



(21)申請案號：108128028

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 08 月 07 日

(51)Int. Cl.：A61K39/395 (2006.01)A61K9/08 (2006.01)

(30)優先權：2018/08/08美國62/716,239

(71)申請人：美商建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)
美國

(72)發明人：薩利斯布里 柯利奧 SALISBURY, CLEO (US)；莎瑪 維卡斯 SHARMA, VIKAS (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：67 項 圖式數：6 共 106 頁

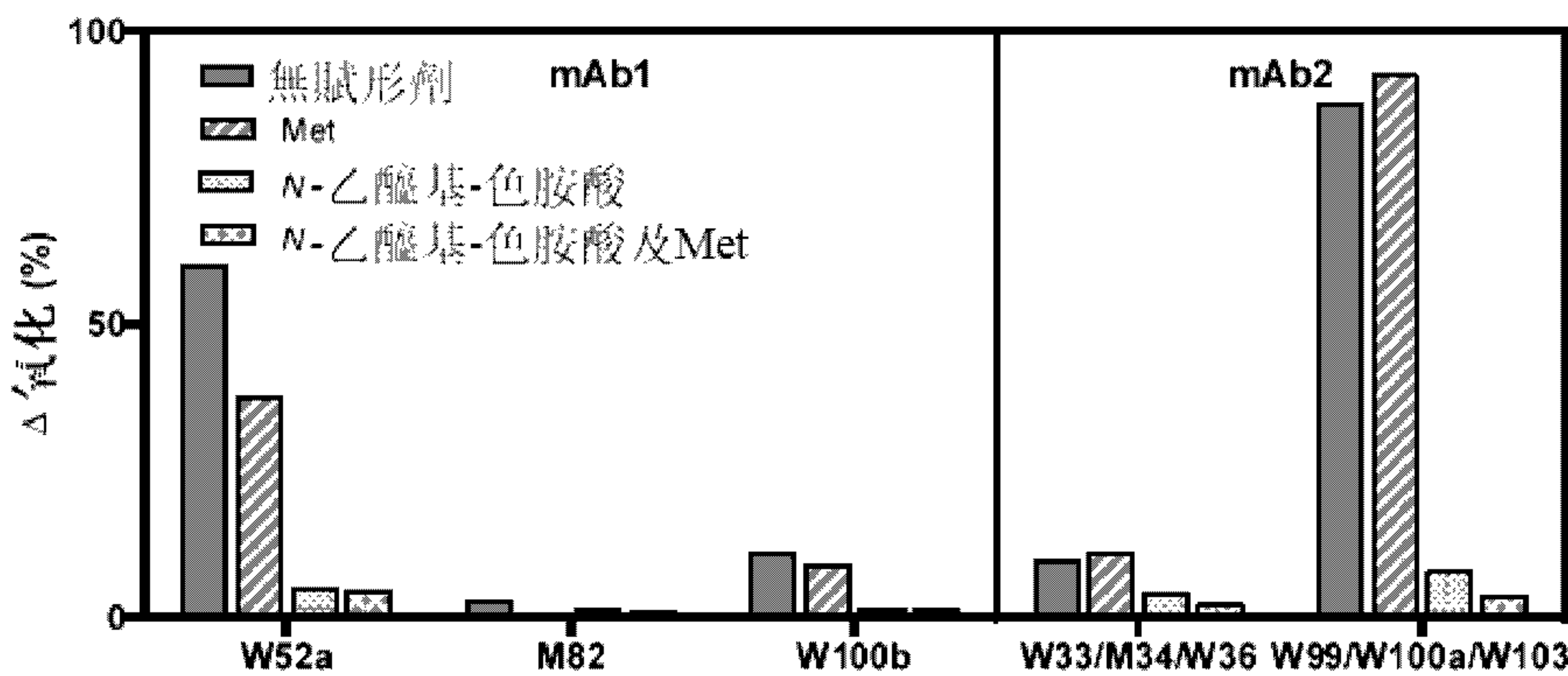
(54)名稱
色胺酸衍生物及 L－甲硫胺酸用於蛋白質調配之用途

(57)摘要
本發明提供包含多肽之方法及調配物，該多肽包含易於氧化之溶劑可及胺基酸殘基，其中使用 N-乙醯基-DL-色胺酸(NAT)及/或 L-甲硫胺酸來防止該多肽氧化。

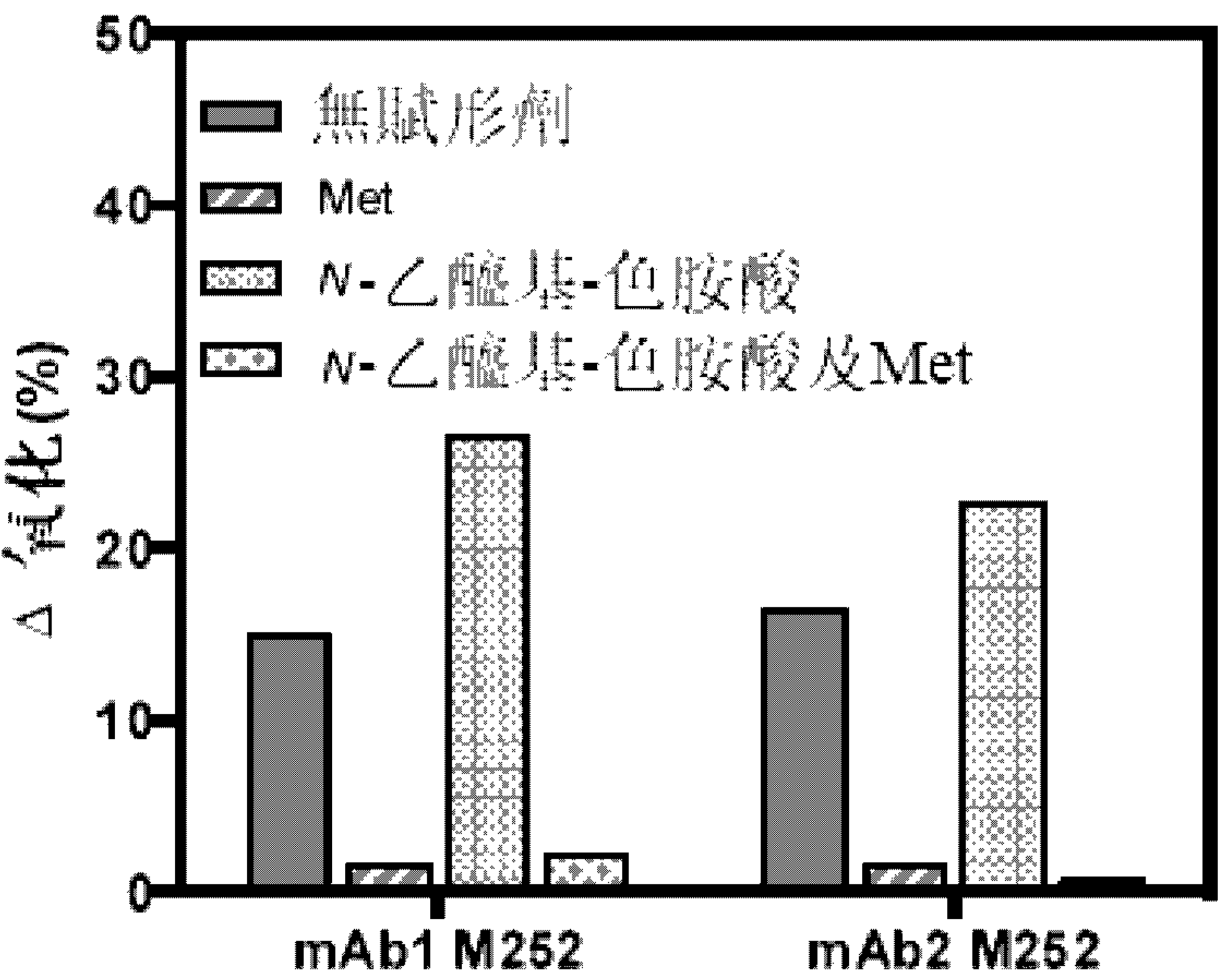
The present disclosure provides methods and formulations comprising a polypeptide comprising solvent accessible amino acid residues susceptible to oxidation wherein N-acetyl-DL-tryptophan (NAT) and/or L-methionine is used to prevent oxidation of the polypeptide.

指定代表圖：

符號簡單說明：
無



【圖 2A】



【圖 2B】



202019478

【發明摘要】

【中文發明名稱】色胺酸衍生物及 L-甲硫胺酸用於蛋白質調配之用途

【英文發明名稱】USE OF TRYPTOPHAN DERIVATIVES AND L-METHIONINE FOR PROTEIN FORMULATION

【中文】

本發明提供包含多肽之方法及調配物，該多肽包含易於氧化之溶劑可及胺基酸殘基，其中使用 N-乙醯基-DL-色胺酸(NAT)及/或 L-甲硫胺酸來防止該多肽氧化。

【英文】

The present disclosure provides methods and formulations comprising a polypeptide comprising solvent accessible amino acid residues susceptible to oxidation wherein N-acetyl-DL-tryptophan (NAT) and/or L-methionine is used to prevent oxidation of the polypeptide.

【指定代表圖】圖 2

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】色胺酸衍生物及 L-甲硫胺酸用於蛋白質調配之用途

【英文發明名稱】USE OF TRYPTOPHAN DERIVATIVES AND L-METHIONINE FOR PROTEIN FORMULATION

【技術領域】

【0001】 本發明係關於包含多肽、N-乙醯基-DL-色胺酸及 L-甲硫胺酸之液體調配物及其製造及使用方法。

【先前技術】

【0002】 包括單株抗體(mAb)在內之治療性蛋白質之生物活性取決於構形及生化穩定性。氧化為治療性蛋白質開發中之許多降解問題之一，此係因為其可能對藥物動力學或生物活性產生負面影響，尤其當氧化發生在參與生理靶標結合之蛋白質區域或效應子功能之關鍵區域時。此外，氧化可改變治療性蛋白質對聚集之敏感性，從而影響免疫原性型態。

【0003】 管控生物治療劑之氧化風險之常見解決方案為凍乾。然而，此方法並不總為合意的，因為其可能增加生產成本，且可能使藥物之製造及臨床使用更加複雜。經由易氧化胺基酸殘基之突變進行蛋白質重改造亦為降低氧化風險之可能途徑。然而，靶向突變並不總為可行之解決方案，因為儘管其可降低氧化之可能性，但其亦可能降低蛋白質對其靶標之結合親和力，且從而降低蛋白質之效力。因此，需要在製造、儲存及使用期間控制治療性蛋白質氧化之替代或互補策略。

【0004】 多肽調配物之實例揭示於 WO 2010/030670、WO 2014/160495、WO 2014/160497 及 WO 2017/117304 中。

【0005】 本文引用之所有參考文獻，包括專利申請案、專利公開案、非專利文獻及 UniProtKB/Swiss-Prot/GenBank 登錄號皆以全文引用之方式併入本文中，如同指示各個別參考文獻特定地且個別地以引用方式併入一般。

【發明內容】

【0006】 為了滿足上述及其他需求，本文揭示包含多肽(例如治療性多肽，諸如抗體)、N-乙醯基-DL-色胺酸(NAT)及 L-甲硫胺酸之液體調配物，其中 NAT 及 L-甲硫胺酸係以足以減少或防止多肽中之一或多個胺基酸殘基(例如色胺酸殘基、甲硫胺酸殘基等)氧化之量提供。本發明至少部分基於以下發現：儘管在氧化應激期間添加 NAT 可有效保護兩種例示性抗體之可變區色胺酸殘基，但納入 NAT 使得 Fc 甲硫胺酸殘基對氧化敏感。然而，發現向包含 NAT 之調配物中添加 L-甲硫胺酸對於兩種例示性抗體均可有效保護色胺酸與甲硫胺酸殘基之氧化(參見實例 1)。本發明亦至少部分基於以下發現：兩種賦形劑在活體內均為良好耐受的(參見實例 1)，表明 NAT 及 L-甲硫胺酸在生物治療調配物中作為抗氧化賦形劑可為安全且有效的。

【0007】 因此，在一個態樣中，本文提供包含多肽、N-乙醯基-DL-色胺酸(NAT)及 L-甲硫胺酸之液體調配物，其中 NAT 係以足以防止多肽中之一或多個色胺酸殘基氧化之量提供，且其中 L-甲硫胺酸係以足以防止多肽中之一或多個甲硫胺酸殘基氧化之量提供。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 0.01 至約 25 mM。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 0.05 至約 1.0 mM。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 0.05 至約 0.3 mM。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為選自由以下組成之群的濃度：約 0.05 mM、約 0.1 mM、約 0.3 mM 及約 1.0 mM。在一些實施例中，調配物中 L-甲硫胺酸之濃度為約 1 至約 125 mM。在一些實施例中，調配物中 L-甲硫胺酸之濃

度為約 5 至約 25 mM。在一些實施例中，調配物中 L-甲硫胺酸之濃度為約 5 mM。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 0.3 mM 且調配物中 L-甲硫胺酸之濃度為約 5.0 mM。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 1.0 mM 且調配物中 L-甲硫胺酸之濃度為約 5.0 mM。

【0008】 在本發明之一些實施例中，多肽為抗體。在一些實施例中，多肽之一或多個色胺酸殘基位於抗體之可變區內。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基包含 W103，其中殘基編號係根據 Kabat 編號來進行。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基位於抗體之 HVR 內。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基位於抗體之 HVR-H1 及/或 HVR-H3 內。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基包含 W33、W36、W52a、W99、W100a 及/或 W100b，其中殘基編號係根據 Kabat 編號來進行。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基位於抗體之可變區內。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基包含 M34 及/或 M82，其中殘基編號係根據 Kabat 編號來進行。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基位於抗體之恆定區內。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基包含 M252 及/或 M428，其中殘基編號係根據 EU 編號來進行。在一些實施例中，抗體為 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗體。在一些實施例中，抗體為多株抗體、單株抗體、人類化抗體、人類抗體、嵌合抗體、多特異性抗體或抗體片段。

【0009】 在本發明之一些實施例中，多肽中一或多個色胺酸殘基之氧化相對於缺少 NAT 之液體調配物中多肽中之一或多個相應色胺酸殘基之氧化有所減少。在一些實施例中，多肽中一或多個甲硫胺酸殘基之氧化相對於缺少 L-甲硫胺酸之液體調配物中多肽中之一或多個相應甲硫胺酸殘基之氧化有所減少。在一些實施例中，多肽中一或多個色胺酸殘基及一或多個甲硫胺酸殘基之氧化相對於缺少 NAT 及 L-甲硫胺酸之液體調配物中多肽中之一或多個相應色胺酸殘

基及一或多個相應甲硫胺酸殘基之氧化有所減少。在一些實施例中，氧化減少約 40%、約 50%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%或約 99%。

【0010】 在本發明之一些實施例中，調配物中之多肽濃度為約 1 mg/mL 至約 250 mg/mL。在一些實施例中，調配物具有約 4.5 至約 7.0 之 pH 值。在一些實施例中，調配物進一步包含一或多種賦形劑。在一些實施例中，一或多種賦形劑係選自由以下組成之群：穩定劑、緩衝劑、表面活性劑及張力劑。

【0011】 在本發明之一些實施例中，調配物為適於投與個體之醫藥調配物。在一些實施例中，醫藥調配物適於皮下、靜脈內或玻璃體內投與。在一些實施例中，個體為人類。

【0012】 在一些態樣中，本發明提供一種包含如本文所述之液體調配物之製品或套組。

【0013】 在一些態樣中，本發明提供一種減少水性調配物中之多肽之氧化的方法，該方法包括將 NAT 及 L-甲硫胺酸添加至調配物中，其中 NAT 係以足以防止多肽中之一或多個色胺酸殘基氧化之量提供，且其中 L-甲硫胺酸係以足以防止多肽中之一或多個甲硫胺酸殘基氧化之量提供。在一些實施例中，將 NAT 添加至調配物中，達至約 0.01 至約 25 mM 之濃度。在一些實施例中，將 NAT 添加至調配物中，達至約 0.05 至約 1 mM 之濃度。在一些實施例中，將 NAT 添加至調配物中，達至約 0.05 至約 0.3 mM 之濃度。在一些實施例中，將 NAT 添加至調配物中，達至選自由以下組成之群的濃度：約 0.05 mM、約 0.1 mM、約 0.3 mM 及約 1.0 mM。在一些實施例中，將 L-甲硫胺酸添加至調配物中，達至約 1 至約 125 mM 之濃度。在一些實施例中，將 L-甲硫胺酸添加至調配物中，達至約 5 至約 25 mM 之濃度。在一些實施例中，將 L-甲硫胺酸添加至調配物中，達至約 5 mM 之濃度。在一些實施例中，將 NAT 添加至調配物中，達

至約 0.3 mM 之濃度，且其中將 L-甲硫胺酸添加至調配物中，達至約 5.0 mM 之濃度。在一些實施例中，將 NAT 添加至調配物中，達至約 1.0 mM 之濃度，且其中將 L-甲硫胺酸添加至調配物中，達至約 5.0 mM 之濃度。

【0014】 在本發明之一些實施例中，多肽為抗體。在一些實施例中，多肽之一或多個色胺酸殘基位於抗體之可變區內。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基包含 W103，其中殘基編號係根據 Kabat 編號來進行。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基位於抗體之 HVR 內。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基位於抗體之 HVR-H1 及/或 HVR-H3 內。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基包含 W33、W36、W52a、W99、W100a 及/或 W100b，其中殘基編號係根據 Kabat 編號來進行。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基位於抗體之可變區內。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基包含 M34 及/或 M82，其中殘基編號係根據 Kabat 編號來進行。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基位於抗體之恆定區內。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基包含 M252 及/或 M428，其中殘基編號係根據 EU 編號來進行。在一些實施例中，抗體為 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗體。在一些實施例中，抗體為多株抗體、單株抗體、人類化抗體、人類抗體、嵌合抗體、多特異性抗體或抗體片段。

【0015】 在本發明之一些實施例中，多肽中一或多個色胺酸殘基之氧化相對於缺少 NAT 之液體調配物中多肽中之一或多個相應色胺酸殘基之氧化有所減少。在一些實施例中，多肽中一或多個甲硫胺酸殘基之氧化相對於缺少 L-甲硫胺酸之液體調配物中多肽中之一或多個相應甲硫胺酸殘基之氧化有所減少。在一些實施例中，多肽中一或多個色胺酸殘基及一或多個甲硫胺酸殘基之氧化相對於缺少 NAT 及 L-甲硫胺酸之液體調配物中多肽中之一或多個相應色胺酸殘

基及一或多個相應甲硫胺酸殘基之氧化有所減少。在一些實施例中，氧化減少約 40%、約 50%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%或約 99%。

【0016】 在本發明之一些實施例中，調配物中之多肽濃度為約 1 mg/mL 至約 250 mg/mL。在一些實施例中，調配物具有約 4.5 至約 7.0 之 pH 值。在一些實施例中，調配物進一步包含一或多種賦形劑。在一些實施例中，一或多種賦形劑係選自由以下組成之群：穩定劑、緩衝劑、表面活性劑及張力劑。在一些實施例中，調配物為適合於向個體投與之醫藥調配物。在一些實施例中，醫藥調配物適合於皮下、靜脈內或玻璃體內投與。在一些實施例中，個體為人類。

【0017】 應理解，上文及本文所述之各個實施例之一個、一些或所有特性可組合以形成本發明之其他實施例。本發明之此等及其他態樣對熟習此項技術者將為顯而易見的。本發明之該等及其他實施例將由下文之詳細描述進一步描述。

【圖式簡單說明】

【0018】 圖 1A-1B 顯示在 2,2'-偶氮-雙(2-甲脒基丙烷)二鹽酸鹽(AAPH)應激後 N-乙醯基-DL-色胺酸(NAT)濃度對兩種例示性 IgG1 抗體(mAb1 及 mAb2)之氧化水準之影響。圖 1A 顯示 NAT 濃度對 Fv 色胺酸氧化水準之影響。圖 1B 顯示 NAT 濃度對 Fc 甲硫胺酸氧化水準之影響。

【0019】 圖 2A-2B 顯示兩種例示性 IgG1 抗體(mAb1 及 mAb2)之 AAPH 應激後之氧化水準，該兩種例示性 IgG1 抗體係在不含甲硫胺酸或 NAT、含 5 mM 甲硫胺酸、0.3 mM NAT 或 5 mM 甲硫胺酸及 0.3 mM NAT 之組合的情況下加以調配。圖 2A 顯示氧化敏感性 Fv 色胺酸之氧化水準。圖 2B 顯示 Fc 甲硫胺酸之氧化水準。

【0020】 圖 3A-3B 顯示在高 UV 光應激後 NAT 濃度對兩種例示性 IgG1 抗體 (mAb1 及 mAb2) 之氧化水準之影響。圖 3A 顯示 NAT 濃度對 HVR 色胺酸氧化水準之影響。圖 3B 顯示 NAT 濃度對 Fc 甲硫胺酸氧化水準之影響。

【0021】 圖 4A-4B 顯示兩種例示性 IgG1 抗體(mAb1 及 mAb2)之高 UV 光應激後之氧化水準，該兩種例示性 IgG1 抗體係在不含甲硫胺酸或 NAT、含 5 mM 甲硫胺酸、0.3 mM NAT 或 5 mM 甲硫胺酸及 0.3 mM NAT 之組合的情況下加以調配。圖 4A 顯示 HVR 色胺酸之氧化水準。圖 4B 顯示 Fc 甲硫胺酸之氧化水準。

【0022】 圖 5 顯示抗氧化劑降低化學氧化風險。

【0023】 圖 6 顯示在 1 mM NAT 及 5 mM 甲硫胺酸情況下防止 W52 氧化。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0024】 本申請案主張於 2018 年 8 月 8 日提交之美國臨時申請案第 62/716,239 號之權益，該臨時申請案各自以全文引用之方式併入本文中。

I. 定義.

【0025】 在詳細描述本發明之前，應理解，本發明不限於特定組合物或生物系統，其當然可發生變化。亦應理解，本文使用之術語僅用於描述特定實施例之目的，且不欲具有限制性。

【0026】 除非內容另有明確指示，否則如本文所用，單數形式「一(a、an)」及「該」包括複數個指示物。因此，例如，提及「一個分子」視情況包括兩個或更多個該等分子之組合及類似情況。

【0027】 如本文所用之術語「約」係指熟習此項技術者容易得知之各別值之常用誤差範圍。本文對「約」值或參數之提及包括(且描述)針對該值或參數本身之實施例。

【0028】 應理解，本文所述本發明之態樣及實施例包括「包含態樣及實施例」、「由態樣及實施例組成」及「基本上由態樣及實施例組成」。

【0029】 如本文所用之術語「及/或」，諸如片語「A 及/或 B」意欲包括 A 與 B；A 或 B；A (單獨)；及 B (單獨)。同樣，如本文所用之術語「及/或」，諸如「A、B 及/或 C」之片語意欲涵蓋以下實施例中之每一者：A、B 及 C；A、B 或 C；A 或 C；A 或 B；B 或 C；A 及 C；A 及 B；B 及 C；A (單獨)；B (單獨)；及 C (單獨)。

