



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I480064 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：099114238

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 05 月 04 日

(51)Int. Cl. : A61K9/08 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2009/05/04 美國

61/175,380

(71)申請人：艾伯維生物技術有限責任公司(百慕達) ABBVIE BIOTECHNOLOGY LTD. (BM)
百慕達(72)發明人：佛路荷夫 沃夫根 FRAUNHOFER, WOLFGANG (DE)；克魯斯 漢斯 裘根
KRAUSE, HANS-JUERGEN (DE)；紐 麥可 NEU, MICHAEL (DE)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 1215407A

CN 1688339A

審查人員：廖彥昱

申請專利範圍項數：46 項 圖式數：26 共 144 頁

(54)名稱

人類抗-TNF α 抗體之穩定高蛋白質濃度調配物

STABLE HIGH PROTEIN CONCENTRATION FORMULATIONS OF HUMAN ANTI-TNF-ALPHA-ANTIBODIES

(57)摘要

本發明提供一種液體醫藥調配物，其不包括 NaCl 且包含超過 20 mg 之多元醇及至少約 100 mg/mL 之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分。本發明提供一種具有長期穩定性及有利於皮下投藥之特徵的高濃度抗體調配物。

The invention provides a liquid pharmaceutical formulation which does not include NaCl and comprises more than 20 mg of a polyol and at least about 100 mg/mL of a human anti-TNF-alpha antibody, or antigen-binding portion thereof. The invention provides a high concentration antibody formulation having long-term stability and advantageous characteristics for subcutaneous administration.

(無元件符號說明)

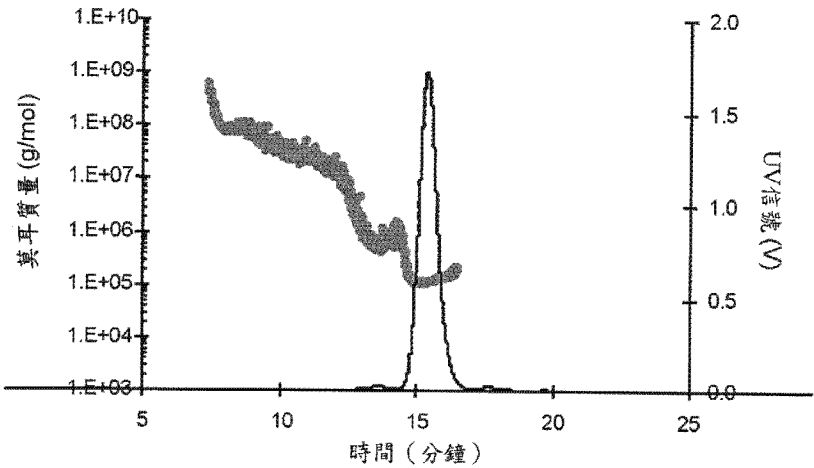


圖 1

六、發明說明：

相關申請案

本申請案主張2009年5月4申請之美國臨時申請案第61/175,380號之優先權，該臨時申請案之全部內容係以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

考慮到諸如抗體之治療性蛋白質的調配物必須具有在經濟上及治療上成功之眾多所需性質(例如穩定性、投藥之適合性、濃度)，故該等治療性蛋白質之調配經常為一項難題。在製造、儲存及傳遞期間，已知治療性蛋白質會經歷物理及化學降解。此等不穩定性會降低蛋白質效能且會增大患者發生不良事件之風險，並因此顯著影響管理核准(regulatory approval)(例如參看Wang等人，(2007) J Pharm Sci 96:1)。因此，穩定蛋白質調配物為治療性蛋白質之成功所必需。

為了達成有效性，許多治療性蛋白質需要以高劑量投與，其較佳被調配成高濃度調配物。因為高蛋白質濃度調配物可影響投與個體藥物之模式(例如靜脈內相對於皮下)及頻率，所以其為所需的。

儘管高蛋白質濃度調配物存在益處，但調配高濃度治療性蛋白質呈現眾多難題。舉例而言，提高蛋白質濃度經常會負面地影響蛋白質聚集、溶解度、穩定性及黏度(例如參看Shire等人，(2004) J Pharm Sci 93:1390)。黏度增大(此對於高蛋白質溶液為極常見的一項難題)會對調配物之投

與具有負面後果，例如感覺疼痛及灼痛症狀以及在製造、處理、填充加工(fill-finish)及藥物傳遞裝置選擇方面之限制性(例如參看Shire等人, (2004) J Pharm Sci 93:1390)。甚至對於具有常見結構特徵之治療性蛋白質(例如抗體)，經核准之調配物迄今為止已具有不同之成分及濃度範圍。舉例而言，抗CD20抗體利妥昔(Rituxan)經調配以便以10 mg/mL之濃度靜脈內投與，而抗RSV抗體西納吉(Synagis)經調配以便以100 mg/mL之濃度肌肉內投與。因此，可用於治療目的之高蛋白質調配物(尤其為抗體調配物)仍為一大難題。因此，對可提供給藥及管理優勢的穩定、高濃度蛋白質調配物存在需要。

【發明內容】

本發明至少部分基於人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合片段(例如阿達木單抗(adalimumab))之新穎高濃度調配物的發現。本發明之調配物在高濃度抗體下提供許多令人驚訝之特徵。舉例而言，本發明之調配物儘管具有高濃度蛋白質，但仍可在長期時間內維持物理及化學穩定性，且具有適合於皮下投藥之黏度。本發明之調配物至少部分建立於以下驚人發現：人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分可在高濃度(例如100 mg/mL)下保持可溶且保持不聚集，同時維持適合於注射(例如皮下投藥)之黏度。本發明之調配物的驚人之處亦在於高濃度(例如100 mg/mL)之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分可在較寬pH值範圍(例如約pH 5.2至約pH 6.0)內保持可溶且保持不聚集及化學上穩定(例如

無氧化或脫鹽胺現象)。無需NaCl作為穩定劑，且增加糖醇賦形劑即可實現此等有利特徵。

本發明之一個態樣提供一種液體醫藥調配物，其包含超過40 mg之多元醇及至少約100 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分。

本發明之另一態樣提供一種液體醫藥調配物，其包含超過20 mg之多元醇及至少約100 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分。在一個實施例中，本發明之調配物不含有NaCl。

本發明亦提供一種液體醫藥調配物，其pH值為約5.0至6.4且包含至少約100 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分，其中該調配物不含有NaCl且在標準24小時攪拌-應力分析(stir-stress assay)之後或在以液體形式長期儲存24個月後具有小於60 NTU之濁度。

本發明進一步提供一種液體醫藥調配物，其pH值為約5.0至6.4且包含至少約100 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分，其中該調配物不含有NaCl且在標準48小時攪拌-應力分析之後具有小於100 NTU之濁度。

本發明之另一態樣包括一種液體醫藥調配物，其pH值為約5.0至6.4且包含至少約100 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分，其中該調配物不含有NaCl且在5°C、25°C或40°C下儲存3個月後具有小於40 NTU之濁度。

本發明亦提供一種液體醫藥調配物，其包含至少約100 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分；超過約20

mg/mL之多元醇；0.1-2.0 mg/mL界面活性劑；約1.15-1.45 mg/mL檸檬酸*H₂O；約0.2-0.4 mg/mL脫水檸檬酸鈉；約1.35-1.75 mg/mL Na₂HPO₄*2H₂O；約0.75-0.95 mg/mL NaH₂PO₄*2H₂O，其中該調配物具有約4.7至6.5之pH值且不包含NaCl。

本發明之調配物適合於皮下投藥。因此，本發明亦包括使用包含人類TNF α 抗體或其抗原結合部分之本發明調配物來治療個體之與有害TNF α 活性相關之病症。

在一個實施例中，本發明之調配物具有一定濃度之人類TNF α 抗體或其抗原結合部分，及介於約3.1-3.3 mPas*s之間的黏度。

在一個實施例中，本發明之調配物包含超過20 mg之多元醇。可包括於本發明調配物中之額外量的多元醇為超過30 mg之多元醇。或者，可在本發明調配物中使用超過40 mg(包括(但不限於)40-45 mg或約42 mg)的多元醇。

在一個實施例中，本發明之調配物中所用之多元醇為糖醇，諸如(但不限於)甘露糖醇或山梨糖醇。在一個實施例中，調配物包含約40-45 mg/mL甘露糖醇或山梨糖醇。

可在本發明調配物中使用此項技術中已知之各種界面活性劑。在一個實施例中，界面活性劑為聚山梨醇酯80。在另一實施例中，在本發明調配物中使用約0.1-2.0 mg/mL聚山梨醇酯80。

在本發明之一個實施例中，調配物包含約1.30-1.31 mg/mL檸檬酸*H₂O。

在本發明之另一實施例中，調配物包含約 0.30-0.31 mg/mL 脫水檸檬酸鈉。

在本發明之又一實施例中，調配物包含約 1.50-1.56 mg/mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

在本發明之另一實施例中，調配物包含約 0.83-0.89 mg/mL $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

在另一實施例中，本發明調配物之 pH 值介於約 4.8 至約 6.4 之範圍內。舉例而言，本發明調配物之 pH 值可介於約 5.0 至約 5.4 之範圍內(例如約 5.2)，或可介於約 5.8 至約 6.4 之範圍內(例如約 6.0)。

本發明調配物之優勢在於其可提供高濃度抗體，而通常隨著蛋白質濃度之增加發生的蛋白質聚集卻不會增多。在一個實施例中，本發明之調配物具有低於約 1% 之聚集蛋白質。

亦涵蓋具有濃度為至少約 50 mg/mL 之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分的本文所述之調配物作為本發明之一部分。

在一個實施例中，人類抗體或其抗原結合部分包含：包含含有如 SEQ ID NO: 3 所示之胺基酸序列之 CDR3 域的輕鏈，及包含含有如 SEQ ID NO: 4 所示之胺基酸序列之 CDR3 域的重鏈。

在本發明之一個實施例中，抗體具有包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列或自 SEQ ID NO: 3 藉由在位置 1、4、5、7 或 8 處之單一丙胺酸取代或在位置 1、3、4、6、7、8 及/或 9

處之一至五個保守性胺基酸取代修飾而來之胺基酸序列的輕鏈CDR3域，且具有包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列或自SEQ ID NO: 4藉由在位置2、3、4、5、6、8、9、10或11處之單一丙胺酸取代或在位置2、3、4、5、6、8、9、10、11及/或12處之一至五個保守性胺基酸取代修飾而來之胺基酸序列的重鏈CDR3域。

本發明之抗體可具有某些功能特徵。舉例而言，人類抗體或其抗原結合部分自人類TNF α 解離之 K_d 可為 1×10^{-8} M或 1×10^{-8} M以下，自人類TNF α 解離之 K_{off} 速率常數可為 1×10^{-3} s $^{-1}$ 或 1×10^{-3} s $^{-1}$ 以下(均藉由表面電漿共振測定)，及/或在標準活體外L929分析中中和人類TNF α 細胞毒性之 IC_{50} 為 1×10^{-7} M或 1×10^{-7} M以下。

在一個實施例中，人類抗體或其抗原結合部分為人類IgG1 κ 抗體。

在本發明之一個實施例中，人類抗體之輕鏈或其抗原結合部分進一步含有包含如SEQ ID NO: 5所示之胺基酸序列的CDR2域及包含如SEQ ID NO: 7所示之胺基酸序列的CDR1域，及/或人類抗體之重鏈含有包含如SEQ ID NO: 6所示之胺基酸序列的CDR2域及包含如SEQ ID NO: 8所示之胺基酸序列的CDR1域。在另一實施例中，人類抗體之輕鏈或其抗原結合部分包含如SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列且人類抗體之重鏈包含如SEQ ID NO: 2所示之胺基酸序列。在本發明中亦包括具有與本文所示之SEQ ID NO至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之

胺基酸序列的人類抗體或其抗原結合部分。

在本發明之又一實施例中，人類抗體或其抗原結合部分為阿達木單抗。

【實施方式】

I. 定義

為了能更容易地理解本發明，首先定義某些術語。另外，應注意每當陳述某一參數之值或值範圍時，介於所述值之間的值及範圍亦意欲為本發明之一部分。

術語「醫藥調配物」係指呈使活性成分之生物活性明確有效之形式且不含對將投與調配物之個體明顯有毒之額外組分的製劑。

短語「醫藥學上可接受之載劑」為技術上認可的且包括醫藥學上可接受之適合於投與哺乳動物之物質、組合物或媒劑。該等載劑包括涉及將標的藥劑自身體之一個器官或部分載運或輸送至身體之另一器官或部分的液體或固體填料、稀釋劑、賦形劑、溶劑或封囊物質。在與調配物之其他成分相容且對患者安全無害或無影響之意義上，各載劑必須為「可接受的」。

「醫藥學上可接受之賦形劑」(媒劑、添加劑)為彼等可適當地投與個體哺乳動物以提供有效劑量之所用活性成分的賦形劑。

術語「賦形劑」係指可添加至調配物中以提供所需稠度(例如改變整體性質)、改良穩定性及/或調節滲透壓度之藥劑。常用賦形劑之實例包括(但不限於)糖、多元醇、胺基

酸、界面活性劑及聚合物。

常用賦形劑為多元醇。如本文中所用之「多元醇」為具有多個羥基之物質，且包括糖(還原及非還原性糖)、糖醇及糖酸。在本文中較佳多元醇具有小於約600 kD(例如在約120 kD至約400 kD之範圍內)之分子量。多元醇之非限制性實例為果糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、蔗糖、海藻糖、山梨糖、松三糖、棉子糖、甘露糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、蘇糖醇、山梨糖醇、甘油、L-葡糖酸鹽及其金屬鹽。

如本文中所用之「緩衝液」係指藉由酸鹼共軛組分之作作用阻止pH值變化的緩衝溶液。本發明之緩衝液具有在約4至約8、較佳為約4.5至約7之範圍內的pH值，且最佳具有在約5.0至約6.5之範圍內的pH值。可將pH值控制在此範圍內之緩衝液的實例包括磷酸鹽、乙酸鹽(例如乙酸钠)、丁二酸鹽(諸如丁二酸钠)、葡糖酸鹽、麩胺酸鹽、組胺酸、檸檬酸鹽及其他有機酸緩衝液。在一個實施例中，適用於本發明之調配物中之緩衝液為檸檬酸鹽及磷酸鹽緩衝液。

術語「界面活性劑」一般包括可保護調配物中之蛋白質不受空氣/溶液界面誘生應力及溶液/表面誘生應力影響之彼等藥劑。舉例而言，界面活性劑可保護蛋白質以免聚集。適合之界面活性劑可包括例如聚山梨醇酯、聚氧乙烯烷基醚(諸如Brij 35.RTM.)或泊洛沙姆(poloxamer)，諸如吐溫(Tween)20、吐溫80或泊洛沙姆188。較佳清潔劑為泊洛沙姆，例如泊洛沙姆188、泊洛沙姆407；聚氧乙烯烷基

醚，例如 Brij 35.RTM.、Cremophor A25、Sympatens ALM/230；及聚山梨醇酯/吐溫，例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、Mirj，及泊洛沙姆，例如泊洛沙姆188，及吐溫，例如吐溫20及吐溫80。

「穩定」調配物為內含抗體在製造過程期間及/或在儲存後基本上保持其物理穩定性及/或化學穩定性及/或生物活性之調配物。在此項技術中可利用量測蛋白質穩定性之各種分析技術且相關內容綜述於以下文獻中：Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee 編, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)及 Jones, A. (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90。舉例而言，在一個實施例中，根據具有低降解(例如斷裂)及/或聚集蛋白質百分比之溶液中單體蛋白質之百分比，測定蛋白質穩定性。較佳地，調配物在室溫(約30°C)下或在40°C下至少1個月內保持穩定，及/或在約2-8°C下至少1年或至少2年內保持穩定。此外，在冷凍(至例如-70°C)及解凍調配物(在下文中稱作「凍融循環」)之後，調配物較佳保持穩定。

若在目視檢驗顏色及/或澄清度後或如藉由UV光散射或藉由尺寸排阻層析法所量測，抗體實質上顯示無例如聚集、沈澱及/或變性之跡象，則該抗體在醫藥調配物中「保持其物理穩定性」。聚集為個別分子或複合物共價或非共價地締合形成聚集體之過程。聚集可進行至形成可見沈澱物之程度。

可藉由此項技術中熟知之方法(包括量測樣本之表觀光

衰減(吸收率或光學密度))評估調配物之穩定性，諸如物理穩定性。此類對光衰減之量測與調配物之濁度有關聯。調配物之濁度部分為溶解於溶液中之蛋白質的本徵特性且通常藉由濁度測定法測定，且以濁度單位(Nephelometric Turbidity Unit, NTU)量度。

例如隨溶液中一或多種組分之濃度(例如蛋白質及/或鹽濃度)而變之濁度亦稱作調配物之「乳白光」或「乳白色外觀」。可參考使用已知濁度之懸浮液產生的標準曲線計算濁度。測定醫藥組合物濁度之參考標準可基於歐洲藥典(European Pharmacopeia)準則(European Pharmacopoeia, 第四版, Directorate for the Quality of Medicine of the Council of Europe (EDQM), Strasbourg, France)。根據歐洲藥典準則，澄清溶液係定義為濁度小於或等於根據歐洲藥典標準濁度約為3之參考懸浮液的溶液。濁度量測可偵測瑞雷散射(Rayleigh scatter)，在無締合或非理想性效應存在下，其通常隨濃度線性變化。在此項技術中熟知評估物理穩定性之其他方法。

若在特定時刻，抗體之化學穩定性使得其被認為仍保持其生物活性(如下所定義)，則該抗體在醫藥調配物中「保持其化學穩定性」。可藉由例如偵測及定量抗體之以化學方式改變之形式來評估化學穩定性。化學變化可包括尺寸修改(例如截割)，其可例如使用尺寸排阻層析法、SDS-PAGE及/或基質輔助雷射脫附離子化/飛行時間質譜法(MALDI/TOF MS)來評估。其他類型之化學變化包括電荷

變化(例如因脫醯胺或氧化而發生)，其可例如藉由離子交換層析法來評估。

若醫藥調配物中之抗體對於其預定目的具有生物學活性，則抗體在醫藥調配物中「保持其生物活性」。舉例而言，若醫藥調配物中之抗體之生物活性在製備醫藥調配物時所展現之生物活性的約30%、約20%或約10%以內(在分析誤差以內)(例如在抗原結合分析中所測定)，則生物活性得以保持。

在藥理學含義內，在本發明之上下文中，抗體之「治療有效量」或「有效量」係指能有效地預防或治療或減輕該抗體可有效治療之病症之症狀的量。「病症」為可受益於抗體治療之任何病狀。其包括慢性及急性病症或疾病，包括使個體易患所討論之病症的彼等病理學病狀。

「治療」係指治療性處理與預防性措施。需要治療者包括已患有病症者以及欲預防病症者。

如本文中所用之短語「非經腸投與」意謂除經腸及局部投與以外通常藉由注射進行之投與模式，且包括(但不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、顱內、關節內、脊柱內及胸骨內注射及輸注。

如本文所用，短語「全身投與」及「周邊投與」意謂化合物、藥物或其他物質除直接投與至中樞神經系統以外之投與，使得其進入患者身體系統內且因此經歷代謝及其他

類似過程，例如皮下投與。

如本文中所用之術語「人類 TNF α 」(本文中縮寫為 hTNF α 、TNF α ，或簡稱為 hTNF)意欲指以 17 kD 分泌形式及 26 kD 膜締合形式存在之人類細胞激素，其生物活性形式係由非共價結合之 17 kD 分子之三聚體構成。hTNF α 之結構例如在以下文獻中有進一步描述：Pennica, D. 等人，(1984) Nature 312:724-729；Davis, J. M. 等人，(1987) Biochem 26:1322-1326；及 Jones, E. Y. 等人，(1989) Nature 338:225-228。術語人類 TNF α 意欲包括重組人類 TNF α (rhTNF α)，其可藉由標準重組表現法製備或可於市面上購得(R & D Systems, 目錄號 210-TA, Minneapolis, Minn.)。

如本文中所用之術語「抗體」意欲指包含以雙硫鍵互相連接之四條多肽鏈(即兩條重鏈(H)及兩條輕鏈(L))的免疫球蛋白分子。此定義亦包括其他天然產生之結構改變之抗體，諸如駱駝抗體。各重鏈包含重鏈可變區(在本文中縮寫為 HCVR 或 VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域，即 CH1、CH2 及 CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區(在本文中縮寫為 LCVR 或 VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域 CL。VH 及 VL 區可進一步再分為稱為互補決定區(CDR)之高變區，其間穿插有稱為架構區(FR)之較保守的區域。各 VH 及 VL 係由三個 CDR 及四個 FR 構成，該等區域自胺基端至羧基端按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本發明之一個實施例中，調配物含有具有 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列之抗體，如美

國專利第6,090,382號及第6,258,562號中所述者，該等文獻各自以引用的方式併入本文中。

如本文中所用之術語「CDR」係指抗體可變序列內之互補決定區。在重鏈及輕鏈之各可變區中存在三個CDR，各可變區之該三個CDR被命名為CDR1、CDR2及CDR3。此等CDR之確切邊界已根據不同系統以不同方式來界定。由Kabat(Id.)描述之系統不僅提供適用於抗體之任何可變區的明確之殘基編號系統，而且提供界定三個CDR之精確殘基邊界。此等CDR可稱作Kabat CDR。Chothia等人發現Kabat CDR內之某些子部分儘管在胺基酸序列層面上具有很大多樣性，但仍呈現幾乎相同之肽主鏈構形(Chothia等人，(1987) Mol. Biol. 196:901-917；Chothia等人，(1989) Nature 342:877-883)。此等子部分被命名為L1、L2及L3或H1、H2及H3，其中「L」及「H」分別表示輕鏈及重鏈區域。此等區域可稱作Chothia CDR，其具有與Kabat CDR重疊之邊界。Padlan (1995) FASEB J. 9:133-139及MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5):732-45已描述了界定與Kabat CDR重疊之CDR的其他邊界。其他CDR邊界界定可能未必嚴格遵循本文所述系統之一，但仍將與Kabat CDR重疊，不過其可根據特定殘基或殘基組或甚至全部CDR不顯著影響抗原結合之預測或實驗結果而有縮短或延長。儘管某些實施例使用Kabat或Chothia界定之CDR，但本文所用之方法可利用根據任一此等系統界定之CDR。

