4-Ig分子之表現卡匣之一部分的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)。亦展示藉由核酸編碼之胺基酸序列(SEQ ID NO:2)。可自該表現卡匣產生之CTLA4-Ig分子包含具有以下殘基之胺基酸序列之分子：(i)SEQ ID NO:2之26-383、(ii)SEQ ID NO:2之26-382、(iii)SEQ ID NO:2之27-383或(iv)SEQ ID NO:2之26-382或視情況(v)SEQ ID NO:2之25-382或(vi)SEQ ID NO:2之25-383。表現卡匣包括以下區域：(a)製瘤素(Oncostatin)M信號序列(SEQ ID NO:1之核苷酸11-88；SEQ ID NO:2之胺基酸1-26)；(b)人類CTLA4之細胞外域(SEQ ID NO:1之核苷酸89-463；SEQ ID NO:2之胺基酸27-151)；(c)人類IgG1恆定區之經修飾部分(SEQ ID NO:1之核苷酸464-1159；SEQ ID NO:2之胺基酸152-383)，其包含經修飾鉸鏈區(SEQ ID NO:1之核苷酸464-508；SEQ ID NO:2之胺基酸152-166)，經修飾人類IgG1 CH2域(SEQ ID NO:1之核苷酸509-838；SEQ ID NO:2之胺基酸167-276)及人類IgG1 CH3域(SEQ ID NO:1之核苷

酸 839-1159；SEQ ID NO:2之胺基酸 277-383)。

圖 2 描述 CTLA4-L104EA29Y-Ig(亦稱為 "L104EA29YIg" 及 "LEA29Y") 之核苷酸 (SEQ ID NO:3) 及胺基酸 (SEQ ID NO:4) 序列，該 CTLA4-L104EA29Y-Ig 包括信號肽；以位置 +1 處之甲硫胺酸開始及以位置 +124 處之天冬胺酸結束，或以位置 -1 處之丙胺酸開始及以位置 +124 處之天冬胺酸結束之 CTLA4 的突變細胞外域；及 Ig 區域。SEQ ID NO:3 及 4 分別描述 L104EA29YIg 之核苷酸及胺基酸序列，該 L104EA29YIg 包括信號肽；以位置 +27 處之甲硫胺酸開始及以位置 +150 處之天冬胺酸結束，或以位置 +26 處之丙胺酸開始及以位置 +150 處之天冬胺酸結束之 CTLA4 的突變細胞外域；及 Ig 區域。L104EA29YIg 可具有以下殘基之胺基酸序列：(i) SEQ ID NO:4 之 26-383、(ii) SEQ ID NO:4 之 26-382；(iii) SEQ ID NO:4 之 27-383 或 (iv) SEQ ID NO:4 之 27-382 或視情況 (v) SEQ ID NO:4 之 25-382 或 (vi) SEQ ID NO:4 之 25-383。

## 序列表

<110> 美商必治妥美雅史谷比公司

<120> 安定之蛋白質調配物

<130> 10739 TW

<140> 095147647

<141> 2006-12-19

<150> 60/752,150

<151> 2005-12-20

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1152

<212> DNA

<213> CTLA4Ig

<400> 1

```

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcaact cctgtttcca      60
agcatgycga gcatggcaat gcaogtggcc cagcctgctg tggtaactggc cagcagccga      120
ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccagycga aagccactga ggtccgggtg      180
acagtgcttc ggcaggctga cagccaggtg actgaagtct gtgoggcaac ctacatgatg      240
gggaetgagt tgaccttact agatgattoc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa      300
gtgaacctoa ctatccaagg actgagggcc atggacaogg gactctacat ctgcaaggtg      360
gagctcatgt acccaccgcc atactacctg ggcataggca accggaacca gatttatgta      420
attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac      480
acatcccac cgtcccagc acctgaactc ctgggtggat cgtcagttt cctcttccc      540
ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggacctctg aggtcacatg cgtggtggtg      600
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag tccaactggg acgtggacgg cgtggaggtg      660
cataatgcc aagcaaaagcc ggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc      720
gtcctcacgg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc      780
aacaagccc tcccagccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga      840
gaaccacagg tgtacaacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc      900
ctgacctgcc tggtcгааagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat      960
gggcagccgg agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc     1020
ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca     1080

```

tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaaac cactacaacgc agaagagcct ctccctgtct 1140  
 ccgggtaaat ga 1152

<210> 2  
 <211> 383  
 <212> PRT  
 <213> CTLA4Ig

<400> 2

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala  
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro  
 20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu  
 35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg  
 50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met  
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser  
 85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp  
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu  
 130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His  
 145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val  
 165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

```

180              185              190
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    195              200              205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
    210              215              220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    225              230              235              240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
    245              250              255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
    260              265              270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    275              280              285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
    290              295              300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    305              310              315              320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
    325              330              335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
    340              345              350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
    355              360              365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    370              375              380