【0030】 術語「醫藥調配物」係指以下製劑：其形式允許活性成分之生物活性有效，且不含對將投與該調配物之個體具有不可接受之毒性的其他組分。該等調配物為無菌的。

【0031】 「無菌」調配物為潔淨的或不含或基本上不含所有活的微生物及其孢子。

【0032】 「穩定」調配物為如下調配物，在該調配物中其中之多肽在儲存時基本上保持其物理穩定性及/或化學穩定性及/或生物活性。較佳地，調配物在儲存時基本上保持其物理及化學穩定性以及其生物活性。儲存期通常根據調配物之預期儲放壽命來選擇。用於量測多肽穩定性之各種分析技術為此項技術可獲得的且綜述於例如 *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee 編，Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)及 Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993)中。穩定性可在所選曝光量及/或溫度下持續所選時間段進行量測。穩定性可用多種不同方法進行定性及/或定量評估，包括聚集

體形成之評估(例如使用尺寸排阻層析、藉由量測濁度及/或藉由目視檢查)；ROS 形成之評估(例如藉由使用光應激分析或 2,2'-偶氮雙(2-甲脒基丙烷)二鹽酸鹽(AAPH)應激分析)；蛋白質之特定胺基酸殘基(例如單株抗體之 Trp 殘基及/或 Met 殘基)之氧化；藉由使用陽離子交換層析、影像毛細管等電聚焦(icIEF)或毛細管區帶電泳評價電荷異質性；胺基末端或羧基末端序列分析；質譜分析；用於比較減小及完整之抗體的 SDS-PAGE 分析；肽圖譜(例如胰蛋白酶或 LYS-C)分析；評估蛋白質之生物活性或靶標結合功能(例如抗體之抗原結合功能)等。不穩定性可涉及以下中之任何一或多者：聚集、去醯胺化(例如 Asn 去醯胺化)、氧化(例如 Met 氧化及/或 Trp 氧化)、異構化(例如 Asp 異構化)、剪切/水解/片段化(例如鉸鏈區片段化)、丁二醯亞胺形成、未配對半胱胺酸、N 末端延伸、C 末端加工、糖基化差異等。

【0033】 若多肽在目視檢查顏色及/或透明度時，或如藉由例如 UV 光散射或尺寸排阻層析所量測，顯示沒有或極少之聚集、沈澱、片段化及/或變性之跡象，則該多肽在醫藥調配物中「保持其物理穩定性」。

【0034】 若給定時間之化學穩定性使得如下文所定義多肽被視為仍然保持生物活性，則該多肽在醫藥調配物中「保持其化學穩定性」。化學穩定性可藉由偵測及量化多肽之化學變化形式來評價。化學變化可涉及多肽氧化，此可使用例如胰蛋白酶肽圖譜、反相高效液相層析(HPLC)及液相層析-質譜(LC/MS)來評估。其他類型之化學變化包括多肽之電荷變化，此可藉由例如離子交換層析或 icIEF 來評估。

【0035】 若多肽在給定時間之生物活性如例如在單株抗體之抗原結合分析中所測定在醫藥調配物製備時展現之生物活性之約 20%內(諸如在約 10%內)(在分析之誤差內)，則多肽在醫藥調配物中「保持其生物活性」。

【0036】 如本文所用，多肽之「生物活性」係指多肽結合其靶標之能力，例如單株抗體結合於抗原之能力。其可進一步包括可在活體外或活體內量測之生物反應。該活性可為拮抗的或對抗的。

【0037】 「易於氧化」之多肽為包含一或多個已發現易於氧化之殘基的多肽，該等殘基為諸如(但不限於)甲硫胺酸(Met)、半胱胺酸(Cys)、組胺酸(His)、色胺酸(Trp)及酪胺酸(Tyr)。舉例而言，單株抗體 Fab 部分之色胺酸胺基酸或單株抗體 Fc 部分之甲硫胺酸胺基酸可能易於氧化。

【0038】 多肽之「氧化不穩定」殘基為在氧化分析(例如，AAPH 誘導或熱誘導氧化)中具有大於 35%氧化之殘基。多肽中殘基之氧化百分比可藉由此項技術中已知之任何方法來確定，諸如用於位點特異性 Trp 氧化之胰蛋白酶消化繼之以 LC-MS/MS。

【0039】 溶劑中生物分子之「溶劑可及表面積」或「SASA」為溶劑可及之生物分子的表面積。SASA 可用量測單位(例如平方埃)或溶劑可及表面積之百分比來表示。舉例而言，多肽中胺基酸殘基之 SASA 可為 $80 \text{ \AA}^2$ 或 30%。SASA 可藉由此項技術中已知之任何方法來確定，包括例如使用什拉克-魯普利演算法(Shrake-Rupley algorithm)、LCPO 法、摹圖法或分子動力學模擬。

【0040】 術語「等滲」在提及相關調配物時係指具有與人類血液基本相同之滲透壓之調配物。等滲調配物通常將具有約 250 至 350 mOsm 之滲透壓。等滲性可使用例如蒸氣壓或冰凝型滲透計來量測。

【0041】 如本文所用，「緩衝劑」係指藉由酸鹼共軛組分之作用抵抗 pH 變化之緩衝溶液。舉例而言，本發明之緩衝劑可具有約 4.5 至約 8.0 範圍內之 pH 值。組胺酸乙酸鹽為緩衝劑之實例，其可將 pH 值控制在此範圍內。

【0042】 「防腐劑」為例如可視情況納入調配物中以基本上減少其中之細菌作用，從而促進多用途調配物之產生的化合物。潛在防腐劑之實例包括十八烷基二甲基苯甲基氯化銨、氯化六烴季銨、苯紮氯銨(烷基為長鏈化合物之烷基苯甲基二甲基氯化銨之混合物)及苜索氯銨。其他類型之防腐劑包括芳香醇(諸如苯酚)、丁醇及苯甲醇、對羥基苯甲酸烷基酯(諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯)、兒茶酚、間苯二酚、環己醇、3-戊醇及間甲酚。在一個實施例中，本文之防腐劑為苯甲醇。

【0043】 如本文所用，「表面活性劑」係指表面活性物質，較佳指非離子表面活性劑。本文之表面活性劑之實例包括聚山梨醇酯(例如，聚山梨醇酯 20 及聚山梨醇酯 80)；泊洛沙姆(poloxamer) (例如泊洛沙姆 188)；Triton；十二烷基硫酸鈉(SDS)；月桂基硫酸鈉；辛基糖苷鈉；月桂基磺基甜菜鹼、肉豆蔻基磺基甜菜鹼、亞油烯基磺基甜菜鹼或硬脂基磺基甜菜鹼；月桂基肌胺酸、肉豆蔻基肌胺酸、亞油烯基肌胺酸或硬脂基肌胺酸；亞油烯基甜菜鹼、肉豆蔻基甜菜鹼或鯨蠟基甜菜鹼；月桂醯胺丙基甜菜鹼、椰油醯胺丙基甜菜鹼、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胺、棕櫚醯胺丙基二甲胺或異硬脂醯胺丙基二甲胺；甲基椰油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、聚丙二醇以及乙二醇及丙二醇之共聚物(例如 Pluronic、PF68 等)等。在一個實施例中，本文之表面活性劑為聚山梨醇酯 20。在另一實施例中，本文之表面活性劑為泊洛沙姆 188。

【0044】 如本文所用之「醫藥學上可接受之」賦形劑或載劑包括醫藥學上可接受之載劑、穩定劑、緩衝劑、酸、鹼、糖、防腐劑、表面活性劑、張力劑及

類似物，其為此項技術中熟知的 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy，第 22 版，Pharmaceutical Press, 2012)。醫藥學上可接受之賦形劑之實例包括緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸、L-色胺酸及甲硫胺酸；低分子量(少於約 10 個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺、精胺酸或離胺酸；單醣、二醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；金屬錯合物，諸如鋅-蛋白質錯合物；螯合劑，諸如 EDTA；糖醇，諸如甘露醇或山梨醇；成鹽相對離子，諸如鈉；及/或非離子表面活性劑，諸如聚山梨醇酯、泊洛沙姆、聚乙二醇 (PEG)及 PLURONICS™。「醫藥學上可接受之」賦形劑或載劑為能夠合理地向個體投與以提供有效劑量之所用活性成分且在所用劑量及濃度下對暴露於其中之個體無毒之彼等賦形劑或載劑。

【0045】 所調配之多肽較佳為基本上純的，且理想地為基本上均質的(例如，不含污染蛋白質等)。「基本上純之」多肽意指組合物包含基於組合物總重量至少約 90 重量%、較佳至少約 95 重量%之多肽(例如單株抗體)。「基本上均質之」多肽意指組合物包含基於組合物總重量至少約 99 重量%之多肽(例如單株抗體)。

【0046】 術語「蛋白質」、「多肽」及「肽」在本文中可互換使用且指任何長度之胺基酸聚合物。聚合物可為直鏈或具支鏈的，其可包含經修飾之胺基酸，且其可由非胺基酸間隔開。該等術語亦涵蓋天然或藉由例如以下干預修飾之胺基酸聚合物：二硫鍵形成、糖基化、脂化、乙醯化、磷酸化或任何其他操縱或修飾，諸如與標記組分結合。定義中亦包括例如含有一或多種胺基酸類似物(包括例如非天然胺基酸等)以及此項技術中已知之其他修飾之多肽。本文定

義中所涵蓋之多肽之實例包括哺乳動物多肽，諸如腎素；生長激素，包括人生長激素及牛生長激素；生長激素釋放因子；甲狀旁腺激素；甲狀腺刺激激素；脂蛋白； α -1-抗胰蛋白酶；胰島素 A 鏈；胰島素 B 鏈；胰島素原；卵泡刺激素；降鈣素；黃體生成激素；胰高血糖素；瘦素；凝血因子，諸如因子 VIIIc、因子 IX、組織因子及馮維勒布蘭德因子(von Willebrands factor)；抗凝血因子，諸如蛋白質 C；心房利鈉因子；肺表面活性劑；纖溶酶原活化劑，諸如尿激酶或人類尿素或組織型纖溶酶原活化劑(t-PA)；鈴蟾肽；凝血酶；造血生長因子；腫瘤壞死因子- α 及腫瘤壞死因子- β ；腫瘤壞死因子受體，諸如死亡受體 5 及 CD120；TNF 相關凋亡誘導配位體(TRAIL)；B 細胞成熟抗原(BCMA)；B 淋巴球刺激劑(BLyS)；增殖誘導配位體(APRIL)；腦啡肽酶；RANTES (活化調節，正常 T 細胞表現及分泌)；人類巨噬細胞發炎蛋白(MIP-1- α)；血清白蛋白，諸如人類血清白蛋白；苗勒氏抑制物質(Muellerian-inhibiting substance)；鬆弛素 A 鏈；鬆弛素 B 鏈；普羅鬆弛素(prorelaxin)；小鼠促性腺激素相關肽；微生物蛋白，諸如 β -內醯胺酶；DNA 酶；IgE；細胞毒性 T 淋巴球相關抗原(CTLA)，諸如 CTLA-4；抑制素；活化素；血小板源性內皮細胞生長因子(PD-ECGF)；血管內皮生長因子家族蛋白(例如 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 及 PlGF)；血小板源性生長因子(PDGF)家族蛋白(例如 PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D 及其二聚體)；成纖維細胞生長因子(FGF)家族，諸如 aFGF、bFGF、FGF4 及 FGF9；表皮生長因子(EGF)；激素或生長因子受體，諸如 VEGF 受體(例如 VEGFR1、VEGFR2 及 VEGFR3)、表皮生長因子(EGF)受體(例如 ErbB1、ErbB2、ErbB3 及 ErbB4 受體)、血小板源性生長因子(PDGF)受體(例如 PDGFR- α 及 PDGFR- β)及成纖維細胞生長因子受體；TIE 配位體(血管生成素 ANGPT1、ANGPT2)；血管生成素受體，諸如

TIE1 及 TIE2；蛋白質 A 或 D；類風濕因子；神經營養因子，諸如骨源性神經營養因子(BDNF)、神經營養因子-3、神經營養因子-4、神經營養因子-5 或神經營養因子-6 (NT-3、NT-4、NT-5 或 NT-6)，或諸如 NGF-b 之神經生長因子；轉型生長因子(TGF)，諸如 TGF- α 及 TGF- β ，包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5；胰島素樣生長因子-I 及胰島素樣生長因子-II (IGF-I 及 IGF-II)；des(1-3)-IGF-I (腦 IGF-I)、胰島素樣生長因子結合蛋白(IGFBP)；CD 蛋白，諸如 CD3、CD4、CD8、CD19 及 CD20；紅細胞生成素；骨誘導因子；免疫毒素；骨形態發生蛋白(BMP)；趨化介素，諸如 CXCL12 及 CXCR4；干擾素，諸如干擾素 α 、干擾素 β 及干擾素 γ ；群落刺激因子(CSF)，諸如 M-CSF、GM-CSF 及 G-CSF；細胞介素，諸如介白素(IL)，例如 IL-1 至 IL-10；中期因子(midkine)；超氧化物歧化酶；T 細胞受體；表面膜蛋白；衰變加速因子；病毒抗原，諸如 AIDS 包膜之一部分；轉運蛋白；歸巢受體；地址素；調節蛋白；整合素，諸如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 及 VCAM；蝶素(ephrin)；Bv8； δ 樣配位體 4 (DLL4)；Del-1；BMP9；BMP10；卵泡抑素；肝細胞生長因子(HGF)/分散因子(SF)；Alk1；Robo4；ESM1；串珠素(Perlecan)；EGF 樣結構域多重 7 (EGFL7)；CTGF 及其家族成員；血小板反應素，諸如血小板反應素 1 及血小板反應素 2；膠原，諸如膠原 IV 及膠原 XVIII；神經纖毛蛋白，諸如 NRP1 及 NRP2；多效生長因子(PTN)；顆粒蛋白前體(Progranulin)；增殖蛋白；切口蛋白，如 Notch1 及 Notch4；腦信號蛋白(semaphorin)，如 Sema3A、Sema3C 及 Sema3F；腫瘤相關抗原，諸如 CA125 (卵巢癌抗原)；免疫黏附素；及任一上文所列多肽之片段及/或變異體以及結合至一或多種蛋白質(包括例如任一上文所列蛋白質)之抗體(包括抗體片段)。

【0047】 術語「抗體」在本文中以最廣義使用且具體涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性、三特異性等)以及抗體片段，只要其展現需要之生物活性即可。

【0048】 「經分離」多肽(例如經分離抗體)為已自其天然環境之組分鑑定、分離及/或回收之多肽。其天然環境之污染物組分為會干擾多肽之研究、診斷或治療用途之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質溶質或非蛋白質溶質。經分離多肽包括重組細胞內之原位多肽，因多肽之天然環境之至少一種組分將不存在。然而，通常經分離之多肽將藉由至少一個純化步驟來製備。

【0049】 「天然抗體」通常為約 150,000 道耳頓之異四聚醣蛋白，由兩條相同之輕鏈(L)及兩條相同之重鏈(H)組成。各輕鏈藉由一個共價二硫鍵連接至重鏈，而不同免疫球蛋白同種型之重鏈之間二硫鍵之數量有所變化。各重鏈及輕鏈亦具有規則間隔之鏈內二硫橋。各重鏈之一端具有可變結構域(V_H)，其後為許多恆定結構域。各輕鏈之一端具有可變結構域(V_L)，且其另一端具有恆定結構域；輕鏈之恆定結構域與重鏈之第一恆定結構域對齊，且輕鏈可變結構域與重鏈之可變結構域對齊。認為特定胺基酸殘基在輕鏈與重鏈可變結構域之間形成界面。

【0050】 術語「恆定結構域」係指相對於免疫球蛋白之另一部分，亦即含有抗原結合位點之可變結構域，免疫球蛋白分子之具有更保守胺基酸序列之部分。恆定結構域含有重鏈之 C_H1 、 C_H2 及 C_H3 結構域(統稱為 CH)及輕鏈之 CHL (或 CL)結構域。

【0051】 抗體之「可變區」或「可變結構域」係指抗體之重鏈或輕鏈之胺基末端結構域。重鏈之可變結構域可稱為「 V_H 」。輕鏈之可變結構域可稱為「 V_L 」。該等結構域通常為抗體之最可變部分且含有抗原結合位點。

【0052】 術語「可變」係指在抗體之間可變結構域之某些部分的序列差異很大，且用於各特定抗體對其特定抗原之結合及特異性中。然而，可變性並不均勻地分佈在抗體之可變結構域中。其集中在輕鏈與重鏈可變結構域中稱為超變區(HVR)之三個區段中。可變結構域之更高度保守之部分稱為框架區(FR)。天然重鏈及輕鏈之可變結構域各自包含四個 FR 區，大部分採用 β -摺疊組態，由三個 HVR 連接，此形成連接 β -摺疊結構之環，且在一些情況下形成 β -摺疊結構之一部分。每條鏈中之 HVR 藉由 FR 區緊密結合在一起，且與另一條鏈之 HVR 一起促進抗體之抗原結合位點之形成(參見 Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版，National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991))。恆定結構域不直接參與抗體與抗原之結合，但展現各種效應子功能，例如抗體參與抗體依賴性細胞毒性。

【0053】 來自任何哺乳動物物種之抗體(免疫球蛋白)之「輕鏈」可基於其恆定結構域之胺基酸序列指配給稱為卡帕(「 κ 」)及拉姆達(「 λ 」)之兩種明顯不同類型中之一者。

【0054】 如本文所用之術語 IgG 「同種型」或「子類」意指由免疫球蛋白恆定區之化學及抗原特徵定義之任一免疫球蛋白子類。視抗體重鏈之恆定結構域之胺基酸序列而定，可將抗體(免疫球蛋白)指配給不同類別。免疫球蛋白有五大類：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，且其中幾類可進一步分為子類(同種型)，例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 及 IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白之重鏈恆定結構域分別稱為 α 、 γ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同類別之免疫球蛋白之亞單位結構及三維組態為眾所周知的，且大致描述於例如 Abbas 等人，*Cellular and Mol. Immunology*，第 4 版(W.B. Saunders, Co., 2000)中。抗體可為較大融合分子之一

部分，該較大融合分子係藉由抗體與一或多種其他蛋白質或肽之共價或非共價締合形成。

【0055】 術語「全長抗體」、「完整抗體」及「全抗體」在本文中可互換地用於指呈實質上完整形式之抗體，而非如下文所定義之抗體片段。該等術語尤其指具有含 Fc 區之重鏈之抗體。

【0056】 「抗體片段」包含完整抗體之一部分，較佳包含其抗原結合區域。抗體片段之實例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 及 Fv 片段；雙價抗體；線性抗體；單鏈抗體分子；及自抗體片段形成之多特異性抗體。

【0057】 木瓜蛋白酶消化抗體產生兩個相同之抗原結合片段，稱為「Fab」片段，各片段有單一抗原結合位點及殘留之「Fc」片段，其名稱反映了其易於結晶之能力。胃蛋白酶處理產生具有兩個抗原結合位點且仍然能夠交聯抗原之 F(ab')₂ 片段。Fab 片段含有重鏈可變結構域及輕鏈可變結構域，且亦含有輕鏈之恆定結構域及重鏈之第一恆定結構域(CH1)。Fab'片段與 Fab 片段之不同之處在於在重鏈 CH1 結構域之羧基末端添加了幾個殘基，包括來自抗體鉸鏈區之一或多個半胱胺酸。Fab'-SH 為本文對 Fab'-之命名，其中恆定結構域之半胱胺酸殘基帶有游離巯基。F(ab')₂ 抗體片段最初以成對之 Fab'片段產生，其之間具有鉸鏈半胱胺酸。抗體片段之其他化學偶合亦為已知的。

【0058】 「Fv」為含有完整抗原結合位點之最小抗體片段。在一個實施例中，雙鏈 Fv 種類由緊密非共價締合之一個重鏈可變結構域及一個輕鏈可變結構域之二聚體組成。在單鏈 Fv (scFv)種類中，一個重鏈可變結構域及一個輕鏈可變結構域可藉由撓性肽連接子共價連接，使得輕鏈及重鏈可以類似於雙鏈 Fv 種類之「二聚體」結構締合。在此組態中，各可變結構域之三個 HVR 相互作用以確定 VH-VL 二聚體之表面上之抗原結合位點。總之，六個 HVR 賦予抗體

抗原結合特異性。然而，即使單個可變結構域(或僅包含三個抗原特異性 HVR 之 Fv 之一半)亦具有識別及結合抗原之能力，不過親和力低於整個結合位點。

【0059】 「單鏈 Fv」或「scFv」抗體片段包含抗體之 VH 及 VL 結構域，其中該等結構域存在於單個多肽鏈中。通常，scFv 多肽進一步包含介於 VH 與 VL 結構域之間的多肽連接子，此使得 scFv 能夠形成抗原結合所需之結構。關於 scFv 之綜述，參見例如 Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，第 113 卷，Rosenburg 及 Moore 編，Springer-Verlag, New York，第 269-315 頁，1994。

【0060】 術語「雙價抗體」係指具有兩個抗原結合位點之抗體片段，該等片段包含連接至同一多肽鏈(VH-VL)中之輕鏈可變結構域(VL)之重鏈可變結構域(VH)。藉由使用過短而不能使同一鏈上之兩個結構域配對之連接子，結構域被迫與另一鏈之互補結構域配對且形成兩個抗原結合位點。雙價抗體可為二價或雙特異性的。雙價抗體更全面地描述於例如 EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson 等人，*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)；及 Hollinger 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)中。三價抗體及四價抗體亦描述於 Hudson 等人，*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)中。

【0061】 如本文所用之術語「單株抗體」係指自實質上同源之抗體群體獲得之抗體，例如，除了可能之突變(例如，可能以少量存在之天然突變)之外，構成該群體之個別抗體為相同的。因此，修飾語「單株」指示抗體之特徵為不為非離散抗體之混合物。在一些實施例中，該單株抗體通常包括包含結合靶標之多肽序列之抗體，其中靶標結合多肽序列係藉由包括自複數個多肽序列選擇單個靶標結合多肽序列之過程獲得。舉例而言，選擇過程可為自複數個純系選擇獨特之純系，諸如雜交瘤純系、噬菌體純系或重組 DNA 純系之彙集物。應理