如本文中所用之術語抗體之「抗原結合部分」(或簡稱

為「抗體部分」)係指抗體之一或多個保留特異性結合於抗原(例如 hTNF α)之能力的片段。已證明抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段來執行。涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內的結合片段之實例包括(i) Fab片段，即由 VL、VH、CL及CH1域組成之單價片段；(ii) F(ab')₂片段，即包含鉸鏈區由二硫橋連接之兩個Fab片段的二價片段；(iii)由 VH及CH1域組成之Fd片段；(iv)由抗體單臂之VL及VH域組成之Fv片段；(v) dAb片段(Ward等人，(1989) Nature 341:544-546)，其係由VH域組成；及(vi)分離之互補決定區(CDR)。此外，儘管Fv片段之兩個結構域VL及VH係由各別基因編碼，但其可使用重組方法經由使其能夠成為單一蛋白質鏈之合成連接子接合，在該單一蛋白質鏈中，VL及VH區配對形成單價分子(稱為單鏈Fv(scFv)；例如參看Bird等人，(1988) Science 242:423-426；及Huston等人，(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。此等單鏈抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內。亦涵蓋單鏈抗體之其他形式，諸如雙功能抗體。雙功能抗體為二價雙特異性抗體，其中VH及VL域表現於單一多肽鏈上，但使用過短連接子以致同一鏈上之兩個結構域之間無法配對，從而迫使該等結構域與另一鏈之互補結構域配對且形成兩個抗原結合位點(例如參看Holliger, P.等人，(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448；Poljak, R. J.等人，(1994) Structure 2:1121-1123)。在本發明之一個實施例中，調配物含有美國專利第6,090,382號及

第6,258,562號中所述之抗原結合部分，該等文獻各自以引用的方式併入本文中。

另外，抗體或其抗原結合部分可為由抗體或抗體部分與一或多種其他蛋白質或肽共價或非共價締合所形成的較大免疫黏附分子之一部分。此等免疫黏附分子之實例包括使用抗生蛋白鏈菌素核心區來製備四聚scFv分子(Kipriyanov, S. M.等人, (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101)及使用半胱胺酸殘基、標記肽及C端聚組胺酸標籤來製備二價及經生物素標記之scFv分子(Kipriyanov, S. M.等人, (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058)。可使用習知技術(諸如分別用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化全抗體)自全抗體製備抗體部分，諸如Fab及F(ab')₂片段。此外，如本文所述，可使用標準重組DNA技術獲得抗體、抗體部分及免疫黏附分子。

如本文中所用之術語「人類抗體」意欲包括具有源自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。本發明中所用之人類抗體可例如在CDR且尤其CDR3中包括並非由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如，由活體外隨機或位點特異性突變誘發或由活體內體細胞突變所引入之突變)。然而，如本文中所用之術語「人類抗體」並不意欲包括已將源自另一哺乳動物物種(諸如小鼠)生殖系之CDR序列移植於人類架構序列上的抗體。

如本文中所用之術語「重組人類抗體」意欲包括所有藉由重組方式製備、表現、形成或分離之人類抗體，諸如使

用轉染至宿主細胞中之重組表現載體所表現之抗體(下文在章節II中進一步描述)、自重組的組合人類抗體庫分離之抗體(在下文章節III中進一步描述)、自人類免疫球蛋白基因之轉殖基因動物(例如小鼠)分離之抗體(例如參看Taylor, L. D.等人, (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295)或藉由涉及將人類免疫球蛋白基因序列黏接於其他DNA序列上之任何其他方式製備、表現、形成或分離之抗體。此等重組人類抗體具有源自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區。然而,在某些實施例中,對此等重組人類抗體進行活體外突變誘發(或者,當使用人類Ig序列之轉殖基因動物時,進行活體內體細胞突變誘發),且因此,重組抗體之VH及VL區之胺基酸序列為儘管源自人類生殖系VH及VL序列且與人類生殖系VH及VL序列有關,但卻可能無法天然存在於活體內人類抗體生殖系譜系內的序列。

如本文中所用之「分離之抗體」意欲指實質上不含其他具有不同抗原特異性之抗體的抗體(例如,特異性結合hTNF α 之分離之抗體實質上不含特異性結合hTNF α 以外之抗原的抗體)。然而,特異性結合hTNF α 之分離之抗體可對其他抗原(諸如來自其他物種之TNF α 分子)具有交叉反應性。此外,分離之抗體可實質上不含其他細胞物質及/或化學物質。

如本文中所用之「中和抗體」(或「中和hTNF α 活性之抗體」)意指結合於hTNF α 使得hTNF α 之生物活性受到抑制之抗體。此種對hTNF α 生物活性之抑制可藉由量測hTNF α 生

物活性之一或多個指標(諸如hTNF α 誘導之細胞毒性(活體外或活體內)、hTNF α 誘導之細胞活化及hTNF α 與hTNF α 受體之結合)來評估。hTNF α 生物活性之此等指標可用此項技術中已知之若干標準活體外或活體內分析中的一或多個分析來評估，且描述於美國專利第6,090,382號及第6,258,562號中，該等文獻各自以引用的方式併入本文中。抗體中和hTNF α 活性之能力較佳係藉由抑制L929細胞之hTNF α 誘導之細胞毒性來評估。可評估抗體抑制HUVEC上hTNF α 誘導之ELAM-1表現(作為hTNF α 誘導之細胞活化的度量)之能力作為hTNF α 活性之另一或替代性參數。

如本文中所用之術語「表面電漿共振」係指一種允許藉由例如使用BIAcore系統(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden及Piscataway, N.J.)偵測生物感測器矩陣內之蛋白質濃度變化來分析即時生物特異性相互作用的光學現象。關於進一步的描述，參看Jonsson, U.等人，(1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26；Jonsson, U.等人，(1991) *Biotechniques* 11:620-627；Johnson, B.等人，(1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131；及Johnson, B.等人，(1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277。

如本文中所用之術語「 K_{on} 」意欲指如此項技術中所知的結合蛋白(例如抗體)與抗原締合形成例如抗體/抗原複合物之締合速率常數。

如本文中所用之術語「 K_{off} 」意欲指抗體自抗體/抗原複合物解離之解離速率常數。

如本文中所用之術語「 K_d 」意欲指特定抗體-抗原相互作用之解離常數，且係指在滴定量測中在平衡時獲得之值或藉由將解離速率常數(k_{off})除以締合速率常數(k_{on})獲得之值。

在以下子章節(subsection)中更詳細地描述本發明之各種態樣。

II. 本發明之調配物

本發明提供相較於技術上認可之調配物特性有所改良之液體醫藥調配物(例如抗體調配物)。本發明係基於以下驚人發現：藉由移除NaCl且添加超過20 mg/mL之多元醇(例如糖醇)，可將調配物中人類TNF α 抗體之濃度增至約100 mg/mL。儘管存在高濃度抗體，但例如在製造、儲存及/或反覆冷凍/解凍處理步驟或長久曝露於增大之空氣-液體界面期間，本發明之調配物能夠維持蛋白質之溶解度及穩定性。另外，本發明之調配物儘管具有約100 mg/mL抗體，但維持低度蛋白質聚集(亦即低於1%)。令人驚訝的是，本發明之調配物儘管具有約100 mg/mL抗體，但亦維持在適合於皮下注射之範圍內的低黏度。此外，本發明之調配物(例如高濃度TNF α 抗體)在幾乎一個pH值範圍(例如pH 5.2至pH 6.0)內，維持溶解度，維持適合於皮下注射之低黏度，且維持穩定性。在一個實施例中，在標準48小時攪拌-應力分析之後，調配物之濁度小於100 NTU。因此，本發明之高抗體調配物克服了許多已知之調配難題，包括穩定性、黏度、濁度及物理降解難題。

本發明調配物之一個令人驚奇的特徵在於在無NaCl存在下，調配物之整體黏度保持較低(例如約3.1-3.3 mPas*s，例如約3.00、3.05、3.10、3.15、3.20、3.25、3.30、3.35或約3.40 mPas*s)，而抗體濃度較高(例如100 mg/mL或100 mg/mL以上)。一般而言，黏度隨著蛋白質濃度增加而增加(關於綜述，參看Shire等人，(2004) J Pharm Sci 93:1390)。此類增加幾乎總會藉由添加離子賦形劑(例如NaCl及MgCl₂)來阻止，然而，添加此等賦形劑亦會使溶液濁度增加。濁度增加常常與形成不溶性蛋白質聚集體、沈澱物或蛋白質粒子(例如聚集)相關聯。因此，本發明之液體醫藥調配物提供高抗體濃度(例如至少100 mg/mL)與適合於皮下投與之黏度，而無需添加NaCl。

在一個實施例中，本發明之調配物包括使得液體調配物不顯示明顯的乳白光、聚集或沈澱之高濃度蛋白質。

在另一實施例中，本發明之調配物包括適合於例如皮下投與但不會明顯地感覺到疼痛(例如藉由視覺類比量表(visual analog scale, VAS)評分來測定)之高濃度蛋白質。

本發明之調配物包含高蛋白質濃度，包括例如約50 mg/mL或約100 mg/mL人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合片段之蛋白質濃度。因此，如下文在實例1中所述，在本發明之一個態樣中，液體醫藥調配物包含約50 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體濃度。如下文在實例2-6中所述，本在發明之另一態樣中，液體醫藥調配物包含約100 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體濃度。在本發明之又一態樣中，液體醫藥調配

物包含約150 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體濃度。儘管本發明之較佳實施例為包含高蛋白質濃度之調配物，但亦預期本發明之調配物可包含介於約1 mg/mL與約150 mg/mL或約40 mg/mL-125 mg/mL之間的抗體濃度。介於上述濃度之間的濃度及範圍亦意欲為本發明之一部分(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199或200 mg/mL)。

在另一態樣中，本發明提供一種液體醫藥組合物，其包含足以調配抗體(例如阿達木單抗)之量的多元醇、界面活性劑及緩衝系統以便在大於約例如100 mg/mL之濃度下進行治療性使用。在一個實施例中，液體醫藥組合物不包含NaCl。

然而，應注意，儘管本發明之較佳調配物不包含NaCl，但少量(例如約0.01 mM至約300 mM)NaCl可存在於調配物中。另外，意欲包括介於所述值之間的任何NaCl用量。

在一個態樣中，本發明提供一種液體醫藥組合物，其包含人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合片段(例如阿達木單抗)、足以調配抗體以便進行治療性使用之量的多元醇，但未添加NaCl。

本發明亦提供包含人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合片段之液體調配物，其pH值為約5.0至6.4，未添加NaCl，且在標準24小時攪拌-應力分析之後濁度小於約60 NTU(例如約20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62或63 NTU)。在另一態樣中，本發明提供包含人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合片段之液體調配物，其pH值為約5.0至6.4，未添加NaCl，且在標準48小時攪拌-應力分析之後濁度小於約100 NTU(例如約35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、

59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100 NTU)。在又一態樣中，本發明提供包含人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合片段之液體調配物，其pH值為約5.0至6.4，未添加NaCl，且在5°C、25°C或40°C下儲存3個月後濁度小於約40 NTU(例如約20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60 NTU)。

本發明調配物之一個特徵在於包括濃度大於20 mg/mL之多元醇，例如糖醇。在一個實施例中，該多元醇為山梨糖醇或甘露糖醇。應注意，將山梨糖醇或甘露糖醇添加至蛋白質溶液中並不總是與蛋白質穩定性的提高相關。舉例而言，當在熱學或界面應力條件期間評估時，分別與吐溫20及羥丙基- β -環糊精對比，山梨糖醇針對豬生長激素之沈澱未提供優勢(Charman等人，(1993) Pharm Res.10(7):954-62)。

在一個實施例中，適用於本發明調配物之多元醇為糖醇，例如甘露糖醇或山梨糖醇。包含多元醇之本發明之液體調配物通常包含超過約20 mg之多元醇。在一個實施例中，調配物包含超過約30 mg/mL之多元醇。在另一實施例中，調配物包含超過約40 mg/mL之多元醇。在另一實施例

中，調配物包含約40-45 mg/mL多元醇，例如約35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54或55 mg/mL多元醇。另外，意欲包括使用任一上述值之組合作為上限及/或下限的數值範圍。

在本發明之某些實施例中，所製備之液體調配物於pH緩衝溶液中包含抗體。本發明之緩衝液具有介於約4至約8、較佳約4.5至約7.0、更佳約4.5至約6.0、甚至更佳約4.8至約5.5之範圍內的pH值，且最佳具有約5.0至約6.4之pH值。在一個實施例中，本發明之調配物的pH值為約5.2。在另一實施例中，本發明之調配物的pH值為約6.0。介於上述pH值之間的範圍亦意欲為本發明之一部分(例如4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4)。意欲包括使用任一上述值之組合作為上限及/或下限的數值範圍，例如5.2-5.8。可將pH值控制在此範圍內之緩衝液的實例包括磷酸鹽、乙酸鹽(例如乙酸钠)、丁二酸鹽(諸如丁二酸钠)、葡糖酸鹽、麩胺酸鹽、組胺酸、檸檬酸鹽及其他有機酸緩衝液。

在本發明之一個特定實施例中，調配物包含緩衝系統，其含有檸檬酸鹽及/或磷酸鹽以維持pH值在約5.0至約6.4之範圍內。在一個實施例中，調配物之pH值為約5.2。在另一實施例中，調配物之pH值為約6.0。

在另一個較佳實施例中，緩衝系統包括單水合檸檬酸、

檸檬酸鈉、二水合磷酸氫二鈉及/或二水合磷酸二氫鈉。在另一個較佳實施例中，緩衝系統包括約 1.15-1.45 mg/ml 檸檬酸(例如約 1.15、1.20、1.25、1.30、1.35、1.40 或 1.45)、約 0.2-0.4 mg/mL 脫水檸檬酸鈉(例如約 0.2、0.25、0.3、0.35 或 0.4)、約 1.35-1.75 mg/mL 脫水磷酸氫二鈉(例如 1.35、1.40、1.45、1.50、1.55、1.60、1.65、1.70 或 1.75)、約 0.75-0.95 mg/mL 脫水磷酸二氫鈉(例如約 0.75、0.80、0.85、0.9 或 0.95)。

介於上述濃度之間的值及範圍亦意欲為本發明之一部分。另外，意欲包括使用任一上述值之組合作為上限及/或下限的數值範圍，例如 1.20-1.40 mg/mL。

在其他實施例中，緩衝系統包括 1.3-1.31 mg/mL 檸檬酸(例如約 1.305 mg/mL)。在另一實施例中，緩衝系統包括約 0.27-0.33 mg/mL 脫水檸檬酸鈉(例如約 0.305 mg/mL)。在一個實施例中，緩衝系統包括約 1.5-1.56 mg/mL 脫水磷酸氫二鈉(例如約 1.53 mg/mL)。在另一實施例中，緩衝系統包括約 0.83-0.89 mg/mL 二水合磷酸二氫鈉(例如約 0.86 mg/mL)。

亦可將清潔劑或界面活性劑添加至本發明之抗體調配物中。例示性清潔劑包括非離子清潔劑，諸如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯 20、80 等)或泊洛沙姆(例如泊洛沙姆 188)。清潔劑之添加量為能減少所調配抗體之聚集及/或最小化調配物中之微粒形成及/或減少吸附之量。在本發明之一個較佳實施例中，調配物包括界面活性劑，其為聚山

梨醇酯。在本發明之另一個較佳實施例中，調配物含有清潔劑聚山梨醇酯80。在一個較佳實施例中，調配物含有介於約0.1 mg/mL與約2.0 mg/mL之間(例如約1 mg/mL)的聚山梨醇酯80。

介於上述濃度之間的值及範圍亦意欲為本發明之一部分，例如0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9。另外，意欲包括使用任一上述值之組合作為上限及/或下限的數值範圍，例如0.3至1.1 mg/mL。

在一個實施例中，本發明之調配物基本上由以下組成：濃度為至少約100 mg/mL之人類TNF α 抗體或其抗原結合部分、界面活性劑(例如聚山梨醇酯80)、多元醇(例如超過20 mg/mL之山梨糖醇或甘露糖醇)及緩衝系統(例如單水合檸檬酸、檸檬酸鈉、二水合磷酸氫二鈉及/或二水合磷酸二氫鈉)，且不含有NaCl。

在一個實施例中，調配物含有上文確認之藥劑(亦即濃度為至少約100 mg/mL之抗體、緩衝系統、多元醇及界面活性劑，無NaCl)且基本上不含防腐劑，諸如苯甲醇、苯酚、間甲酚、氯丁醇及苄索氯銨。在另一實施例中，調配物中可包括防腐劑。調配物中可包括一或多種其他醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑，諸如Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A.編(1980)中所述之其他藥劑，前提為該等其他藥劑不會明顯不利地影響調配物之所需特徵。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用

劑量及濃度下對接受者無毒且包括：其他緩衝劑；共溶劑；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；螯合劑，諸如EDTA；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；可生物降解之聚合物，諸如聚酯；及/或成鹽相對離子，諸如鈉。

對於所治療之特定適應症，必要時亦可將本文中之調配物與一或多種其他治療劑(較佳為具有不會不利地影響調配物之抗體的互補活性之治療劑)組合。此等治療劑宜以可有效於所欲目的之量、以組合形式存在。可與本發明之調配物組合的其他治療劑在美國專利第6,090,382號及第6,258,562號中有進一步描述，該等文獻各自以引用的方式併入本文中。

欲用於活體內投與之調配物必須為無菌的。此係藉由在製備調配物之前或之後經由無菌過濾膜過濾來容易地實現。

如上所述，本發明之液體調配物具有有利的穩定性及儲存特性。液體調配物之穩定性並不視儲存形式而定，且包括(但不限於)已冷凍、凍乾、噴霧乾燥之調配物，或內部懸浮有活性成分之調配物。可在所選溫度下於所選時段內量測穩定性。在本發明之一個態樣中，液體調配物中之蛋白質在液體形式下在至少約3個月、至少約4個月、至少約5個月、至少約6個月、至少約12個月、至少約18個月內保持穩定。介於上述時段之間的值及範圍亦意欲為本發明之一部分，例如約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或約24個

月。另外，意欲包括使用任一上述值之組合作為上限及/或下限的數值範圍。較佳地，調配物在室溫(約30°C)下或在40°C下至少約1個月內保持穩定，及/或在約2-8°C下至少約1年內保持穩定，或更佳為在約2-8°C下至少約2年內保持穩定。此外，在冷凍(至例如-80°C)及解凍調配物(在下文中稱作「凍融循環」)之後，調配物較佳保持穩定。

蛋白質在液體調配物中之穩定性亦可以調配物中蛋白質之單體、聚集體或片段或其組合之百分比來定義。若在目視檢驗顏色及/或澄清度後或如藉由UV光散射或藉由尺寸排阻層析法所量測，蛋白質實質上顯示無聚集、沈澱及/或變性之跡象，則該蛋白質在調配物中「保持其物理穩定性」。在本發明之一個態樣中，穩定液體調配物為內部存在之聚集蛋白質之含量低於約10%且較佳低於約5%的調配物。

在一個實施例中，藉由在攪拌應力分析(例如24小時或48小時攪拌-應力分析)之後測定調配物濁度來測定液體調配物之物理穩定性。舉例而言，可藉由將適合體積之液體調配物置放於具有磁性攪拌器(例如多點式HP，550 rpm)之燒杯中、在任何適合之時刻(例如在T0-T48(小時)時)移取等分試樣及必要時對該等等分試樣進行適合之分析來進行攪拌應力分析。處於相同條件下但未攪拌之調配物樣本充當對照物。

可使用來自Hach(Germany)之實驗室濁度量測系統進行濁度量測且以濁度單位(NTU)報導。

本發明之液體調配物亦具有有利之耐受性。使用疼痛視覺類比量表(VAS)，基於對個體感知之注射部位疼痛的評價來評估耐受性。

(VAS)為一種量測疼痛之量測手段，其涵蓋一串連續值，例如自無疼痛至極大的疼痛。在操作上，VAS為一條長約100 mm之水平線，其以數字及/或字詞描述符來界定，例如0或10，或『無疼痛』或『劇烈疼痛』，視情況在極端值之間加上其他字詞或數字描述符，例如輕度、中度及嚴重；或1至9(例如參看Lee JS等人，(2000) Acad Emerg Med 7:550)。

可量測之其他耐受性指標包括例如德賴茲量表(Draize Scale)(出血、瘀斑、紅斑、水腫、搔癢)及瘀血。

III.用於本發明調配物中之抗體

可用於本發明調配物中之抗體為針對抗原TNF α (包括人類TNF α (或hTNF α))之抗體。

在一個實施例中，本發明提供一種分離之人類抗體或其抗原結合部分，其以高親和力及低解離速率結合於人類TNF α ，而且具有高中和能力。本發明中所用之人類抗體較佳為重組型中和性人類抗-hTNF α 抗體。本發明之最佳的重組型中和抗體在本文中被稱作D2E7，亦稱作HUMIRA™或阿達木單抗(D2E7 VL區域之胺基酸序列如SEQ ID NO: 1所示；D2E7 VH區域之胺基酸序列如SEQ ID NO: 2所示)。D2E7(阿達木單抗/HUMIRA®)之特性已描述於Salfeld等人之美國專利第6,090,382號、第6,258,562號及第6,509,015

號(其各自以引用的方式併入本文中)中。

在一個實施例中，人類TNF α 或其抗原結合部分自人類TNF α 解離之 K_d 為 1×10^{-8} M或 1×10^{-8} M以下且 K_{off} 速率常數為 1×10^{-3} s $^{-1}$ 或 1×10^{-3} s $^{-1}$ 以下(均藉由表面電漿共振測定)，且在標準活體外L929分析中中和人類TNF α 細胞毒性之 IC_{50} 為 1×10^{-7} M或 1×10^{-7} M以下。更佳地，分離之人類抗體或其抗原結合部分自人類TNF α 解離之 K_{off} 為 5×10^{-4} s $^{-1}$ 或 5×10^{-4} s $^{-1}$ 以下，或甚至更佳的是， K_{off} 為 1×10^{-4} s $^{-1}$ 或 1×10^{-4} s $^{-1}$ 以下。更佳地，分離之人類抗體或其抗原結合部分在標準活體外L929分析中中和人類TNF α 細胞毒性之 IC_{50} 為 1×10^{-8} M或 1×10^{-8} M以下，甚至更佳為 1×10^{-9} M或 1×10^{-9} M以下，且更佳為 1×10^{-10} M或 1×10^{-10} M以下。在一個較佳實施例中，抗體為分離之人類重組抗體或其抗原結合部分。

在此項技術中眾所周知，抗體重鏈及輕鏈CDR3域在抗體對抗原之結合特異性/親和力方面起重要作用。因此，在另一態樣中，本發明係關於藉由投與對於與hTNF α 締合具有緩慢解離動力學且具有與D2E7之輕鏈及重鏈CDR3域結構上一致或相關之輕鏈及重鏈CDR3域的人類抗體來治療克隆氏病(Crohn's disease)。D2E7 VL CDR3之位置9可由Ala或Thr佔據而不會實質上影響 K_{off} 。因此，D2E7 VL CDR3之共同基元(consensus motif)包含胺基酸序列：Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A)(SEQ ID NO: 3)。另外，D2E7 VH CDR3之位置12可由Tyr或Asn佔據而不會實質上影響 K_{off} 。因此，D2E7 VH CDR3之共同基元包含胺基酸序列：V-S-

Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N)(SEQ ID NO: 4)。此外，如美國專利第6,090,382號之實例2中所表明，D2E7重鏈及輕鏈之CDR3域易於經單一丙胺酸殘基取代(在VL CDR3內之位置1、4、5、7或8處，或在VH CDR3內之位置2、3、4、5、6、8、9、10或11處)而不會實質上影響 K_{off} 。此外，熟習此項技術者應瞭解，考慮到D2E7 VL及VH CDR3域易於經丙胺酸取代，在仍保持抗體之低解離速率常數的同時取代CDR3域內之其他胺基酸(尤其經保守性胺基酸取代)可為可能的。較佳在D2E7 VL及/或VH CDR3域內僅僅進行一至五個保守性胺基酸取代。更佳在D2E7 VL及/或VH CDR3域內僅僅進行一至三個保守性胺基酸取代。另外，不應在對於結合於hTNF α 至關重要之胺基酸位置處進行保守性胺基酸取代。D2E7 VL CDR3之位置2及5以及D2E7 VH CDR3之位置1及7似乎對於與hTNF α 之相互作用為關鍵的，且因此，較佳不在此等位置處進行保守性胺基酸取代(儘管如上所述在D2E7 VL CDR3之位置5處的丙胺酸取代為可接受的亦然)(參看美國專利第6,090,382號)。

因此，在另一實施例中，抗體或其抗原結合部分較佳含有以下特徵：

a)如藉由表面電漿共振所測定，自人類TNF α 解離之 K_{off} 速率常數為 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下；

b)具有包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列或自SEQ ID NO: 3藉由在位置1、4、5、7或8處之單一丙胺酸取代或在位置1、3、4、6、7、8及/或9處之一至五個保守性胺基酸取代

修飾而來之胺基酸序列的輕鏈CDR3域；

c)具有包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列或自SEQ ID NO: 4藉由在位置2、3、4、5、6、8、9、10或11處之單一丙胺酸取代或在位置2、3、4、5、6、8、9、10、11及/或12處之一至五個保守性胺基酸取代修飾而來之胺基酸序列的重鏈CDR3域。

抗體或其抗原結合部分自人類TNF α 解離之 K_{off} 更佳為 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 或 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下。抗體或其抗原結合部分自人類TNF α 解離之 K_{off} 甚至更佳為 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下。

在又一實施例中，抗體或其抗原結合部分較佳含有：具有包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列或自SEQ ID NO: 3藉由在位置1、4、5、7或8處之單一丙胺酸取代修飾而來之胺基酸序列的CDR3域之輕鏈可變區(LCVR)，及具有包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列或自SEQ ID NO: 4藉由在位置2、3、4、5、6、8、9、10或11處之單一丙胺酸取代修飾而來之胺基酸序列的CDR3域之重鏈可變區(HCVR)。較佳地，LCVR進一步具有包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列的CDR2域(亦即D2E7 VL CDR2)且HCVR進一步具有包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的CDR2域(亦即D2E7 VH CDR2)。甚至更佳地，LCVR進一步具有包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的CDR1域(亦即D2E7 VL CDR1)且HCVR具有包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的CDR1域(亦即D2E7 VH CDR1)。VL之架構區較佳來自V κ I人類生殖系家族，更佳來自A20人類生殖系Vk基因且最佳來自美國專利第

6,090,382號之圖1A及1B中所示之D2E7 VL架構序列。VH之架構區較佳來自VH3人類生殖系家族，更佳來自DP-31人類生殖系VH基因且最佳來自美國專利第6,090,382號之圖2A及2B中所示之D2E7 VH架構序列。

因此，在另一實施例中，抗體或其抗原結合部分較佳含有包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列的輕鏈可變區(LCVR)(亦即D2E7 VL)及包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的重鏈可變區(HCVR)(亦即D2E7 VH)。在某些實施例中，抗體包含重鏈恆定區，諸如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區。重鏈恆定區較佳為IgG1重鏈恆定區或IgG4重鏈恆定區。此外，抗體可包含輕鏈恆定區，即 κ 輕鏈恆定區或 λ 輕鏈恆定區。抗體較佳包含 κ 輕鏈恆定區。或者，抗體部分可為例如Fab片段或單鏈Fv片段。

在其他實施例中，本發明包括使用含有D2E7相關VL及VH CDR3域之分離之人類抗體或其抗原結合部分。舉例而言，抗體或其抗原結合部分，其含具有包含選自由以下組成之群的胺基酸序列之CDR3域之輕鏈可變區(LCVR)：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25及SEQ ID NO: 26，或含具有包含選自由以下組成之群的胺基酸序列

之CDR3域之重鏈可變區(HCVR)：SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34及SEQ ID NO: 35。

本發明之方法及組合物中所用之抗體或抗體部分可藉由使免疫球蛋白輕鏈及重鏈基因在宿主細胞中重組表現來製備。為了重組表現抗體，以一或多個攜帶編碼抗體之免疫球蛋白輕鏈及重鏈之DNA片段的重組表現載體轉染宿主細胞，以使得該等輕鏈及重鏈表現於宿主細胞中且較佳分泌於培養有宿主細胞之培養基中，可自該培養基回收抗體。使用標準重組DNA方法獲得抗體重鏈及輕鏈基因，將此等基因併入重組表現載體中，且將該等載體引入宿主細胞中，諸如 Sambrook、Fritsch及 Maniatis (編), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)、Ausubel, F.M.等人(編) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) 及 Boss等人之美國專利第4,816,397號中描述之方法。

為了表現阿達木單抗(D2E7)或阿達木單抗(D2E7)相關抗體，首先獲得編碼輕鏈及重鏈可變區之DNA片段。此等DNA可藉由使用聚合酶鏈反應(PCR)擴增及修飾生殖系輕鏈及重鏈可變序列來獲得。在此項技術中已知人類重鏈及輕鏈可變區基因之生殖系DNA序列(例如參看「Vbase」人類生殖系序列資料庫；亦參看 Kabat, E.A.等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版,

U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版物第 91-3242 號 ; Tomlinson, I.M. 等人 , (1992) 「 The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops 」 J. Mol. Biol. 227:776-798 ; 及 Cox, J.P.L. 等人 , (1994) 「 A Directory of Human Germ-line V78 Segments Reveals a Strong Bias in their Usage 」 Eur. J. Immunol. 24:827-836 ; 該等文獻各自之內容係以引用的方式明確地併入本文中)。為了獲得編碼 D2E7 或 D2E7 相關抗體之重鏈可變區的 DNA 片段，藉由標準 PCR 擴增人類生殖系 VH 基因之 VH3 家族的成員。最佳擴增 DP-31 VH 生殖系序列。為了獲得編碼 D2E7 或 D2E7 相關抗體之輕鏈可變區的 DNA 片段，藉由標準 PCR 擴增人類生殖系 VL 基因之 V κ I 家族的成員。最佳擴增 A20 VL 生殖系序列。可使用標準方法，基於上文引用之參考文獻中所揭示之核苷酸序列來設計適用於擴增 DP-31 生殖系 VH 及 A20 生殖系 VL 序列之 PCR 引子。

一旦獲得生殖系 VH 及 VL 片段，即可使此等序列突變以編碼本文所揭示之 D2E7 或 D2E7 相關胺基酸序列。首先將由生殖系 VH 及 VL DNA 序列編碼之胺基酸序列與 D2E7 或 D2E7 相關 VH 及 VL 胺基酸序列相比較以鑑別 D2E7 或 D2E7 相關序列中不同於生殖系之胺基酸殘基。接著，使用遺傳密碼子確定應進行何種核苷酸變化，使生殖系 DNA 序列中之適當核苷酸突變以便使突變之生殖系序列編碼 D2E7 或 D2E7 相關胺基酸序列。生殖系序列之突變誘發係藉由標

準方法進行，該等方法諸如為PCR介導之突變誘發(其中將突變之核苷酸併入PCR引子中以便使PCR產物含有突變)或定點突變誘發。

此外，應注意若藉由PCR擴增所獲得之「生殖系」序列編碼架構區中與實際生殖系構型不同之胺基酸差異(亦即，例如由於體細胞突變，與實際生殖系序列相比經擴增序列上之差異)，則可能需要將此等胺基酸差異變回實際生殖系序列(亦即將架構殘基「回突變」為生殖系構型)。

一旦獲得編碼D2E7或D2E7相關VH及VL區段之DNA片段(例如如上所述，藉由生殖系VH及VL基因之擴增及突變誘發來獲得)後，此等DNA片段可藉由標準重組DNA技術來進一步操作，例如以將可變區基因轉化為全長抗體鏈基因、轉化為Fab片段基因或轉化為scFv基因。在此等操作中，使編碼VL或VH之DNA片段可操作地連接至編碼另一蛋白質之另一DNA片段，諸如抗體恆定區或可撓性連接子。此情形下所用之術語「可操作地連接」意欲意謂使兩個DNA片段接合以便使由該兩個DNA片段編碼之胺基酸序列保持同框。

可藉由將編碼VH之DNA可操作地連接至編碼重鏈恆定區(CH1、CH2及CH3)之另一DNA分子而將編碼VH區之分離之DNA轉化為全長重鏈基因。人類重鏈恆定區基因之序列在此項技術中為已知的(例如參看Kabat, E.A.等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH

出版物第91-3242號)且可藉由標準PCR擴增來獲得涵蓋此等區域之DNA片段。重鏈恆定區可為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區，但最佳為IgG1或IgG4恆定區。對於Fab片段重鏈基因，可將編碼VH之DNA可操作地連接至僅編碼重鏈CH1恆定區之另一DNA分子。

可藉由將編碼VL之DNA可操作地連接至編碼輕鏈恆定區CL之另一DNA分子而將編碼VL區之分離之DNA轉化為全長輕鏈基因(以及Fab輕鏈基因)。人類輕鏈恆定區基因之序列在此項技術中為已知的(例如參看Kabat, E.A.等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版物第91-3242號)且可藉由標準PCR擴增來獲得涵蓋此等區域之DNA片段。輕鏈恆定區可為 κ 或 λ 恆定區，但最佳為 κ 恆定區。

為了產生scFv基因，使編碼VH及VL之DNA片段可操作地連接至編碼可撓性連接子(例如編碼胺基酸序列(Gly4-Ser)3)之另一片段，以便使VH及VL序列可表現為鄰接單鏈蛋白質，其中VH及VL區藉由可撓性連接子接合(例如參看Bird等人, (1988) Science 242:423-426；Huston等人, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883；McCafferty等人, Nature (1990) 348:552-554)。

為了表現本發明中所用之抗體或抗體部分，將如上所述所獲得之編碼部分或全長輕鏈及重鏈之DNA插入表現載體中，以使得該等基因可操作地連接至轉錄及轉譯控制序

列。在此情形下，術語「可操作地連接」意欲意謂抗體基因接合至載體，以使得該載體內之轉錄及轉譯控制序列發揮其調節抗體基因之轉錄及轉譯的預期功能。選擇與所用表現宿主細胞相容之表現載體及表現控制序列。可將抗體輕鏈基因及抗體重鏈基因插入各別載體中，或更通常將兩種基因插入同一表現載體中。藉由標準方法(例如接合，或若不存在限制性位點，則平端接合(blunt end ligation)抗體基因片段與載體上之互補限制性位點)將抗體基因插入表現載體中。在插入D2E7或D2E7相關輕鏈或重鏈序列之前，表現載體可能已攜帶抗體恆定區序列。舉例而言，一種將D2E7或D2E7相關VH及VL序列轉化為全長抗體基因之方法為將其分別插入已編碼重鏈恆定區與輕鏈恆定區之表現載體中，以便使VH區段可操作地連接至載體內之CH區段且使VL區段可操作地連接至載體內之CL區段。或者或另外，重組表現載體可編碼有助於自宿主細胞分泌抗體鏈之信號肽。可將抗體鏈基因選殖至載體中，以使得信號肽同框連接至抗體鏈基因之胺基端。信號肽可為免疫球蛋白信號肽或異源信號肽(亦即來自非免疫球蛋白之信號肽)。

除抗體鏈基因外，本發明之重組表現載體攜帶控制抗體鏈基因在宿主細胞中之表現的調節序列。術語「調節序列」意欲包括控制抗體鏈基因之轉錄或轉譯之啟動子、強化子及其他表現控制元件(例如聚腺苷酸化信號)。此等調節序列例如描述於Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego,

CA (1990)。熟習此項技術者應瞭解，表現載體之設計(包括調節序列之選擇)可視諸如欲轉型之宿主細胞之選擇、所需蛋白質之表現程度等之因素而定。用於哺乳動物宿主細胞表現之較佳調節序列包括引導哺乳動物細胞中之高度蛋白質表現之病毒元件，諸如源自細胞巨大病毒(CMV)(諸如CMV啟動子/強化子)、猿猴病毒40(SV40)(諸如SV40啟動子/強化子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))及多瘤病毒之啟動子及/或強化子。關於病毒調節元件及其序列之進一步的描述，例如參看Stinski之美國專利第5,168,062號、Bell等人之美國專利第4,510,245號及Schaffner等人之美國專利第4,968,615號。

除抗體鏈基因及調節序列外，本發明中所用之重組表現載體可攜帶額外序列，諸如調節宿主細胞中之載體複製之序列(例如複製起點)及可選標記基因。可選標記基因有助於選擇已引入有載體之宿主細胞(例如參看均由Axel等人著之美國專利第4,399,216號、第4,634,665號及第5,179,017號)。舉例而言，通常，可選標記基因賦予已引入有載體之宿主細胞對藥物(諸如G418、潮黴素(hygromycin)或甲胺喋呤(methotrexate))之抗性。較佳之可選標記基因包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(用於在dhfr-宿主細胞中進行甲胺喋呤選擇/擴增)及neo基因(用於G418選擇)。

為了表現輕鏈及重鏈，藉由標準技術將編碼重鏈及輕鏈之表現載體轉染至宿主細胞中。術語「轉染」之各種形式

意欲涵蓋將外源性DNA引入原核或真核宿主細胞中之多種常用技術，例如電穿孔、磷酸鈣沈澱、DEAE-聚葡萄糖轉染及其類似技術。儘管理論上有可能在原核或真核宿主細胞中表現本發明之抗體，但在真核細胞及最佳在哺乳動物宿主細胞中表現抗體為最佳的，此係因為此等真核細胞及尤其哺乳動物細胞比原核細胞更有可能組裝及分泌適當摺疊及具免疫活性之抗體。據報導，抗體基因之原核表現不能有效地以高產率產生活性抗體(Boss, M.A.及Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13)。

用於表現本發明之重組抗體的較佳哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞)(包括在Urlaub及Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中所述之dhfr-CHO細胞，其與例如在R.J. Kaufman及P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621中所述之DHFR可選標記一起使用)、NS0骨髓瘤細胞、COS細胞及SP2細胞。當將編碼抗體基因之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞中時，藉由將宿主細胞培養足以使抗體在宿主細胞中表現或更佳使抗體分泌至宿主細胞所生長之培養基中的一段時間來產生抗體。可使用標準蛋白質純化方法自培養基回收抗體。

宿主細胞亦可用以產生完整抗體之部分，諸如Fab片段或scFv分子。應瞭解，上述程序之變化屬於本發明之範疇內。舉例而言，可能需要用編碼本發明抗體之輕鏈或重鏈(但並非兩者)之DNA轉染宿主細胞。亦可使用重組DNA技術來移除一些或所有編碼對於結合於hTNF α 並非必需之輕

鏈與重鏈中之任一者或兩者的DNA。本發明之抗體亦涵蓋由此等截短之DNA分子表現之分子。另外，可藉由標準化學交聯方法使本發明之抗體與第二抗體交聯來產生雙功能抗體，其中一條重鏈及一條輕鏈屬於本發明之抗體而其他重鏈及輕鏈對於除hTNF α 以外之抗原具有特異性。

在用於重組表現本發明之抗體或其抗原結合部分的較佳系統中，藉由磷酸鈣介導之轉染將編碼抗體重鏈與抗體輕鏈兩者之重組表現載體引入dhfr-CHO細胞中。在重組表現載體內，抗體重鏈及輕鏈基因各自可操作地連接至CMV強化子/AdMLP啟動子調節元件以達成該等基因之高度轉錄。重組表現載體亦攜帶DHFR基因，其允許使用甲胺喋呤選擇/擴增來選擇已經載體轉染之CHO細胞。培養所選轉型體宿主細胞以允許表現抗體重鏈及輕鏈且自培養基回收完整抗體。使用標準分子生物學技術來製備重組表現載體、轉染宿主細胞、選擇轉型體、培養宿主細胞及自培養基回收抗體。

鑒於上文，可用於重組表現本發明中所用之抗體及抗體部分的核酸、載體及宿主細胞組合物包括核酸以及包含該等核酸、包含人類TNF α 抗體阿達木單抗(D2E7)之載體。編碼D2E7輕鏈可變區之核苷酸序列如SEQ ID NO: 36所示。LCVR之CDR1域涵蓋核苷酸70-102，CDR2域涵蓋核苷酸148-168且CDR3域涵蓋核苷酸265-291。編碼D2E7重鏈可變區之核苷酸序列如SEQ ID NO: 37所示。HCVR之CDR1域涵蓋核苷酸91-105，CDR2域涵蓋核苷酸148-198且

CDR3域涵蓋核苷酸295-330。熟習此項技術者應瞭解，編碼D2E7相關抗體或其部分(例如CDR域，諸如CDR3域)之核苷酸序列可來源於使用遺傳密碼子及標準分子生物學技術編碼D2E7 LCVR及HCVR之核苷酸序列。

在一個實施例中，液體醫藥調配物包含與抗體阿達木單抗生物等效或生物類似之人類TNF α 抗體或其抗原結合部分。在一個實施例中，生物類似性抗體為當與參考抗體(例如阿達木單抗)相比時不顯示臨床上有意義之差異的抗體。生物類似性抗體具有與參考抗體(例如阿達木單抗)等效之安全性、純度及效能。

IV.本發明之調配物的投與

本發明調配物之一個優勢在於可用於以皮下方式向個體傳遞高濃度之人類抗-TNF α 抗體或抗原結合部分(例如阿達木單抗)。因此，在一個實施例中，以皮下方式向個體傳遞本發明之調配物。在一個實施例中，個體向自己投與調配物。

在一個實施例中，投與有效量之調配物。用語調配物之「有效量」為對於抑制TNF α 活性，例如預防有害TNF α 活性相關狀態之各種形態學症狀及軀體症狀(somatic symptom)必需或足夠之量。在另一實施例中，調配物之有效量為達成所需結果必需之量。調配物之有效量的實例為足以抑制有害TNF α 活性或治療TNF α 活性有害之病症的量。

如本文中所用之術語「TNF α 活性有害之病症」意欲包括在罹患病症之個體體內存在TNF α 已顯示或被懷疑為造

成該病症之病理生理之原因或為促使該病症惡化之因素的疾病或其他病症。因此，TNF α 活性有害之病症為預期抑制TNF α 活性可緩解病症之症狀及/或進展的病症。此等病症之跡象可為例如罹患病症之個體之生物流體中的TNF α 濃度升高(例如個體之血清、血漿、滑液等中的TNF α 濃度升高)，其可例如使用抗-TNF α 抗體來偵測。

如下文在隨附實例中所述，本發明調配物之一個優勢在於可製備包含高濃度抗體之調配物但不會增加調配物黏度的能力。因此，亦如下所述，新穎調配物允許較之先前市售的調配物以較小體積投與高量(例如有效量)之抗體，藉此減小疼痛。

在一個實施例中，抗體之有效量可根據嚴格基於重量之給藥方案(例如mg/kg)來確定或可為與重量無關之全身劑量(亦稱作固定劑量)。在一個實例中，有效量之調配物為0.8 mL含有約80 mg抗體之全身劑量的調配物(亦即0.8 mL之100 mg/mL本發明之抗體調配物)。在另一實例中，有效量之調配物為0.4 mL含有約40 mg抗體之全身劑量的本發明調配物(亦即0.4 mL之100 mg/mL本發明之抗體調配物)。在又一實例中，有效量之調配物為兩次0.8 mL含有約160 mg抗體之全身劑量的調配物(亦即兩個各自含有0.8 mL之100 mg/mL本發明之抗體調配物的單元)。在另一實例中，有效量之調配物為0.2 mL含有約20 mg抗體之全身劑量的本發明調配物(亦即0.2 mL之100 mg/mL本發明之抗體調配物)。或者，有效量可根據基於重量之固定給藥方

案來確定(例如參看 WO 2008/154543，其以引用的方式併入本文中)。

本發明提供一種存放期延長之穩定的高濃度調配物，其在一個實施例中用以在罹患 TNF α 活性有害之病症的個體中抑制 TNF α 活性，該使用包含投與該個體本發明之調配物以便抑制該個體體內之 TNF α 活性。較佳地，TNF α 為人類 TNF α 且個體為人類個體。或者，個體可為表現與本發明之抗體交叉反應之 TNF α 的哺乳動物。此外，個體可為已引入有 hTNF α (例如藉由投與 hTNF α 或藉由表現 hTNF α 轉殖基因來達成)之哺乳動物。

可出於治療目的對人類個體投與本發明之調配物(在下文作進一步論述)。在本發明之一個實施例中，液體醫藥調配物易於投與，其包括例如可由患者自我投與之調配物。在一個較佳實施例中，經由皮下注射投與本發明之調配物，較佳為單次使用。此外，可投與表現與抗體交叉反應之 TNF α 的非人類哺乳動物(例如靈長類動物、豬或小鼠)本發明之調配物以達獸醫學目的或作為人類疾病之動物模型。關於後者，此等動物模型可適用於評估本發明抗體之治療功效(例如測試投藥之劑量及時程)。

在一個實施例中，可經由預填充注射器、自動注射筆或無針投藥裝置來投與個體本發明之液體醫藥調配物。因此，本發明亦提供一種包含本發明之液體醫藥調配物的自動注射筆、預填充注射器或無針投藥裝置。在一個實施例中，本發明提供一種包含含有 100 mg/mL 人類 TNF α 抗體或

其抗原結合部分之調配物之劑量的傳遞裝置，例如包含以下劑量之自動注射筆或預填充注射器：約 19 mg、20 mg、21 mg、22 mg、23 mg、24 mg、25 mg、26 mg、27 mg、28 mg、29 mg、30 mg、31 mg、32 mg、33 mg、34 mg、35 mg、36 mg、37 mg、38 mg、39 mg、40 mg、41 mg、42 mg、43 mg、44 mg、45 mg、46 mg、47 mg、48 mg、49 mg、50 mg、51 mg、52 mg、53 mg、54 mg、55 mg、56 mg、57 mg、58 mg、59 mg、60 mg、61 mg、62 mg、63 mg、64 mg、65 mg、66 mg、67 mg、68 mg、69 mg、70 mg、71 mg、72 mg、73 mg、74 mg、75 mg、76 mg、77 mg、78 mg、79 mg、80 mg、81 mg、82 mg、83 mg、84 mg、85 mg、86 mg、87 mg、88 mg、89 mg、90 mg、91 mg、92 mg、93 mg、94 mg、95 mg、96 mg、97 mg、98 mg、99 mg、100 mg、101 mg、102 mg、103 mg、104 mg、105 mg 等之調配物。