```

```

<210> 3
<211> 1152
<212> DNA
<213> M104EAZ9YIq

<400> 3

```

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcaagtctgg tecttgcact cctgtttcca 60  
 agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactggc cagcagccga 120  
 ggcacgcta gcttctgtg tgagtatgca tctccaggca aatatactga ggtccgggtg 180  
 acagtgcctc ggcaggctga cagccagggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240  
 gggaatgagc tgaccttctt agatgattcc atctgcaagg gcacctcag tggaaatcaa 300  
 gtgaaacctc ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctaat ctgcaagggtg 360  
 gagtcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaacca gatttatgta 420  
 attgatccag aaccgtgcc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480  
 acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagtott cctcttcccc 540  
 ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggtggtg 600  
 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660  
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720  
 gtcttcacog tcttgacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc 780  
 aacaaagccc tcccagccc catcgagaaa accatctcca aagocaaagg gcagccccga 840  
 gaaccacagg tgtacacct gcccccattc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900  
 ctgacctgcc tggtcasagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960  
 gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctcctc 1020  
 tctcttaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080  
 tgcctcgtga tgcattgggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140  
 ccgggtaaat ga 1152

<210> 4  
 <211> 383  
 <212> PRT  
 <213> L104EA29YIq

<400> 4

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala  
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro  
 20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu



Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 370 375 380

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98179141

A61k 9/08 (2006.01)

※申請日：95.12.19

※IPC 分類：A61K 9/19 (2006.01)

原申請案號：095147647

A61k 47/26 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61k 39/395 (2006.01)

安定之蛋白質調配物

STABLE PROTEIN FORMULATIONS

## 二、中文發明摘要：

本發明大致係關於包括 CTLA4Ig 分子之安定之調配物，其包含用於經由包含(例如)諸如靜脈內(IV)及皮下(SC)之途徑之各種途徑來投藥以用於治療免疫系統疾病及誘發耐受性的凍乾及液體調配物。

## 三、英文發明摘要：

The present invention relates generally to stable formulations comprising CTLA4Ig molecules, including lyophilized, and liquid formulations for administration via various routes including, for example, routes such as intravenous (IV) and subcutaneous(SC) for treating immune system diseases and tolerance induction.

## 七、申請專利範圍：

1. 一種適於在靜脈內投藥前稀釋之安定之調配物，其包括至少 20 mg/ml 之 CTLA4Ig 分子、能安定該調配物之糖且其濃度可有效安定該調配物、以及醫藥學上可接受之水性載劑。
2. 如請求項 1 之調配物，其中該糖係選自由蔗糖、乳糖、麥芽糖及海藻糖及其混合物組成之群。
3. 如請求項 1 之調配物，其中該糖為雙糖。
4. 如請求項 1 之調配物，其中該雙糖為蔗糖。
5. 如請求項 1 之調配物，其進一步包括醫藥學上可接受之緩衝劑。
6. 如請求項 1 之調配物，其具有 6 至 8 之 pH 值範圍。
7. 如請求項 1 之調配物，其中 CTLA4Ig 分子具有 SEQ ID NO:2 所示之以位置 27 處之甲硫胺酸或位置 26 處之丙胺酸開始及以位置 383 處之離胺酸或位置 382 處之甘胺酸結束的胺基酸序列。
8. 如請求項 1 之調配物，其中該 CTLA4Ig 分子為 L104EA29YIg，其具有 SEQ ID NO:4 所示之以位置 27 處之甲硫胺酸或位置 26 處之丙胺酸開始及以位置 383 處之離胺酸或位置 382 處之甘胺酸結束的胺基酸序列。
9. 如請求項 7 或 8 之調配物，其中該糖係選自由蔗糖、乳糖、麥芽糖及海藻糖組成之群。
10. 如請求項 7 或 8 之調配物，其中該糖為蔗糖。
11. 如請求項 1、7 或 8 之調配物，其中蛋白質:糖之比率為至