解，可進一步改變所選靶標結合序列，例如以提高對靶標之親和力，使靶標結合序列人類化，提高其在細胞培養物中之產量，降低其在活體內之免疫原性，形成多特異性抗體等，且包含改變之靶標結合序列之抗體亦為本發明之單株抗體。與通常包括針對不同決定簇(決定基)之不同抗體之多株抗體製劑不同，單株抗體製劑之各單株抗體係針對抗原上之單個決定簇。除了其特異性之外，單株抗體製劑之優勢亦在於其通常不會由其他免疫球蛋白污染。

【0062】 修飾語「單株」指示抗體之特徵為自實質上同源之抗體群體獲得，且不應理解為需要藉由任何特定方法產生抗體。舉例而言，要根據本發明使用之單株抗體可藉由多種技術製備，包括例如雜交瘤方法(例如 Kohler 及 Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975)；Hongo 等人，*Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995)；Harlow 等人，*Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press，第 2 版，1988)；Hammerling 等人，*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、重組 DNA 方法(參見例如美國專利第 4,816,567 號)、噬菌體展示技術(參見例如 Clackson 等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)；Marks 等人，*J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992)；Sidhu 等人，*J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004)；Lee 等人，*J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004)；及 Lee 等人，*J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)及用於在動物中產生人類或人類樣抗體之技術，該等動物具有部分或全部人類免疫球蛋白基因座或編碼人類免疫球蛋白序列之基因(參見例如 WO 1998/24893；WO 1996/34096；WO 1996/33735；WO 1991/10741；Jakobovits 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993)；Jakobovits 等人，*Nature* 362: 255-258 (1993)；Bruggemann 等人，*Year in Immunol.* 7:33 (1993)；美國專利第 5,545,807 號；第 5,545,806 號；第

5,569,825 號；第 5,625,126 號；第 5,633,425 號；及第 5,661,016 號；Marks 等人，*Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)；Lonberg 等人，*Nature* 368: 856-859 (1994)；Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994)；Fishwild 等人，*Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996)；Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996)；及 Lonberg 及 Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)。

【0063】 本文中之單株抗體具體包括「嵌合」抗體，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與衍生自特定物種或屬於特定抗體類別或子類之抗體中之相應序列相同或同源，而鏈之其餘部分與衍生自另一物種或屬於另一抗體類別或子類之抗體中之相應序列相同或同源，以及該等抗體之片段，只要其展現所需生物活性即可(參見例如美國專利第 4,816,567 號；及 Morrison 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。嵌合抗體包括 PRIMATTZED[®]抗體，其中抗體之抗原結合區域衍生自藉由例如用相關抗原免疫獼猴產生之抗體。

【0064】 非人類(例如鼠類)抗體之「人類化」形式為含有衍生自非人免疫球蛋白之最小序列之嵌合抗體。在一個實施例中，人類化抗體為人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體 HVR 之殘基經來自非人類物種(供體抗體) HVR 之具有所需特異性、親和力及/或能力之殘基替代，該非人類物種為諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物。在一些情況下，人類免疫球蛋白之 FR 殘基經相應之非人類殘基替代。此外，人類化抗體可包含受體抗體或供體抗體中未發現之殘基。可進行該等修飾以進一步改善抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含至少一個可變結構域且通常為兩個可變結構域之實質上全部，其中所有或實質上所有之超變環對應於非人類免疫球蛋白之彼等超變環，且所有或實質上所有之 FR 為人類免疫球蛋白序列之彼等 FR。人類化抗體亦將視情況包含免疫球蛋白恆定區(Fc)、通常為人類免疫球蛋白恆定區之至少一部分。關於其他細節

參見例如 Jones 等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann 等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。亦參見例如 Vaswani 及 Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998)；Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995)；Hurle 及 Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)；及美國專利第 6,982,321 號及第 7,087,409 號。

【0065】 「人類抗體」為具有對應於由人類產生之抗體之胺基酸序列之胺基酸序列及/或使用如本文所揭示之製備人類抗體之任一技術製備之抗體。人類抗體之此定義特定而言排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。人類抗體可使用此項技術中已知之多種技術產生，包括噬菌體展示文庫。Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991)；Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)。Cole 等人，*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss，第 77 頁 (1985)；Boerner 等人，*J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)中所述之方法亦可用於製備人類單株抗體。亦參見 van Dijk 及 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001)。人類抗體可藉由向基因轉殖動物投與抗原來製備，該基因轉殖動物已經修飾以因應抗原激發產生該等抗體，但其內源基因座已經禁用，例如經免疫之異種小鼠(關於 XENOMOUSE™ 技術參見例如美國專利第 6,075,181 號及第 6,150,584 號)。關於經由人類 B 細胞雜交瘤技術產生之人類抗體亦參見例如 Li 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)。

【0066】 術語「超變區」、「HVR」或「HV」當在本文中使用時係指抗體可變結構域中序列超變及/或形成結構上確定之環的區域。通常，抗體包含六個 HVR；三個在 VH 中(H1、H2、H3)且三個在 VL 中(L1、L2、L3)。在天然抗體中，H3 及 L3 展示六個 HVR 之最大多樣性，且尤其認為 H3 在賦予抗體精細特異性方面發揮獨特作用。參見例如 Xu 等人，*Immunity* 13:37-45 (2000)；

Johnson 及 Wu, *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo 編，Human Press, Totowa, N.J., 2003)。事實上，僅由重鏈組成之天然存在之駱駝科抗體在沒有輕鏈之情況下具有功能且為穩定的。參見例如 Hamers-Casterman 等人，*Nature* 363:446-448 (1993)；Sheriff 等人，*Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)。在一些實施例中，HVR 為互補決定區(CDR)。

【0067】 本文使用且涵蓋許多 HVR 描述。Kabat 互補決定區(CDR)係基於序列可變性且為最常用的(Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。而 Chothia 係指結構環之位置(Chothia 及 Lesk，*J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM HVR 代表 Kabat HVR 與 Chothia 結構環之間的折衷情況且由 Oxford Molecular 之 AbM 抗體模型化軟體使用。「接點」HVR 係基於對可用複雜晶體結構之分析。該等 HVR 中每一者之殘基如下所示。

環	Kabat	AbM	Chothia	接點
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 編號)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 編號)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

【0068】 HVR 可包含如下「延長之 HVR」：VL 中之 24-36 或 24-34 (L1)、46-56 或 50-56 (L2)及 89-97 或 89-96 (L3)及 VH 中之 26-35 (H1)、50-65 或 49-65

(H2)及 93-102、94-102 或 95-102 (H3)。對於該等定義中之每一者，可變結構域殘基係根據 Kabat 等人，見上文進行編號。

【0069】 「框架」或「FR」殘基為除如本文所定義之 HVR 殘基外之彼等可變結構域殘基。

【0070】 術語「如 Kabat 中之可變結構域殘基編號」、「如 Kabat 中之胺基酸位置編號」、「殘基編號係根據 Kabat 編號來進行」及其變化形式係指在 Kabat 等人，見上文中用於抗體編譯之重鏈可變結構域或輕鏈可變結構域之編號系統。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可含有更少或額外之胺基酸，對應於可變結構域之 FR 或 HVR 之縮短或插入。舉例而言，重鏈可變結構域可包括 H2 之殘基 52 後之單個胺基酸插入(根據 Kabat 之殘基 52a)及重鏈 FR 殘基 82 後插入之殘基(例如，根據 Kabat 之殘基 82a、82b 及 82c 等)。可藉由抗體序列與「標準」Kabat 編號序列之同源區域之比對來確定給定抗體之殘基之 Kabat 編號。

【0071】 當提及可變結構域中之殘基(約輕鏈之殘基 1-107 及重鏈之殘基 1-113)時，通常使用 Kabat 編號系統(例如 Kabat 等人，*Sequences of Immunological Interest*.第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。當提及免疫球蛋白重鏈恆定區中之殘基時，通常使用術語「EU 編號系統」、「EU 索引」、「殘基編號係根據 EU 編號來進行」及其變化形式(例如，Kabat 等人，見上文中報導之 EU 索引)。「如 EU 索引中之 Kabat」係指人類 IgG1 EU 抗體之殘基編號。

【0072】 術語「多特異性抗體」係以最廣泛意義使用且具體涵蓋包含抗原結合結構域之抗體，該抗原結合結構域具有多決定基特異性(亦即，能夠特異性結合至一個生物分子上之兩個或更多個不同決定基，或者能夠特異性結合至兩個

或更多個不同生物分子上之決定基)。在一些實施例中，多特異性抗體(諸如雙特異性抗體)之抗原結合結構域包含兩個 VH/VL 單位，其中第一 VH/VL 單位特異性結合至第一決定基且第二 VH/VL 單位特異性結合至第二決定基，其中各 VH/VL 單位包含重鏈可變結構域(VH)及輕鏈可變結構域(VL)。該等多特異性抗體包括(但不限於)全長抗體、具有兩個或更多個 VL 及 VH 結構域之抗體、抗體片段(諸如 Fab、Fv、dsFv、scFv)、雙價抗體、雙特異性雙價抗體及三價抗體、共價或非共價連接之抗體片段。進一步包含重鏈恆定區之至少一部分及/或輕鏈恆定區之至少一部分之 VH/VL 單位亦可稱為「半聚體」或「半抗體」。在一些實施例中，半抗體包含單個重鏈可變區之至少一部分及單個輕鏈可變區之至少一部分。在一些該等實施例中，包含兩種半抗體且結合至兩種抗原之雙特異性抗體包含結合至第一抗原或第一決定基但不結合至第二抗原或第二決定基之第一半抗體及結合至第二抗原或第二決定基而不結合至第一抗原或第一決定基之第二半抗體。根據一些實施例，多特異性抗體為以 5 M 至 0.001 pM、3 M 至 0.001 pM、1 M 至 0.001 pM、0.5 M 至 0.001 pM 或 0.1 M 至 0.001 pM 之親和力結合至各抗原或決定基之 IgG 抗體。在一些實施例中，半聚體包含重鏈可變區之足以允許與第二半聚體形成分子內二硫鍵之部分。在一些實施例中，半聚體包含杵突變或臼突變，例如，以允許與包含互補臼突變或杵突變之第二半聚體或半抗體異二聚化。下文進一步討論杵突變及臼突變。

【0073】 「雙特異性抗體」為包含抗原結合結構域之多特異性抗體，該抗原結合結構域能夠特異性結合至一個生物分子上之兩個不同決定基，或者能夠特異性結合至兩個不同生物分子上之決定基。雙特異性抗體在本文中亦可稱為具有「雙重特異性(dual specificity/dual specific)」。除非另外指明，否則在雙特異性抗體名稱中所列之雙特異性抗體結合之抗原的順序為任意的。在一些實施例

中，雙特異性抗體包含兩個半抗體，其中各半抗體包含單個重鏈可變區及視情況存在之重鏈恆定區之至少一部分，以及單個輕鏈可變區及視情況存在之輕鏈恆定區之至少一部分。在一些實施例中，雙特異性抗體包含兩個半抗體，其中各半抗體包含單個重鏈可變區及單個輕鏈可變區，且不包含一個以上之單個重鏈可變區，且不包含一個以上之單個輕鏈可變區。在一些實施例中，雙特異性抗體包含兩個半抗體，其中各半抗體包含單個重鏈可變區及單個輕鏈可變區，且其中第一半抗體結合至第一抗原而不結合至第二抗原，且第二半抗體結合至第二抗原而不結合至第一抗原。

【0074】 如本文所用之術語「杵入臼」或「KnH」技術係指藉由在兩種多肽相互作用之界面將突起(杵)引入一種多肽中且將空腔(臼)引入另一種多肽中來指導兩種多肽在活體外或活體內一起配對之技術。舉例而言，已將 KnH 引入抗體之 Fc:Fc 結合界面、CL:CH1 界面或 VH/VL 界面中(參見例如 US 2011/0287009、US2007/0178552、WO 96/027011、WO 98/050431 及 Zhu 等人，1997, *Protein Science* 6:781-788)。在一些實施例中，KnH 在多特異性抗體之製造期間驅動兩條不同重鏈一起配對。舉例而言，在 Fc 區具有 KnH 之多特異性抗體可進一步包含連接至各 Fc 區之單個可變結構域，或者進一步包含與相似或不同輕鏈可變結構域配對之不同重鏈可變結構域。KnH 技術亦可用於將兩個不同之受體細胞外結構域一起配對，或將包含不同靶識別序列之任何其他多肽序列(例如，包括親和體、肽體及其他 Fc 融合體)配對。

【0075】 如本文所用之術語「杵突變」係指在一多肽與另一多肽相互作用之界面將突起(杵)引入該多肽中之突變。在一些實施例中，另一多肽具有臼突變(參見例如 US 5,731,168、US 5,807,706、US 5,821,333、US 7,695,936、US 8,216,805，其各自以全文引用之方式併入本文中)。

【0076】 如本文所用之術語「臼突變」係指在一多肽與另一多肽相互作用之界面將空腔(臼)引入該多肽中之突變。在一些實施例中，另一多肽具有杵突變(參見例如 US 5,731,168、US 5,807,706、US 5,821,333、US 7,695,936、US 8,216,805，其各自以全文引用之方式併入本文中)。

【0077】 表述「線性抗體」係指 Zapata 等人(1995 *Protein Eng*, 8(10):1057-1062)中所述之抗體。簡言之，該等抗體包含一對串聯 Fd 區段(VH-CH1-VH-CH1)，其與互補之輕鏈多肽一起形成一對抗原結合區。線性抗體可為雙特異性或單特異性的。

II. 多肽調配物及製劑

【0078】 本發明之某些態樣係關於包含多肽、N-乙醯基-DL-色胺酸(NAT)及 L-甲硫胺酸之調配物，其中 NAT 及 L-甲硫胺酸減少或防止多肽之氧化。在一些實施例中，多肽易於氧化。在一些實施例中，多肽中之甲硫胺酸、半胱胺酸、組胺酸、色胺酸及/或酪胺酸殘基易於氧化。在一些實施例中，多肽中之一或多個色胺酸殘基易於氧化。在一些實施例中，多肽中之一或多個甲硫胺酸殘基易於氧化。在一些實施例中，多肽中之一或多個色胺酸及一或多個甲硫胺酸殘基易於氧化。在一些實施例中，多肽為抗體。在一些實施例中，調配物進一步包含至少一種根據本文所述任一多肽之其他多肽。在一些實施例中，調配物進一步包含一或多種賦形劑。在一些實施例中，調配物為液體調配物。在一些實施例中，調配物為水性調配物。在一些實施例中，調配物為醫藥調配物(例如適合於向人類個體投與)。

【0079】 在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 0.01 mM 至約 25 mM (諸如約 0.01、0.025、0.05、0.075、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0、

14.0、15.0、16.0、17.0、18.0、19.0、20.0、21.0、22.0、23.0、24.0 或 25.0 mM 中之任一者，包括該等值之間的任何範圍)或高達 NAT 可溶於調配物中之最高濃度。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 0.05 至約 1 mM。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 0.05 至約 0.3 mM。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 0.05 mM。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 0.1 mM。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 0.3 mM。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 1.0 mM。在一些實施例中，調配物中 NAT 之濃度為約 1 mM。

【0080】 在一些實施例中，NAT 減少或防止多肽中一或多個色胺酸殘基之氧化。在一些實施例中，NAT 藉由反應性氧物質(ROS)減少或防止多肽中一或多個色胺酸殘基之氧化。在一些實施例中，反應性氧物質係選自單線態氧、超氧化物(O_2^-)、烷氧基、過氧基、過氧化氫(H_2O_2)、三氧化二氫(H_2O_3)、氫三氧自由基($HO_3^\bullet$)、臭氧(O_3)、羥基及/或烷基過氧化物。

【0081】 在一些實施例中，多肽為抗體，且 NAT 減少或防止抗體中一或多個色胺酸殘基之氧化。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基位於抗體之輕鏈恆定區及/或重鏈恆定區內。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基位於抗體之輕鏈可變區(例如 HVR-L1、HVR-L2 及/或 HVR-L3)及/或重鏈可變區(例如 HVR-H1、HVR-H2 及/或 HVR-H3)內。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基位於抗體之重鏈可變區中。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基位於重鏈可變區之框架區中。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基包含 W103 (根據 Kabat 編號)。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基位於抗體之 HVR-H1、HVR-H2 及/或 HVR-H3 (例如 HVR-H1 及/或 HVR-H3)中。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基包含 W33、W36、W52、W52a、W99、W100a、W100b 及/

或 W103 (根據 Kabat 編號)。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基包含 W33 及/或 W36、W99 及/或 W100a。在一些實施例中，在本發明之調配物中納入 NAT 減少或防止抗體在殘基 W33、W36、W52a、WW99、W100a、W110b 及/或 W103 處之氧化(例如與缺少 NAT 之液體調配物中多肽中之一或多個相應色胺酸殘基相比)。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基位於抗體之 HVR-L1、HVR-L2 及/或 HVR-L3 中。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基包含 W94、W31 及/或 W91。

【0082】 在一些實施例中，調配物中 L-甲硫胺酸之濃度為約 1.0 mM 至約 125.0 mM (諸如約 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、45.0、50.0、55.0、60.0、65.0、70.0、75.0、80.0、85.0、90.0、95.0、100.0、105.0、110.0、115.0、120.0 或 125.0 mM 中之任一者，包括該等值之間的任何範圍)，或高達 L-甲硫胺酸可溶於調配物中之最高濃度。在一些實施例中，調配物中 L-甲硫胺酸之濃度為約 5.0 至約 25.0 mM。在一些實施例中，調配物中 L-甲硫胺酸之濃度為約 5.0 mM。

【0083】 在一些實施例中，L-甲硫胺酸減少或防止多肽中一或多個甲硫胺酸殘基之氧化。在一些實施例中，L-甲硫胺酸藉由反應性氧物質(ROS)減少或防止多肽中一或多個甲硫胺酸殘基之氧化。在一些實施例中，反應性氧物質係選自單線態氧、超氧化物(O_2^-)、烷氧基、過氧基、過氧化氫(H_2O_2)、三氧化二氫(H_2O_3)、氫三氧自由基($HO_3^\bullet$)、臭氧(O_3)、羥基及/或烷基過氧化物。

【0084】 在一些實施例中，多肽為抗體，且 L-甲硫胺酸減少或防止抗體中一或多個甲硫胺酸殘基之氧化。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基位於抗體之輕鏈可變區(例如 HVR-L1、HVR-L2 及/或 HVR-L3)及/或重鏈可變區(例如 HVR-H1、HVR-H2 及/或 HVR-H3)內。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘

基位於抗體之重鏈可變區中。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基位於重鏈可變區之框架區中。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基包含 M82 (根據 Kabat 編號)。在一些實施例中，一或多個色胺酸殘基位於抗體之 HVR-H1、HVR-H2 及/或 HVR-H3 (例如 HVR-H1)中。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基包含 M34 (根據 Kabat 編號)。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基位於抗體之 HVR-L1、HVR-L2 及/或 HVR-L3 (例如 HVR-L1)中。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基位於輕鏈中；例如位點 M30、M33、M92 處。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基位於重鏈中；例如位點 M82、M99、M57、M58、M62、M64 及 95-102 之間的其他位點處。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基位於抗體之輕鏈恆定區及/或重鏈恆定區內。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基位於抗體(例如 IgG1 抗體)之重鏈恆定區中。在一些實施例中，一或多個甲硫胺酸殘基包含 M252、M35 及/或 M428 (根據 EU 編號)。在一些實施例中，在本發明之調配物中納入 L-甲硫胺酸減少或防止抗體在殘基 M34、M82、M252 及/或 M428 處之氧化(例如與缺少 L-甲硫胺酸之液體調配物中多肽中之一或多個相應甲硫胺酸殘基相比)。

【0085】 在一些實施例中，在本發明之調配物中納入 NAT 增加抗體在一或多個甲硫胺酸殘基(例如上文所述之任一甲硫胺酸殘基，諸如位置 M252 及/或 M428 之 Fc 區甲硫胺酸)之氧化。在一些實施例中，在調配物中納入 L-甲硫胺酸減少或防止抗體中一或多個甲硫胺酸殘基(例如上文所述之任一甲硫胺酸殘基，諸如位置 M252、M358 及/或 M428 之 Fc 區甲硫胺酸)之 NAT 誘導及/或擴增之氧化。在一些實施例中，本發明之液體調配物包含本文所述任一濃度之 NAT 及本文所述任一濃度之 L-甲硫胺酸。在一些實施例中，液體調配物包含

濃度為約 0.3 mM 之 Nat 及濃度為約 5.0 mM 之 L-甲硫胺酸。在一些實施例中，液體調配物包含濃度為約 1.0 mM 之 NAT 及濃度為約 5.0 mM 之 L-甲硫胺酸。

【0086】 在一些實施例中，本發明提供之液體調配物包含多肽、NAT 及 L-甲硫胺酸(其中 NAT 及 L-甲硫胺酸減少或防止液體調配物中多肽之氧化)，其中多肽之氧化(例如多肽中一或多個色胺酸殘基及/或一或多個甲硫胺酸殘基之氧化)減少約 40%至約 100% (例如與缺少 NAT 及/或 L-甲硫胺酸之液體調配物中多肽中之一或多個相應色胺酸殘基及/或一或多個相應甲硫胺酸殘基相比)。在一些實施例中，多肽之氧化(例如多肽中一或多個色胺酸殘基及/或一或多個甲硫胺酸殘基之氧化)減少約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%中之任一者，包括該等值之間的任何範圍(例如與缺少 NAT 及/或 L-甲硫胺酸之液體調配物中多肽中之一或多個相應色胺酸殘基及/或一或多個相應甲硫胺酸殘基相比)。可使用此項技術中已知之任何合適之量測多肽氧化之方法，包括例如下文實例 1 (以及其中引用之參考文獻)中所述之方法。

【0087】 多肽中之氧化量可例如使用 RP-HPLC、LC/MS 或胰蛋白酶肽圖譜中之一或多者來確定。在一些實施例中，多肽中之氧化係使用 RP-HPLC、LC/MS 或胰蛋白酶肽圖譜中之一或多者確定為百分比，且公式為：

$$\text{氧化}\% = 100 \times \frac{\text{氧化峰面積}}{\text{峰面積} + \text{氧化峰面積}}$$

【0088】 在一些實施例中，本發明提供之液體調配物包含多肽、NAT 及 L-甲硫胺酸(其中 NAT 及 L-甲硫胺酸減少或防止液體調配物中多肽之氧化)，其中不超過約 40%至約 0%之多肽發生氧化(例如在多肽中之一或多個色胺酸殘基及/或一或多個甲硫胺酸殘基處氧化)。在一些實施例中，不超過約 40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或 0%中之任一者(包