本發明之調配物較佳用以治療 TNF α 活性有害之病症。如本文中所用之術語「TNF α 活性有害之病症」意欲包括在罹患病症之個體體內存在 TNF α 已顯示或被懷疑為造成該病症之病理生理之原因或為促使該病症惡化之因素的疾病或其他病症。因此，TNF α 活性有害之病症為預期抑制 TNF α 活性可緩解病症之症狀及/或進展的病症。此等病症之跡象可為例如罹患病症之個體之生物流體中的 TNF α 濃度升高(例如個體之血清、血漿、滑液等中的 TNF α 濃度升高)，其可例如使用如上所述之抗-TNF α 抗體來偵測。

關於TNF α 活性有害之病症存在有眾多實例。TNF α 活性有害之實例亦描述於美國專利第6,015,557號；第6,177,077號；第6,379,666號；第6,419,934號；第6,419,944號；第6,423,321號；第6,428,787號；及第6,537,549；以及PCT公開案第WO 00/50079號及第WO 01/49321號，所有該等文獻之全部內容係以引用的方式併入本文中。本發明之調配物亦可用以治療TNF α 活性有害之病症，如在美國專利第6,090,382號、第6,258,562號及美國專利申請公開案第US20040126372號中所述，所有該等文獻之全部內容係以引用的方式併入本文中。

下文進一步討論本發明之調配物在治療特定例示性病症中之用途。

A. 敗血症

腫瘤壞死因子在敗血症之病理生理學中具有已確定的作用，以及包括以下之生物效應：低血壓、心肌抑制(myocardial suppression)、血管滲漏症候群(vascular leakage syndrome)、器官壞死、刺激釋放毒性第二介體(toxic secondary mediator)及活化凝血級聯(例如參看Tracey, K. J.及Cerami, A. (1994) Annu. Rev. Med. 45:491-503；Russell, D及Thompson, R. C. (1993) Curr. Opin. Biotech. 4:714-721)。因此，本發明之調配物可用以治療任一種臨床背景下之敗血症，包括敗血性休克、內毒素休克、革蘭氏陰性敗血症(gram negative sepsis)及毒性休克症候群。

此外，為了治療敗血症，本發明之調配物可與一或多種可進一步緩解敗血症之其他治療劑共投與，該等其他治療劑諸如為介白素-1抑制劑(諸如PCT公開案第WO 92/16221號及第WO 92/17583號中所述者)、細胞激素介白素-6(例如參看PCT公開案第WO 93/11793號)或血小板活化因子拮抗劑(例如參看歐洲專利申請公開案第EP 374 510號)。

另外，在一個較佳實施例中，在治療之時，在IL-6血清或血漿濃度為500 pg/ml以上及更佳為1000 pg/ml之敗血症患者子群內對人類個體投與本發明之調配物(參看PCT公開案第WO 95/20978號)。

B. 自體免疫疾病

腫瘤壞死因子已涉及在各種自體免疫疾病之病理生理學中起作用。舉例而言，TNF α 已涉及在類風濕性關節炎中觸發組織發炎且引起關節破壞(例如參看Tracey及Cerami, 同上文；Arend, W. P.及Dayer, J-M. (1995) Arth. Rheum. 38:151-160；Fava, R. A.等人, (1993) Clin. Exp. Immunol. 94:261-266)。TNF α 亦已涉及在糖尿病中促進胰島細胞死亡及介導胰島素抗性(例如參看Tracey及Cerami, 同上文；PCT公開案第WO 94/08609號)。TNF α 亦已涉及在多發性硬化症中介導對寡樹突神經膠質細胞之細胞毒性及誘導產生發炎性斑塊(例如參看Tracey及Cerami, 同上文)。亦包括於自體免疫疾病中之可使用本發明調配物治療的疾病為青少年特發性關節炎(JIA)(亦稱作青少年類風濕性關節炎)(參看Grom等人, (1996) Arthritis Rheum. 39:1703；

Mangge 等人, (1995) Arthritis Rheum. 8:211)。

本發明之調配物可用以治療自體免疫疾病，尤其與發炎相關之自體免疫疾病，包括類風濕性關節炎、類風濕性脊椎炎(亦稱作僵直性脊椎炎)、骨關節炎及痛風性關節炎、過敏症、多發性硬化症、自體免疫糖尿病、自體免疫性葡萄膜炎、青少年特發性關節炎(亦稱作青少年類風濕性關節炎)及腎病症候群。

C. 傳染性疾病

腫瘤壞死因子已涉及介導在各種傳染性疾病中觀察到之生物效應。舉例而言，TNF α 已涉及在瘧疾中介導腦部發炎及毛細管血栓與梗塞(例如參看 Tracey 及 Cerami，同上文)。TNF α 亦已涉及在腦膜炎中介導腦部發炎、誘發血腦障壁破裂、引發敗血性休克症候群及觸發靜脈梗塞(例如參看 Tracey 及 Cerami，同上文)。TNF α 亦已涉及在後天性免疫不全症候群(AIDS)中誘發惡病質、刺激病毒增殖及介導中樞神經系統損傷(例如參看 Tracey 及 Cerami，同上文)。因此，本發明之抗體及抗體部分可用於治療傳染性疾病，包括細菌性腦膜炎(例如參看歐洲專利申請公開案第 EP 585 705 號)、腦部瘧疾、AIDS 及 AIDS 相關複合症(AIDS-related complex/ARC)(例如參看歐洲專利申請公開案第 EP 230 574 號)以及繼發於移植之細胞巨大病毒感染(例如參看 Fietze, E. 等人, (1994) Transplantation 58:675-680)。本發明之調配物亦可用以緩解與傳染性疾病相關之症狀，包括由感染(諸如流感)所致之發燒及肌痛以及繼發

於感染(例如繼發於AIDS或ARC)之惡病質。

D. 移植

腫瘤壞死因子已涉及作為同種異體移植排斥反應及移植物抗宿主疾病(GVHD)之關鍵介體且涉及介導當針對T細胞受體CD3複合物之大鼠抗體OKT3用以抑制腎移植排斥反應時所觀察到之不良反應(例如參看Tracey及Cerami, 同上文; Eason, J. D.等人, (1995) Transplantation 59:300-305; Suthanthiran, M.及Strom, T. B. (1994) New Engl. J. Med. 331:365-375)。因此, 本發明之調配物可用以抑制移植排斥反應, 包括同種異體移植及異種移植之排斥反應, 且用以抑制GVHD。儘管抗體或抗體部分可單獨使用, 但其亦可與一或多種能抑制針對同種異體移植之免疫反應或抑制GVHD的其他藥劑組合使用。舉例而言, 在一個實施例中, 將本發明之調配物與OKT3組合使用以抑制OKT3誘導之反應。在另一實施例中, 將本發明之調配物與一或多種針對與調節免疫反應有關之其他目標之抗體組合使用, 該等其他目標諸如為細胞表面分子CD25(介白素-2受體- α)、CD11a(LFA-1)、CD54(ICAM-1)、CD4、CD45、CD28/CTLA4、CD80(B7-1)及/或CD86(B7-2)。在又一實施例中, 將本發明之調配物與一或多種一般免疫抑制劑(諸如環孢素A或FK506)組合使用。

E. 惡性疾病

腫瘤壞死因子已涉及在惡性疾病中誘發惡病質、刺激腫瘤生長、增強轉移潛力及介導細胞毒性(例如參看Tracey及

Cerami，同上文)。因此，本發明之調配物可用於治療惡性疾病，以抑制腫瘤生長或轉移及/或緩解繼發於惡性疾病之惡病質。

F.肺病

腫瘤壞死因子已涉及成人呼吸窘迫症候群之病理生理學，包括刺激白血球-內皮細胞活化、將細胞毒性引向肺細胞及誘發血管滲漏症候群(例如參看 Tracey 及 Cerami，同上文)。因此，本發明之調配物可用以治療各種肺病，包括成人呼吸窘迫症候群(例如參看 PCT 公開案第 WO 91/04054 號)、休克肺、慢性肺部發炎性疾病、肺部類肉瘤病、肺纖維化及矽粉沈著病。

G.腸病

腫瘤壞死因子已涉及發炎性腸病之病理生理學(例如參看 Tracy, K. J. 等人, (1986) Science 234:470-474; Sun, X-M. 等人, (1988) J. Clin. Invest. 81:1328-1331; MacDonald, T. T. 等人, (1990) Clin. Exp. Immunol. 81:301-305)。已對嵌合鼠類抗-hTNF α 抗體進行了治療克隆氏病之臨床測試(van Dullemen, H. M. 等人, (1995) Gastroenterology 109:129-135)。本發明之調配物亦可用以治療腸病(諸如特發性發炎性腸病)，其包括兩種症候群，即克隆氏病及潰瘍性結腸炎。

H.心臟病

本發明之調配物亦可用以治療各種心臟病，包括心臟局部缺血(例如參看歐洲專利申請公開案第 EP 453 898 號)及

心臟機能不全(heart insufficiency)(心肌虛弱)(例如參看 PCT公開案第 WO 94/20139號)。

I. 脊椎關節病

TNF α 已涉及多種病症之病理生理學，該等病症包括發炎疾病，諸如脊椎關節病(例如參看 Moeller, A. 等人, (1990) Cytokine 2:162-169；Moeller 等人之美國專利第 5,231,024號；Moeller, A之歐洲專利公開案第 260 610 B1 號)。可用本發明調配物治療之脊椎關節病的實例包括牛皮癬性關節炎。腫瘤壞死因子已涉及牛皮癬性關節炎之病理生理學(Partsch 等人, (1998) Ann Rheum Dis. 57:691；Ritchlin 等人, (1998) J Rheumatol. 25:1544)。

J. 皮膚和指甲病症

在一個實施例中，將本發明之調配物用以治療皮膚及指甲病症。如本文中所用之術語「TNF α 活性有害之皮膚及指甲病症」意欲包括在罹患病症之個體體內存在TNF α 已顯示或被懷疑為造成該病症之病理生理之原因或為促使該病症惡化之因素的皮膚及/或指甲病症及其他病症，例如牛皮癬。可使用本發明調配物治療的皮膚病之實例為牛皮癬。在一個實施例中，將本發明之調配物用以治療斑塊牛皮癬。腫瘤壞死因子已涉及牛皮癬之病理生理學(Takematsu 等人, (1989) Arch Dermatol Res. 281:398；Victor及Gottlieb (2002) J Drugs Dermatol. 1(3):264)。

在一個實施例中，將本發明之調配物用以治療類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎或僵直性脊椎炎。可根據可有效

治療類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎或僵直性脊椎炎之給藥方案及劑量，對人類個體投與包含分離之人類TNF α 抗體或其抗原結合部分(例如阿達木單抗)之本發明調配物。在一個實施例中，每隔一週對人類個體投與如下劑量：在本發明調配物中具有約40 mg之人類TNF α 抗體或其抗原結合部分(例如阿達木單抗)(例如0.4 mL之100 mg/mL本發明調配物)，以便治療類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎或僵直性脊椎炎。在一個實施例中，每隔一週經皮下投與調配物(亦稱作每兩週，參看以引用的方式併入本文中之US 20030235585中所述之投藥方法)，以治療類風濕性關節炎、僵直性脊椎炎或牛皮癬性關節炎。

在一個實施例中，將本發明之調配物用以治療克隆氏病。可根據可有效治療克隆氏病之給藥方案及劑量，對人類個體投與包含分離之人類TNF α 抗體或其抗原結合部分(例如阿達木單抗)之本發明調配物。在一個實施例中，最初在約第1天時，對人類個體投與如下劑量：在本發明調配物中具有約160 mg之人類TNF α 抗體或其抗原結合部分(例如阿達木單抗)(例如1.6 mL之100 mg/mL本發明調配物)，接著在兩週後投與後續劑量：80 mg抗體(例如0.8 mL之100 mg/mL本發明調配物)，接著每隔一週投與約40 mg(例如0.4 mL之100 mg/mL本發明調配物)，以便治療克隆氏病。在一個實施例中，根據包含誘導劑量及維持劑量之多個可變劑量的方案，經皮下投與調配物，以治療克隆氏病(關於治療克隆氏病，例如參看美國專利公開案第US

20060009385號及第US 20090317399號，其各自以引用的方式併入本文中)。

在一個實施例中，使用本發明調配物治療牛皮癬。可根據可有效治療牛皮癬之給藥方案及劑量，對人類個體投與包含分離之人類TNF α 抗體或其抗原結合部分(例如阿達木單抗)之本發明調配物。在一個實施例中，對人類個體投與如下初始劑量：在本發明調配物中具有約80 mg之人類TNF α 抗體或其抗原結合部分(例如阿達木單抗)(例如0.8 mL之100 mg/mL本發明調配物)，接著在初始劑量之後一週開始每隔一週投與後續劑量：40 mg抗體(例如0.4 mL之100 mg/mL本發明調配物)。在一個實施例中，根據包含誘導劑量及維持劑量之多個可變劑量的方案(例如參看US 20060009385及WO 2007/120823，其各自以引用的方式併入本文中)皮下投與調配物，以治療牛皮癬。

在一個實施例中，將本發明之調配物用以治療青少年特發性關節炎(JIA)。可根據可有效治療JIA之給藥方案及劑量，對人類個體投與包含分離之人類TNF α 抗體或其抗原結合部分(例如阿達木單抗)之本發明調配物。在一個實施例中，每隔一週投與重15 kg(約33 lb)至小於30 kg(66 lb)之個體如下劑量：在本發明調配物中具有20 mg之人類TNF α 抗體或其抗原結合部分(例如0.2 mL之100 mg/mL本發明調配物)，以便治療JIA。在另一實施例中，每隔一週投與重大於或等於30 kg(66 lb)之個體如下劑量：在本發明調配物中具有40 mg之人類TNF α 抗體或其抗原結合部分(例

如 0.4 mL 之 100 mg/mL 本發明調配物)，以便治療 JIA。在一個實施例中，根據基於重量之固定劑量(例如參看美國專利公開案第 20090271164 號，其係以引用的方式併入本文中)皮下投與調配物，以治療 JIA。

在一個實施例中，可根據按月給藥時程(藉此每月一次或每四週一次投與抗體)，對人類個體投與分離之人類 TNF α 抗體或其抗原結合部分(例如阿達木單抗)，以治療與有害 TNF α 活性相關之病症。如上所述，可根據按月給藥時程治療之病症的實例包括(但不限於)類風濕性關節炎、僵直性脊椎炎、JIA、牛皮癬、克隆氏病或牛皮癬性關節炎。因此，可根據按月給藥時程，對人類個體投與包含分離之人類 TNF α 抗體或其抗原結合部分(例如阿達木單抗)之本發明調配物以治療與有害 TNF α 活性相關之病症。在一個實施例中，投與患有與有害 TNF α 活性相關之病症的個體如下劑量：在本發明調配物中具有 80 mg 之人類 TNF α 抗體或其抗原結合部分(例如 0.8 mL 之 100 mg/mL 本發明調配物)。

本文所述之劑量可以單次劑量形式(例如 40 mg(0.4 mL) 或 80 mg 劑量(0.8 mL)之單次劑量)傳遞，或者可以多次劑量形式傳遞(例如四次 40 mg 劑量或兩次 80 mg 劑量以傳遞 160 mg 劑量)。

包含分離之人類 TNF α 抗體或其抗原結合部分(例如阿達木單抗)之本發明調配物亦可與其他治療劑組合投與個體。在一個實施例中，將該調配物與甲胺喋呤或其他改變

病情之抗風濕藥 (disease-modifying anti-rheumatic drug/DMARD) 組合投與人類個體，以治療類風濕性關節炎。在另一實施例中，將該調配物與甲胺喋呤或其他改變病情之抗風濕藥 (DMARD) 組合投與人類個體，以治療 JIA。其他組合療法描述於美國專利第 6,258,562 號及第 7,541,031 號以及美國專利公開案第 US20040126372 號中，所有該等文獻之全部內容均以引用的方式併入本文中。

包含人類 TNF α 抗體或其抗原結合部分之本發明調配物亦可用以治療先前 TNF 抑制劑療法失敗之個體，例如已對英利昔單抗 (infliximab) 失去反應或不能耐受英利昔單抗之個體。

在以下實例中進一步說明本發明，但不應將該等實例視為作進一步限制。

實例

實例 1：改良人類抗-TNF α 抗體液體醫藥調配物之穩定性

此實例提供旨在改良抗體阿達木單抗之醫藥調配物之穩定性的實驗之結果。

材料及方法

將阿達木單抗 (子類 G₁，約 47 kDa) 調配於經改質之醫藥調配物中以便產生最終藥物濃度為 50 mg/mL 之液體非經腸劑型。先前調配實驗已確定，在阿達木單抗之蛋白質穩定化方面，磷酸鹽/檸檬酸鹽緩衝系統優於其他緩衝系統。因此，經由添加賦形劑 (液體，50 mg/mL 劑量) 來改良穩定性。所用之所有賦形劑均具有最高純度 (「pro 分析」級) 且

購自 Merck KGaA, Darmstadt, Germany。甘露糖醇來源於 Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland。

根據 Ph. Eur. 2002 之規則 (§ 2.9.20 Contamination with particulate matter-visible particles) 進行可見微粒物質之分析。藉由光阻法 (light obscuration) (SVSS-C⁴⁰, PAMAS GmbH, Rutesheim, Germany) 確定次可見 (Subvisible) 微粒物質分析。將 Superose TM6 10/30 柱 (Amersham Pharmacia Europe GmbH, Freiburg, Germany) 用於 SE-HPLC 分析 (估算蛋白質單體含量)，應用 0.5 mL/min 流動速率之 PBS 緩衝液 (pH 7.5)，且連接至 UV₂₈₀ 分光光度測定、折射率偵測及 MALS 以進行線上偵測。至少一式三份地進行各樣本之分析。除非另外陳述，否則所有 SE-HPLC 數據 S_{rel} 均在 0.13 以下且所有光阻數據均在 2.3 以下。

經由以賦形劑儲備溶液稀釋阿達木單抗濃縮物 (約 70 mg/mL) 來製備個別蛋白質調配物。使用如表 16 中所列之檸檬酸鹽與磷酸鹽緩衝組分之組合物 (亦即檸檬酸 *H₂O、脫水檸檬酸鈉、Na₂HPO₄*2H₂O、NaH₂PO₄*2H₂O) 來製備 70 mg/mL 阿達木單抗儲備溶液。

藉由使用如表 16 中所列之檸檬酸鹽與磷酸鹽緩衝組分之組合物 (亦即檸檬酸 *H₂O、脫水檸檬酸鈉、Na₂HPO₄*2H₂O、NaH₂PO₄*2H₂O) 將賦形劑溶解於磷酸鹽 / 檸檬酸鹽緩衝介質中來產生賦形劑儲備溶液。在無菌過濾 (0.2 µm, Minisart[®], Sartorius AG, Goettingen, Germany) 之前，藉由添加緩衝組分之酸 / 鹼樣品來調節 pH 值。所有調

配物均至少以一式兩份製備，且經由將溶液批料在無菌層狀氣流條件(aseptic laminar air flow condition)下最終無菌過濾於經加熱殺菌(180℃，25分鐘)之2R玻璃小瓶(Schott Glas, Mainz, Germany)中來產生。在使用之前根據Ph. Eur.經由濕熱(121℃)將塗佈鐵氟龍(Teflon)之丁基橡膠封蓋殺菌。

使各種調配物在三種不同溫度(5℃、25℃、40℃)下短時儲存3個月。

藉由使用磷酸鹽/檸檬酸鹽緩衝介質進行緩衝液更換，經由 Vivaflow 50 單元 (截斷 50 kDa，Vivascience G, Hannover, Germany)透濾阿達木單抗本體溶液來提供阿達木單抗濃縮物。生物醫藥溶液之濃縮及緩衝液更換的當前方法係基於 IEX、SE-HPLC、超濾/透濾及切向流過濾(Christy等人, (2002) Desalination, 144:133-136)。因為在具有可變流動力學之單一單元操作內可能存在純化、濃縮及緩衝液更換，所以應用透濾，由此將蛋白質應力減到最小(表1)。

表1.蛋白質損失與透濾循環次數之相關性

透濾循環次數	蛋白質濃度(mg/mL)
1	72.81
2	72.7
3	72.51
4	72.34
5	72.02
6	71.79
7	71.53
8	71.25
9	71
10	70.67



所進行之各循環造成約0.25%總蛋白質之蛋白質損失。
在濃縮製造之過程中，蛋白質損失一般不超過7%。

在一個透濾循環內，蛋白質濃度加倍且將其再稀釋至原始濃度(除了末端濃縮步驟外)。因此，可有效移除不希望存在之不合需要之溶解物質(例如1.00%濃度可在十個透濾循環內減小至0.00098%)。在純化及濃縮之後，離心(5°C，3000 g，20分鐘)阿達木單抗濃縮物。

估算最佳pH值

為了估算最佳溶液pH值(亦即pH 5.2或pH 6.0)，分析兩種僅僅pH值不同之不同阿達木單抗調配物。表2A及2B中說明含有1 mg/mL吐溫80之調配物的穩定性資料。

表2A.在40°C儲存期間調配物pH值對單體含量之影響

儲存時間(週)	在pH 5.2下之單體含量(%)	在pH 6.0下之單體含量(%)
0	98.9	98.86
1	98.59	98.19
4	97.54	97.01
12	95.53	95.53

表2B.在儲存期間調配物pH值對次可見微粒物質形成之影響

儲存溫度(°C)	在pH 5.2下每毫升>1 µm之次可見粒子含量	在pH 6.0下每毫升>1 µm之次可見粒子含量
5	3564	179329
25	2547	50898
40	1532	36556

關於單體含量，未發現一個pH值優於另一pH值，此係因為兩種調配物在40°C儲存時顯示相當之單體損失。25°C儲存條件之資料類似於40°C之資料，然而在5°C下所有在此研究過程中分析之蛋白質溶液的單體含量均未經歷顯著

變化。

然而，發現濁度有差異。不論儲存溫度如何，6.0之溶液pH值使得在12週之儲存期間形成次可見微粒物質。因為微粒物質形成強度與較低溫度有關，所以粒子來源不被視為蛋白質源性的。就此而言，若嚴重之微粒物質形成僅僅係由於蛋白質不穩定，則此將與在儲存測試期間暴露於高溫有關(Constantino等人, (1994b) J. Pharm. Sci. 83: 1662-1669)。

關於含有6.16 mg/mL NaCl代替吐溫80之50 mg/mL阿達木單抗調配物，添加鹽導致形成次可見粒子，在兩種溶液中大於1 μm 之粒子數增加的程度類似(參看表3A及3B)。此外，在12週之後，SE-HPLC資料顯示pH 6.0溶液具有大於pH 5.2溶液之單體含量，但差異極小(約0.3%)且未被25°C之結果確證。