少 1:2。

12. 如請求項 7 或 8 之調配物，其進一步包括醫藥學上可接受之緩衝劑。

13. 如請求項 7 或 8 之調配物，其具有 6 至 8 之 pH 值範圍。

## 八、圖式：

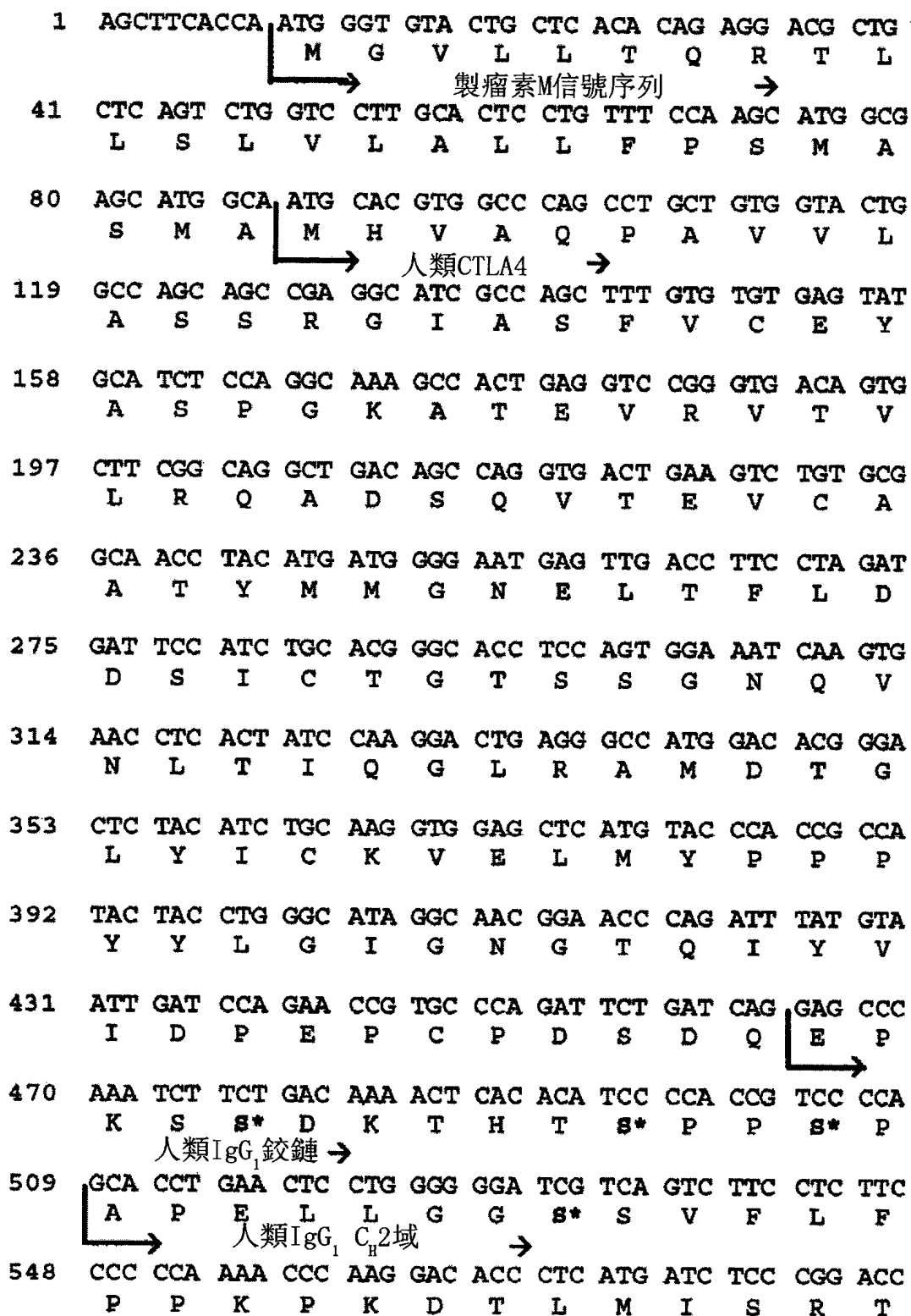


圖1A

587 CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA  
 P E V T C V V V D V S H E  
 626 GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG  
 D P E V K F N W Y V D G V  
 665 GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG  
 E V H N A K T K P R E E Q  
 704 TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC  
 Y N S T Y R V V S V L T V  
 743 CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC  
 L H Q D W L N G K E Y K C  
 782 AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA  
 K V S N K A L P A P I E K  
 821 ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG  
 T I S K A K G Q P R E P Q  
 860 GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG  
 V Y T L P P S R D E L T K  
 899 AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT  
 N Q V S L T C L V K G F Y  
 938 CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG  
 P S D I A V E W E S N G Q  
 977 CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC  
 P E N N Y K T T P P V L D  
 1016 TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG  
 S D G S F F L Y S K L T V  
 1055 GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC  
 D K S R W Q Q G N V F S C  
 1094 TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG  
 S V M H E A L H N H Y T Q  
 1133 AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA GTGCGACG  
 K S L S L S P G K -  
 1172 GCCGGCAAGC CCCGCTCCCC GGGCTCTCGC GGTCGCAC GAGGATGCTT  
 1222 CTAGA

圖 1B

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCCAAATATACTGAGGTCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGTCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCCAACGGAAACCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGGCCAGATTCGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAATCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTGTCTCTCTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCTTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGGCACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--N--E--S--N--	+294
GGGAGCCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--M--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--N--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGTAAATGA	
P--G--K--*	

圖2

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 ( 1 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)