括該等值之間的任何範圍)之多肽發生氧化(例如在多肽中之一或多個色胺酸殘基及/或一或多個甲硫胺酸殘基處氧化)。

【0089】 在一些實施例中，本發明提供之液體調配物包含多肽、NAT 及 L-甲硫胺酸(其中 NAT 及 L-甲硫胺酸減少或防止液體調配物中多肽之氧化)，其中多肽中至少一個氧化不穩定色胺酸殘基(例如如本文所述抗體之任何一或多個色胺酸殘基)之氧化減少約 40%至約 100% (例如與缺少 NAT 之調配物中多肽中之一或多個相應色胺酸殘基相比)。在一些實施例中，多肽中氧化不穩定色胺酸殘基之氧化減少約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%中之任一者，包括該等值之間的任何範圍。在一些實施例中，多肽中各氧化不穩定色胺酸殘基之氧化減少約 40%至約 100% (諸如約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%中之任一者，包括該等值之間的任何範圍)。

【0090】 在一些實施例中，本發明提供之液體調配物包含多肽、NAT 及 L-甲硫胺酸(其中 NAT 及 L-甲硫胺酸減少或防止液體調配物中多肽之氧化)，其中多肽中不超過約 40%至約 0%之至少一種氧化不穩定色胺酸殘基(例如如本文所述抗體之任何一或多個色胺酸殘基)發生氧化。在一些實施例中，多肽中不超過約 40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或 0%中之任一者(包括該等值之間的任何範圍)之氧化不穩定色胺酸殘基發生氧化。在一些實施例中，多肽中不超過約 40%至約 0% (例如不超過約 40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或 0%中之任一者，包括該等值之間的任何範圍)之各氧化不穩定色胺酸殘基發生氧化。

【0091】 在一些實施例中，本發明提供之液體調配物包含多肽、NAT 及 L-甲硫胺酸(其中 NAT 及 L-甲硫胺酸減少或防止液體調配物中多肽之氧化)，其中多肽中至少一個氧化不穩定甲硫胺酸殘基(例如如本文所述抗體之任何一或多個甲硫胺酸殘基)之氧化減少約 40%至約 100% (例如與缺少 L-甲硫胺酸之調配物中多肽中之一或多個相應甲硫胺酸殘基相比)。在一些實施例中，多肽中氧化不穩定甲硫胺酸殘基之氧化減少約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%中之任一者，包括該等值之間的任何範圍。在一些實施例中，多肽中各氧化不穩定甲硫胺酸殘基之氧化減少約 40%至約 100% (諸如約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%中之任一者，包括該等值之間的任何範圍)。

【0092】 在一些實施例中，本發明提供之液體調配物包含多肽、NAT 及 L-甲硫胺酸(其中 NAT 及 L-甲硫胺酸減少或防止液體調配物中多肽之氧化)，其中多肽中不超過約 40%至約 0%之至少一個氧化不穩定甲硫胺酸(例如如本文所述抗體之任何一或多個甲硫胺酸殘基)發生氧化。在一些實施例中，多肽中不超過約 40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或 0%中之任一者(包括該等值之間的任何範圍)之氧化不穩定甲硫胺酸殘基發生氧化。在一些實施例中，多肽中不超過約 40%至約 0% (例如不超過約 40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或 0%中之任一者，包括該等值之間的任何範圍)之各氧化不穩定甲硫胺酸殘基發生氧化。

【0093】 在一些實施例中，調配物中之多肽(例如抗體)濃度為約 1 mg/mL 至約 250 mg/mL。在一些實施例中，多肽(例如抗體)為治療性多肽。調配物中之例示性多肽濃度包括約 1 mg/mL 至大於約 250 mg/mL、約 1 mg/mL 至約 250

mg/mL、約 10 mg/mL 至約 250 mg/mL、約 15 mg/mL 至約 225 mg/mL、約 20 mg/mL 至約 200 mg/mL、約 25 mg/mL 至約 175 mg/mL、約 25 mg/mL 至約 150 mg/mL、約 25 mg/mL 至約 100 mg/mL、約 30 mg/mL 至約 100 mg/mL 或約 45 mg/mL 至約 55 mg/mL。

【0094】 在一些實施例中，多肽為抗體。在一些實施例中，抗體為多株抗體、單株抗體、人類化抗體、人類抗體、嵌合抗體、多特異性抗體(例如雙特異性、三特異性等)或抗體片段。在一些實施例中，抗體衍生自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗體序列。在一些實施例中，抗體衍生自 IgG1 抗體序列。

【0095】 在一些實施例中，調配物為水性調配物。在一些實施例中，調配物進一步包含一或多種賦形劑。此項技術已知之任何合適之賦形劑均可用於本文所述之調配物中，包括例如穩定劑、緩衝劑、表面活性劑、張力劑及其任何組合。舉例而言，本發明之調配物可包含單株抗體、如本文所提供之防止多肽氧化(例如在一或多個色胺酸殘基處)之 NAT、如本文所提供之防止多肽氧化(例如在一或多個甲硫胺酸殘基處)之 L-甲硫胺酸及使調配物之 pH 值維持在所需水準之緩衝劑。在一些實施例中，本文所提供之調配物具有約 4.5 至約 9.0 之 pH 值。在一些實施例中，本文所提供之調配物具有約 4.5 至約 7.0 之 pH 值。在一些實施例中，pH 值在 pH 4.0 至 8.5 範圍內、在 pH 4.0 至 8.0 範圍內、在 pH 4.0 至 7.5 範圍內、在 pH 4.0 至 7.0 範圍內、在 pH 4.0 至 6.5 範圍內、在 pH 4.0 至 6.0 範圍內、在 pH 4.0 至 5.5 範圍內、在 pH 4.0 至 5.0 範圍內、在 pH 4.0 至 4.5 範圍內、在 pH 4.5 至 9.0 範圍內、在 pH 5.0 至 9.0 範圍內、在 pH 5.5 至 9.0 範圍內、在 pH 6.0 至 9.0 範圍內、在 pH 6.5 至 9.0 範圍內、在 pH 7.0 至 9.0 範圍內、在 pH 7.5 至 9.0 範圍內、在 pH 8.0 至 9.0 範圍內、在 pH 8.5 至 9.0 範圍內、在 pH 5.7 至 6.8 範圍內、在 pH 5.8 至 6.5 範圍內、在 pH 5.9 至 6.5 範圍

內、在 pH 6.0 至 6.5 範圍內或在 pH 6.2 至 6.5 範圍內。在一些實施例中，調配物具有 6.2 或約 6.2 之 pH 值。在一些實施例中，調配物具有 6.0 或約 6.0 之 pH 值。在一些實施例中，調配物進一步包含至少一種根據本文所述之任一多肽之其他多肽。

【0096】 在一些實施例中，本文所提供之調配物為適合於向個體投與之醫藥調配物。如本文所用，「個體(subject)」、「患者」或「個體(individual)」可指人類或非人類動物。「非人類動物」可指任何未歸類為人類之動物，諸如家養、農場或動物園動物、運動動物、寵物(諸如狗、馬、貓、牛等)，以及用於研究之動物。研究動物可指(但不限於)線蟲、節肢動物、脊椎動物、哺乳動物、青蛙、嚙齒類動物(例如小鼠或大鼠)、魚(例如斑馬魚或河豚魚)、鳥(例如雞)、狗、貓及非人類靈長類動物(例如恆河猴、食蟹猴、黑猩猩等)。在一些實施例中，個體(subject)、患者或個體(individual)為人類。

【0097】 調配物中之多肽及抗體可使用此項技術中已知之任何合適之方法製備。調配物中之抗體(例如全長抗體、抗體片段及多特異性抗體)可使用此項技術可獲得之技術製備，該等技術之非限制性例示性方法將在以下部分中更詳細描述。熟習此項技術者可使本文之方法適合於製備包含其他多肽之調配物，諸如基於肽之抑制劑。用於產生治療性蛋白質之大體上充分理解且常用之技術及程序參見 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook 等人，第 4 版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012)；*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel 等人編，2003)；*Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel 等人編，J. Wiley and Sons, 2002)；*Current Protocols in Protein Science*, (Horswill 等人，2006)；*Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow 及 Lane 編，1988)；*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*

and Specialized Applications (R.I. Freshney, 第 6 版, J. Wiley and Sons, 2010), 該等參考文獻以全文引用之方式併入本文中。

【0098】 在一些實施例中，根據本文所述之任一調配物(例如液體調配物)，調配物包含兩種或更多種多肽(例如形式為兩種或更多種多肽之共調配物)。舉例而言，在一些實施例中，調配物為包含兩種或更多種多肽、NAT 及 L-甲硫胺酸之共調配物，其中 NAT 及 L-甲硫胺酸減少或防止兩種或更多種多肽中至少一者之氧化。在一些實施例中，NAT 及 L-甲硫胺酸減少或防止兩種或更多種多肽中複數者之氧化。在一些實施例中，NAT 及 L-甲硫胺酸減少或防止兩種或更多種多肽中每一者之氧化。在一些實施例中，兩種或更多種多肽中之至少一者為抗體，諸如多株抗體、單株抗體、人類化抗體、人類抗體、嵌合抗體、多特異性抗體或抗體片段。在一些實施例中，兩種或更多種多肽中之複數者為抗體，諸如獨立地選自多株抗體、單株抗體、人類化抗體、人類抗體、嵌合抗體、多特異性抗體或抗體片段之抗體。在一些實施例中，兩種或更多種多肽中之每一者為抗體，諸如獨立地選自多株抗體、單株抗體、人類化抗體、人類抗體、嵌合抗體、多特異性抗體或抗體片段之抗體。在一些實施例中，調配物之一或多種抗體衍生自 IgG1 抗體序列。在一些實施例中，調配物為液體調配物。在一些實施例中，調配物為水性調配物。在一些實施例中，調配物為醫藥調配物(例如適合於向人類個體投與)。在一些實施例中，醫藥調配物適合於經由任何經腸途徑或非經腸途徑投與。術語「經腸投與途徑」係指經由胃腸道之任何部分投與。經腸途徑之實例包括經口、經黏膜、經頰及經直腸途徑或胃內途徑。「非經腸投與途徑」係指除經腸投與途徑以外之投與途徑。非經腸投與途徑之實例包括靜脈內、肌內、皮內、腹膜內、腫瘤內、膀胱內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、玻璃體內、心內、經氣管、關節內、包膜下、蛛網膜下、

椎管內、硬膜外及胸骨內、皮下或局部投與。在一些實施例中，醫藥調配物適合於皮下、靜脈內或玻璃體內投與。在一些實施例中，醫藥調配物適合於皮下或玻璃體內投與。

A. 抗體製備

【0099】 本文提供之液體調配物中之抗體係針對相關抗原。較佳地，抗原為生物學上重要之多肽且向患有病症之哺乳動物投與抗體可在該哺乳動物中產生治療益處。然而，亦考慮針對非多肽抗原之抗體。

【0100】 當抗原為多肽時，其可為跨膜分子(例如受體)或配位體，諸如生長因子。例示性抗原包括諸如以下之分子：血管內皮生長因子(VEGF)；CD20；ox-LDL；ox-ApoB100；腎素；生長激素，包括人生長激素及牛生長激素；生長激素釋放因子；甲狀旁腺激素；甲狀腺刺激激素；脂蛋白； α -1-抗胰蛋白酶；胰島素 A 鏈；胰島素 B 鏈；胰島素原；卵泡刺激激素；降鈣素；黃體生成激素；胰高血糖素；凝血因子，諸如因子 VIIIc、因子 IX、組織因子及馮維勒布蘭德因子；抗凝血因子，諸如蛋白質 C；心房利鈉因子；肺表面活性劑；纖維溶酶原活化劑，諸如尿激酶或人類尿素或組織型纖維溶酶原活化劑(t-PA)；鈴蟾肽；凝血酶；造血生長因子；腫瘤壞死因子受體，諸如死亡受體 5 及 CD120；腫瘤壞死因子- α 及腫瘤壞死因子- β ；腦啡肽酶；RANTES (活化調節，正常 T 細胞表現及分泌)；人類巨噬細胞發炎蛋白(MIP-1- α)；血清白蛋白，諸如人類血清白蛋白；苗勒氏抑制物質；鬆弛素 A 鏈；鬆弛素 B 鏈；普羅鬆弛素；小鼠促性腺激素相關肽；微生物蛋白，諸如 β -內醯胺酶；DNA 酶；IgE；細胞毒性 T 淋巴球相關抗原(CTLA)，諸如 CTLA-4；抑制素；活化素；激素或生長因子受體；蛋白質 A 或 D；類風濕因子；神經營養因子，諸如骨源性神經營養因子(BDNF)、-3、神經營養因子-4、神經營養因子-5 或神經營養因子-6 (NT-3、

NT4、NT-5 或 NT-6)，或諸如 NGF- β 之神經生長因子；血小板源性生長因子 (PDGF)；成纖維細胞生長因子，諸如 aFGF 及 bFGF；表皮生長因子(EGF)；轉型生長因子(TGF)，諸如 TGF- α 及 TGF- β ，包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5；胰島素樣生長因子-I 及胰島素樣生長因子-II (IGF-1 及 IGF-II)；des (1-3)-IGF-I (腦 IGF-I)、胰島素樣生長因子結合蛋白；CD 蛋白，諸如 CD3、CD4、CD8、CD19 及 CD20；紅細胞生成素；骨誘導因子；免疫毒素；骨形態發生蛋白(BMP)；干擾素，諸如干擾素 α 、干擾素 β 及干擾素 γ ；群落刺激因子(CSF)，例如 M-CSF、GM-CSF 及 G-CSF；介白素(IL)，例如 IL-1 至 IL-10；超氧化物歧化酶；T 細胞受體；表面膜蛋白；衰變加速因子；病毒抗原，諸如 AIDS 包膜之一部分；轉運蛋白；歸巢受體；地址素；調節蛋白；整合素，諸如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 及 VCAM；腫瘤相關抗原，諸如 HER2、HER3 或 HER4 受體；及任一上文所列多肽之片段。

(i) 抗原製備

【0101】 視情況與其他分子結合之可溶性抗原或其片段可用作產生抗體之免疫原。對於跨膜分子，諸如受體，該等分子之片段(例如受體之細胞外結構域)可用作免疫原。或者，表現跨膜分子之細胞可用作免疫原。該等細胞可衍生自天然來源(例如癌細胞株)，或者可為藉由重組技術轉型以表現跨膜分子之細胞。適用於製備抗體之其他抗原及其形式對熟習此項技術者而言為顯而易見的。

(ii) 某些基於抗體之方法

【0102】 多株抗體較佳藉由多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射相關抗原及佐劑在動物中產生。使用雙功能或衍生劑，例如順丁烯二醯亞胺苯甲醯磺基丁二醯亞胺酯(經由半胱胺酸殘基結合)、N-羥基丁二醯亞胺(經由離胺酸殘基)、戊二醛、

丁二酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中 R 及 R^1 為不同烷基)，將相關抗原結合至待免疫物種中之免疫原性蛋白質上可能為有用的，該免疫原性蛋白質為例如鎖孔戚血藍蛋白、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑。

【0103】 藉由將例如 100 μg 或 5 μg 蛋白質或結合物(分別用於兔或小鼠)與 3 體積之弗氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)組合且在多個位點皮內注射溶液，使動物對抗原、免疫原性結合物或衍生物免疫。一個月後，藉由在多個位點皮下注射，用弗氏完全佐劑中 1/5 至 1/10 原始量之肽或結合物對動物進行加強免疫。7 至 14 天後，給動物放血，且分析血清之抗體效價。對動物進行加強免疫直至效價穩定。較佳地，用具有相同抗原但結合至不同蛋白質之結合物及/或經由不同之交聯試劑對動物進行加強免疫。亦可在重組細胞培養中以蛋白質融合物形式製成結合物。此外，諸如明礬之聚集劑亦適合用於增強免疫反應。

【0104】 相關單株抗體可使用雜交瘤方法製備，該方法由 Kohler 等人，*Nature*, 256:495 (1975) 首次描述，且進一步描述於例如 Hongo 等人，*Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995)；Harlow 等人，*Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press，第 2 版，1988)；Hammerling 等人，*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) 及關於人類-人類雜交瘤之 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) 中。其他方法包括例如關於自雜交瘤細胞株產生單株人天然 IgM 抗體之美國專利第 7,189,826 號中所述之彼等方法。人類雜交瘤技術(三源雜交瘤技術(Trioma technology)) 描述於 Vollmers 及 Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 以及 Vollmers 及 Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005) 中。

【0105】 關於多種其他雜交瘤技術，參見例如 US 2006/258841；US 2006/183887（完整人類抗體）、US 2006/059575；US 2005/287149；US 2005/100546；US 2005/026229；及美國專利第 7,078,492 號及第 7,153,507 號。使用雜交瘤方法產生單株抗體之例示性方案描述如下。在一個實施例中，對小鼠或其他合適之宿主動物(諸如倉鼠)進行免疫，以得到產生或能夠產生將特異性結合至用於免疫之蛋白質之抗體的淋巴球。藉由多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射相關多肽或其片段及佐劑(諸如單磷醯脂質 A (MPL)/海藻糖二孢菌酯(TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, Mont.)在動物中產生抗體。相關多肽(例如抗原)或其片段可使用此項技術中熟知之方法(諸如重組方法)來製備，該等方法中之一些進一步描述於本文中。分析經免疫動物之血清之抗抗原抗體，且視情況施以加強免疫。自產生抗抗原抗體之動物分離淋巴球。或者，可在活體外對淋巴球進行免疫。

【0106】 接著使用合適之融合劑(諸如聚乙二醇)將淋巴球與骨髓瘤細胞融合，形成雜交瘤細胞。參見例如 Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*，第 59-103 頁(Academic Press, 1986)。可使用有效融合、支持所選抗體產生細胞穩定大量地產生抗體且對培養基(諸如 HAT 培養基)敏感之骨髓瘤細胞。例示性骨髓瘤細胞包括(但不限於)鼠類骨髓瘤株，諸如可自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA 獲得之衍生自 MOPC-21 及 MPC-11 小鼠腫瘤之彼等細胞株以及可自 American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA 獲得之 SP-2 或 X63-Ag8-653 細胞。亦描述人類骨髓瘤及小鼠-人類雜交骨髓瘤細胞株用於產生人類單株抗體(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984)；Brodeur 等人，*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*，第 51-63 頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

【0107】 將由此製備之雜交瘤細胞接種且使於合適之培養基(例如含有一或多種抑制未融合之親代骨髓瘤細胞生長或存活之物質的培養基)中生長。舉例而言，若親代骨髓瘤細胞缺少次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT 或 HPRT)，則雜交瘤之培養基通常將包括次黃嘌呤、胺基喋呤及胸腺嘧啶核苷(HAT 培養基)，該等物質阻止 HGPRT 缺陷細胞之生長。較佳地，如例如 Even 等人，*Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006)中所述，使用無血清雜交瘤細胞培養方法來減少諸如胎牛血清之動物源性血清的使用。

【0108】 寡肽作為提高雜交瘤細胞培養物之生產率之工具描述於 Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005)中。具體而言，標準培養基富含某些胺基酸(丙胺酸、絲胺酸、天冬醯胺、脯胺酸)或蛋白質水解物部分，且由 3 至 6 個胺基酸殘基組成之合成寡肽可顯著抑制細胞凋亡。肽以毫莫耳或更高之濃度存在。

【0109】 可分析生長雜交瘤細胞之培養基之與本文所述抗體結合之單株抗體的產生。由雜交瘤細胞產生之單株抗體之結合特異性可藉由免疫沈澱或藉由活體外結合分析(諸如放射免疫分析(RIA)或酶聯免疫吸附分析(ELISA))來確定。單株抗體之結合親和力可藉由例如斯卡查德分析(Scatchard analysis)來確定。參見例如 Munson 等人，*Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)。

【0110】 在鑑定出產生所需特異性、親和力及/或活性之抗體之雜交瘤細胞後，可藉由限制性稀釋程式對純系進行亞選殖，且藉由標準方法使其生長。參見例如 Goding，見上文。適用於此目的之培養基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培養基。此外，雜交瘤細胞可作為動物中之腹水腫瘤在活體內生長。由亞純系分泌之單株抗體係藉由習用免疫球蛋白純化程序(諸如蛋白質 A-Sepharose、羥基磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析)適當地自培養基、

腹水或血清分離。用於自雜交瘤細胞分離蛋白質之一種程序描述於 US 2005/176122 及美國專利第 6,919,436 號中。該方法包括在結合過程中使用最少之鹽，諸如溶致鹽，且較佳在溶離過程中亦使用少量有機溶劑。

(iii) 某些文庫篩選方法

【0111】 本文所述調配物及組合物中之抗體可藉由使用組合文庫篩選具有所需活性之抗體來製備。舉例而言，此項技術中已知多種方法來產生噬菌體展示文庫及篩選該等文庫中具有所需結合特徵之抗體。該等方法實質上描述於 Hoogenboom 等人，*Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 等人編，Human Press, Totowa, N.J., 2001)中。舉例而言，一種產生相關抗體之方法係經由使用如 Lee 等人，*J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93 中所述之噬菌體抗體文庫。

【0112】 原則上，藉由篩選含有噬菌體之噬菌體文庫來選擇合成抗體純系，該等噬菌體文庫展示融合至噬菌體外殼蛋白之抗體可變區(Fv)之各種片段。該等噬菌體文庫藉由親和層析針對所需抗原進行淘選。使表現能夠結合至所需抗原之 Fv 片段之純系吸附至抗原，且因此與文庫中之非結合純系分離。接著將結合純系自抗原中溶離出來，且可藉由額外之抗原吸附/溶離循環進一步富集。藉由設計合適之抗原篩選程序來選擇相關噬菌體純系，隨後使用來自相關噬菌體純系之 Fv 序列及合適之恆定區(Fc)序列構築全長抗體純系，可獲得任一抗體，該等合適之恆定區(Fc)序列描述於 Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版，NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991)，第 1-3 卷中。

【0113】 在一些實施例中，抗體之抗原結合結構域由兩個具有約 110 個胺基酸之可變(V)區形成，各可變區來自輕鏈(VL)及重鏈(VH)，該兩個可變區皆存

在三個超變環(HVR)或互補決定區(CDR)。如 Winter 等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)中所述，可變結構域可功能性地在噬菌體上展示為單鏈 Fv (scFv)片段，其中 VH 及 VL 經由短撓性肽共價連接，或者展示為 Fab 片段，其中其各自融合至恆定結構域且非共價相互作用。如本文所用，編碼噬菌體純系之 scFv 及編碼噬菌體純系之 Fab 統稱為「Fv 噬菌體純系」或「Fv 純系」。

【0114】 如 Winter 等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)中所述，可藉由聚合酶鏈反應(PCR)對 VH 及 VL 基因譜進行單獨選殖，且在噬菌體文庫中隨機重組，接著可搜索抗原結合純系。來自經免疫來源之文庫提供針對免疫原之高親和力抗體，而無需構築雜交瘤。或者，如 Griffiths 等人，*EMBO J*, 12: 725-734 (1993)所述，可對原始譜進行選殖，以在無需任何免疫之情況下提供針對廣泛範圍之非自體抗原以及自體抗原之單一人類抗體來源。最後，如 Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)所述，亦可藉由自幹細胞選殖未重排之 V 基因區段且使用含有隨機序列之 PCR 引子編碼高度可變之 CDR3 區且在活體外完成重排來製備原始文庫。