表3A.在40°C儲存期間pH值對單體含量之影響

儲存時間(週)	在pH 5.2下之單體含量(%)	在pH 6.0下之單體含量(%)
0	98.9	98.7
1	98.59	98.11
4	97.46	96.97
12	95.29	95.22

表3B.在儲存期間pH值對次可見微粒物質形成(B)之影響

儲存溫度(°C)	在pH 5.2下每毫升>1 μm 之次可見粒子含量	在pH 6.0下每毫升>1 μm 之次可見粒子含量
5	127707	241222
25	17760	80404
40	91356	180084

粒子形成似乎因NaCl添加及pH 6.0儲存而受到促進，且因添加吐溫80及溶液pH值為5.2而改良。因此，建議吐溫

80作為能減少含有鹽(諸如NaCl)之溶液中之粒子污染的成分(表4A及4B)。接著檢驗含有6.16 mg/mL NaCl與1 mg/mL 吐溫80之溶液。

表4A.在儲存期間pH值對單體含量之影響

儲存時間(週)	在pH 5.2下之單體含量(%)	在pH 6.0下之單體含量(%)
0	98.9	98.7
1	98.59	98.11
4	97.46	96.97
12	95.29	95.22

表4B.在40℃儲存期間pH值對次可見微粒物質形成之影響

儲存溫度(℃)	在pH 5.2下每毫升>1 μm之次可見粒子含量	在pH 6.0下每毫升>1 μm之次可見粒子含量
5	152196	365213
25	61622	141182
40	111053	249876

如表4B中所示，對於包含鹽及界面活性劑之調配物，添加界面活性劑對次可見粒子之形成不具有影響，因為儘管添加吐溫80但次可見粒子仍為明顯的。有趣的是，在所有樣本中，在最低儲存溫度(5℃)下粒子數均為最多，此表明粒子來源可能歸因於無機材料。此外，含鹽溶液之目視檢驗顯示：不論儲存溫度如何，在儲存4週之後均略微混濁。可見無機組分之沈澱可為在低溫下儲存之結果，即使儲存為暫時性的亦然，例如磷酸鈉緩衝液在4℃下會產生相對不可溶之 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Borchert等人, (1986) PDA J. Pharm. Sci. Technol., 40:212-241)。然而，就以微粒物質作為評估準則而言，pH值為5.2之溶液較之pH值為6.0之檢驗溶液具有優勢。

然而，關於單體含量，在儲存期間兩種溶液pH值得到相

同的單體含量，且在含NaCl之調配物(無吐溫80)之情況下，pH 6.0似乎顯示略更高之穩定性。儘管存在此類似之單體概況，但通常認為，在接近中性或甚至鹼性之pH值條件下，蛋白質傾向於具有廣泛各種潛在降解機制(Wang (1999) Int. J. Pharm., 185:129-188)，例如非離子化蛋白質鹽胺之羰基胺反應、(鹼催化) β -消除及脫鹽胺因較高pH值以及各種氧化反應而受到促進(Akers及DeFelippis, Peptides and proteins as parenteral solutions, Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins, Frokjaer, S ; Hovgaard, L.編 (2000) 145-177)。因此，總而言之，就50 mg/mL阿達木單抗之長期穩定性而言，5.2之溶液pH值被認為優於6.0之值。

藉由賦形劑：界面活性劑來穩定化

為了測定界面活性劑對50 mg/mL阿達木單抗調配物之穩定化潛力，將各種量之吐溫80(0.%、0.03%、0.1%)添加至含有6.16 mg/mL NaCl之蛋白質溶液中。一般認為吐溫80例如藉由疏水性表面相互作用進行結合來穩定化蛋白質。因為鹽之存在會影響蛋白質表面特徵，所以另外研究不存在NaCl之影響(在表5中描述為無NaCl之0.1%吐溫80溶液)(亦參看Kheirrolomoom等人，(1998) Biochem. Eng. J., 2:81-88)。

表 5. 吐溫 80 對含有 6.16 mg/mL NaCl 之蛋白質調配物的影響 (儲存溫度 40°C)

儲存時間(週)	單體含量(%) 0%吐溫	單體含量(%) 0.03%吐溫	單體含量(%) 0.1%吐溫	單體含量(%) 0.1%吐溫，無 NaCl
0	98.86	98.91	98.9	98.9
1	98.55	98.58	98.59	98.59
4	97.39	97.49	97.46	97.54
12	95.18	92.55	95.29	95.53

來自不同量吐溫 80 (有或無 NaCl) 之結果呈現於表 5 中。如表所示，在有或無 NaCl 存在下，吐溫 80 不能向調配物提供穩定性。就 0.03% 吐溫 80/NaCl 而言，在 40°C 下儲存 12 週之後，該組合使得單體含量降低。此結果與大多數解決此主題之文章相抵觸，此係因為一般而言，吐溫 80 對穩定化之影響與界面活性劑濃度之升高 (在 0.001% 至 1% 之範圍內有效) 有關 (參看 Arakawa 等人, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev., 46:307-326)。

除在有或無 NaCl 時在不同吐溫 80 百分比下之單體濃度外，亦檢驗在不同溫度下之次可見粒子形成 (參看表 6)。在所有儲存溫度下，添加吐溫 80 均使得次可見粒子數有實質增加 (尤其在 0.03% 之濃度下)，此證實 SE-HPLC 分析之發現。有趣的是，不論儲存溫度如何，不存在 NaCl 均顯示可顯著減少次可見粒子之形成。

表 6. 在 40°C 下儲存含有 6.16 mg/mL NaCl 之溶液期間，吐溫 80 對次可見微粒物質形成之影響

儲存溫度(°C)	每毫升>1 μm 之次可見粒子含量(%), 0%吐溫	每毫升>1 μm 之次可見粒子含量(%), 0.03%吐溫	每毫升>1 μm 之次可見粒子含量(%), 0.1%吐溫	每毫升>1 μm 之次可見粒子含量(%), 0.1%吐溫, 無NaCl
5	127707	203884	152196	3564
25	17760	529244	61622	2547
40	91356	360929	111053	1533

亦關於凍融循環後的微粒形成檢驗各種濃度之吐溫 80。與在儲存期間對液體溶液之較小穩定化影響相反，吐溫 80 顯示在冷凍-解凍循環期間賦予阿達木單抗顯著穩定性(表 7)。

表 7. 藉助於冷凍-解凍循環，使具有不同吐溫 80 含量之蛋白質溶液受應力的結果

凍融循環次數	每毫升>1 μm 之次可見粒子含量(%), 0%吐溫	每毫升>1 μm 之次可見粒子含量(%), 0.03 %吐溫	每毫升>1 μm 之次可見粒子含量(%), 0.1%吐溫
0	5996	5391	5449
1	6178	6360	5049
2	13526	14520	6582
3	25509	26508	7850
4	38564	48392	8012
5	60507	69810	9533
6	69942	94742	12991
7	76209	99787	18111

亦經由冷凍(-80°C, 12 小時)及解凍(5°C, 12 小時)使溶液反覆經受應力來測定吐溫 80 之影響。所應用之冷凍-解凍(冷凍/解凍)循環之次數與次可見微粒物質增加緊密相

關。然而，儘管5個凍融循環對含0%或0.03%吐溫80含量之溶液的影響使得粒子($\geq 1\ \mu\text{m}$ 之粒子)污染增加約10倍，但在0.1%吐溫80溶液中該情況實際上保持不變。SE-HPLC分析證實了此等結果(表8)。

表8.與所施加之冷凍-解凍循環次數無關的吐溫80含量不同之阿達木單抗溶液中的單體損失

凍融循環次數	單體含量(%), 0%吐溫	單體含量(%), 0.03 %吐溫	單體含量(%), 0.1%吐溫
0	98.41	98.48	98.43
1	98.29	98.38	98.42
2	98.33	98.45	98.41
3	98.3	98.46	98.43
4	98.29	98.46	98.45
5	98.22	98.45	98.42
6	98.15	98.49	98.41
7	98.12	98.48	98.42

密切根據關於凍融循環對其他蛋白質之影響的公開之眾多研究的結果，當暴露於反覆之冷凍/解凍應時當無界面活性劑存在時50 mg/mL阿達木單抗之穩定性降低。相反地，當原生單體含量(使用多角度光散射法(MALS)檢測)保持不變時，添加界面活性劑可保護蛋白質以免受與冷凍/解凍相關之有害參數的影響。

總而言之，較佳向50 mg/mL阿達木單抗溶液中添加0.1%吐溫80。儘管0.1%吐溫僅輕微地改良儲存液體中之蛋白質穩定性，但在諸如冷凍及解凍之過程期間的穩定效應為相當大的。然而，添加吐溫80可顯現有巨大益處，因為冷凍為製造、儲存及運輸蛋白質醫藥品中常見之單元操作(Cao等人, (2003) Biotechnol. Bioeng., 82:684-690)。另

外，充分接受在藥品中使用0.1%吐溫80，此早在1986年由Orthoclone™(鼠類IgG2a)之FDA核准所證明。

除吐溫80之外，研究非離子界面活性劑Solutol® HS15穩定化阿達木單抗之潛力。最近就阿伐枯明非經腸藥物(aviscumin parenteral)而言顯示了濃度為0.03%及0.1%之Solutol®的保護特徵(Steckel等人, (2003) Int. J. Pharm., 257:181-194)。因此，就形成微粒物質污染而言，將Solutol®對阿達木單抗溶液之影響與含有0.1%吐溫80之蛋白質溶液相比(表9)。

表9.與含有0.1%吐溫80之阿達木單抗溶液相比，含有各種Solutol®濃度之阿達木單抗溶液對儲存12週後微粒物質之形成的影響

儲存溫度(°C)	每毫升>1 µm之次可見粒子含量(%), 0.3 mg/mL Solutol	每毫升>1 µm之次可見粒子含量(%), 1 mg/mL Solutol	每毫升>1 µm之次可見粒子含量(%), 10 mg/mL Solutol	每毫升>1 µm之次可見粒子含量(%), 0.1%吐溫
5	52760	57049	196929	152000
25	2978	1840	6827	61000
40	3884	1258	91333	111000

與含0.03%及0.1% Solutol®之溶液相反，分別含1% Solutol®及0.1%吐溫80之阿達木單抗溶液顯示在儲存期間微粒物質顯著增加。低Solutol®濃度之此積極影響並不反映在SE-HPLC分析之資料中。在儲存12週(40°C)之後，與參考(0.1%吐溫80)相比，所有含有Solutol®之溶液均顯示單體含量損失約0.5%。(圖1)。

此實驗亦說明在分子量(hmw)蛋白質聚集體之早期偵

測中由MALS提供之巨大優勢(圖2A及2B)。由於其對大分析物之高敏感性，因此極小濃度係足以藉由MALS來偵測聚集體，例如在儲存1週(40°C)後之hmw聚集體形成可藉由MALS來證實，但實際上不能藉由UV₂₈₀偵測來實現偵測。

因此，因為一般不能接受已在加速存放期研究(accelerated shelf life studies)之早期形成hmw聚集體，所以自可能的穩定劑之清單中移除Solutol。已知甚至極小量的蛋白質(<0.1%)會造成沈澱(Hoffman, Analytical methods and stability testing of biopharmaceuticals, Protein formulation and delivery, McNally, E. J.編, 3 (2000) 71-110)。上述發現證實先前研究，該等先前研究顯示較高濃度(>1%)之Solutol[®] HS15使蛇根平(serpine)相關蛋白酶抑制劑之溶液不穩定且促成可見微粒物質現象(例如參看WO 2006037606)。

藉由賦形劑：多元醇來穩定化

將許多糖(例如蔗糖、葡萄糖、棉子糖、海藻糖)及多元醇(例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇)包含於蛋白質穩定化共溶劑之種類中。普遍咸信此等物質主要經由空間排斥機制來起作用。舉例而言，經常將諸如山梨糖醇之多元醇用以穩定化非經腸藥物，例如在許多凍乾疫苗藥品中，諸如MumpsTM、MeruvaxTM II及AttenuvaxTM，或靜脈內可投與溶液，諸如CardeneTM。

與諸如界面活性劑之其他賦形劑相對比，必須以較高濃度(>0.5 M)添加糖及多元醇，以便發揮其完全的穩定化潛

力。因此，將濃度為50 mg/mL及100 mg/mL之山梨糖醇添加至阿達木單抗溶液中，且儲存12週(表10)。

表10.在儲存12週期間山梨糖醇對阿達木單抗溶液中之微粒物質形成的影響

儲存溫度(°C)	每毫升>1 µm之次可見粒子含量(%), 50 mg/mL山梨糖醇	每毫升>1 µm之次可見粒子含量(%), 100 mg/mL山梨糖醇	每毫升>1 µm之次可見粒子含量(%), 無山梨糖醇
5	1000	3040	152196
25	778	2800	61622
40	2636	460	111053

與不存在山梨糖醇之溶液相比，山梨糖醇可降低在儲存期間形成粒子之趨勢。山梨糖醇之添加量實際上並未導致任何差異。關於單體含量，發現山梨糖醇之穩定化效應與濃度密切相關。NaCl之存在有損於蛋白質穩定性(表11)。

表11.阿達木單抗穩定性視山梨糖醇濃度而定，由蛋白質單體之含量反映(數字指示濃度(mg/mL)；在40°C下儲存)

儲存時間(週)	單體含量(%), 無山梨糖醇	單體含量(%), 100 mg/mL山梨糖醇	單體含量(%), 50 mg/mL山梨糖醇	單體含量(%), 50 mg/mL山梨糖醇/4 mg/mL NaCl
0	99.66	99.65	99.65	99.66
1	99.09	99.2	99.19	99.13
4	97.93	98.41	98.38	98.1
8	96.52	97.54	97.48	96.98
12	95.32	96.8	96.49	96.13

根據表11，在40°C下儲存12週期間，添加100 mg/mL山梨糖醇使單體含量升高約1.5%。減少賦形劑之量使得阿達木單抗穩定性降低。此等發現確證對馬免疫球蛋白穩定性之最近研究，其中就熱應力下之蛋白質穩定化而言，180 mg/mL山梨糖醇顯示優於添加90 mg/mL(Rodrigues-Silva等

人, 1999 *Toxicon* 37(1), 33-45)。已報導糖及糖源性多元醇之穩定化的濃度依賴性(Chan等人, (1996) *Pharm. Res.*, 13:756-761; Fatouros等人, (1997b) *Pharm. Res.*, 14:1679-1684)。有趣的是, 如表11中所示, 添加4 mg/mL鹽顯著有損於山梨糖醇之穩定化潛力(約0.25%單體)。另一方面, 在存放期實驗期間, 含有0.1%吐溫80之阿達木單抗溶液中不存在NaCl使得單體含量僅有極小的增加(如表11中所示)。

如表12中所示, 以甘露糖醇代替山梨糖醇來重複實驗。藉由將甘露糖醇添加至阿達木單抗溶液中來證實對山梨糖醇之發現:(1)在儲存12週(40°C)之後, 由80 mg/mL甘露糖醇增濃之溶液的蛋白質單體含量超過無甘露糖醇溶液約1.5%, (2)甘露糖醇之穩定化輸入符合濃度依賴性概況, 及(3)NaCl降低單獨甘露糖醇降低之單體含量。有趣的是, 此等資料由在25°C下進行之相同實驗得到確證。

表12.阿達木單抗穩定性視甘露糖醇濃度而定, 由蛋白質單體之含量反映(數字指示濃度(mg/mL); 在40°C下儲存)

儲存時間(週)	單體含量(%), 無甘露糖醇	單體含量(%), 80 mg/mL甘露糖醇	單體含量(%), 40 mg/mL甘露糖醇	單體含量(%), 40 mg/mL甘露糖醇/4 mg/mL NaCl
0	99.66	99.67	99.66	99.69
1	99.09	99.2	99.18	99.14
4	97.93	98.36	98.31	98.1
8	96.52	97.46	97.48	97.05
12	95.32	96.81	96.37	96.26

總而言之, 濃度為50 mg/mL之阿達木單抗係由山梨糖醇與甘露糖醇穩定化。NaCl阻礙此穩定化。NaCl當被添加至

另一機制來穩定化蛋白質，藉此減少在長期儲存期間之斷裂。

藉由賦形劑：鹽來穩定化

NaCl為調配蛋白質非經腸藥物中使用最多之鹽。然而，上述結果顯示在50 mg/mL之阿達木單抗濃度下，在多元醇存在下，NaCl阻礙阿達木單抗穩定性，且作為唯一賦形劑並不提高蛋白質穩定性。當考慮鹽之可能穩定作用時，根據Hoffmeister感膠離子序來考慮其行為提供粗略的經驗規則(a rough rule of thumb)。因此，對使用陰離子乙酸根以代替氯離子作為鈉鹽中之相對離子進行研究。

如表 14 中說明，個別溶液(亦即 50 mg/mL 山梨糖醇/4 mg/mL 乙酸鈉、50 mg/mL 山梨糖醇/4 mg/mL NaCl，及 50 mg/mL 山梨糖醇，無鹽)顯示不同的蛋白質穩定性。含有 NaCl 之阿達木單抗溶液不利於蛋白質穩定性，因為在僅儲存 4 週(40°C)之後，含有 NaCl 或乙酸鈉之調配物的比較顯示乙酸鈉增濃批料中之單體含量比含有 NaCl 之調配物之單體含量大約 0.25%，在 12 週之後差異合計達 >0.4%。因此，乙酸鈉比氯化鈉更有助於阿達木單抗穩定性。然而，因為無鹽調配物具有相同單體含量，所以添加乙酸鈉並不提高蛋白質穩定化。

表 14：阿達木單抗在含有山梨糖醇之溶液中的穩定性視鹽添加而定(數字指示濃度(mg/mL)；在 40°C 下儲存)

儲存時間(週)	單體含量(%), 50 mg/mL山梨糖醇/4 mg/mL乙酸鈉	單體含量(%), 50 mg/mL山梨糖醇/4 mg/mL NaCl	單體含量(%), 50 mg/mL山梨糖醇-無鹽
0	99.66	99.66	99.65
1	99.21	99.13	99.19
4	98.36	98.1	98.38
8	97.34	96.98	97.48
12	96.46	96.13	96.49

與兩種其他調配物(含 50 mg/mL山梨糖醇及無 4 mg/mL NaCl之鹽的調配物)相比，含有乙酸鹽之調配物顯示較多數量之超過 1 μm 之粒子(約 180,000/mL相對於 <6,000/mL)。

亦檢驗緩衝系統，藉此將鈉及鉀緩衝系統與不同濃度之山梨糖醇相比較。如在表 15 中說明，溶解於磷酸鉀緩衝液中之阿達木單抗的穩定性等同於在磷酸鈉緩衝液中測定之穩定性。在 25°C 下進行之儲存測試的資料證實此等發現。另外，兩種緩衝系統在微粒物質污染方面等同。因此，在液體蛋白質調配物中，磷酸鉀被認為較佳。

表 15. 在使用鈉及鉀作為陽離子相對離子之磷酸鹽緩衝系統中的阿達木單抗穩定性(緩衝液濃度為約 10 Mm，數字指示山梨糖醇濃度(mg/mL)；在 40°C 下儲存)

儲存時間(週)	單體含量(%), 100 mg/mL山梨糖醇/鉀	單體含量(%), 50 mg/mL山梨糖醇/鉀	單體含量(%), 100 mg/mL山梨糖醇/鈉	單體含量(%), 50 mg/mL山梨糖醇/鈉
0	99.67	99.67	99.65	99.65
1	99.21	99.22	99.2	99.19
4	98.39	98.37	98.41	98.38
8	97.61	97.59	97.54	97.48
12	96.88	96.46	96.8	96.49

總而言之，應在調配 50 mg/mL 阿達木單抗溶液時避免添加 NaCl。若例如由於滲透壓度因此存在鹽為有利的，則乙酸鈉較之氯化鈉具有優勢。類似地，基於鉀之磷酸鹽緩衝系統就阿達木單抗穩定性而言等同於磷酸鈉緩衝系統。

總而言之，較之約 50 mg/mL 阿達木單抗溶液之其他替代方案，5.2 之溶液 pH 值及添加 0.1% 吐溫 80 為有利的。將在冷凍/解凍研究及(加速)儲存測試後之蛋白質穩定性及微粒物質污染用作評估準則。此外，諸如甘露糖醇及山梨糖醇之多元醇實質上以實際上相同之效能有助於蛋白質穩定性。在原生狀態蛋白質下之優先累積不為唯一的穩定化路徑，因為蛋白質聚集與斷裂均被阻礙。在多元醇存在下 NaCl 阻礙蛋白質穩定性。添加乙酸鈉不會不利地影響蛋白質穩定性。

此等資料表明包含磷酸鉀緩衝液(pH 5.2)、0.1% 吐溫 80 及約 50 mg/mL 甘露糖醇或山梨糖醇之調配物旨在對於 50 mg/mL 之阿達木單抗濃度，最終滲透壓度值為約 300 mosM/kg。

實例 2：高濃度阿達木單抗調配物

以下實例提供許多包含抗 TNF α 抗體阿達木單抗之高濃度蛋白質調配物的成分。令人驚訝地，下述調配物儘管存在高濃度抗體(亦即約 100 mg/mL)但具有許多有利特性。

相對於市售 50 mg/mL 阿達木單抗調配物(F7)研究調配物(稱作 F1 至 F6)之許多特徵，包括濁度。藉由分析未稀釋溶液來測定溶液濁度。以 NTU 值(濁度單位)報導濁度。

如 German Drug Codex 中所述藉由目測來測定可見粒子污染。根據 USP 藉由光阻法監測次可見粒子。採用稀釋溶液之動力學光散射分析來估算流體動力學直徑(以平均或 Z 平均尺寸報導，該平均或 Z 平均尺寸係藉由粒子尺寸分佈之 DLS 實測強度自相關函數及多分散指數 PDI 之累積量分析來計算)。

藉由允許偵測片段及聚集體之 SEC 評估調配物之物理化學穩定性。為監測化學穩定性，使用 SE-HPLC(偵測片段及水解樣品)及 CEX-HPLC(陽離子交換 HPLC)。CEX-HPLC 拆分可能已在儲存期間形成之不同離胺酸同功異型物及降解產物(例如脫醯胺物質及氧化物質)。

所測試之調配物係稱作 F1-F6(表 16)，其在不同基質中含有 100 mg/mL 阿達木單抗，跨度 pH 5.2 至 pH 6.0，以不同多元醇且在有或無氯化鈉之情況下調配。

表 16. 阿達木單抗調配物 F1-F7 之組分

組分	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
阿達木單抗	100	100	100	100	100	100	50
甘露糖醇	12	42	-	12	42	-	12
山梨糖醇	-	-	42	-	-	42	-
聚山梨醇酯 80	1	1	1	1	1	1	1
檸檬酸*H ₂ O	1.305	1.305	1.305	1.305	1.305	1.305	1.305
脫水檸檬酸鈉	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
NaCl	6.165	0	0	6.165	0	0	6.165
NaOH	適量補足	適量補足	適量補足	適量補足	適量補足	適量補足	適量補足
總重	100	100	100	100	100	100	100

如下實例 3-6 中所述，進一步研究上述 100 mg/mL 調配物

(F1-F7)以表徵總體穩定性及黏度。

以下為如何製造高濃度阿達木單抗調配物之描述，其尤其就例示性溶液F2及F6而言。起始溶液為在液體緩衝液中，例如在自前述製造方法步驟產生之緩衝液中的低濃度(低於本發明之高濃度)純化抗體溶液。在此情況下，提供在與F7相同之無界面活性劑、pH值為5.2之緩衝系統中的濃度為約70 mg/mL之阿達木單抗溶液。接著濃縮起始溶液且藉由超濾來透濾，該超濾較佳在切向流過濾系統中，使用能夠定量截留抗體(例如用10 kD之截斷值)之膜。

舉例而言，藉由使用無界面活性劑之相應基質作為透濾緩衝液將濃縮物稀釋至約50 mg/L來製造代表性調配物F2及F6。使用切向流過濾系統進行連續緩衝液更換。一般以恆定保留體積(至少5體積或較佳8體積)之透濾緩衝液進行透濾。在最終步驟中，將透濾溶液進一步濃縮至高濃度，例如高於或等於150 mg/mL。接著藉由以透濾緩衝液沖洗管子自超濾系統回收出最終混濁保留物。在添加各別量之聚山梨醇酯80且使用透濾緩衝液調節至目標蛋白質濃度之後，獲得透明至略微乳白色之高濃度液體調配物。在經由0.22 μ m過濾器過濾之後，若儲存在約2-8°C下，則溶液穩定至少約12個月。

實例3：高濃度阿達木單抗調配物在冷凍/解凍應力下之穩定性

為了證明阿達木單抗調配物在100 mg/mL蛋白質濃度下穩定，進行冷凍/解凍應力(在-80°C下進行冷凍，在25°C下

進行解凍)實驗。

將對粒子形成敏感之分析法陣列用以偵測可能之物理不穩定性。量測濁度作為在膠體或可見範圍內粒子聚集體發展之指標。甚至在第四個凍融循環之後，濁度(以NTU值報導)並不顯著變化(圖3)。較高pH溶液之濁度提高可能歸因於在接近蛋白質pI之pH值(阿達木單抗8.5)下降低之電荷排斥造成的蛋白質-蛋白質相互作用提高(Wang等人, (2007) J Pharm Sci 96 (1) 2457-2468)。

採用動力學光散射作為測定次微粒範圍內粒度之方法。將在尺寸分佈測定過程中獲得之多分散指數值用作膠體或微米尺寸範圍內聚集之另一敏感指標。類似於濁度資料，無一測試調配物顯示任何物理不穩定性徵兆(圖4)。

另外，評估尺寸排除資料。圖5展示聚集體含量。未偵測到與反覆冷凍/解凍應力相關之物理化學不穩定性徵兆。

已熟知冷凍/解凍處理可引起實質上蛋白變性及聚集，導致可溶及不可溶聚集體形成(Parborji等人, (1994) Pharm Res 11 (5)764-771)。使所有在本文中呈現之調配物均經受反覆之冷凍解凍處理且結果說明無一調配物對反覆之凍融循環(-80°C/25°C)敏感。儘管調配物之較高pH值(靠近阿達木單抗之pI，亦即8.5)，但所有調配物均與其pH值(在所有情況下，如與初始值相比，不存在顯著變化)無關而類似地穩定。

來自比較不同緩衝溶液之各別研究的資料證實此等結

果。關於在冷凍-解凍後之均質溶液(亦即具有最小pH值、滲透壓度、密度梯度之溶液)及在冷凍-解凍期間之最小pH值位移，最有利之緩衝系統被證明為未添加NaCl之緩衝組合物(參看實例1)。調配為pH 6之無NaCl緩衝系統顯示具有所有估算pH值之最小pH值位移。

實例4：含有不同多元醇作為等張劑之100 mg/mL調配物的穩定性。

採用差示掃描熱量測定(DSC)來測試所有100 mg/mL阿達木單抗調配物之一般穩定性。使用VP毛細管DSC形式Microcal獲得DSC資料。所有實驗均用1次加熱運作，使用以下標準化程序來進行：溫度範圍：20°C -90°C，加熱速率：1 K/min，蛋白質濃度1 mg/mL。

較高T_m值一般指示構形穩定性提高(Singh等人，(2003) AAPS PharmSciTech 4 (3)條款42)。圖6提供100 mg/mL阿達木單抗調配物之T_m值。此等資料顯示所有調配物均達成高T_m值。然而，無氯化鈉之調配物(F2、F3、F5、F6)顯示T_m值顯著提高，表明此等調配物之穩固性。因為以1 mg/mL測試調配物，所以F1之T_m資料與F7之T_m相同，藉此證實100 mg/mL無氯化鈉或在pH 6.0下之調配物的穩定性較之F7調配物獲改良。

將使用磁性攪拌棒之攪拌應力模型用以偵測新穎阿達木單抗調配物之物理化學不穩定性。此熟知模型藉由使阿達木單抗經受長期空氣-液體界面暴露以及攪拌相關空蝕(使得以可預測方式形成可溶及不可溶蛋白質聚集體)來誘導

產生應力。

一般而言，在各自 pI(阿達木單抗 pI 8.5、低淨電荷、減到最小之靜電斥力)範圍內之 pH 值下調配的蛋白質由於斥力降低因此較易發生空氣-液體界面相關聚集。另外，諸如氯化鈉之離子賦形劑由於其離子防護特性因此在蛋白質聚集中起作用。可因存在氯化鈉而降低疏水吸引力，藉此減小蛋白質-蛋白質相互作用且提高膠體穩定性(Shire 等人, (2004) J Pharm Sci, 93 (6)1390-1402)。

評估濁度資料以偵測由攪拌應力引起之聚集體形成。表 17 展示與調配組合物及攪拌時間相關之濁度值。F1-F3(在 5.2 之較低 pH 值下調配)之初始濁度值說明在含有氯化鈉(F1)與無 NaCl(F2、F3)之溶液之間的差異。相反地，調節至 6.0 之較高 pH 值的溶液(F4-F6)的特徵在於較高濁度。在此項技術中已知在諸如攪拌之機械應力之後 NaCl 可降低 mAb 溶液之澄清度(例如 Fesinmeyer 等人, (2009) Pharm Res, 26 (4)903-913)。

表 17：調配物 F1-F6 之濁度(NTU)與攪拌時間的對應關係

	T0 小時	T1 小時	T5 小時	T24 小時	T48 小時
F1	31,5	33,25	36,05	46,9	54,85
F2	19,8	20,25	23,1	28,65	40
F3	18,8	19,75	22,2	27,3	39,5
F4	36,8	37,25	42,4	63,45	86,75
F5	36,1	38,85	44,5	64,3	76,7
F6	36,6	38,85	42,8	59,1	72,7

在所有測試調配物中，攪拌至多 48 小時均引起濁度值提高。較低 pH 之無 NaCl 調配物最不傾向於因攪拌而濁度提高。令人驚訝地，與較低濃度(50 mg/mL)阿達木單抗調配

物相比，所有測試之100 mg/mL調配物在攪拌後均顯示顯著降低之濁度(表18)。

一般而言，乳白色外觀為瑞雷散射之簡單結果且與蛋白質濃度線性相關。然而，乳白色外觀並不引起物理不穩定性(Sukumar等人, (2004) Pharm Res 21 (7)1087-1093)。50 mg/mL阿達木單抗調配物在攪拌24小時後顯示63-130 NTU之濁度且在48小時後顯示109-243 NTU之濁度，然而100 mg/mL阿達木單抗調配物產生介於27-63(24小時)與40-87(48小時)之範圍內的值。根據Treueheit等人((2002) Pharm Res 19 (4)511-516)，提高之蛋白質濃度在低於10 mg/mL之範圍內降低OPC-Fc溶液中空氣-液體界面引起之聚集。Kiese等人((2008) J Pharm Sci 97 (10)4347-4366)已報導類似結果。出乎意料地，新穎阿達木單抗調配物之特徵在於在100 mg/mL之高得多之蛋白質濃度範圍內攪拌應力穩定性提高。

因此，新穎調配物與50 mg/mL調配物相比穩定性提高。

表18：來自使用不同批次之50 mg/mL阿達木單抗調配物(F7)進行之攪拌應力實驗的資料

	批次 201359A	批次 191299A	批次 221479A	批次 221489A	批次 241679A	批次 231649A
NTU T24	63.3 (22.85)	130.4 (39.24)	94.8 (28.98)	92.1 (30.88)	82.0 (29.75)	88.0 (30.15)
NTU T48	109 (52.50)	243 (84.23)	n.a.	178.4 (55.80)	136 (30.65)	175.7 (63.37)

另外，尺寸排阻層析法資料揭示所有100 mg/mL調配物在攪拌48小時之後均具有<1%之聚集體含量，從而支持新

穎調配物之穩定性的主張(圖7)。較低pH值及不存在氯化鈉又為有利。儘管一般咸信在較高pH值下之低淨電荷會增加不穩定性，但此資料證實以下驚人發現：新穎調配物儘管pH值接近阿達木單抗之pI但穩定，且不存在NaCl為有利的。

實例5：有或無氯化鈉、pH 5.2及6.0、含2種不同多元醇之100 mg/mL阿達木單抗調配物的長期穩定性。

使新穎100 mg/mL阿達木單抗調配物經受長期儲存以證實較之50 mg/mL標準調配物之優越穩定性。評估在5°C下歷經12個月之穩定性資料(推薦之商品儲存溫度)。資料事實上表明新穎調配物未顯示降低之穩定性(表19)。

關於SEC及IEX，未發生單體含量之顯著損失或可量測之降解。

此外，儘管新穎阿達木單抗調配物之較高蛋白質濃度，但就次可見範圍內之粒子污染而言，與50 mg/mL市售阿達木單抗調配物之12 M資料相比，獲得顯著增強。次可見微粒污染(表明聚集、沈澱及一般物理不穩定現象)之測試揭示新穎阿達木單抗調配物幾乎保持不含次可見粒子。最大值28(≥ 10)及最大值3(≥ 5)之初始粒子顯著低於50 mg/mL調配物F7(分別為703及38)。

另外，在整個12個月之穩定性測試內，粒子含量無顯著變化，且保持為顯著低於F7之含量。

在測試之所有儲存條件下，藥品批料之物理化學穩定性實際上等同。此為意外的，此係因為已完全公認的是：例

如在較高蛋白質濃度下物理穩定性傾向於降低(Wang W. (1999) Int J Pharm 185:129-188)。

表 19：F1-F7(T0/12 M)之穩定性研究之分析資料的比較

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
SEC單體	99.6 99.4	99.0 99.4	99.7 99.4	99.4 99.2	98.7 99.1	99.4 99.1	99.8 99.4
離胺酸變體 之IEX總和	85.9 83.5	85.7 83.2	85.9 83.2	86.0 84.9	85.8 84.7	86.0 84.6	85.1 82.6
澄清度	29.3 30.2	16.10 17.10	16.5 17.85	32.20 34.0	31.5 33.5	32.6 33.9	19.7 18.4
DAC評分	0.0 0.1	0.0 0.1	0.0 0.4	0.0 0.0	0.0 0.0	0.0 0.0	0.4 0.0
>=10 μm 之 次可見粒子	31 2	4 4	2 3	6 7	18 8	28 5	703 746
>=25 μm 之 次可見粒子	0 1	0 0	0 1	0 1	0 3	1 2	38 36

為了證實新穎 100 mg/mL調配物之儲存穩定性提高的結果，對2種代表性調配物F2及F6進行加速穩定性測試(在 5°C、25°C、40°C 下3個月)且與市售之 50 mg/mL調配物(來自註冊運作(registration run)之代表性批料)相比。此等實驗之結果概括於圖 8-13 中。

來自此等批料之濁度資料證實無 NaCl 之調配物在 100 mg/mL 下，尤其在 5.2 之較低 pH 值下的優越特性。一般已知提高溶液中之蛋白質濃度增加乳白光且藉此提高由瑞利散射讀出之濁度(Sukumar 等人，(2004) Pharm Res 21 (7)1087-1093)。令人驚訝地，無氯化鈉之新穎調配物在與 50 mg/mL 調配物之相同 pH 值下顯示類似濁度程度(圖 8)。

圖 9-11 提供新穎調配物之微粒形成(可見及次可見粒子)之詳細資料。證實了穩定性提高之驚人發現。事實上，可能甚至在高溫下儲存3個月之後降低次可見與可見粒子評

分。

圖 12-13 中提供之資料進一步證實 100 mg/mL 調配物之穩定性，如其對於 SEC 分析學與化學穩定性(使用 IEX 來測試)均不顯示任何穩定性問題。

實例 6：100 mg/mL 阿達木單抗調配物較之 50 mg/mL 阿達木單抗調配物提高之可製造性

此實例概括與新穎 100 mg/mL 阿達木單抗調配物(代表性調配物 F2 及 F6)較之目前市售之 50 mg/mL 產品的獲改良加工穩定性有關之資料。

藉由抽汲、過濾、混合、填充加工方法、貨運或震盪產生之機械應力由於使蛋白質暴露於空氣-水界面、材料表面及剪切力，因此可引起變性及連續聚集(Mahler 等人，(2005) Eur J Pharm Biopharm 59:407-417；Shire 等人，(2004) J Pharm Sci, 93 (6)1390-1402)。

最初測定黏度值作為表徵蛋白質溶液之可加工性的基本參數。表 20 提供對於 F1-F7 調配物獲得之黏度資料。提高蛋白質濃度使得與 50 mg/mL 調配物(F7)相比黏度提高。

預期移除靜電保護劑 NaCl 提高疏水性蛋白質相互作用(尤其在接近阿達木單抗 pI 之 pH 值下)，藉此提高黏度。報導此作用在 <200 mM 之 NaCl 濃度下最顯著(Shire 等人，(2004) J Pharm Sci, 93 (6)1390-1402)。

然而，出乎意料地，自調配物移除 NaCl(F1 含有約 105 mM NaCl)產生約 3.1-3.3 mPas*s(F2、F3、F5 及 F6)之仍相對較低黏度值。此對於在 6.0 之較高 pH 值下之溶液(F5 及

F6)係尤其驚人。

總而言之，所有調配物之特徵均在於黏度在對於液體填充加工製造操作最佳之範圍內。

表 20：F1-F7在 25°C 下之黏度比較

調配物	黏度[mPa*s]
F1	2.8902
F2	3.1278
F3	3.1223
F4	2.9018
F5	3.2585
F6	3.2279
F7	1.3853

在模擬由無菌製造方法過程中之無菌過濾引起之應力的實驗室模型中，兩種含有 100 mg/mL阿達木單抗之代表性新穎調配物提供顯示所有調配物在過濾相關切應力下均穩定之分析資料。因為低含量之較高分子量子群之敏感指標多分散指數並不顯著提高，所以DLS資料並不顯示較高分子量聚集體發展之任何徵兆。尤其將DLS量測用以偵測呈尺寸分佈的低量之較高分子量物質，例如聚集體，因為彼等物質具有較高散射強度(與d6成比例)且藉此將顯著影響Z_{Ave}及作為Z_{Ave}尺寸分佈之指標的多分散指數。另外，SEC資料證實過濾未誘導聚集。

令人驚訝地，甚至 100 mg/mL調配物不顯示任何不穩定性。甚至在多次無菌過濾(作為最壞情況)之後，儘管蛋白質含量提高，但可加工性係維持在高程度。

表 21：用於比較 F2、F6 及 F7 在無菌過濾應力下之穩定性的 DLS 及 SEC 資料

方法	F2, 100 mg/mL	F6, 100 mg/mL	F7, 50 mg/mL
DLS(nm)			
過濾前之PDI	0.058	0.054	0.022
5個過濾循環後之PDI	0.057	0.050	0.032
SEC(聚集體%)			
在過濾之前	0.235	0.429	0.220
在5個過濾循環之後	0.238	0.426	0.310

為了進一步證明新穎阿達木單抗調配物在加工相關應力下之高穩定性，在攪拌應力模型中測試調配物，該模型比較調配物在磁性攪拌棒之不同攪拌速度下的特性(在混配加工步驟中之製造條件下出現攪拌應力)。

攪拌應力抗性之比較顯示在 100 mg/mL 蛋白質濃度下濁度未提高(圖 14)。在所有測試攪拌速度下，在 pH 5.2 下，無氯化鈉且多元醇含量提高之代表性 100 mg/mL 調配物均與市售調配物表現類似。在較高攪拌速度下，所有調配物在攪拌 24 小時之後均顯示濁度值略微提高，然而未偵測到在 100 mg/mL 下對切應力所致不穩定性之易感性顯著提高。

如藉由 DLS 量測獲得之流體動力學直徑之變化的比較產生類似資料。儘管咸信含較高蛋白質濃度之調配物對攪拌應力較敏感，但兩種 100 mg/mL 調配物均與 50 mg/mL 調配物表現類似。令人驚訝地，含最高 pH 值之調配物 F2 顯示濁度與流體動力學直徑分析學均最低之相對提高(圖 15)。

甚至在較高蛋白質濃度下之類似方法穩定性之此驚人發

現係由模擬由抽汲過程誘導之應力的機械應力模型進一步證實。製造方法之此最終步驟涵蓋蠕動泵引起之切應力，藉此提高溶液不穩定性風險。又，使用濁度(圖16)及DLS(圖17，表22)所得之資料證實新穎100 mg/mL調配物並不經歷粒子發展反應，且保持與50 mg/mL調配物類似地穩定。未可偵測到對抽汲應力誘導聚集體形成之易感性。此發現另外係由SEC資料證實，SEC資料並不顯示與泵循環相關之測試調配物之任何差異(圖18)。

表 22：用於比較 F2、F6 及 F7 在若干個泵循環前後之穩定性的 DLS 資料 (PDI)

泵循環	市售者，pH 5.2	甘露糖醇，pH 5.2(形式2)	山梨糖醇，pH 6(形式6)
0	0.06	0.055	0.028
1	0.059	0.064	0.029
10	0.061	0.058	0.032
20	0.059	0.069	0.022

使用各種填充設備(旋轉活塞及蠕動泵)，評估100 mg/mL調配物之穩定性差異。

此等研究顯示尤其對於含有氯化鈉之在較高pH值下之調配物(F1及F4)，在活塞泵中產生之較高切應力使得可見粒子數增加。Bausch, Ursula J.(Impact of filling processes on protein solutions. 2008, PhD Thesis, University of Basel, Faculty of Science; http://edoc.unibas.ch/845/1/DissB_8427.pdf)最近已報導了類似結果，但僅在10 mg/mL之利妥昔單抗(rituximab)溶液之蛋白質濃度下。令人驚訝地，含100 mg/mL阿達木單抗之氯化鈉調配物在使用活塞泵之高剪切條件下顯示改良之可加工性。

圖 19-22 提供粒子數及濁度資料，其證實含 NaCl 之阿達木單抗溶液對提高之加工應力條件的敏感性提高：根據 DAC 目測評分法測定 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 及 $\geq 25\ \mu\text{m}$ 之粒度範圍為非經腸之基本品質屬性。因此，無 NaCl 調配物中次可見粒子之減少提供顯著之調配物改良。

如圖 19 中所示，蠕動填充並不引起在填充(T0)後及在儲存後直接產生可見粒子。相反地，對於調配為 pH 6.0 之溶液，甚至在 T0 時，活塞填充產生顯著的粒子數(圖 20)。在含有氯化鈉之 F4 中量測到最高值，而 F5-F6 產生顯著較低的評分，從而證實無氯化鈉之調配物在加工應力下之穩定性有改良。

藉由濁度量測獲得支持性結果(圖 21-22)。使用活塞泵填充之溶液的初始值高於使用蠕動填充方法填充之溶液的初始值。無氯化鈉之調配物產生低於含有氯化鈉之調配物的濁度。另外，活塞填充引起之切應力允許 F4(含氯化鈉)就濁度而言與 F5 及 F6(無氯化鈉)區分。

實例 7：無氯化鈉之調配物中的不同多元醇濃度之影響的比較

就多元醇濃度對 5°C 下之短期穩定性之影響來測試以下含有 100 mg/mL 阿達木單抗之無氯化鈉之調配物。將調配物調節至 pH 6.0 以呈現就聚集及粒子形成趨勢而言較差之條件。

表 23：實例 6 中測試之調配物的概況

	F8	F9	F10	F11
組分	1號甘露糖醇 (12 mg/mL)	2號甘露糖醇 (42 mg/mL)	3號山梨糖醇 (12 mg/mL)	4號山梨糖醇 (42 mg/mL)
阿達木單抗	100	100	100	100
甘露糖醇	12	42	-	-
山梨糖醇	-	-	12	42
吐溫80	1	1	1	1
檸檬酸*H ₂ O	1.305	1.305	1.305	1.305
檸檬酸鈉 *2H ₂ O	0.305	0.305	0.305	0.305
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	1.53	1.53	1.53	1.53
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	0.86	0.86	0.86	0.86
NaCl	0	0	0	0
NaOH	適量補足	適量補足	適量補足	適量補足
目標pH值	6.0	6.0	6.0	6.0

以 42 mg/mL 之濃度使用甘露糖醇或山梨糖醇以滿足無氯化鈉溶液之張力要求。資料顯示與 12 mg/mL 之先前所用濃度相比，兩種多元醇均不僅有助於溶液之滲透壓度，而且另外對蛋白質穩定性具有顯著影響。

穩定性資料表明與多元醇類型無關地，對於較高多元醇濃度，澄清度獲改良。在一般視為非最佳之條件(例如 pH 6.0，接近於阿達木單抗之 pI)下，多元醇濃度較高之調配物甚至在 5°C 下短期儲存 4 週後顯示改良之澄清度。此可用若干分析法觀察到。

圖 23 顯示測試調配物之澄清度可因提高多元醇濃度而顯著降低且可在測試階段內保持為較低澄清度。另外，在 5°C 下 4 週之後，觀察到在較高多元醇濃度下產生較高單體含量之聚集略微減少(圖 24 及 25)。在較高多元醇濃度下，在 $\geq 10 \mu\text{m}$ 範圍內之次可見粒子減少(例如在 T0 時)。

實例 8：人類抗-TNF α 抗體之穩定高蛋白質濃度調配物

測試各種阿達木單抗調配物在加速穩定性測試條件與在推薦儲存溫度條件下長期儲存下維持阿達木單抗物理及化學穩定性之適應性(參看下表1)。調配物在pH值(pH 5.2相對於pH 6)、賦形劑條件(例如甘露糖醇或山梨糖醇之濃度)、鹽/離子強度條件(例如NaCl濃度)及蛋白質濃度(50 mg/mL相對於100 mg/mL)方面不同。