【0115】 在一些實施例中，使用絲狀噬菌體藉由與次要外殼蛋白 pIII 融合來展示抗體片段。抗體片段可展示為單鏈 Fv 片段，其中 VH 及 VL 結構域藉由撓性多肽間隔子連接在同一多肽鏈上，例如如 Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)所述，或展示為 Fab 片段，其中一條鏈與 pIII 融合且另一條鏈分泌至細菌宿主細胞周質中，其中 Fab-外殼蛋白結構之組裝藉由置換一些野生型外殼蛋白而展示在噬菌體表面上，例如如 Hoogenboom 等人，*Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991)中所述。

【0116】 通常，編碼抗體基因片段之核酸係獲自自人類或動物收穫之免疫細胞。若需要偏向抗抗原純系之文庫，則用抗原對個體進行免疫以產生抗體反

應，且回收脾細胞及/或循環 B 細胞(其他外周血淋巴球(PBL))用於文庫構築。在一個實施例中，藉由在攜帶功能性人類免疫球蛋白基因陣列(且缺少功能性內源抗體產生系統)之基因轉殖小鼠中產生抗抗原抗體反應來獲得偏向於抗抗原純系之人類抗體基因片段文庫，使得抗原免疫產生會產生針對抗原之人類抗體之 B 細胞。以下描述產生人類抗體之基因轉殖小鼠之產生。

【0117】 抗抗原反應性細胞群之額外富集可藉由使用合適之篩選程序(例如藉由使用抗原親和層析之細胞分離或使細胞吸附至螢光染料標記之抗原上，隨後進行流動活化細胞分選(FACS))分離表現抗原特異性膜結合抗體之 B 細胞來獲得。

【0118】 或者，使用來自未經免疫之供體之脾細胞及/或 B 細胞或其他 PBL 提供可能之抗體譜之更佳代表，且亦允許使用抗原不具抗原性之任何動物(人類或非人類)物種來構築抗體文庫。對於併有活體外抗體基因構築之文庫，自個體收穫幹細胞，以提供編碼未重排抗體基因區段之核酸。相關免疫細胞可自多種動物物種獲得，諸如人類、小鼠、大鼠、兔(lagomorpha)、狼(luprine)、犬、貓、豬、牛、馬及鳥類物種等。

【0119】 自相關細胞回收編碼抗體可變基因區段(包括 VH 及 VL 區段)之核酸且進行擴增。在重排之 VH 及 VL 基因文庫之情況下，如 Orlandi 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989)中所述，可藉由自淋巴球分離基因體 DNA 或 mRNA，隨後用與重排之 VH 及 VL 基因之 5'及 3'端匹配之引子進行聚合酶鏈反應(PCR)來獲得所需 DNA，由此製備不同之 V 基因譜用於表現。如 Orlandi 等人(1989)及 Ward 等人，*Nature*, 341: 544-546 (1989)中所述，可使用編碼成熟 V 結構域之外顯子之 5'端的反向引子及基於 J 區段內之正向引子自 cDNA 及基因體 DNA 擴增 V 基因。然而，為自 cDNA 擴增，反向引子亦可基

於如 Jones 等人，*Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991)中所述之前導外顯子及如 Sastry 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989)中所述之恆定區內之正向引子。如 Orlandi 等人(1989)或 Sastry 等人(1989)中所述，為了使互補最大化，可在引子中併入簡併性。在一些實施例中，藉由使用靶向各 V-基因家族之 PCR 引子擴增免疫細胞核酸樣品中存在之所有可用之 VH 及 VL 排列來使文庫多樣性最大化，例如如 Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)之方法中所述或如 Orum 等人，*Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993)之方法中所述。為將擴增之 DNA 選殖至表現載體中，可如 Orlandi 等人(1989)中所述在 PCR 引子內在一端作為標籤，或者如 Clackson 等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)中所述藉由用帶標籤之引子進一步 PCR 擴增來引入罕見限制位點。

【0120】 合成重排之 V 基因譜可在活體外衍生自 V 基因區段。已對大多數人類 VH 基因區段進行了選殖及測序(報導於 Tomlinson 等人，*J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)中)及圖譜分析(報導於 Matsuda 等人，*Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)中；如 Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)中所述，可使用編碼不同序列及長度之 H3 環的 PCR 引子使用該等經選殖區段(包括 H1 及 H2 環之所有主要構形)產生不同之 VH 基因譜。亦可如 Barbas 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992)中所述，使用集中在單個長度之長 H3 環中之所有序列多樣性來製備 VH 譜。人類 V κ 及 V λ 區段已經選殖及測序(報導於 Williams 及 Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)中)且可用於製備合成輕鏈譜。基於一系列 VH 及 VL 摺疊以及 L3 及 H3 長度，合成 V 基因譜將編碼具有相當大結構多樣性之抗體。在 V 基因編碼 DNA 擴增後，可根據 Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)之方法使種系 V 基因區段在活體外重排。

【0121】 抗體片段譜可藉由以幾種方式將 VH 及 VL 基因庫組合在一起來構築。各譜可在不同之載體中產生，且載體在活體外重組，例如如 Hogrefe 等人，*Gene*, 128: 119-126 (1993)中所述，或藉由組合感染在活體內重組，例如 Waterhouse 等人，*Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993)中所述之 loxP 系統。活體內重組方法利用 Fab 片段之雙鏈性質來克服由大腸桿菌(*E. coli*)轉型效率對文庫大小構成之限制。原始 VH 及 VL 譜係單獨選殖，一個選殖至噬菌粒中且另一個選殖至噬菌體載體中。接著藉由含噬菌粒之細菌之噬菌體感染將兩個文庫組合，使得各細胞含有不同之組合且文庫大小僅受存在之細胞數量(約 10^{12} 個純系)之限制。兩種載體皆含有活體內重組信號，使得 VH 及 VL 基因重組至單個複製子上，且共同包裝成噬菌體病毒體。該等巨大文庫提供具有良好親和力之大量不同抗體(K_d^{-1} 為約 10^{-8} M)。

【0122】 或者，可將各譜依序選殖至相同載體中，例如如 Barbas 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991)中所述，或藉由 PCR 組裝在一起且接著選殖，例如如 Clackson 等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)中所述。亦可使用 PCR 組裝將 VH 及 VL DNA 與編碼撓性肽間隔子之 DNA 連接以形成單鏈 Fv (scFv)譜。在另一技術中，如 Embleton 等人，*Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992)中所述，使用「細胞內 PCR 組裝」藉由 PCR 將淋巴球內之 VH 及 VL 基因組合，且接著選殖連接基因之譜系。

【0123】 由原始文庫(天然或合成)產生之抗體可具有中等親和力(K_d^{-1} 為約 10^6 至 10^7 M⁻¹)，但亦可如 Winter 等人(1994)，見上文所述藉由構築且自二級文庫重新選擇在活體外模擬親和力成熟。舉例而言，在 Hawkins 等人，*J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992)之方法中或在 Gram 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992)之方法中，藉由使用易錯聚合酶(報導於 Leung 等人，

Technique 1: 11-15 (1989)中)在活體外隨機引入突變。此外，可藉由例如使用帶有跨越相關 CDR 之隨機序列之引子的 PCR 在所選個別 Fv 純系中隨機突變一或多個 CDR 且篩選更高親和力純系來進行親和力成熟。WO9607754 (於 1996 年 3 月 14 日公佈)描述用於在免疫球蛋白輕鏈之互補決定區中誘導誘變以形成輕鏈基因文庫之方法。另一種有效方法為如 Marks 等人，*Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992)中所述，使藉由噬菌體展示選擇之 VH 或 VL 結構域與自未經免疫之供體獲得之天然存在之 V 結構域變異體之譜系重組，且在幾輪鏈改組中篩選更高之親和力。此技術允許產生親和力為約 10^{-9} M 或更低之抗體及抗體片段。

【0124】 文庫之篩選可藉由此項技術中已知之各種技術來完成。舉例而言，可使用抗原包被吸附板之孔，在附著至吸附板之宿主細胞上表現或用於細胞分選，或與生物素結合以用鏈黴親和素包被之珠粒捕獲，或用於任何其他淘選噬菌體展示文庫之方法中。

【0125】 使噬菌體文庫樣品在適使於使至少一部分噬菌體粒子與吸附劑結合之條件下與經固定之抗原接觸。通常，選擇包括 pH 值、離子強度、溫度及類似條件來模擬生理條件。洗滌結合至固相之噬菌體，接著藉由酸(例如如 Barbas 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991)中所述)或藉由鹼(例如如 Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)中所述)或藉由抗原競爭(例如在類似於 Clackson 等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)之抗原競爭方法之程序中)來溶離。噬菌體可在一輪選擇中富集 20-1,000 倍。此外，可使富集之噬菌體在細菌培養物中生長且再經受諸多輪選擇。

【0126】 選擇之效率取決於許多因素，包括洗滌期間之解離動力學，以及單個噬菌體上之多個抗體片段是否能同時與抗原接合。藉由使用短洗滌、多價噬菌體展示及固相中抗原之高包被密度可保留具有快速解離動力學(及弱結合親和

力)之抗體。高密度不僅經由多價相互作用穩定噬菌體，而且有利於已解離噬菌體之重新結合。可藉由使用如 Bass 等人，*Proteins*, 8: 309-314 (1990)及 WO 92/09690 中所述之長洗滌及單價噬菌體展示以及如 Marks 等人，*Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992)中所述之低抗原包被密度來促進具有慢解離動力學(及良好結合親和力)之抗體之選擇。

【0127】 對於抗原，可在不同親和力之噬菌體抗體之間，甚至在親和力略有不同之情況下進行選擇。然而，所選抗體之隨機突變(例如如在一些親和成熟技術中所實施)可能會產生許多突變體，該等突變體大多數與抗原結合，且少數具有較高親和力。在限制抗原之情況下，可將罕見之高親和力噬菌體競爭出去。為了保留所有較高親和力突變體，可將噬菌體與過量之生物素化抗原一起孵育，但生物素化抗原之莫耳濃度低於抗原之目標莫耳親和力常數。接著，可藉由鏈黴親和素包被之順磁珠粒捕獲高親和力結合噬菌體。該「平衡捕獲」允許根據抗體之結合親和力來選擇抗體，其靈敏度允許自大量過量親和力較低之噬菌體中分離出親和力高了低至兩倍之突變純系。亦可操縱用於洗滌結合至固相之噬菌體之條件以根據解離動力學進行區分。

【0128】 可根據活性來選擇抗抗原純系。在一些實施例中，本發明提供結合至活細胞之抗抗原抗體，該等活細胞天然表現抗原或結合至自由漂浮之抗原或附著至其他細胞結構之抗原。對應於該等抗抗原抗體之 Fv 純系可如下進行選擇：(1)如上所述自噬菌體文庫分離抗抗原純系，且視情況藉由使噬菌體純系之分離群體在合適之細菌宿主中生長來擴增該群體；(2)選擇分別需要阻斷及非阻斷活性之抗原及第二蛋白質；(3)將抗抗原噬菌體純系吸附至經固定之抗原上；(4)使用過量之第二蛋白質溶離識別抗原結合決定簇之任何不需要之純系，該等抗原結合決定簇與第二蛋白質之結合決定簇重疊或共用；及(5)溶離在步驟(4)之

後保持吸附之純系。視情況，可藉由重複本文所述之選擇程序來進一步富集具有所需阻斷/非阻斷特性之純系。

【0129】 編碼雜交瘤源性單株抗體或噬菌體展示 Fv 純系之 DNA 很容易使用習用程序分離及測序(例如，藉由使用寡核苷酸引子，該等引子經設計以自雜交瘤或噬菌體 DNA 模板特異性擴增相關重鏈及輕鏈編碼區)。在分離後，可將該 DNA 置於表現載體中，接著將其轉染至原本不會產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猿猴 COS 細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中，以在重組宿主細胞中獲得所要單株抗體之合成。關於抗體編碼 DNA 之細菌中之重組表現之綜述論文包括 Skerra 等人，*Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993)及 Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992)。

【0130】 編碼 Fv 純系之 DNA 可與編碼重鏈及/或輕鏈恆定區之已知 DNA 序列組合(例如，合適之 DNA 序列可自 Kabat 等人，見上文獲得)，以形成編碼全長或部分長度重鏈及/或輕鏈之純系。應瞭解，任何同種型之恆定區皆可用於此目的，包括 IgG、IgM、IgA、IgD 及 IgE 恆定區，且該等恆定區可自任何人類或動物物種獲得。如本文所用之「嵌合」及「雜交」抗體之定義中包括 Fv 純系，該 Fv 純系衍生自一種動物(諸如人類)物種之可變結構域 DNA，且接著融合至另一種動物物種之恆定區 DNA，形成「雜交」全長重鏈及/或輕鏈之編碼序列。在一些實施例中，衍生自人類可變 DNA 之 Fv 純系融合至人類恆定區 DNA，形成全長或部分長度人類重鏈及/或輕鏈之編碼序列。

【0131】 編碼衍生自雜交瘤之抗抗原抗體之 DNA 亦可藉由例如用人類重鏈及輕鏈恆定區之編碼序列取代衍生自雜交瘤純系之同源鼠類序列來修飾(例如如 Morrison 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)中之方法)。編碼雜交瘤或 Fv 純系衍生之抗體或片段之 DNA 可藉由將非免疫球蛋白多肽之全部

或部分編碼序列共價連接至免疫球蛋白編碼序列來進一步修飾。以此方式，製備具有 Fv 純系或雜交瘤純系衍生之抗體的結合特異性之「嵌合」或「雜交」抗體。

(iv) 人類化及人類抗體

【0132】 用於人類化非人類抗體之各種方法在此項技術中為已知的。舉例而言，人類化抗體具有自非人來源引入之一或多個胺基酸殘基。該等非人類胺基酸殘基通常稱為「導入」殘基，其通常取自「導入」可變結構域。人類化基本上可按照 Winter 及同事之方法(Jones 等人，*Nature*, 321:522-525 (1986)；Riechmann 等人，*Nature*, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen 等人，*Science*, 239:1534-1536 (1988))藉由用嚙齒類動物 CDR 或 CDR 序列取代人類抗體之相應序列來實施。因此，該等「人類化」抗體為嵌合抗體(美國專利第 4,816,567 號)，其中實質上不完整之人類可變結構域已由來自非人類物種之相應序列取代。實際上，人類化抗體通常為人類抗體，其中一些 CDR 殘基及可能的一些 FR 殘基由嚙齒類動物抗體中類似位點之殘基取代。

【0133】 選擇要用於製造人類化抗體之人類可變結構域(包括輕鏈結構域及重鏈結構域)對於降低抗原性非常重要。根據所謂的「最佳擬合」方法，針對已知人類可變結構域序列之整個文庫篩選嚙齒類動物抗體之可變結構域之序列。接著，最接近於嚙齒類動物之人類序列被公認為人類化抗體之人類框架(FR) (Sims 等人，*J. Immunol.*, 151:2296 (1993)；Chothia 等人，*J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987))。另一種方法使用衍生自特定輕鏈或重鏈亞組之所有人類抗體之一致序列之特定框架。相同之框架可用於幾種不同之人類化抗體(Carter 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)；Presta 等人，*J. Immunol.*, 151:2623 (1993))。

【0134】 更重要的是，抗體經人類化保持對抗原之高親和力及其他有利之生物學特性。為了達成此目標，根據該方法之一個實施例，藉由使用親代序列及人類化序列之三維模型分析親代序列及各種概念性人類化產物之方法來製備人類化抗體。三維免疫球蛋白模型為普遍可獲得的且為熟習此項技術者所熟悉。電腦程式為可獲得的，其說明且展示所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構。對該等展示之檢查允許分析殘基在候選免疫球蛋白序列之功能中之可能作用，亦即分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原之能力的殘基。以此方式，可自受體序列及導入序列選擇且組合 FR 殘基，使得達成所需抗體特徵，諸如增加對目標抗原之親和力。通常，超變區殘基直接且最實質上參與影響抗原結合。

【0135】 可藉由將選自人類源性噬菌體展示文庫之 Fv 純系可變結構域序列與如上所述之已知人類恆定結構域序列組合來構築本文所述之調配物及組合物中之人類抗體。或者，可藉由雜交瘤方法製備人類單株抗體。用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株已由例如 Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984)；Brodeur 等人，*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*，第 51-63 頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及 Boerner 等人，*J. Immunol.*, 147: 86 (1991)描述。

【0136】 有可能產生基因轉殖動物(例如小鼠)，其能夠在免疫時，在不產生內源性免疫球蛋白之情況下產生完整之人類抗體譜。舉例而言，已描述嵌合及種系突變小鼠中抗體重鏈連接區(J_H)基因之純合缺失使得完全抑制內源性抗體產生。在該等種系突變小鼠中轉移人類種系免疫球蛋白基因陣列將使得在抗原激發時產生人類抗體。參見例如 Jakobovits 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

90:2551 (1993)；Jakobovits 等人，*Nature*, 362:255-258 (1993)；Bruggermann 等人，*Year in Immuno.*, 7:33 (1993)；及 Duchosal 等人，*Nature* 355:258 (1992)。

【0137】 基因改組亦可用於自非人類(例如嚙齒類動物)抗體獲得人類抗體，其中人類抗體具有與起始非人類抗體相似之親和力及特異性。根據此亦稱為「決定基印記」之方法，藉由如本文所述之噬菌體展示技術獲得之非人類抗體片段之重鏈或輕鏈可變區經人類 V 結構域基因譜替代，產生非人類鏈/人類鏈 scFv 或 Fab 嵌合體之群體。用抗原選擇引起非人類鏈/人類鏈嵌合 scFv 或 Fab 之分離，其中人類鏈恢復在初級噬菌體展示純系中去除相應非人類鏈時被破壞之抗原結合位點，亦即決定基管控(標記)人類鏈搭配物之選擇。當重複該過程以替代剩餘之非人類鏈時，獲得人類抗體(參見於 1993 年 4 月 1 日公佈之 PCT WO 93/06213)。與藉由 CDR 移植實現非人類抗體之傳統人類化不同，此技術提供完全人類抗體，其不具有非人類來源之 FR 或 CDR 殘基。

(v) 抗體片段

【0138】 抗體片段可藉由諸如酶消化之傳統方法或重組技術產生。在某些情況下，使用抗體片段比使用完整抗體有優勢。較小尺寸之片段允許較快之清除，且可更好地接近實體腫瘤。關於某些抗體片段之綜述參見 Hudson 等人 (2003) *Nat. Med.* 9:129-134。

【0139】 已經開發了多種產生抗體片段之技術。傳統上，該等片段係經由完整抗體之蛋白水解消化衍生而來(參見例如 Morimoto 等人，*Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)；及 Brennan 等人，*Science*, 229:81 (1985))。然而，該等片段現可由重組宿主細胞直接產生。Fab、Fv 及 ScFv 抗體片段皆可在大腸桿菌中表現及分泌，因此允許容易地產生大量該等片段。抗體片段可自上文所論述之抗體噬菌體文庫分離。或者，可自大腸

桿菌直接回收 Fab'-SH 片段，且進行化學偶合以形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等人，*Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。根據另一方法，可直接自重組宿主細胞培養物分離 F(ab')₂ 片段。包含挽救受體結合決定基殘基之活體內半衰期延長之 Fab 及 F(ab')₂ 片段描述於美國專利第 5,869,046 號中。用於產生抗體片段之其他技術對於熟習此項技術者而言為顯而易見的。在一些實施例中，抗體為單鏈 Fv 片段(scFv)。參見 WO 93/16185；美國專利第 5,571,894 號；及第 5,587,458 號。Fv 及 scFv 為僅有之完整組合位點且沒有恆定區之種類；因此，其可能適合於在活體內使用期間減少非特異性結合。可構築 scFv 融合蛋白，以在 scFv 之胺基或羧基末端產生效應蛋白之融合。參見 *Antibody Engineering*, Borrebaeck 編，見上文。抗體片段亦可為「線性抗體」，例如如美國專利第 5,641,870 號中所述。該等線性抗體可為單特異性或雙特異性的。

(vi) 多特異性抗體

【0140】 多特異性抗體對至少兩種不同之決定基具有結合特異性，其中決定基通常來自不同抗原。儘管該等分子通常將僅結合兩個不同決定基(亦即雙特異性抗體，BsAb)，但當在本文中使用时，此表述亦涵蓋具有額外特異性之抗體，諸如三特異性抗體。雙特異性抗體可製備成全長抗體或抗體片段(例如 F(ab')₂ 雙特異性抗體)。

【0141】 用於製備雙特異性抗體之方法為此項技術中已知的。全長雙特異性抗體之傳統產生係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現，其中兩條鏈具有不同特異性(Millstein 等人，*Nature*, 305:537-539 (1983))。由於免疫球蛋白重鏈及輕鏈之隨機分類，該等雜交瘤(四瘤)產生 10 種不同抗體分子之潛在混合物，其中僅一者具有正確之雙特異性結構。通常藉由親和層析步驟純化正確之分子

相當麻煩，且產物產率低。類似程序揭示於 WO 93/08829 中及 Traunecker 等人，*EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)中。

【0142】 根據不同之方法，具有所需結合特異性之抗體可變結構域(抗體-抗原組合位點)融合至免疫球蛋白恆定結構域序列。融合較佳使用免疫球蛋白重鏈恆定結構域，包含鉸鏈、CH2 及 CH3 區域之至少一部分。通常使含有輕鏈結合所需之位點之第一重鏈恆定區(CH1)存在於融合物中之至少一者中。將編碼免疫球蛋白重鏈融合物及免疫球蛋白輕鏈(若需要)之 DNA 插入至單獨表現載體中，且共轉染至合適之宿主生物體中。當構築中使用之三個多肽鏈之不同比率提供最佳產率時，此在實施例中提供調節三個多肽片段之相互比例之極大靈活性。然而，當至少兩條多肽鏈以相等之比率表現產生高產率時，或者當該等比率沒有特別意義時，可在一個表現載體中插入兩條或全部三條多肽鏈之編碼序列。

【0143】 在此方法之一個實施例中，雙特異性抗體由一個臂中具有第一結合特異性之雜交免疫球蛋白重鏈及另一個臂中之雜交免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)組成。發現此不對稱結構有助於自不期望之免疫球蛋白鏈組合分離所需雙特異性化合物，因為僅一半雙特異性分子中存在免疫球蛋白輕鏈提供簡便之分離方法。此方法揭示於 WO 94/04690 中。關於產生雙特異性抗體之其他細節參見例如，Suresh 等人，*Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)。

【0144】 根據 WO96/27011 中所述之另一方法，可對一對抗體分子之間的界面進行設計，以最大化自重組細胞培養物回收之異二聚體之百分比。一個界面包含抗體恆定結構域之 CH3 結構域之至少一部分。在此方法中，來自第一抗體分子界面之一或多個小胺基酸側鏈經較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)替代。藉由用較小之胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)替代較大之胺基酸側鏈，在第二

抗體分子之界面上形成與較大側鏈大小相同或相似之互補「空腔」。此提供相較於其他不期望最終產物如同二聚體提高異二聚體之產率的機制。

【0145】 雙特異性抗體包括交聯或「雜結合」抗體。舉例而言，雜結合物中之抗體中之一者可與抗生物素蛋白偶合，另一者可與生物素偶聯。舉例而言，已提出該等抗體使免疫系統細胞靶向不期望之細胞(美國專利第 4,676,980 號)，且用於治療 HIV 感染(WO 91/00360、WO 92/200373 及 EP 03089)。雜結合抗體可使用任何方便之交聯方法製備。合適之交聯劑以及多種交聯技術為此項技術中所熟知的且揭示於美國專利第 4,676,980 號中。

【0146】 用於自抗體片段產生雙特異性抗體之技術亦已描述於文獻中。舉例而言，雙特異性抗體可使用化學鍵聯來製備。Brennan 等人，*Science*, 229: 81 (1985)描述了如下程序，其中完整抗體經蛋白水解裂解以產生 $F(ab')_2$ 片段。該等片段在二硫醇錯合劑亞砷酸鈉存在下經還原，以穩定鄰位二硫醇且防止分子間二硫化物之形成。產生之 Fab' 片段接著轉化成硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。一種 Fab' -TNB 衍生物接著藉由用巯基乙胺還原再轉化為 Fab' -硫醇，且與等莫耳量之另一 Fab' -TNB 衍生物混合以形成雙特異性抗體。產生之雙特異性抗體可用作對酶進行選擇性固定之物質。

【0147】 最新進展促進了自大腸桿菌直接回收 Fab' -SH 片段，該等片段可經化學偶合以形成雙特異性抗體。Shalaby 等人，*J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)描述完整人類化雙特異性抗體 $F(ab')_2$ 分子之產生。各 Fab' 片段分開地由大腸桿菌中分泌，且在活體外經歷定向化學偶合以形成雙特異性抗體。

【0148】 亦描述了直接自重組細胞培養物中製備及分離雙特異性抗體片段之各種技術。舉例而言，已使用白胺酸拉鏈產生了雙特異性抗體。Kostelny 等人，*J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。來自 Fos 及 Jun 蛋白之白胺酸拉鏈肽

藉由基因融合連接至兩種不同抗體之 Fab' 部分。抗體同二聚體在鉸鏈區經還原以形成單體，且接著再氧化以形成抗體異二聚體。此方法亦可用於產生抗體同二聚體。由 Hollinger 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) 描述之「雙價抗體」技術已提供製備雙特異性抗體片段之替代機制。該等片段包含藉由連接子連接至輕鏈可變結構域(V_L)之重鏈可變結構域(V_H)，該連接子太短而不能允許同一鏈上之兩個結構域之間配對。因此，一個片段之 V_H 及 V_L 結構域被迫與另一片段之互補 V_L 及 V_H 結構域配對，從而形成兩個抗原結合位點。亦報導了另一種藉由使用單鏈 Fv (sFv) 二聚體製備雙特異性抗體片段之策略。參見 Gruber 等人，*J. Immunol*, 152:5368 (1994)。

【0149】 考慮了超過二價之抗體。舉例而言，可製備三特異性抗體。Tuft 等人，*J. Immunol*. 147: 60 (1991)。

(vii) 單結構域抗體

【0150】 在一些實施例中，本文所述之抗體為單結構域抗體。單結構域抗體為包含抗體之重鏈可變結構域之全部或一部分或輕鏈可變結構域之全部或一部分的單一多肽鏈。在一些實施例中，單結構域抗體為人類單結構域抗體 (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; 參見例如美國專利第 6,248,516 B1 號)。在一個實施例中，單結構域抗體由抗體之重鏈可變結構域之全部或一部分組成。

(viii) 抗體變異體

【0151】 在一些實施例中，考慮了本文所述抗體之胺基酸序列修飾。舉例而言，可能需提高抗體之結合親和力及/或其他生物學特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由將適當之變化引入編碼抗體之核苷酸序列中或藉由肽合成來製備。該等修飾包括例如抗體胺基酸序列內殘基之缺失及/或插入及/或取代。可

進行缺失、插入及取代之任一組合來得到最終構築體，條件為最終構築體具有所需特徵。可在序列形成時將胺基酸改變引入本發明抗體胺基酸序列中。

(ix) 抗體衍生物

【0152】 本發明之調配物及組合物中之抗體可經進一步修飾以含有此項技術中已知且容易獲得之其他非蛋白質部分。在一些實施例中，適合於抗體衍生化之部分為水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇之共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三氧環己烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及葡聚糖或聚(n-乙基吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、環氧丙烷/環氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由於其在水中之穩定性，在製造中可能具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為具支鏈或不具支鏈的。附著至抗體之聚合物之數量可有所變化，且若附著一種以上之聚合物，則其可為相同或不同之分子。通常，用於衍生化之聚合物之數量及/或類型可基於以下考慮來確定，包括(但不限於)要改良之抗體的特定特性或功能、抗體衍生物是否將在限定條件下用於治療等。

(x) 載體、宿主細胞及重組方法

【0153】 抗體亦可使用重組方法產生。為重組產生抗抗原抗體，分離編碼抗體之核酸且將其插入可複製載體中，用於進一步選殖(擴增 DNA)或用於表現。編碼抗體之 DNA 可容易地用習用程式分離及測序(例如，藉由使用能夠特異性結合至編碼抗體重鏈及輕鏈之基因之寡核苷酸探針)。許多載體為可獲得的。載體組分通常包括(但不限於)以下中之一或多者：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、增強子元件、啟動子及轉錄終止序列。

(a) 信號序列組分

【0154】 本文所述之調配物及組合物中之抗體不僅可直接重組產生，亦可作為與異源多肽之融合多肽而產生，該異源多肽較佳為信號序列或在成熟蛋白質或多肽之 N 末端具有特定裂解位點之另一多肽。較佳選擇之異源信號序列為由宿主細胞識別及處理(例如，由信號肽酶裂解)之序列。對於不識別及處理天然抗體信號序列之原核宿主細胞，信號序列由選自例如鹼性磷酸酶、青黴素酶、lpp 或熱穩定腸毒素 II 前導序列之群的原核信號序列取代。對於酵母分泌，天然信號序列可經例如酵母轉化酶前導序列、因子前導序列(包括酵母屬(*Saccharomyces*)及克魯維酵母屬(*Kluyveromyces*) α 因子前導序列)或酸性磷酸酶前導序列、白色念珠菌(*C. albicans*)糖化酶前導序列或 WO 90/13646 中所述之信號取代。在哺乳動物細胞表現中，可獲得哺乳動物信號序列以及病毒分泌前導序列，例如單純疱疹 gD 信號。

(b) 複製起點

【0155】 表現及選殖載體皆含有使載體能夠在一或多個所選宿主細胞中複製之核酸序列。通常，在選殖載體中，此序列為能夠使載體獨立於宿主染色體 DNA 進行複製的序列，且包括複製起點或自主複製序列。各種細菌、酵母及病毒之該等序列為熟知的。質體 pBR322 之複製起點適用於大多數革蘭氏陰性細菌，2 μ 質體之複製起點適用於酵母，且各種病毒複製起點(SV40、多瘤、腺病毒、VSV 或 BPV)可用於選殖哺乳動物細胞中之載體。通常，哺乳動物表現載體不需要複製起點組分(SV40 起點通常僅因其含有早期啟動子而使用)。

(c) 選擇基因組分

【0156】 表現及選殖載體可含有選擇基因，亦稱為可選擇標記。典型之選擇基因所編碼之蛋白質(a)賦予對抗生素或其他毒素(例如胺苄青黴素、新黴素、

胺甲喋呤或四環素)之抗性，(b)補充營養缺陷，或(c)提供複雜培養基不能提供之關鍵營養素，例如編碼芽孢桿菌(*Bacilli*)之 D-丙胺酸消旋酶之基因。

【0157】 選擇方案之一個實例利用藥物來阻止宿主細胞之生長。用異源基因成功轉型之彼等細胞產生賦予耐藥性之蛋白質，且因此在選擇方案中存活下來。此優勢選擇之實例使用藥物新黴素、黴酚酸及潮黴素。

【0158】 適用於哺乳動物細胞之可選擇標記之另一實例為能夠鑑定吸收編碼抗體之核酸之彼等標記，諸如 DHFR、麩胺醯胺合成酶(GS)、胸苷激酶、金屬硫蛋白-I 及金屬硫蛋白-II，較佳為靈長類金屬硫蛋白基因、腺苷去胺酶、鳥胺酸脫羧酶等。

【0159】 例如，藉由在含有胺甲喋呤(Mtx)之培養基中培養轉型體來鑑定用 DHFR 基因轉型之細胞，胺甲喋呤為 DHFR 之競爭性拮抗劑。在該等條件下，DHFR 基因與任何其他共轉型之核酸一起擴增。可使用缺乏內源性 DHFR 活性之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株(例如 ATCC CRL-9096)。

【0160】 或者，藉由在含有 L-甲硫胺酸磺基脲(Msx)之培養基中培養轉型體來鑑定用 GS 基因轉型之細胞，Msx 為 GS 之抑制劑。在該等條件下，GS 基因與任何其他共轉型之核酸一起擴增。GS 選擇/擴增系統可與上文所述之 DHFR 選擇/擴增系統組合使用。

【0161】 或者，可藉由在含有用於可選擇標記之選擇劑(諸如胺基糖苷抗生素，例如卡那黴素、新黴素或 G418)之培養基中之細胞生長來選擇用編碼相關抗體、野生型 DHFR 基因及另一種可選擇標記(諸如胺基糖苷 3'-磷酸轉移酶(APH))之 DNA 序列轉型或共轉型之宿主細胞(尤其含有內源性 DHFR 之野生型宿主)。參見美國專利第 4,965,199 號。

【0162】 適用於酵母中之選擇基因為存在於酵母質體 YRp7 中之 *trp1* 基因 (Stinchcomb 等人, *Nature*, 282:39 (1979))。 *trp1* 基因為缺乏在色胺酸中生長之能力的酵母突變株(例如 ATCC 編號 44076 或 PEP4-1)提供選擇標記。 Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)。在酵母宿主細胞基因體中存在 *trp1* 損傷則為偵測藉由在不存在色胺酸情況下生長引起之轉型提供有效的環境。類似地, *Leu2* 缺陷型酵母株(ATCC 20,622 或 38,626)由帶有 *Leu2* 基因之已知質體補充。

【0163】 此外, 衍生自 1.6 μ m 環狀質體 pKD1 之載體可用於克魯維酵母之轉型。或者, *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)報導了大規模生產重組小牛凝乳酶之表現系統。亦揭示了克魯維酵母工業株分泌成熟重組人類血清白蛋白之穩定多拷貝表現載體。 Flier 等人, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)。

(d) 啟動子組分

【0164】 表現及選殖載體通常含有由宿主生物體識別且可操作地連接至編碼抗體之核酸的啟動子。適用於原核宿主之啟動子包括 *phoA* 啟動子、 β -內醯胺酶及乳糖啟動子系統、鹼性磷酸酶啟動子、色胺酸(*trp*)啟動子系統及雜交啟動子, 諸如 *tac* 啟動子。然而, 其他已知之細菌啟動子亦為合適的。用於細菌系統中之啟動子亦將含有可操作地連接至編碼抗體之 DNA 的夏因-達爾加諾 (Shine-Dalgarno, S.D.)序列。

【0165】 對於真核生物啟動子序列為已知的。事實上, 所有真核基因皆具有富含 AT 之區域, 其位於轉錄起始位點上游約 25 至 30 個鹼基處。在許多基因轉錄起點上游 70-80 個鹼基處發現之另一序列為 CNCAAT 區, 其中 N 可為任何核苷酸。在大多數真核基因之 3'端為 AATAAA 序列, 其可能為在編碼序列之 3'端添加聚 A 尾之信號。將所有該等序列適當地插入真核表現載體中。

【0166】 適用於酵母宿主之啟動子序列之實例包括 3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶(諸如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脫氫酶、己糖激酶、丙酮酸脫羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸異構酶、3-磷酸甘油酸變位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖異構酶、磷酸葡萄糖異構酶及葡糖激酶)之啟動子。

【0167】 其他酵母啟動子為誘導型啟動子，具有受生長條件控制之轉錄的額外優勢，其為醇脫氫酶 2、異細胞色素 C、酸性磷酸酶、與氮代謝相關之降解酶、金屬硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脫氫酶以及負責麥芽糖及半乳糖利用之酶的啟動子區。適用於酵母表現之載體及啟動子進一步描述於 EP 73,657 中。酵母增強子亦有利地與酵母啟動子一起使用。

【0168】 哺乳動物宿主細胞中之載體的抗體轉錄可由例如自病毒(諸如多瘤病毒、雞痘病毒、腺病毒(諸如腺病毒 2)、牛乳頭瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨細胞病毒、逆轉錄病毒、B 型肝炎病毒、猿猴病毒 40 (SV40))之基因體或自異源哺乳動物啟動子(例如肌動蛋白啟動子或免疫球蛋白啟動子)、自熱休克啟動子獲得之啟動子控制，條件為該等啟動子與宿主細胞系統相容。

【0169】 SV40 病毒之早期及晚期啟動子方便地以 SV40 限制性片段之形式獲得，該片段亦含有 SV40 病毒複製起點。人類巨細胞病毒之直接早期啟動子方便地以 HindIII E 限制性片段之形式獲得。使用牛乳頭瘤病毒作為載體在哺乳動物宿主中表現 DNA 之系統揭示於美國專利第 4,419,446 號中。此系統之修改描述於美國專利第 4,601,978 號中。關於人類 β -干擾素 cDNA 在單純疱疹病毒之胸苷激酶啟動子控制下在小鼠細胞中之表現亦參見 Reyes 等人，*Nature* 297:598-601 (1982)。或者，可使用勞斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)長末端重複序列作為啟動子。

(e) 增強子元件組分

【0170】 高等真核生物對編碼抗體之 DNA 之轉錄通常因在載體中插入增強子序列而增加。現已自哺乳動物基因(珠蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白及胰島素)中得知許多增強子序列。然而，通常吾人將使用來自真核細胞病毒之增強子。實例包括複製起點後側(bp 100-270)之 SV40 增強子、巨細胞病毒早期啟動子增強子、複製起點後側之多瘤增強子及腺病毒增強子。關於增強真核啟動子活化之元件亦參見 Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982)。增強子可在抗體編碼序列之 5'或 3'位置剪接至載體中，但較佳位於啟動子之 5'位點。

(f) 轉錄終止組分

【0171】 真核宿主細胞(酵母、真菌、昆蟲、植物、動物、人類或來自其他多細胞生物體之有核細胞)中使用之表現載體亦將含有終止轉錄及穩定 mRNA 所需之序列。該等序列通常可自真核或病毒 DNA 或 cDNA 之 5'及(偶爾) 3'非轉譯區獲得。該等區域含有在編碼抗體之 mRNA 之非轉譯部分轉錄為多腺苷酸化片段之核苷酸區段。一種有用轉錄終止組分為牛生長激素多腺苷酸化區域。參見 WO94/11026 及其中揭示之表現載體。

(g) 宿主細胞之選擇及轉型

【0172】 本文中適用於選殖或表現載體中之 DNA 之宿主細胞為上述原核生物細胞、酵母細胞或高等真核細胞。適用於此目的之原核生物包括真細菌，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*)，諸如埃希氏菌屬(*Escherichia*)，例如大腸桿菌；腸桿菌屬(*Enterobacter*)、歐文氏菌屬(*Erwinia*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)、變形桿菌屬(*Proteus*)；沙門氏菌屬(*Salmonella*)，例如鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*)；沙雷氏菌屬(*Serratia*)，例如黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)；及志賀氏菌屬(*Shigella*)，以及桿菌屬(*Bacilli*)，諸如枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌(*B.*

licheniformis) (例如在 1989 年 4 月 12 日公佈之 DD 266,710 中揭示之地衣芽孢桿菌 41P)；假單胞菌屬(*Pseudomonas*)，諸如銅綠假單胞菌(*P. aeruginosa*)；及鏈黴菌屬(*Streptomyces*)。一種較佳之大腸桿菌選殖宿主為大腸桿菌 294 (ATCC 31,446)，不過其他菌株，諸如大腸桿菌 B、大腸桿菌 X1776 (ATCC 31,537)及大腸桿菌 W3110 (ATCC 27,325)亦為合適的。該等實例為說明性而非限制性的。

【0173】 全長抗體、抗體融合蛋白及抗體片段可在細菌中產生，特別是在不需要糖基化及 Fc 效應子功能時，諸如當治療性抗體與本身在腫瘤細胞破壞中顯示有效性之細胞毒性劑(例如毒素)結合時。全長抗體在循環中具有更長之半衰期。大腸桿菌之產生更快且更成本有效。關於抗體片段及多肽在細菌中之表現參見例如美國專利第 5,648,237 號(Carter 等人)、美國專利第 5,789,199 號(Joly 等人)、美國專利第 5,840,523 號(Simmons 等人)，其描述轉譯起始區(TIR)及用於最佳化表現及分泌之信號序列。亦參見 Charlton, *Methods in Molecular Biology*，第 248 卷(B. K. C. Lo 編，Humana Press, Totowa, N.J., 2003)，第 245-254 頁，其描述抗體片段在大腸桿菌中之表現。在表現後，抗體可自大腸桿菌細胞漿中以可溶性部分分離，且可根據同種型經由例如蛋白質 A 或 G 管柱純化。最終純化可類似於用於純化例如在 CHO 細胞中表現之抗體之方式來進行。

【0174】 除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物亦為適用於抗體編碼載體之選殖或表現宿主。釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通麵包酵母為低等真核宿主微生物中最常用的。然而，許多其他屬、種及菌株在本文中為普遍可獲得且有用的，諸如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)；克魯維酵母宿主，諸如乳酸克魯維酵母(*K. lactis*)、脆壁克魯維酵母(*K. fragilis*)

(ATCC 12,424)、保加利亞克魯維酵母(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克克魯維酵母(*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、瓦提克魯維酵母(*K. waltii*) (ATCC 56,500)、果蠅克魯維酵母(*K. drosophilarum*) (ATCC 36,906)、耐熱克魯維酵母(*K. thermotolerans*)及馬克斯克魯維酵母(*K. marxianus*)；耶氏酵母屬(*Yarrowia*) (EP 402,226)；巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183,070)；念珠菌屬(*Candida*)；里氏木黴(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234)；粗糙脈孢菌(*Neurospora crassa*)；許旺酵母屬(*Schwanniomyces*)，諸如西方許旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)；絲狀真菌，諸如紅黴屬(*Neurospora*)、青黴屬(*Penicillium*)、彎頸黴屬(*Tolypocladium*)及麴菌屬(*Aspergillus*)宿主，諸如小巢狀麴菌(*A. nidulans*)及黑麴菌(*A. niger*)。關於論述酵母及絲狀真菌用於產生治療性蛋白質之用途之綜述參見例如 Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)。

【0175】 可選擇糖基化路徑已經「人類化」之某些真菌及酵母菌株，從而產生具有部分或完整人類糖基化模式之抗體。參見例如 Li 等人，*Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (描述巴斯德畢赤酵母中糖基化路徑之人類化)；及 Gerngross 等人，見上文。

【0176】 適用於表現糖基化抗體之宿主細胞亦衍生自多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑定了許多桿狀病毒株及變異體以及來自宿主(諸如草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (毛蟲)、埃及斑蚊(*Aedes aegypti*) (蚊子)、白線斑蚊(*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*) (果蠅)及家蠶(*Bombyx mori*))之相應許可昆蟲宿主細胞。用於轉染之多種病毒株為公眾可獲得的，例如苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa californica*) NPV 之 L-1 變異體及家蠶 NPV 之 Bm-5 株，且該等病毒可用作根據本發明之本文之病毒，尤其用於草地貪夜蛾細胞之轉染。

【0177】 棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄、浮萍(亞麻科(*Leninaceae*))、苜蓿(蒺藜狀苜蓿(*M. truncatula*))及菸草之植物細胞培養物亦可用作宿主。參見例如美國專利第 5,959,177 號、第 6,040,498 號、第 6,420,548 號、第 7,125,978 號及第 6,417,429 號(描述用於在基因轉殖植物中產生抗體之 PLANTIBODIES™ 技術)。

【0178】 脊椎動物細胞可用作宿主，且脊椎動物細胞在培養物(組織培養)中之繁殖已成為常規程序。有用哺乳動物宿主細胞株之實例為由 SV40 轉型之猴腎 CV1 細胞株(COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胚腎株(經亞選殖用於在懸浮培養物中生長之 293 或 293 細胞，Graham 等人，*J. Gen Virol.* 36:59 (1977))；幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；小鼠賽特利細胞(sertoli cell) (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人類宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；人類肝細胞(Hep G2, HB 8065)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI 細胞(Mather 等人，*Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982))；MRC 5 細胞；FS4 細胞；及人類肝癌細胞株(Hep G2)。其他有用之哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括 DHFR⁻ CHO 細胞(Urlaub 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如 NS0 及 Sp2/0。關於某些適用於抗體產生之哺乳動物宿主細胞株之綜述參見例如 Yazaki 及 Wu, *Methods in Molecular Biology*，第 248 卷(B. K. C. Lo 編，Humana Press, Totowa, N.J., 2003)，第 255-268 頁。

【0179】 用上述用於抗體產生之表現或選殖載體轉型宿主細胞，且在經適當改良以誘導啟動子、選擇轉型體或擴增編碼所需序列之基因的習用營養培養基中培養。

(h) 培養宿主細胞

【0180】 用於產生抗體之宿主細胞可在多種培養基中培養。諸如漢氏 F10 (Ham's F10) (Sigma)、最小必需培養基((MEM), (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)及杜貝克改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ((DMEM), Sigma)之市售培養基適合於培養宿主細胞。此外，可使用 Ham 等人，*Meth. Enz.* 58:44 (1979)；Barnes 等人，*Anal. Biochem.* 102:255 (1980)；美國專利第 4,767,704 號；第 4,657,866 號；第 4,927,762 號；第 4,560,655 號；或第 5,122,469 號；WO 90/03430；WO 87/00195；或美國專利公開案 30,985 中所述之任一培養基作為宿主細胞之培養基。該等培養基中之任一者可根據需要補充有激素及/或其他生長因子(諸如胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝劑(諸如 HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如 GENTAMYCINTM 藥物)、微量元素(定義為通常以微莫耳濃度範圍內之最終濃度存在之無機化合物)及葡萄糖或等效能量來源。任何其他必要之補充物亦可以熟習此項技術者將已知之適當濃度包括在內。諸如溫度、pH 值及類似條件之培養條件為先前與經選擇用於表現之宿主細胞一起使用之彼等條件，且對於熟習此項技術者而言為顯而易見的。