表24：以下實例中提及之調配物的概況(所有濃度均係指mg/mL)。

組分	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
阿達木單抗	100	100	100	100	100	100	50
甘露糖醇	12	42	-	12	42	-	12
山梨糖醇	-	-	42	-	-	42	-
聚山梨醇酯80	1	1	1	1	1	1	1
檸檬酸*H ₂ O	1.305	1.305	1.305	1.305	1.305	1.305	1.305
二水合檸檬酸鈉	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
NaCl	6.165	0	0	6.165	0	0	6.165
NaOH	適量 補足	適量 補足	適量 補足	適量 補足	適量 補足	適量 補足	適量 補足
目標pH值	5.2	5.2	5.2	6.0	6.0	6.0	5.2

表2提供應力溫度及樣本牽引點(sample pull point)之概述。調配物F2及F6係鑑別為維持阿達木單抗之物理穩定性與化學穩定性分別歷時至少18個月及12個月之調配物。儘管蛋白質濃度提高100%(自調配物F7中之50 mg/mL提高至調配物F2及F6中之100 mg/mL)，但以甘露糖醇(調配物F2)及山梨糖醇(調配物F6)更換調配物賦形劑NaCl達成高穩定化潛力。令人驚訝地，兩種調配物之物理穩定性分別維持至少12個月及18個月。甚至在儲存12個月之後，兩種調配

物均含有大於99%單體(SEC資料)，且聚集體含量在1%以下。

類似地，在整個穩定性監測中因為表明穩定性之離胺酸變體總和(L0+L1+L2)超過80%，所以化學穩定性(其經常為蛋白質藥品中之存放期限限制因素)得以維持。

在此項技術中接受之適於監測蛋白質調配物之物理及/或化學穩定性的其他測試證實調配物F2及F6之穩定化潛力，該等測試例如為次可見粒子測試、濁度量測、目測、澄清度或顏色監測。

重要的是，表明功效之抗-TNF中和測試顯示兩種調配物在整個完整樣本牽引時程中均維持阿達木單抗功效，且數據係在75%至125%之高品質含量範圍內。

表 25：對於F2及F6調配物在各種溫度下在不同月數內所獲得之穩定性資料

	5°C	25°C/60% R.H	40°C/75% R.H.
F2	9個月	6個月	6個月
F6	3個月	3個月	3個月
F2	18個月	6個月	6個月
F6	12個月	6個月	6個月

表 26：調配物 F2 及調配物 F6 之所選穩定性測試資料 - 長期，達 9 個月

測試項目	分項	測試持續時間	F2			F6		
			儲存條件 [°C/% R.H.]			儲存條件 [°C/% R.H.]		
			5°C	25°C/60% R.H.	40°C/75% R.H.	5°C	25°C/60% R.H.	40°C/75% R.H.
微粒污染： 可見粒子	目測 評分	初始	0.0	0.0	0.0	0	0	0
		3個月	0.0	0.0	0.0	0	0	0
		6個月	0.0	0.0	0.0	-	-	-
		9個月	0.0	-	-	-	-	-

澄清度	濁度	初始	19.40	19.40	19.40	35,7	35,7	35,7
		3個月	18.70	19.90	21.60	35,1	35	37
		6個月	20.30	21.00	28.20	-	-	-
		9個月	20.50	-	-	-	-	-
	空白	初始	0.08	0.08	0.08	0,31	0,31	0,31
		3個月	0.15	0.34	0.21	0,28	0,16	0,29
		6個月	0.15	0.46	0.22	-	-	-
		9個月	0.08	-	-	-	-	-
顏色	B標度	初始	-	-	-	-	-	-
		3個月	-	-	-	-	-	-
		6個月	-	-	-	-	-	-
		9個月	-	-	-	-	-	-
	BY標度	初始	<=BG 7	<=BG 7	<=BG 7	<=BG 7	<=BG 7	<=BG 7
		3個月	<=BG 7	<=BG 7	<=BG 7	<=BG 7	<=BG 7	<=BG 7
		6個月	<=BG 7	<=BG 7	<=BG 6	-	-	-
		9個月	<=BG 7	-	-	-	-	-
pH	單一值	初始	5.3	5.3	5.3	6	6	6
		3個月	5.3	5.3	5.3	6	6	6
		6個月	5.3	5.3	5.4	-	-	-
		9個月	5.3	-	-	-	-	-
微粒污染： 次可見粒子	>=1 μm之 粒子	3個月	3936	4522	6688	3203	3328	4834
		6個月	4372	4470	3788	-	-	-
		9個月	19709	-	-	-	-	-
	>=10 μm之 粒子[/ 單位.]	初始	17	17	17	15	15	15
		3個月	8	23	28	6	11	45
		6個月	34	39	46	-	-	-
		9個月	127	-	-	-	-	-
	>=25 μm之 粒子[/ 單位.]	初始	0	0	0	0	0	0
		3個月	0	0	0	0	0	1
		6個月	0	0	1	-	-	-
		9個月	1	-	-	-	-	-
陽離子交換 HPLC(CEX- HPLC)	第1酸 性區域 [%]	初始	2.8	2.8	2.8	2,9	2,9	2,9
		3個月	2.8	6.9	36.1	2,7	5	22,2
		6個月	2.9	11.3	58.0	-	-	-
		9個月	3.1	-	-	-	-	-
	第2酸 性區域 [%]	初始	10.7	10.7	10.7	10,9	10,9	10,9
		3個月	10.9	17.3	34.7	11	16,7	40
		6個月	11.0	22.2	25.1	-	-	-
		9個月	11.2	-	-	-	-	-
	離胺酸 變體總 和[%]	初始	84.2	84.2	84.2	84	84	84
		3個月	84.2	72.3	24.6	84,7	75,7	33,2
		6個月	83.9	61.7	10.9	-	-	-
		9個月	83.2	-	-	-	-	-
	離胺酸 2後之 峰 [%]	初始	1.0	1.0	1.0	1,4	1,4	1,4
		3個月	0.7	1.4	2.2	0,8	1,3	2,4
		6個月	0.9	2.3	4.2	-	-	-
		9個月	1.1	-	-	-	-	-
	在離胺 酸1與 離胺酸 2之間 的峰 [%]	初始	1.3	1.3	1.3	0,8	0,8	0,8
		3個月	1.4	2.1	2.5	0,8	1,4	2,3
		6個月	1.4	2.4	1.9	-	-	-
		9個月	1.4	-	-	-	-	-

尺寸排阻層析法(SE-HPLC) 阿達木單抗	主要峰 (單體) [%]	初始	99.4	99.4	99.4	98,9	98,9	98,9
		3個月	99.4	98.9	96.4	99	98,3	96
		6個月	99.4	98.5	93.2	-	-	-
		9個月	99.3	-	-	-	-	-
	聚集體 平均值	初始	0.5	0.5	0.5	0,9	0,9	0,9
		3個月	0.5	0.7	1.7	1	1,4	2,7
		6個月	0.5	0.9	3.3	-	-	-
		9個月	0.6	-	-	-	-	-
	片段平 均值	初始	0.1	0.1	0.1	0,1	0,1	0,1
		3個月	0.1	0.4	1.9	0,1	0,3	1,3
		6個月	0.1	0.7	3.4	-	-	-
		9個月	0.1	-	-	-	-	-

表 27：調配物 F2 及調配物 F6 之所選穩定性測試資料 - 長期，達 18 個月。

測試項目	分項	測試持續時間	F2			F6		
			E09807001CL			E09808001CL		
			儲存條件[°C/% R.H.]			儲存條件[°C/% R.H.]		
			5°C	25°C/60% R.H.	40°C/75% R.H.	5°C	25°C/60% R.H.	40°C/75% R.H.
微粒污染：可見粒子	目測評分	初始	0	0	0	0	0	0
		3個月	0	0	0	0,2	0	0
		6個月	0	0	0,2	0,1	0,1	0,2
		9個月	0	-	-	0	-	-
		12個月	0	-	-	0,2	-	-
		18個月	0	-	-	-	-	-
澄清度	濁度	初始	19,4	19,4	19,4	37,3	37,3	37,3
		3個月	20,1	20,3	23	38,1	38,2	39,6
		6個月	18,4	19,5	26,2	35,3	35,1	41,7
		9個月	22,9	-	-	43	-	-
		12個月	18,1	-	-	34,5	-	-
		18個月	19,1	-	-	-	-	-
	空白	初始	0,16	0,16	0,16	0,09	0,09	0,09
		3個月	0,13	0,15	0,06	0,06	0,19	0,19
		6個月	0,05	0,08	0,04	0,05	0,03	0,02
		9個月	0,06	-	-	0,18	-	-
		12個月	0,09	-	-	0,09	-	-
		18個月	0,11	-	-	-	-	-
液體著色程度	B標度	初始	=B 9	=B 9	=B 9	=B 9	=B 9	=B 9
		3個月	<=B 7	<=B 7	<=B 7	<=B 7	<=B 7	<=B 7
		6個月	<=B 8	<=B 8	<=B 7	<=B 8	<=B 7	<=B 6
		9個月	<=B 7	-	-	<=B 7	-	-
		12個月	<=B 7	-	-	<=B 7	-	-
		18個月	<=B 7	-	-	-	-	-
	BY標度	初始	-	-	-	-	-	-
		3個月	-	-	-	-	-	-
		6個月	<=BG 7	<=BG 7	<=BG 6	<=BG 7	<=BG 7	<=BG 6
		9個月	<=BG 7	-	-	<=BG 7	-	-
		12個月	<=BG 7	-	-	<=BG 7	-	-
		18個月	<=BG 7	-	-	-	-	-

pH	單一值	初始	5.3	5.3	5.3	6.1	6.1	6.1
		3個月	5.3	5.3	5.3	6.1	6.1	6.1
		6個月	5.3	5.3	5.3	6.1	6.1	6.1
		9個月	5.3	-	-	6.1	-	-
		12個月	5.2	-	-	6.1	-	-
		18個月	5.3	-	-	-	-	-
微粒污染：次 可見粒子	>=1 μm之 粒子	9個月	4738	-	-	6177	-	-
		12個月	5329	-	-	5793	-	-
		18個月	12589	-	-	-	-	-
	>=10 μm之 粒子[/單位.]	初始	19	19	19	18	18	18
		3個月	34	67	62	42	64	71
		6個月	18	48	72	23	36	54
		9個月	11	-	-	21	-	-
		12個月	16	-	-	22	-	-
		18個月	60	-	-	-	-	-
	>=25 μm之 粒子[/單位.]	初始	0	0	0	0	0	0
		3個月	0	1	2	0	1	2
		6個月	0	1	2	0	0	0
		9個月	0	-	-	0	-	-
		12個月	0	-	-	0	-	-
		18個月	0	-	-	-	-	-
陽離子交換 HPLC(CEX- HPLC)	第一酸性 區域平均 值[%]	初始	2.2	2.2	2.2	2.1	2.1	2.1
		3個月	2.2	6.3	35.8	2.0	3.8	21.6
		6個月	2.4	11.4	59.1	2.2	6.2	44.6
		9個月	2.7	-	-	2.4	-	-
		12個月	2.9	-	-	2.4	-	-
		18個月	3.3	-	-	-	-	-
	第二酸性 區域平均 值[%]	初始	10.3	10.3	10.3	10.2	10.2	10.2
		3個月	10.6	16.7	32.8	10.6	15.7	40.1
		6個月	10.8	22.4	22.0	10.6	21.2	32.0
		9個月	11.1	-	-	10.9	-	-
		12個月	11.3	-	-	11.0	-	-
		18個月	11.9	-	-	-	-	-
	L0+L1+L2 平均值[%]	初始	85.9	85.9	85.9	86.4	86.4	86.4
		3個月	85.0	73.4	22.5	86.0	78.2	30.1
		6個月	84.8	62.0	9.6	85.8	69.8	12.9
		9個月	84.0	-	-	85.3	-	-
		12個月	83.6	-	-	85.0	-	-
		18個月	82.4	-	-	-	-	-
	離胺酸2後 之峰[%]	初始	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.7
		3個月	1.0	1.7	6.5	0.7	1.2	5.3
		6個月	0.7	1.8	7.5	0.7	1.4	7.6
		9個月	0.7	-	-	0.7	-	-
		12個月	0.7	-	-	0.8	-	-
		18個月	0.9	-	-	-	-	-
	在離胺酸1 與離胺酸2 之間的峰 [%]	初始	1.1	1.1	1.1	0.6	0.6	0.6
		3個月	1.2	2.0	2.4	0.6	1.1	2.9
		6個月	1.4	2.4	1.8	0.7	1.5	2.9
		9個月	1.4	-	-	0.8	-	-
		12個月	1.5	-	-	0.8	-	-
		18個月	1.5	-	-	-	-	-

HPLC(SE-HPLC) 阿達木單抗	主要峰(單體)[%]	初始	99.6	99.6	99.6	99.2	99.2	99.2
		3個月	99.1	98.6	96.0	99.2	98.7	96.5
		6個月	99.0	98.0	91.9	99.1	98.2	91.5
		9個月	99.5	-	-	99.1	-	-
		12個月	99.5	-	-	99.1	-	-
		18個月	99.4	-	-	-	-	-
	聚集體平均值	初始	0.3	0.3	0.3	0.6	0.6	0.6
		3個月	0.8	1.0	1.6	0.7	1.0	2.0
		6個月	0.8	1.2	3.7	0.7	1.2	5.7
		9個月	0.4	-	-	0.8	-	-
		12個月	0.4	-	-	0.8	-	-
		18個月	0.4	-	-	-	-	-
	片段平均值	初始	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
		3個月	0.1	0.4	2.4	0.1	0.3	1.4
		6個月	0.2	0.8	4.4	0.2	0.6	2.9
		9個月	0.2	-	-	0.1	-	-
		12個月	0.1	-	-	0.1	-	-
		18個月	0.2	-	-	-	-	-
蛋白質含量 (UV 280 nm)	平均值 [mg/mL]	初始	97.5	97.5	97.5	98.2	98.2	98.2
光子相關光譜學	PDI平均值	初始	0.057	0.057	0.057	0.061	0.061	0.061
		3個月	0.063	0.062	0.126	0.058	0.057	0.083
		6個月	0.058	0.063	0.234	0.062	0.145	0.217
		9個月	0.059	-	-	0.058	-	-
		12個月	0.063	-	-	0.059	-	-
		18個月	0.057	-	-	-	-	-
	Z平均值	初始	4.8	4.8	4.8	7.1	7.1	7.1
		3個月	4.9	4.9	5.3	7.1	7.1	7.3
		6個月	4.8	4.9	6.2	7.1	7.6	8.4
		9個月	4.8	-	-	7.1	-	-
		12個月	4.8	-	-	7.1	-	-
		18個月	4.8	-	-	-	-	-
活體外TNF中和(細胞毒性測試)	樣本[%]	初始	103	103	103	107	107	107
		3個月	115	93	91	104	90	93
		6個月	98	78	71	119	103	82
		9個月	102	-	-	94	-	-
		12個月	89	-	-	86	-	-

實例9：高濃度阿達木單抗之疼痛研究

藉由皮下注射接受單株抗體治療之患者可在注射部位經歷疼痛或不適(例如參看Fransson, J.; Espander-Jansson, A. (1996) Journal of Pharmacy and Pharmacology 48(10), 1012-1015; Parham, S. M.; Pasieka, J. L. (1996) Can. J. Surg. 39, 31-35; Moriel E Z; Rajfer J (1993) The Journal

of urology 149(5 Pt 2), 1299-300)。在人類使用之前將模擬患者經歷之動物模型用以評估疼痛及耐受性效應且評估可能之調配修改。評估可用動物模型之區分蛋白質調配物之特徵的適用性。量測包括注射時發聲(vocalization injection)、爪退縮(在注射後0-10分鐘)、測試機械性異常疼痛及熱痛覺過敏(注射後30分鐘)。亦觀察動物之避害行為，諸如舔或搖動受影響之爪，及注射部位發紅或腫脹。

選擇退縮模型以評估注射部位疼痛，且用以評估調配組合物對耐受性及痛覺之影響。

將100 mg/mL不同阿達木單抗調配物之耐受性與調配物F7(50 mg/mL阿達木單抗調配物)相比。所產生之資料支持以下驚人發現：與50 mg/mL調配物(F7)相比，在皮下注射後在注射部位100 mg/mL調配物之耐受性獲改良。

將新穎100 mg/mL調配物最優化以減少皮下注射相關副作用，諸如注射部位疼痛。注射部位疼痛包含與針刺有關之疼痛及與溶液輸注於subQ儲槽中有關之感覺。儘管在文獻中可得資料表明某些針設計可有利於減小注射部位不適，但無可得之關於調配物貢獻之確切資料(例如參看Chan, G.C.F.等人, (2003) American Journal of Hematology 76(4):398-404)。

使用大鼠疼痛模型獲得之資料表明與目前市售Humira®調配物相比，新穎100 mg/mL調配物在皮下注射類似治療劑量後有效減小注射部位疼痛。此係藉由降低新穎100 mg/mL調配物之注射體積來達成，從而顯示最優化患者治

療及提高患者順應性之高度有價值之益處。

同時，吾人觀察到為調配 100 mg/mL 調配物可接受之範圍內之調配物 pH 值並不影響注射部位疼痛。有趣的是，較遠離生理學 pH 範圍之較低 pH 值可在類似耐受性下投與。

應用於耐受性測試之方法：

爪退縮及避害(Nocifensive)行為分析

使成年雄性 Sprague Dawley 大鼠在足底內(s.c.)注射試液於右後爪之前適應於測試條件 20-30 分鐘。注意爪退縮之數目且定量避害行為(爪保護或舔)所花之時間歷時注射後之頭 10 分鐘。除非另作說明，否則以 150 μ L 之總體積注射所有試液。實驗係經編碼且以不知情隨機化方式運作。將鹽水及辣椒鹼(2.5 μ g)分別用作陰性及陽性對照物。

體積效應

在安慰劑與測試調配物 F7 中均測試注射體積對爪退縮反應之影響。為測定是否可藉由減小實體體積來改善反應，測試不同注射體積(10 μ l、50 μ l 及 150 μ l，足底內)對退縮結果之影響。

測試資料允許以下體積效應之概括：與鹽水(4 $\pm$ 2)相比，在安慰劑(32 $\pm$ 12)及 F7 中，在 150 μ l 下退縮均顯著增加，但在較小體積下與鹽水不可區分。儘管 150 μ L 之較高注射體積一貫產生較高退縮反應，但較低體積(10 μ L 及 50 μ L)產生顯著較低之反應。

此結果表明降低注射液(injectate)體積係刺激性較小，表明與較低濃度調配物(諸如 F7)相比，關於耐受性及痛

覺，高濃度調配物(諸如F2及F6)為有利的。

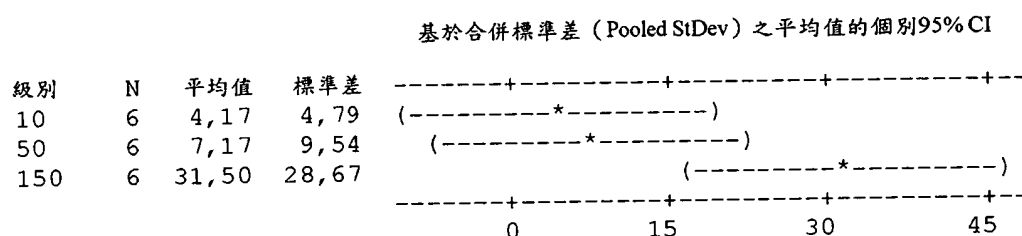
• 安慰劑注射時在注射後0-10分鐘之爪退縮數目：

•

單因子ANOVA：10；50；150 μ l注射體積

來源	DF	SS	MS	F	P
因子	2	2696	1348	4,32	0,033
誤差	15	4679	312		
總計	17	7376			

S=17,66 R-Sq=36,56% R-Sq(adj)=28,10%

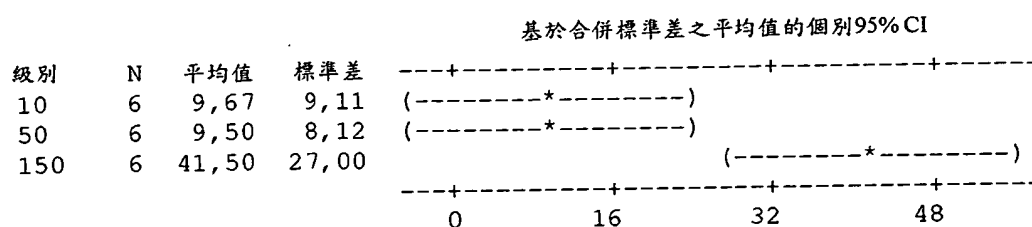


• 活性注射(測試調配物F7)時在注射後0-10分鐘之爪退縮數目：

單因子ANOVA：10；50；150 μ l注射體積

來源	DF	SS	MS	F	P
因子	2	4075	2037	6,96	0,007
誤差	15	4390	293		
總計	17	8465			

S=17,11 R-Sq=48,14% R-Sq(adj)=41,22%



合併標準差 = 17,11

實例10：含有阿達木單抗之溶液pH值對耐受性/疼痛之影響

用含有阿達木單抗之活性溶液進行另一實驗。測試之調

配物為F2(pH 5.2)、F5及F7、pH值接近生理學條件之相應調配物。

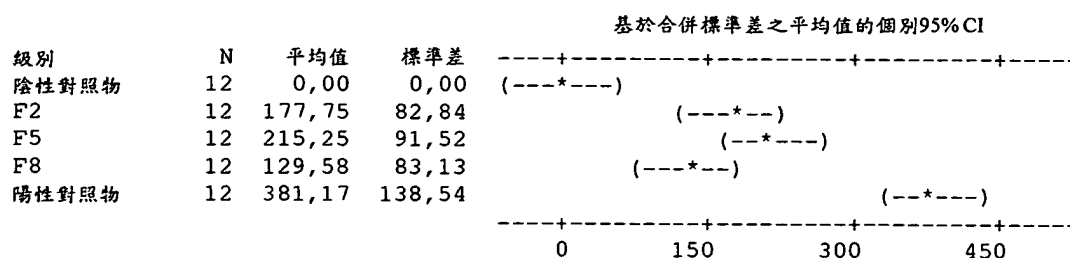
資料表明pH值似乎對動物反應(如使用爪退縮反應及避害行為所花時間來量測)不具有影響。陽性及陰性對照資料在預期範圍內。如文獻中充分證明，較低調配物pH值(亦即酸性)會提高非經腸投與(尤其用皮下注射)後之不耐受及痛覺之風險。因此，令人驚訝的是，對於F2及F5阿達木單抗調配物，調配物pH並不影響耐受性及/或痛覺。此係高度有利的，因為此允許其他參數(諸如調配物pH值、物理穩定性及聚集體含量(可能地與免疫原性風險相關))處於關於調配物決策之高優先級。