(xi) 抗體之純化

【0181】 當使用重組技術時，抗體可在細胞內、在周質空間中產生，或者直接分泌至培養基中。若抗體在細胞內產生，作為第一步，例如藉由離心或超濾去除微粒碎片，無論為宿主細胞抑或溶解之片段。Carter 等人，*Bio/Technology*

10:163-167 (1992)描述用於分離分泌至大腸桿菌周質空間之抗體的程序。簡言之，在乙酸鈉(pH 3.5)、EDTA 及苯基甲基磺醯氟(PMSF)存在下，歷經約 30 分鐘將細胞漿解凍。可藉由離心去除細胞碎片。在抗體分泌至培養基中之情況下，通常首先使用市售蛋白質濃縮過濾器(例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超濾單元)濃縮該等表現系統之上清液。在任一前述步驟中可包括諸如 PMSF 之蛋白酶抑制劑以抑制蛋白水解，且可包括抗生素以防止外來污染物之生長。

【0182】 自細胞製備之抗體組合物可使用例如羥基磷灰石層析、疏水相互作用層析、凝膠電泳、透析及親和層析加以純化，親和層析為通常較佳之純化步驟之一。蛋白質 A 作為親和配位體之適宜性取決於抗體中存在之任何免疫球蛋白 Fc 結構域之種類及同種型。蛋白質 A 可用於純化基於人類 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈之抗體(Lindmark 等人，*J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983))。蛋白質 G 被推薦用於所有小鼠同種型及人類 $\gamma 3$ (Guss 等人，*EMBO J.* 5:1567-1575 (1986))。蛋白質 L 可用於基於 κ 輕鏈純化抗體(Nilson 等人，*J. Immunol. Meth.* 164(1):33-40, 1993)。親和配位體所附著之基質最通常為瓊脂糖，但其他基質亦為可用的。機械穩定之基質諸如可控孔隙玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯允許比使用瓊脂糖可達成的相比更快之流速及更短之處理時間。在抗體包含 C_H3 結構域之情況下，Bakerbond ABX™ 樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)可用於純化。視要回收之抗體而定，亦可使用其他蛋白質純化技術，諸如離子交換管柱分餾、乙醇沈澱、反相 HPLC、矽膠層析、肝素 SEPHAROSE™ 層析陰離子或陽離子交換樹脂(諸如聚天冬胺酸管柱)層析、層析聚焦、SDS-PAGE 及硫酸銨沈澱。

【0183】 通常，製備用於研究、測試及臨床之抗體之各種方法在此項技術中為充分確定的，此與上述方法一致及/或由熟習此項技術者認為適用於特定相關抗體。

B. 選擇生物活性抗體

【0184】 如上所述產生之抗體可經歷一或多種「生物活性」分析，以由治療角度選擇具有有益特性之抗體。可針對抗體結合抗原之能力對抗體進行篩選，該抗原係針對該抗體產生。舉例而言，對於抗 DR5 抗體(例如多茲圖單抗(drozitumab))，抗體之抗原結合特性可在偵測結合至死亡受體 5 (DR5)之能力之分析中評估。

【0185】 在另一實施例中，抗體之親和力可藉由例如飽和結合；ELISA；及/或競爭分析(例如 RIA 之競爭分析)來確定。

【0186】 此外，抗體可經歷其他生物活性分析，例如以評估其作為治療劑之有效性。該等分析在為此項技術中已知的且視目標抗原及抗體之預期用途而定。

【0187】 為了篩選結合至相關抗原上之特定決定基之抗體，可進行諸如 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow 及 David Lane 編(1988)中所述之常規交叉阻斷分析。或者，可進行例如如 Champe 等人，*J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995)中所述之決定基定位，以確定抗體是否結合相關決定基。

III. 製備調配物之方法

【0188】 本發明之某些態樣係關於製備本文所述之任一液體調配物之方法。液體調配物可藉由將具有所需純度之多肽與 NAT 及 L-甲硫胺酸混合來製備。在一些實施例中，要調配之多肽未經歷預先凍乾，且本文中之相關調配物為水性調配物。在一些實施例中，多肽為治療性蛋白質。在一些實施例中，多肽為抗體。在另一實施例中，抗體為多株抗體、單株抗體、人類化抗體、人類抗體、嵌合抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體或抗體片段。在一些實施例中，

抗體為全長抗體。在一些實施例中，調配物中之抗體為抗體片段，諸如 $F(ab')_2$ ，在該情況下可能需要解決全長抗體可能不會出現之問題(諸如將抗體剪切至 Fab)。調配物中存在之多肽之治療有效量係藉由例如考慮所需劑量體積及投與模式來確定。調配物中之例示性多肽濃度包括約 1 mg/mL 至大於約 250 mg/mL、約 1 mg/mL 至約 250 mg/mL、約 10 mg/mL 至約 250 mg/mL、約 15 mg/mL 至約 225 mg/mL、約 20 mg/mL 至約 200 mg/mL、約 25 mg/mL 至約 175 mg/mL、約 25 mg/mL 至約 150 mg/mL、約 25 mg/mL 至約 100 mg/mL、約 30 mg/mL 至約 100 mg/mL 或約 45 mg/mL 至約 55 mg/mL。在一些實施例中，本文所述之多肽易於氧化。在一些實施例中，蛋白質中選自甲硫胺酸、半胱胺酸、組胺酸、色胺酸及/或酪胺酸之一或多個胺基酸易於氧化。在一些實施例中，多肽中之一或多個色胺酸易於氧化。在一些實施例中，多肽中之一或多個甲硫胺酸易於氧化。在一些實施例中，多肽中之一或多個色胺酸及一或多個甲硫胺酸易於氧化。

【0189】 在一些實施例中，液體調配物進一步包含一或多種賦形劑，諸如穩定劑、緩衝劑、表面活性劑及/或張力劑。本發明之液體調配物係在 pH 緩衝溶液中製備。本發明之緩衝劑具有在約 4.0 至約 9.0 範圍內之 pH 值。在一些實施例中，pH 值在 pH 4.0 至 8.5 範圍內、在 pH 4.0 至 8.0 範圍內、在 pH 4.0 至 7.5 範圍內、在 pH 4.0 至 7.0 範圍內、在 pH 4.0 至 6.5 範圍內、在 pH 4.0 至 6.0 範圍內、在 pH 4.0 至 5.5 範圍內、在 pH 4.0 至 5.0 範圍內、在 pH 4.0 至 4.5 範圍內、在 pH 4.5 至 9.0 範圍內、在 pH 5.0 至 9.0 範圍內、在 pH 5.5 至 9.0 範圍內、在 pH 6.0 至 9.0 範圍內、在 pH 6.5 至 9.0 範圍內、在 pH 7.0 至 9.0 範圍內、在 pH 7.5 至 9.0 範圍內、在 pH 8.0 至 9.0 範圍內、在 pH 8.5 至 9.0 範圍內、在 pH 5.7 至 6.8 範圍內、在 pH 5.8 至 6.5 範圍內、在 pH 5.9 至 6.5 範圍

內、在 pH 6.0 至 6.5 範圍內或在 pH 6.2 至 6.5 範圍內。在本發明之一些實施例中，液體調配物具有 6.2 或約 6.2 之 pH 值。在本發明之一些實施例中，液體調配物具有 6.0 或約 6.0 之 pH。在本發明之一些實施例中，液體調配物具有 5.8 或約 5.8 之 pH 值。在本發明之一些實施例中，液體調配物具有 5.5 或約 5.5 之 pH 值。將 pH 值控制在此範圍內之緩衝劑之實例包括有機酸及無機酸及其鹽。舉例而言，乙酸鹽(例如組胺酸乙酸鹽、精胺酸乙酸鹽、乙酸鈉)、丁二酸鹽(例如組胺酸丁二酸鹽、精胺酸丁二酸鹽、丁二酸鈉)、葡萄糖酸鹽、磷酸鹽、反丁烯二酸鹽、草酸鹽、乳酸鹽、檸檬酸鹽及其組合。緩衝劑濃度可為約 1 mM 至約 600 mM，此取決於例如緩衝劑及調配物之所需等滲性。在一些實施例中，調配物包含組胺酸緩衝劑(例如濃度為約 5 mM 至 100 mM)。組胺酸緩衝劑之實例包括組胺酸氯化物、組胺酸乙酸鹽、組胺酸磷酸鹽、組胺酸硫酸鹽、組胺酸丁二酸鹽等。在一些實施例中，調配物中之組胺酸為約 10 mM 至約 35 mM、約 10 mM 至約 30 mM、約 10 mM 至約 25 mM、約 10 mM 至約 20 mM、約 10 mM 至約 15 mM、約 15 mM 至約 35 mM、約 20 mM 至約 35 mM、約 20 mM 至約 30 mM 或約 20 mM 至約 25 mM。在其他實施例中，調配物中之精胺酸為約 50 mM 至約 500 mM (例如約 100 mM、約 150 mM 或約 200 mM)。

【0190】 本發明之液體調配物可進一步包含醣，諸如二醣(例如海藻糖或蔗糖)。如本文所用之「醣」包括一般組成 $(CH_2O)_n$ 及其衍生物，包括單醣、二醣、三醣、多醣、糖醇、還原糖、非還原糖等。本文中之醣之實例包括葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、果糖、麥芽糖、葡聚糖、甘油(glycerin)、葡聚糖、赤蘚糖醇、甘油(glycerol)、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨醇、甘露醇、蜜二糖、松三糖、棉子糖、甘露三糖、水蘇糖、麥芽糖、乳果糖、麥芽酮糖、葡萄糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、異麥芽酮糖等。在一些實施例中，調配物包含蔗糖。

【0191】 可視情況添加表面活性劑至液體調配物中。例示性表面活性劑包括非離子表面活性劑，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 等)。添加之表面活性劑之量使得其減少所調配抗體之聚集及/或最小化調配物中微粒之形成及/或減少吸附。舉例而言，表面活性劑可以約 0.001%至大於約 1.0%重量/體積之量存在於調配物中。在一些實施例中，表面活性劑以約 0.001%至約 1.0%、約 0.001%至約 0.5%、約 0.005%至約 0.2%、約 0.01%至約 0.1%、約 0.02%至約 0.06%或約 0.03%至約 0.05%重量/體積之量存在於調配物中。在一些實施例中，表面活性劑以 0.04%或約 0.04%重量/體積之量存在於調配物中。在一些實施例中，表面活性劑以 0.02%或約 0.02%重量/體積之量存在於調配物中。在一個實施例中，調配物不包含表面活性劑。

【0192】 在一個實施例中，調配物含有上文所鑑定之藥劑(例如抗體、緩衝劑、醣及/或表面活性劑)，且基本上不含一或多種防腐劑，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，防腐劑可包括在調配物中，尤其在調配物為多劑量調配物之情況下。防腐劑之濃度可在約 0.1%至約 2%、較佳約 0.5%至約 1%範圍內。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)中所述之彼等載劑、賦形劑或穩定劑)可包括在調配物中，條件為其不會不利地影響調配物之所需特徵。本文中之例示性醫藥學上可接受之賦形劑進一步包括間質藥物分散劑，諸如可溶性中性活性透明質酸酶醣蛋白(sHASEGP)，例如人類可溶性 PH-20 透明質酸酶醣蛋白，諸如 rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。某些例示性 sHASEGP 及使用方法(包括 rHuPH20)描述於美國專利公開案第 2005/0260186 號及第 2006/0104968 號中。在一個態樣中，sHASEGP 與一或多種其他糖胺聚糖酶(諸如軟骨素酶)組合。

【0193】 調配物可進一步包含金屬離子螯合劑。金屬離子螯合劑為熟習此項技術者所熟知的，且包括(但不一定限於)胺基多羧酸鹽、EDTA (乙二胺四乙酸)、EGTA (乙二醇-雙(β-胺基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸)、NTA (胺三乙酸)、EDDS (乙二胺二丁二酸鹽)、PDTA (1,3-丙二胺四乙酸)、DTPA (二乙三胺五乙酸)、ADA (β-丙胺酸二乙酸)、MGCA (甲基甘胺酸二乙酸)等。此外，本文中之一些實施例包含膦酸鹽/膦酸螯合劑。

【0194】 存在張力劑以調節或保持組合物中液體之張力。當與大的帶電荷生物分子(諸如蛋白質及抗體)一起使用時，其亦可用作「穩定劑」，因為其可與胺基酸側鏈之帶電荷基團相互作用，從而降低分子間及分子內相互作用之可能性。考慮到其他成分之相對量，張力劑可以 0.1 重量%至 25 重量%之間或更佳 1 重量%至 5 重量%之間的任何量存在。較佳張力劑包括多元糖醇，較佳為三元或更高級糖醇，諸如甘油、赤蘚糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨醇及甘露醇。

【0195】 本文所述之調配物亦可含有一種以上之為所治療之特定適應症所需之多肽或小分子藥物，較佳為具有互補活性且不會對另一種多肽產生不利影響之彼等多肽或小分子藥物。舉例而言，在抗體為抗 DR5 (例如多茲圖單抗)之情況下，其可與另一藥劑(例如化療劑及抗腫瘤劑)組合。

【0196】 在一些實施例中，調配物係用於活體內投與。在一些實施例中，調配物為無菌的。可藉由無菌過濾膜過濾使調配物無菌。本文中之治療調配物通常置於具有無菌存取孔之容器中，例如具有可由皮下注射針刺穿之塞子之靜脈內溶液袋或小瓶中。投與途徑係根據已知且可接受之方法，諸如藉由單次或多次濃注或以合適之方式長時間輸注，例如藉由皮下、靜脈內、腹膜內、肌內、

動脈內、病灶內、關節內或玻璃體內途徑之注射或輸注、局部投與、吸入或藉由持續釋放或延長釋放方式來進行。

【0197】 本發明之液體調配物可在儲存後為穩定的。在一些實施例中，液體調配物中之多肽在約 0 至約 5°C (諸如約 1°C、2°C、3°C 或 4°C 中之任一者)下儲存至少約 12 個月(諸如至少約 15 個月、18 個月、21 個月、24 個月、27 個月、30 個月、33 個月、36 個月或更長時間中之任一者)後為穩定的。在一些實施例中，評估或量測液體調配物中多肽之物理穩定性、化學穩定性或生物活性。此項技術已知之任何方法皆可用於評估穩定性及生物活性。在一些實施例中，藉由儲存後液體調配物中多肽之氧化來量測穩定性。可藉由評估在製備時以及儲存後調配物中抗體之物理穩定性、化學穩定性及/或生物活性來測試穩定性。物理特性及/或穩定性可以各種不同之方法定性及/或定量地加以評估，包括評估聚集體形成(例如使用尺寸排阻層析法、藉由量測濁度及/或藉由目視檢查)；藉由使用陽離子交換層析或毛細管區帶電泳評價電荷異質性；胺基末端或羧基末端序列分析；質譜分析；用於比較減小及完整之抗體的 SDS-PAGE 分析；肽圖譜(例如胰蛋白酶或 LYS-C)分析；評估抗體之生物活性或抗原結合功能等。不穩定性可能導致聚集、去醯胺化(例如 Asn 去醯胺化)、氧化(例如 Trp 氧化)、異構化(例如 Asp 異構化)、剪切/水解/片段化(例如鉸鏈區片段化)、丁二醯亞胺形成、不成對半胱胺酸、N 末端延伸、C 末端加工、糖基化差異等。在一些實施例中，使用 RP-HPLC、LC/MS 或胰蛋白酶肽圖譜中之一或多者來確定蛋白質中之氧化。在一些實施例中，使用 RP-HPLC、LC/MS 或胰蛋白酶肽圖譜中之一或多者來確定抗體中之氧化百分比，且公式為：

$$Fab氧化\% = 100 \times \frac{氧化Fab峰面積}{Fab峰面積 + 氧化Fab峰面積}$$
$$Fc氧化\% = 100 \times \frac{氧化Fc峰面積}{Fc峰面積 + 氧化Fc峰面積}$$

【0198】 本文亦提供製備液體調配物或防止液體調配物中之多肽氧化之方法，該等方法包括添加一定量之減少或防止液體調配物中之多肽氧化之 NAT 及 L-甲硫胺酸。在一些實施例中，液體調配物包含抗體。減少或防止多肽氧化之 NAT 及 L-甲硫胺酸之量可為本文所揭示之任一量。

IV. 減少氧化之方法

【0199】 本發明之某些態樣係關於減少液體調配物中之多肽(例如本文所述之任一多肽)氧化之方法，該等方法包括添加一定量之 NAT 及一定量之 L-甲硫胺酸，從而減少或防止液體調配物中之多肽氧化。在一些實施例中，包含 Nat 及 L-甲硫胺酸之液體調配物為本文所述之液體調配物中之任一者。在一些實施例中，多肽易於氧化。在一些實施例中，多肽中之一或多個甲硫胺酸、半胱胺酸、組胺酸、色胺酸及/或酪胺酸殘基易於氧化。在一些實施例中，多肽中之一或多個色胺酸殘基易於氧化。在一些實施例中，多肽中之一或多個甲硫胺酸殘基易於氧化。在一些實施例中，多肽中之一或多個色胺酸及一或多個甲硫胺酸殘基易於氧化。在一些實施例中，多肽為治療性多肽。在一些實施例中，多肽為抗體。在一些實施例中，調配物進一步包含至少一種根據本文所述任一多肽之其他多肽。在一些實施例中，調配物進一步包含一或多種賦形劑。在一些實施例中，調配物為水性調配物。在一些實施例中，調配物為醫藥調配物(例如適合於向人類個體投與)。

【0200】 例如，本發明之調配物可包含單株抗體、如本文所提供之防止單株抗體(例如在抗體中之一或多個色胺酸殘基及一或多個甲硫胺酸殘基處)之氧化的 NAT 及 L-甲硫胺酸及將調配物之 pH 值維持在所需水準之緩衝劑。在一些實施例中，調配物具有約 4.5 至約 7.0 之 pH 值。

【0201】 在一些實施例中，添加至調配物中之 NAT 之量為本文所提供之任一 NAT 濃度。在一些實施例中，添加至調配物中之 NAT 之量為約 0.3 mM。在一些實施例中，添加至調配物中之 NAT 之量為約 1.0 mM。在一些實施例中，NAT 減少或防止多肽中一或多個色胺酸殘基(例如如本文所述抗體之一或多個色胺酸殘基中之任一者)之氧化。在一些實施例中，多肽之氧化(例如多肽中一或多個色胺酸殘基之氧化)減少約 40%至約 100%，諸如減少約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%中之任一者，包括該等值之間的任何範圍(例如與缺少 NAT 之液體調配物中多肽中之一或多個相應色胺酸殘基相比)。在一些實施例中，不超過約 40%至約 0% (諸如不超過約 40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或 0%中之任一者，包括該等值之間的任何範圍)之多肽發生氧化(例如在多肽中之一或多個色胺酸殘基處氧化)。在一些實施例中，NAT 藉由反應性氧物質(ROS)防止多肽之氧化。

【0202】 在一些實施例中，添加至調配物中之 L-甲硫胺酸之量為本文所提供之任一 L-甲硫胺酸濃度。在一些實施例中，添加至調配物中之 L-甲硫胺酸之量為約 5.0 mM。在一些實施例中，L-甲硫胺酸減少或防止多肽中一或多個甲硫胺酸殘基(例如如本文所述抗體之一或多個甲硫胺酸殘基中之任一者)之氧化。在一些實施例中，多肽之氧化(例如多肽中一或多個甲硫胺酸殘基之氧化)減少約 40%至約 100%，諸如減少約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%中之任一者，包括該等值之間的任何範圍(例如與缺少 L-甲硫胺酸之液體調配物中多肽中之一或多個相應甲硫胺酸殘基相比)。在一些實施例中，不超過約 40%至約 0% (諸如不超過約 40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、

2%、1%或 0%中之任一者，包括該等值之間的任何範圍)之多肽發生氧化(例如在多肽中之一或多個甲硫胺酸殘基處氧化)。在一些實施例中，L-甲硫胺酸藉由反應性氧物質(ROS)防止多肽之氧化。

【0203】 在一些實施例中，調配物中之多肽(例如抗體)的濃度為本文所述之任一多肽濃度(例如約 1 mg/mL 至約 250 mg/mL)。在一些實施例中，多肽為治療性多肽。在一些實施例中，多肽為抗體。在一些實施例中，抗體為多株抗體、單株抗體、人類化抗體、人類抗體、嵌合抗體、多特異性抗體(例如雙特異性、三特異性等)或抗體片段。在一些實施例中，抗體衍生自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗體序列。在一些實施例中，抗體衍生自 IgG1 抗體序列。在一些實施例中，調配物進一步包含一或多種賦形劑。此項技術已知之任何合適之賦形劑均可用於本文所述之調配物中，包括例如穩定劑、緩衝劑、表面活性劑、張力劑及其任何組合。在一些實施例中，調配物具有約本文所述之任一 pH 值(例如約 4.5 至約 7.0)之 pH 值。

V. 調配物之投與

【0204】 本發明之某些態樣係關於向個體投與本文所述之任一調配物。在一些實施例中，本發明之液體調配物均可用於製備適合於向個體投與之藥物(例如以治療或預防個體之癌症)。液體調配物可根據已知方法向需要用多肽(例如抗體)治療之個體(例如人類)投與，該等已知方法為諸如以濃注形式靜脈內投與或藉由一段時間之連續輸注、藉由肌內、腹膜內、脊髓內、皮下、關節內、脊髓內、鞘內、經口、局部、吸入或玻璃體內途徑投與。在一些實施例中，液體調配物係藉由靜脈內、玻璃體內或皮下投與向個體投與。在一些實施例中，液體調配物係藉由玻璃體內投與向個體投與。在一些實施例中，液體調配物係藉由皮下投與向個體投與。

【0205】 多肽之適當劑量(「治療有效量」)將取決於例如要治療之病狀、病狀之嚴重程度及病程、多肽係用於預防目的抑或治療目的、先前療法、患者之臨床病史及對多肽之反應、所用多肽之類型以及主治醫師之判斷。多肽適當地以一次或歷經一系列治療向患者投與，且可自診斷開始之任何時間向患者投與。多肽可作為唯一治療或與可用於治療所討論病狀之其他藥物或療法聯合投與。如本文所用，術語「治療」係指治療性治療與預防(prophylactic/preventative)措施兩者。彼等需要治療之患者包括彼等已經患有病症之患者以及彼等要預防病症之患者。如本文所用，「病症」為自治療獲益之任何病狀，包括(但不限於)慢性及急性病症或疾病，包括使個體易患所討論病症之彼等病理病狀。