• 避害行為所花之時間[sec]資料：

單因子ANOVA：陰性對照物；F2；F5；F8；陽性對照物

來源	DF	SS	MS	F	P
因子	4	919856	229964	27,81	0,000
誤差	55	454773	8269		
總計	59	1374629			

S=90,93 R-Sq=66,92% R-Sq(adj)=64,51%



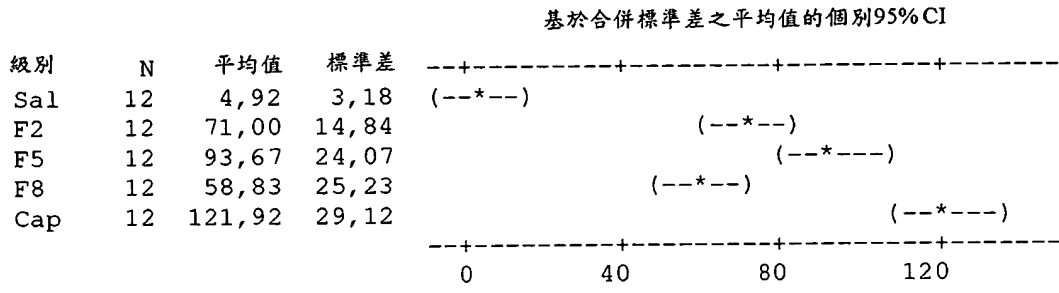
• 注射後0-10分鐘之爪退縮數目：

•

單因子ANOVA：Sal；F2；F5；F8；Cap

來源	DF	SS	MS	F	P
因子	4	91404	22851	49,81	0,000
誤差	55	25234	459		
總計	59	116638			

S=21,42 R-Sq=78,37% R-Sq(adj)=76,79%



合併標準差 = 21,42

Tukey 95%同時信賴區間

實例 11：無阿達木單抗溶液對調配物 pH 值效應之影響

為了測試調配組合物之影響(例如，諸如磷酸鹽之緩衝液、諸如甘露糖醇之賦形劑或諸如聚山梨醇酯 80 之界面活性劑的影響)，進行另一實驗，其中以無蛋白質調配物獲得類似資料。安慰劑溶液之 pH 值在約 5-7 之範圍內變化且令人驚訝的是似乎並不具有改善疼痛之效果，因為對於具有不同 pH 值之調配物注意到之退縮反應為類似的。如先前解釋，此在生物製劑藥品調配物研發中高度有利，因為此允許調配者給予其他參數(諸如調配物 pH 值、物理穩定性及聚集體含量(可能與免疫原性風險相關))關於調配物決策之高優先級。

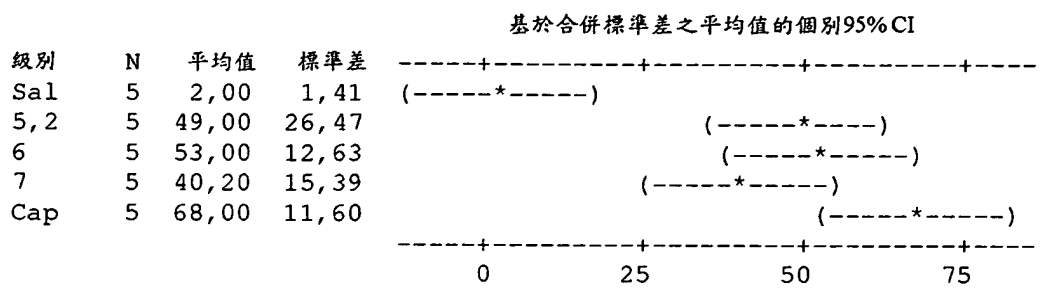
安慰劑注射時在注射後 0-10 分鐘之爪退縮數目：

單因子 ANOVA：Sal；5,2；6；7；Cap



來源	DF	SS	MS	F	P
因子	4	12241	3060	12,41	0,000
誤差	20	4933	247		
總計	24	17174			

S=15,70 R-Sq=71,28% R-Sq(adj)=65,53%



合併標準差 = 15,70

總而言之，上文呈現之資料清楚顯示 100 mg/mL阿達木單抗調配物之優勢在於此等高蛋白質濃度之黏性溶液可在一定pH值範圍內以較低體積投與，但不會減小耐受性及/或增大痛覺。

以引用的方式併入

為了達成任何目的，可能貫穿本申請案引用之所有引用之參考資料(包括例如參考文獻、專利、專利申請案及網站)的內容據此以全文引用的方式明確地併入本文中。除非另外指出，否則本發明之實施將採用此項技術中熟知之習知蛋白質調配技術。

等效形式

在不背離本發明之精神或基本特徵的情況下可以其他特定形式實施本發明。因此，就各方面而言前述實施例應視作說明性的而非限制本文所述之本發明。因此，本發明之範疇係由隨附申請專利範圍而非由前述說明書所指示，且因此屬於申請專利範圍之等效性含義及範圍內的所有變化

均意欲包涵於本文中。

【圖式簡單說明】

圖 1 為展示在含 0.1% Solutol 之溶液中存在高分子量(hmw)蛋白質樣品之圖。根據 MALS(灰線)，聚集體莫耳質量幾乎等於 10^9 g/mol，佔總蛋白質(UV280，黑線)之 2.6%。在 40°C 下儲存 12 週。

圖 2A 及 2B 為展示在 40°C 儲存期間出現之高分子量(hmw)聚集體之早期偵測的圖。儘管經由 UV280(黑色曲線)未偵測到聚集體，但 MALS(灰色曲線)明確證明存在 hmw 樣品。一週儲存(A)相對於原樣本(B)。

圖 3 為展示調配物 F1-F6 之濁度與凍融循環之關係的圖。

圖 4 為展示調配物 F1-F6 之多分散指數與凍融循環之關係的圖。

圖 5 為展示調配物 F1-F6 之聚集體含量(藉由 SEC 測定)與凍融循環之關係的圖。

圖 6 為展示調配物 F1-F6 在 T0 時藉由 DSC 測定之 $T_m(^{\circ}\text{C})$ 的圖。

圖 7 為展示調配物 F1-F6 之聚集體含量(藉由 SEC 測定)與攪拌時間之關係的圖。

圖 8 為展示 F2、F6 及 F7(3 個代表性批料 01032-0134)在穩定性研究中在儲存 3 個月後獲得之濁度值之比較的圖。

圖 9 為展示 F2、F6 及 F7(3 個代表性批料 01032-0134)在穩定性研究中在儲存 3 個月後獲得之可見粒子值(藉由 DAC 評分測定)之比較的圖。

圖 10 為展示 F2、F6 及 F7(3 個代表性批料 01032-0134) 在穩定性研究中在儲存 3 個月後獲得之次可見粒子值($\geq 10 \mu\text{m}$)之比較的圖。

圖 11 為展示 F2、F6 及 F7(3 個代表性批料 01032-0134) 在穩定性研究中在儲存 3 個月後獲得之次可見粒子值($\geq 25 \mu\text{m}$)之比較的圖。

圖 12 為展示 F2、F6 及 F7(3 個代表性批料 01032-0134) 在穩定性研究中在儲存 3 個月後獲得之殘餘單體含量之比較的圖。

圖 13 為展示 F2、F6 及 F7(3 個代表性批料 01032-0134) 在穩定性研究中在儲存 3 個月後獲得之離胺酸變體總和之比較的圖。

圖 14 為展示用於比較 F2、F6 及 F7 在不同攪拌速度之攪拌應力下 24 小時後的穩定性之濁度資料的圖。

圖 15 為展示用於比較 F2、F6 及 F7 在不同攪拌速度之攪拌應力下 24 小時後的穩定性之 DLS 資料(Z 平均值)的圖。

圖 16 為展示用於比較 F2、F6 及 F7 在若干個泵循環前後在應力下的穩定性之濁度資料的圖。

圖 17 為展示用於比較 F2、F6 及 F7 在若干個泵循環前後的穩定性之 DLS 資料(Z 平均值)的圖。

圖 18 為展示用於比較 F2、F6 及 F7 在若干個泵循環前後的穩定性之 SEC 資料(聚集體含量)的圖。

圖 19 為展示使用蠕動泵填充之 100 mg/mL 調配物之目測評分的圖。

圖 20 為展示使用活塞泵填充之 100 mg/mL 調配物之目測評分的圖。

圖 21 為展示使用蠕動泵填充之 100 mg/mL 調配物之濁度的圖。

圖 22 為展示使用活塞泵填充之 100 mg/mL 調配物之濁度的圖。

圖 23 為展示調配物 F8-F11 在 T0 時及在 5°C 下儲存 4 週後之濁度的圖。

圖 24 為展示調配物 F8-F11 在 T0 時及在 5°C 下儲存 4 週後之單體含量的圖。

圖 25 為展示調配物 F8-F11 在 T0 時及在 5°C 下儲存 4 週後之聚集體含量的圖。

圖 26 為展示調配物 F8-F11 在 T0 時及在 5°C 下儲存 4 週後之次可見粒子數的圖。

序列表

<110> 百慕達商亞培生物科技公司

<120> 人類抗-TNF α 抗體之穩定高蛋白質濃度調配物

<130> 117813-90601

<140> 099114238

<141> 2010-05-04

<150> 61/175,380

<151> 009-05-04

<160> 37

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 阿達木單抗輕鏈可變區

<400> 1

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35				40					45				
Tyr	Ala	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Arg	Tyr	Asn	Arg	Ala	Pro	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100						105						

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 阿達木單抗重鏈可變區

<400> 2

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40					45				
Ser	Ala	Ile	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	His	Ile	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55				60					

Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Lys	Val	Ser	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly
		100					105					110			
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 阿達木單抗輕鏈可變區CDR3

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa = Thr或Ala

<400> 3

Gln	Arg	Tyr	Asn	Arg	Ala	Pro	Tyr	Xaa
1				5				

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 阿達木單抗重鏈可變區CDR3

<221> VARIANT

<222> 12

<223> Xaa = Tyr或Asn

<400> 4

Val	Ser	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Asp	Xaa
1				5					10		

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 阿達木單抗輕鏈可變區CDR2

<400> 5

Ala	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser
1				5		

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 阿達木單抗重鏈可變區CDR2

<400> 6

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15
Gly

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 阿達木單抗輕鏈可變區CDR1

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 阿達木單抗重鏈可變區CDR1

<400> 8

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 2SD4輕鏈可變區

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
85 90 95
Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 10
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 2SD4重鏈可變區

<400> 10
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 2SD4輕鏈可變區CDR3

<400> 11
 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> EP B12輕鏈可變區CDR3

<400> 12
 Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>

<223> VL10E4輕鏈可變區CDR3

<400> 13

Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> VL100A9輕鏈可變區CDR3

<400> 14

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> VLL100D2輕鏈可變區CDR3

<400> 15

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> VLL0F4輕鏈可變區CDR3

<400> 16

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> LOE5輕鏈可變區CDR3

<400> 17

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
1 5

<210> 18

<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> VLLOG7輕鏈可變區CDR3

<400> 18
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> VLLOG9輕鏈可變區CDR3

<400> 19
Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> VLLOH1輕鏈可變區CDR3

<400> 20
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> VLLOH10輕鏈可變區CDR3

<400> 21
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> VL1B7輕鏈可變區CDR3

<400> 22

Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> VL1C1輕鏈可變區CDR3

<400> 23
Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> VL0.1F4輕鏈可變區CDR3

<400> 24
Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> VL0.1H8輕鏈可變區CDR3

<400> 25
Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> LOE7.A輕鏈可變區CDR3

<400> 26
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>

<223> 2SD4重鏈可變區CDR3

<400> 27

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> VH1B11重鏈可變區CDR3

<400> 28

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
1 5 10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> VH1D8重鏈可變區CDR3

<400> 29

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> VH1A11重鏈可變區CDR3

<400> 30

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> VH1B12重鏈可變區CDR3

<400> 31

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 32

<211> 12

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> VH1E4重鏈可變區CDR3

<400> 32
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> VH1F6重鏈可變區CDR3

<400> 33
Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 3C-H2重鏈可變區CDR3

<400> 34
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> VH1-D2.N重鏈可變區CDR3

<400> 35
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 36
<211> 321
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 阿達木單抗輕鏈可變區

<400> 36
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtagggga cagagtcacc 60

```

atcacttgtc gggcaagtca gggcatcaga aattacttag cctggtatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcactccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctacagcct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac ttttggccag 300
gggaccaagg tggaaatcaa a                                     321

```

<210> 37

<211> 363

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 阿達木單抗重鏈可變區

```

<400> 37
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ccggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcgg cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcaactgggt ccggcaagct 120
ccaggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttgga atagtgggtca catagactat 180
gcggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaataga acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg 300
taccttagca ccgcgtcctc ccttgactat tggggccaag gtaccctgggt caccgtctcg 360
agt                                     363

```

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：99114238

※ 申請日：99.5.4

※IPC 分類：~~C07K~~ A61K^{9/08} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

人類抗-TNF α 抗體之穩定高蛋白質濃度調配物

A61K^{39/395} (2006.01)

STABLE HIGH PROTEIN CONCENTRATION FORMULATIONS OF
HUMAN ANTI-TNF-ALPHA ANTIBODIES

二、中文發明摘要：

本發明提供一種液體醫藥調配物，其不包括NaCl且包含超過20 mg之多元醇及至少約100 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分。本發明提供一種具有長期穩定性及有利於皮下投藥之特徵的高濃度抗體調配物。

三、英文發明摘要：

The invention provides a liquid pharmaceutical formulation which does not include NaCl and comprises more than 20 mg of a polyol and at least about 100 mg/mL of a human anti-TNF-alpha antibody, or antigen-binding portion thereof. The invention provides a high concentration antibody formulation having long-term stability and advantageous characteristics for subcutaneous administration.

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)

七、申請專利範圍：

1. 一種液體醫藥調配物，其具有5.0至6.4之pH值，且該調配物包含35-55 mg/ml之多元醇、界面活性劑、檸檬酸鹽與磷酸鹽緩衝液、及100-200 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分，該人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分包含：含有包含如SEQ ID NO: 3所示之胺基酸序列的CDR3域包含如SEQ ID NO: 5所示之胺基酸序列的CDR2域及包含如SEQ ID NO: 7所示之胺基酸序列的CDR1域之輕鏈；及含有包含如SEQ ID NO: 4所示之胺基酸序列的CDR3域，包含如SEQ ID NO: 6所示之胺基酸序列的CDR2域及包含如SEQ ID NO: 8所示之胺基酸序列的CDR1域之重鏈，

其中該調配物不含有賦形劑NaCl，且在液體形式下儲存12個月後具有低於約1%之聚集抗體或其抗原結合部分。

2. 如請求項1之調配物，其中該調配物包含35-50 mg/ml之該多元醇。
3. 如請求項1之調配物，其中該調配物包含40-50 mg/ml之該多元醇。
4. 如請求項1之調配物，其中該調配物包含40-45 mg/ml之該多元醇。
5. 如請求項1之調配物，其中該多元醇為糖醇。
6. 如請求項5之調配物，其中該糖醇為甘露糖醇或山梨糖醇。

7. 如請求項1之調配物，其中該人類抗體為人類IgG1 κ 抗體。
8. 如請求項1之調配物，其中該人類抗體之該輕鏈包含如SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列且該人類抗體之該重鏈包含如SEQ ID NO: 2所示之胺基酸序列。
9. 如請求項1之調配物，其中該抗體為阿達木單抗(adalimumab)。
10. 一種液體醫藥調配物，其具有5.0至6.4之pH值，且該調配物包含：

35-55 mg/ml之多元醇，

界面活性劑，

檸檬酸鹽與磷酸鹽緩衝液，及

100-200 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分，該人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分包含：含有包含如SEQ ID NO: 3所示之胺基酸序列之CDR3域，包含如SEQ ID NO: 5所示之胺基酸序列的CDR2域及包含如SEQ ID NO: 7所示之胺基酸序列的CDR1域的輕鏈，及含有包含如SEQ ID NO: 4所示之胺基酸序列之CDR3域，包含如SEQ ID NO: 6所示之胺基酸序列的CDR2域及包含如SEQ ID NO: 8所示之胺基酸序列的CDR1域的重鏈，

其中該調配物不含有NaCl，且在標準24小時攪拌-應力分析後具有20-60 NTU之濁度。

11. 一種液體醫藥調配物，其具有5.0至6.4之pH值，且該調配物包含：

35-55 mg/ml之多元醇，

界面活性劑，

檸檬酸鹽與磷酸鹽緩衝液，及

100-200 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分，該人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分包含：含有包含如SEQ ID NO: 3所示之胺基酸序列之CDR3域，包含如SEQ ID NO: 5所示之胺基酸序列的CDR2域及包含如SEQ ID NO: 7所示之胺基酸序列的CDR1域的輕鏈，及含有包含如SEQ ID NO: 4所示之胺基酸序列之CDR3域，包含如SEQ ID NO: 6所示之胺基酸序列的CDR2域及包含如SEQ ID NO: 8所示之胺基酸序列的CDR1域的重鏈，

其中該調配物不含有NaCl，且在標準48小時攪拌-應力分析後具有35-100 NTU之濁度。

12. 一種液體醫藥調配物，其具有5.0至6.4之pH值，且該調配物包含：

35-55 mg/ml之多元醇，

界面活性劑，

檸檬酸鹽與磷酸鹽緩衝液，及

100-200 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分，該人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分包含：含有包含如SEQ ID NO: 3所示之胺基酸序列之CDR3域，包含如SEQ ID NO: 5所示之胺基酸序列的CDR2域及包含如SEQ ID NO: 7所示之胺基酸序列的CDR1域的輕鏈，及含有包含如SEQ ID NO: 4所示之胺基酸序列之CDR3域，包

含如 SEQ ID NO: 6所示之胺基酸序列的CDR2域及包含如 SEQ ID NO: 8所示之胺基酸序列的CDR1域的重鏈，

其中該調配物不含有NaCl，且在5°C、25°C或40°C下儲存3個月後具有20-40 NTU之濁度。

13. 如請求項10至12中任一項之調配物，其進一步包含35-50 mg/ml之該多元醇。
14. 如請求項10至12中任一項之調配物，其進一步包含40-50 mg/ml之該多元醇。
15. 如請求項10至12中任一項之調配物，其進一步包含約40-45 mg/ml之該多元醇。
16. 如請求項10至12中任一項之調配物，其中該多元醇為糖醇。
17. 如請求項16之調配物，其中該糖醇為甘露糖醇或山梨糖醇。
18. 如請求項10至12中任一項之調配物，其中該pH值為5.0-5.4或5.8-6.4。
19. 如請求項10至12中任一項之調配物，其具有低於1%之聚集蛋白質。
20. 如請求項10至12中任一項之調配物，其中該人類抗體為人類IgG1 κ 抗體。
21. 如請求項10至12中任一項之調配物，其中該人類抗體之該輕鏈包含如SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列且該人類抗體之該重鏈包含如SEQ ID NO: 2所示之胺基酸序列。
22. 如請求項10至12中任一項之調配物，其中該抗體為阿達

本單抗。

23. 一種液體醫藥調配物，其包含：

100-200 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分，該人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分包含：含有包含如SEQ ID NO: 3所示之胺基酸序列之CDR3域，包含如SEQ ID NO: 5所示之胺基酸序列的CDR2域及包含如SEQ ID NO: 7所示之胺基酸序列的CDR1域的輕鏈，及含有包含如SEQ ID NO: 4所示之胺基酸序列之CDR3域，包含如SEQ ID NO: 6所示之胺基酸序列的CDR2域及包含如SEQ ID NO: 8所示之胺基酸序列的CDR1域的重鏈；

35-55 mg/mL之糖醇；

0.1-2.0 mg/mL界面活性劑；

1.15-1.45 mg/mL檸檬酸*H₂O；

0.2-0.4 mg/mL脫水檸檬酸鈉；

1.35-1.75 mg/mL Na₂HPO₄*2H₂O；

0.75-0.95 mg/mL NaH₂PO₄*2H₂O，

其中該調配物具有4.7至6.5之pH值且不包含NaCl。

24. 如請求項23之調配物，其中該糖醇為甘露糖醇或山梨糖醇。

25. 如請求項24之調配物，其包含40-45 mg/mL甘露糖醇或山梨糖醇。

26. 如請求項23之調配物，其中該界面活性劑為聚山梨醇酯80。

27. 如請求項26之調配物，其包含1 mg/mL聚山梨醇酯80。

28. 如請求項23之調配物，其包含1.30-1.31 mg/mL檸檬酸*H₂O。
29. 如請求項23之調配物，其包含0.30-0.31 mg/mL脫水檸檬酸鈉。
30. 如請求項23之調配物，其包含1.50-1.56 mg/mL Na₂HPO₄*2H₂O。
31. 如請求項23之調配物，其包含0.83-0.89 mg/mL NaH₂PO₄*2H₂O。
32. 如請求項23之調配物，其中該pH值為5.2。
33. 如請求項23之調配物，其中該pH值為6.0。
34. 如請求項23之調配物，其中該人類抗體為人類IgG1κ抗體。
35. 如請求項23之調配物，其中該人類抗體之該輕鏈包含如SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列且該人類抗體之該重鏈包含如SEQ ID NO: 2所示之胺基酸序列。
36. 如請求項23之調配物，其中該抗體為阿達木單抗。
37. 如請求項1、10至12及23中任一項之調配物，其適合於皮下投藥。
38. 一種如請求項1、10至12及23中任一項之調配物之用途，其係用以製備用於治療個體之與有害TNFα活性相關之病症的藥物。
39. 一種液體醫藥調配物，其具有5.0至6.4之pH值，且包含：
- 35-55 mg/ml之糖醇，

界面活性劑，

檸檬酸鹽與磷酸鹽緩衝液，

40至125 mg/mL之人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分，及

0.01-300 mM之NaCl，

其中該人類抗-TNF α 抗體或其抗原結合部分包含：輕鏈，該輕鏈含有包含如SEQ ID NO: 3所示之胺基酸序列，包含如SEQ ID NO: 5所示之胺基酸序列的CDR2域，及包含如SEQ ID NO: 7所示之胺基酸序列的CDR1域；及重鏈，該重鏈含有包含如SEQ ID NO: 4所示之胺基酸序列，包含如SEQ ID NO: 6所示之胺基酸序列的CDR2域，及包含如SEQ ID NO: 8所示之胺基酸序列的CDR1域。

40. 如請求項39之調配物，其中該抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含如SEQ ID NO: 1所示之胺基酸序列；及重鏈可變區，該重鏈可變區包含如SEQ ID NO: 2所示之胺基酸序列。

41. 如請求項39之調配物，其中該抗體為阿達木單抗。

42. 如請求項39之調配物，其中該多元醇為糖醇。

43. 如請求項42之調配物，其中該糖醇為甘露糖醇或山梨糖醇。

44. 如請求項如請求項1至12及39中任一項之調配物，其中該界面活性劑為聚山梨醇酯。

45. 如請求項44之調配物，其中該聚山梨醇酯劑為聚山梨醇

酯 80。

46. 如請求項 45 之調配物，其包含 1 mg/mL 聚山梨醇酯 80。