【0206】 在藥理學意義上，在本發明之上下文中，多肽(例如抗體)之「治療有效量」係指在抗體有效治療之病症的預防或治療中有效之量。在一些實施例中，無論藉由一次抑或多次投與，所投與多肽之治療有效量將在每公斤患者體重約 0.1 至約 50 mg (諸如約 0.3 至約 20 mg 或約 0.3 至約 15 mg)之範圍內。在一些實施例中，治療有效量之多肽係以一個日劑量或多個日劑量投與。在一些實施例中，治療有效量之多肽之投與頻率低於每日，諸如每週或每月進行。舉例而言，多肽可以每一週或多週(諸如每 1 週、2 週、3 週或 4 週或更長時間或每 1 個月、2 個月、3 個月、4 個月、5 個月或 6 個月或更長時間)約 100 至約 400 mg 之劑量(諸如約 100 mg、150 mg、200 mg、250 mg、300 mg、350 mg 或 400 mg 中之任一者，包括該等值之間的任何範圍)投與，或以每一週或多週(例如每 1 週、2 週、3 週或 4 週或更長時間或每 1 個月、2 個月、3 個月、4 個月、5 個月或 6 個月或更長時間)約 1.0 mg/kg、1.5 mg/kg、2.0 mg/kg、2.5 mg/kg、3.0 mg/kg、3.5 mg/kg、4.0 mg/kg、4.5 mg/kg、5.0 mg/kg、5.5 mg/kg、6.0

mg/kg、6.5 mg/kg、7.0 mg/kg、7.5 mg/kg、8.0 mg/kg、8.5 mg/kg、9.0 mg/kg、9.5 mg/kg、10.0 mg/kg、15.0 mg/kg 或 20.0 mg/kg 之劑量投與。該劑量可以單劑量或多劑量(例如 2 個、3 個、4 個或更多個劑量)投與，諸如輸注。此療法之進展係藉由習用技術容易地監測。

VI. 製品及套組

【0207】 本發明之某些態樣係關於製品或套組，其包含容納本發明之任一液體調配物之容器。合適之容器包括例如瓶子、小瓶及注射器。容器可由多種材料形成，諸如玻璃或塑膠。例示性容器為 2-20 cc 一次性玻璃小瓶。或者，對於多劑量調配物，容器可為 2-100 cc 玻璃小瓶。容器容納調配物且在容器上或與容器締合之標籤可指示使用說明。製品可進一步包括由商業及使用者角度來看需要之其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭、注射器及帶有使用說明書之包裝插頁。在一些實施例中，製品或套組進一步包含包裝插頁，該包裝插頁包含液體調配物之使用說明書。包裝插頁可指通常包括在治療產品之商業包裝中之說明書，該等說明書含有關於使用該等治療產品之適應症、用法、劑量、投與、禁忌及/或警告之資訊。

【0208】 亦提供可用於各種目的之套組，例如用於減少液體調配物中多肽之氧化，或用於篩選多肽氧化有所減少之液體調配物。在本發明之套組中供應之說明書通常為標籤或包裝插頁(例如包括在套組中之紙張)上之書面說明書，但機器可讀說明書(例如在磁性或光學存儲碟上攜帶之說明書)亦為可接受的。

【0209】 本說明書被視為足以使熟習此項技術者能夠實踐本發明。除了本文顯示及描述之修改之外，熟習此項技術者根據前面之描述將明瞭本發明之各種修改，且該等修改在所附申請專利範圍之範疇內。

實例

【0210】 藉由參考以下實例將更全面地理解本發明。然而，其不應解釋為限制本發明之範疇。應理解，本文所述之實例及實施例僅用於說明之目的，且將建議熟習此項技術者根據其作出各種修改或變化，且該等修改或變化將包括在本申請案之精神及範疇以及所附申請專利範圍之範疇內。

實例 1：NAT 防止氧化之評價.

【0211】 進行以下研究以評價作為生物治療藥物之調配物組分之 N-乙醯基-DL-色胺酸(NAT)及/或 L-甲硫胺酸之抗氧化功效及安全性。選擇 2,2'-偶氮-雙(2-甲脒基丙烷)二鹽酸鹽(AAPH) (一種偶氮化合物，其產生能夠氧化甲硫胺酸與色胺酸殘基之反應性氧) (Ji 等人(2009) *J. Pharm. Sci.* 98(12):4485-4500)以及曝光作為以下研究之氧化模型，因為其代表抗體在製造及/或長期儲存期間可能暴露之常見氧化路徑(Grewal 等人(2014) *Mol. Pharm.* 11(4):1259-1272)。

材料及方法

材料

【0212】 MAb1 及 mAb2 為具有氧化敏感性色胺酸及甲硫胺酸殘基之 IgG1 單株抗體(Dion 等人，手稿正在準備中)。除非另有說明，否則 mAb 係藉由一系列層析步驟(包括蛋白質 A 親和層析及離子交換層析)純化，且在不合表面活性劑或其他賦形劑之情況下在 pH 5.5 之低離子強度乙酸鈉緩衝液中調配。

【0213】 L-甲硫胺酸及 N-乙醯基-DL-色胺酸(NAT)係購自 Ajinomoto North America (Raleigh, NC)。2,2'-偶氮-雙(2-甲脒基丙烷)二鹽酸鹽(AAPH)係購自 Calbiochem (La Jolla, CA)。胰蛋白酶(質譜級)係購自 Promega (Madison, WI)。高壓液相層析(HPLC)級乙腈及水係購自 Fisher Scientific (Fairlawn, NJ)。用於緩衝液製備之水係自 Milli-Q 純化系統(Millipore, Bedford, MA)獲得。

NAT 抗氧化功效之評估

氧化敏感性殘基之鑑定及監測

【0214】 使抗體經受 AAPH 應激，隨後進行肽圖譜分析，以鑑定對氧化敏感之 CDR 及 Fc 殘基(Dion 等人，手稿正在準備中)。使用 Kabat 編號來鑑定可變片段(Fv)殘基，同時使用 EU 命名法(Edelman 等人(1969) *Proc Natl Acad Sci USA* 63(1):78-85)來鑑定 Fc 殘基。若殘基相對於對照氧化超過 5%，則認為其為敏感的且在整個實驗過程中進行監測。肽圖譜及分析資訊如 Dion 等人(手稿正在準備中)所報導。簡言之，使樣品變性、還原、羧甲基化且經受胰蛋白酶消化。在與 Thermo Q Exactive Plus 高解析度質譜儀偶合之 Waters Acquity H 型 UHPLC 上在 Acquity UPLC 肽 CSH C18 管柱上使用水/乙腈/甲酸梯度將肽分離。使用 Thermo Scientific PepFinder™及 Xcalibur™軟體處理資料。利用天然肽及氧化肽最豐富之電荷狀態，對提取之單同位素 m/z 離子層析圖進行積分。藉由用氧化肽之峰面積除以天然肽及氧化肽之總峰面積來計算氧化百分比。對主要色胺酸降解產物(+16 及+32，以及對於高度氧化位點+4、+20 及+48)求和且用於計算色胺酸氧化。僅使用甲硫胺酸亞磺(M_{+16})來計算甲硫胺酸氧化，因為在該等條件下未觀測到甲硫胺酸磺(M_{+32})。在兩個軟體包提供不同答案之情況下，在手動檢查資料後報告 Xcalibur™資料。

AAPH 化學氧化應激模型

【0215】 在 2cc 玻璃小瓶中於 20 mM 乙酸鈉(pH 5.5)中將抗體製備成 1 mg/mL 之最終濃度。於 20 mM 乙酸鈉(pH 5.5)中由 3 mM NAT 之儲備溶液添加 NAT，達至 0.05 mM 及 0.3 mM 之最終濃度。對於指定樣品，於 20 mM 乙酸鈉(pH 5.5)中由 50 mM 儲備溶液添加 L-甲硫胺酸，達至 5 mM 之最終濃度。由 11 mM 儲備溶液添加 AAPH，達至 1 mM 之最終濃度。對於對照樣品，將等體積之水替代 AAPH 添加至蛋白質等分試樣中。添加 AAPH 或水後，將樣品在

40°C 下孵育 16 h。亦即刻將對照樣品冷凍於-70°C 下。以 20:1 之 L-甲硫胺酸與 AAPH 之比率用 L-甲硫胺酸淬滅產生自由基之反應，且接著使用 PD-10 管柱 (GE Healthcare)將各樣品緩衝液交換至調配緩衝劑(20 mM 乙酸鈉、100 mM 蔗糖，pH 5.5)中且使用 Amicon 超離心過濾器(EMD Millipore)濃縮至 10 mg/mL 之最終濃度，以準備經由 LC-MS 肽圖譜進行分析。

曝光應激模型

【0216】 藉由將玻璃小瓶中 10 mg/mL 之樣品暴露於具有總劑量為 300 千勒克司-小時之可見光及 50 W·h/m² 之近 UV (320-400 nm)光之 Atlas SunTest CPS+ Xenon 光箱(Chicago, IL)中進行光穩定性研究。由上述儲備溶液添加 NAT，達至 0.05、0.1、0.3、0.5 或 1.0 mM 之最終濃度。將對照樣品包裹於鋁箔中且置於實驗小瓶旁邊。在曝露之後，將樣品儲存在-70°C 下，以準備經由 LC-MS 肽圖譜進行分析。

NAT 及 L-甲硫胺酸之安全性評價

電腦誘變性及致癌性預測

【0217】 使用 Derek Nexus (程式版本 2.0.2.201111291322；Lhasa Limited, Leeds, UK)及 Leadscope[®] (模型應用器版本 1.5.0；Leadscope Inc., Columbus, OH)電腦模型化工具來評價 NAT 之誘變及致癌可能性。

活體外受體結合及功能評價

【0218】 在結合、細胞及核受體功能及組織生物分析中評價 NAT 之活性。在 U373MG 人類星形細胞瘤細胞中評價與神經激肽-1 (NK-1)受體之結合，該等 U373MG 人類星形細胞瘤細胞內源性表現該受體(Eistetter 等人(1992) Functional characterization of Neurokinin-1 receptors on human U373MG astrocytoma cells. *Glia* 6(2):89-95；Heuillet 等人(1993) *J. Neurochem* 60(3):868-876)，且與參考促

效劑[Sar^9 , $\text{Met}(\text{O}_2)^{11}$]-SP 或參考拮抗劑 L 733,060 比較。將 NAT 或參考化合物與 U373MG 細胞在室溫下一起孵育；一式兩份地對所有濃度進行分析。

【0219】 已顯示經由 NK-1 受體起作用之物質 P 能調節人類與非臨床物種之血管緊張度(Coge 及 Regoli, (1994) *Neuropeptides* 26(6);385-390；Shirahase 等人 (2000) *Br. J. Pharmacol* 129(5);937-942)。為評價 NAT 在 NK-1 受體處之特定活性之潛能，將具有完整內皮之兔肺動脈環懸浮於 20 mL 器官浴槽中，該等器官浴槽中填充有經充氧(95% O_2 /5% CO_2)及預熱(37°C)之生理鹽溶液(mM)：NaCl 118.0、KCl 4.7、 MgSO_4 1.2、 CaCl_2 2.5、 KH_2PO_4 1.2、 NaHCO_3 25 及葡萄糖 11.0 (pH 7.4)。在整個實驗過程中存在普萘洛爾(Propranolol) (1 μM)、吡拉明(pyrilamine) (1 μM)、阿托品(atropine) (1 μM)及甲基麥角新鹼(1 μM)以分別阻斷 β -腎上腺素能受體、組胺 H1 受體、毒蕈鹼受體及 5-HT2 受體。將組織連接至力傳感器以獲得等長張力記錄，拉伸至 2 g 之靜止張力，接著使其平衡 60 分鐘，在此時間期間將其重複洗滌且重新調節張力。使用具有八個器官浴槽之半自動分離器官系統進行實驗，使用多通道資料採集。所量測之參數為由各化合物濃度引起之張力的最大變化。

【0220】 為評估促效劑活性，將組織用去甲腎上腺素(0.1 μM)收縮，暴露於次最大濃度之參考促效劑[Sar^9 , $\text{Met}(\text{O}_2)^{11}$]-SP (0.001 μM)以驗證反應性且獲得對照鬆弛，接著洗滌。此後，用去甲腎上腺素每 45 分鐘將組織收縮一次，使其暴露於濃度增加之 NAT 或參考促效劑，接著洗滌。使各化合物濃度與組織保持接觸，直至獲得穩定反應或最長 15 分鐘。若獲得促效劑樣反應(鬆弛)，則在 30 分鐘前添加之參考拮抗劑 spantide II (1 μM)存在下再次測試化合物之最高濃度，以確認 NK1 受體參與此反應。

【0221】 為評估拮抗劑活性，將組織用去甲腎上腺素($0.1\ \mu\text{M}$)收縮，暴露於次最大濃度之參考促效劑 $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}]\text{-SP}$ ($0.001\ \mu\text{M}$)以獲得對照鬆弛，接著洗滌。在濃度增加之 NAT 或參考拮抗劑 spantide II 存在下將此順序每 45 分鐘重複一次，各物質在暴露於 $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}]\text{-SP}$ 前 30 分鐘時添加。

NAT/L-甲硫胺酸調配物之活體內耐受性

【0222】 在動物中進行之所有程序皆符合動物福利法(Animal Welfare Act)、實驗動物照護及使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)及實驗動物福利辦公室(Office of Laboratory Animal Welfare)之要求。方案由適用之動物照護及使用機構委員會(Institutional Animal Care and Use Committees)批准。

單劑量兔玻璃體內耐受性研究

【0223】 為了評價急性耐受性以支持意欲用於治療視網膜病症之產品，藉由雙側玻璃體內注射(每隻眼 $50\ \mu\text{L}$)向雄性新西蘭白兔(NZW)投與單一劑量之等滲媒劑調配物($n=2$)或含有 $5\ \text{mM}$ NAT 及 $25\ \text{mM}$ L-甲硫胺酸之媒劑調配物($n=3$)。

【0224】 在研究之第 1 天向動物投用媒劑溶液。毒性評價係基於臨床觀察、眼內壓(IOP)量測及眼科檢查。在第 8 天屍檢時，收集眼睛及視神經且進行處理用於蘇木精及伊紅(H&E)染色，且由美國獸醫病理學家(ACVP 認證之獸醫病理學家學會(American College of Veterinary Pathologists (ACVP-certified Veterinary Pathologist)進行顯微鏡分析。

重複劑量兔玻璃體內耐受性研究

【0225】 在雄性及雌性 NZW 兔中進行良好實驗室實踐(GLP)毒理學研究，以支持意欲用於治療視網膜病症之產品。每隔一週(第 1 天、第 15 天、第 29 天及第 43 天)經由雙側玻璃體內注射(每隻眼 $50\ \mu\text{L}$)向動物(每一性別 $n = 5$ 個)投與

媒劑調配物(含有 1 mM NAT、5mM L-甲硫胺酸之等滲溶液，pH 5.5)。毒性評價係基於臨床觀察、體重量測、眼科檢查、IOP 量測、眼部照相術及臨床病理學。在第 45 天屍檢時，收集一套完整之組織且進行處理用於 H&E 染色，且由 ACVP 認證之獸醫病理學家進行顯微鏡分析。

重複劑量食蟹猴毒理學研究-玻璃體內投與

【0226】 在雄性及雌性食蟹猴(食蟹獼猴(*Macaca fascicularis*))中進行 GLP 毒理學研究，以支持意欲用於治療視網膜病症之產品。在 10 週時間內每隔一週(第 1 天、第 15 天、第 29 天、第 43 天、第 57 天及第 71 天)經由雙側玻璃體內注射(每隻眼 50 μ L)向動物(每一性別 n = 5 個)投與媒劑調配物(含有 1 mM NAT、5 mM L-甲硫胺酸之等滲溶液，pH 5.5)。毒性評價係基於臨床觀察、身體檢查、心電圖、眼科檢查、光譜域光學電腦斷層掃描(OCT)、眼部照相術、螢光素血管造影、視網膜電描記術及臨床病理學。在第 72 天或第 99 天屍檢時，收集一套完整之組織且進行處理用於 H&E 染色，且由 ACVP 認證之獸醫病理學家進行顯微鏡分析。

重複劑量食蟹猴研究-皮下投與

【0227】 在雄性及雌性食蟹猴(食蟹獼猴)中進行 GLP 毒理學研究，以支持意欲用於治療代謝疾病之產品。在 4 週內每週一次(第 1 天、第 8 天、第 15 天、第 22 天及第 29 天)向動物(第一性別 n=8 個)皮下(0.1 mL/kg)投與媒劑調配物(含有 0.3 mM NAT、5 mM L-甲硫胺酸之等滲溶液，pH 5.8)。毒性評價係基於臨床觀察、身體檢查、神經及眼科檢查、臨床病理學及尿液分析。在第 32 天或第 99 天屍檢時，收集一套完整之組織且進行處理用於 H&E 染色，且由 ACVP 認證之獸醫病理學家進行顯微鏡分析。

結果

AAPH 自由基化學氧化應激

【0228】 進行 AAPH 應激測試，以確定當暴露於溶液中之自由基時，NAT 對敏感色胺酸及甲硫胺酸殘基之抗氧化特性。如先前所報導(Dion 等人，手稿正在準備中)，mAb1 之肽圖譜指示兩個敏感之 CDR 色胺酸殘基 W52a 及 W100b 以及 Fv 甲硫胺酸 HC M82。對於 mAb2，鑑定出兩種肽，各肽含有多個敏感殘基(CDR H1 W33/M34/W36 及 CDR H3 W99/W100a 及 Fv W103)。對於該兩種具有多個敏感殘基之肽，本文顯示各肽之總和氧化值。亦發現與 FcRn 受體相互作用之 Fc 甲硫胺酸殘基 252 及 428 對兩種分子中之氧化應激為敏感的，此與過去之文獻(Bertolotti-Ciarlet 等人，2009)一致。為了確定 NAT 濃度對抗氧化劑功效之效應，使調配物中 NAT 之濃度在 0 mM 與 0.3 mM 之間變化，且使經調配之 mAb 經受 AAPH 應激(圖 1)。在沒有 NAT 之情況下，具有敏感色胺酸殘基之 Fv 肽之氧化水準在 AAPH 應激後增加 11% (mAb1 之 W100b)、60% (mAb1 之 W52a)及 87% (mAb2 之 W99/W100a/W103)。此等初始起始值給出廣泛範圍之氧化敏感度，在該範圍內研究 NAT 之影響。穩定色胺酸殘基所需之最小 NAT 濃度與殘基之初始 AAPH 敏感度相關(圖 1A)。在添加 0.05 mM NAT 之情況下，mAb1 W100b 之氧化減少至 5%，而 mAb1 W52a 需要添加 0.3 mM NAT 以使氧化減少至 5%。相比之下，添加 0.05 mM、0.1 mM 及 0.3 mM NAT 之情況下，mAb2 之 W99/W100a/W103 之氧化僅分別減少至 77%、62%及 8%。mAb2 上含有 W33/M34/W36 之肽類似地通常隨著 NAT 濃度之增加而減少，不過不能明確確定對該肽中個別色胺酸及甲硫胺酸殘基之相對效應。在不存在 NAT (3%)之情況下，mAb 1 中不太敏感之 M82 殘基最小程度地氧化，且納入 NAT 顯示較小效應(在 0.3 mM NAT 下氧化略微降低至 1%)。

【0229】 亦評價 NAT 濃度對 Fc 甲硫胺酸氧化之影響(圖 1B)。在沒有 NAT 之情況下，兩種 mAb 之 M252 及 M428 之氧化水準在 AAPH 暴露後介於 11%與 16%之間。與 NAT 在很大程度上防止氧化之 CDR 殘基相比，Fc 甲硫胺酸殘基之氧化因添加 NAT 而加劇。在測試之最高水準(0.3 mM NAT)下，Fc 甲硫胺酸殘基之氧化相對於沒有 NAT 之相應條件增加 6%-12%。

【0230】 由於 NAT 防止 CDR 及 Fv 色胺酸殘基發生氧化(在 0.3 mM NAT 下氧化小於 10%) (圖 1A)，但加劇 Fc 甲硫胺酸殘基之氧化(圖 1B)，故將包括與 NAT 共調配之 L-甲硫胺酸之實驗組包括在抗氧化劑功效研究中。單獨之 L-甲硫胺酸(5 mM)對 AAPH 敏感性色胺酸殘基具有混合效應，顯示 mAb1 略有改善，且 mAb2 氧化水準沒有影響或輕微加劇(圖 2A)。在僅添加 L-甲硫胺酸後，兩種分子之 Fc 甲硫胺酸氧化水準降低至 2%或更低(圖 2B)。0.3 mM NAT 及 5 mM L-甲硫胺酸之組合有效地將 AAPH 誘導之氧化降低至對於 CDR 色胺酸殘基為< 5%及對於 Fc 甲硫胺酸殘基為< 2%，使得抗氧化賦形劑之組合成為在所測試之條件下控制氧化水準之最有效方法(圖 2A-B)。

曝光應激：高強度 UV

【0231】 在不同 NAT 濃度(0-1 mM NAT)下將蛋白質(10 mg/mL)暴露於具有高強度 UV 組分(300 千勒克司-小時可見光及 50 W·h/m² 近 UV (320-400nm)光，歷時 6 小時時間)之光應激，以確定 NAT 作為抗氧化劑抵抗光氧化之功效(圖 3A-B)。基於 NAT 具有光敏性之報導(Chin 等人(2008) *J. Am. Chem. Soc.* 130(22):6912-6913)，與 AAPH 研究相比包括更寬之 NAT 濃度範圍。在所測試之條件下，mAb1 及 mAb2 中之大部分 CDR 及 Fv 殘基之氧化水準≤ 1%。僅兩種肽對所測試光條件顯示敏感性(mAb1 W52a (3%) 及 mAb2 之 W99/W100a/W103 (6%)) (圖 3A)。添加≥ 0.1 mM NAT 對此等位點之氧化影響最

小(mAb1 W52a 變化小於 1%，mAb2 之 W99/W100a/W103 增加 1-2%)。當在所測試之條件下向調配物中添加 NAT 時，經確定在無抗氧化劑條件下對光氧化不敏感之殘基仍然對光不敏感。

【0232】 與 Fv 殘基不同，Fc 甲硫胺酸殘基對 UV 光應激及 NAT 之添加為敏感的(圖 3B)。舉例而言，Fc 甲硫胺酸殘基 M252 之氧化自無 NAT 情況下之 8% 增加至在 mAb1 中存在 1 mM NAT 情況下之 19%，mAb2 則自 16%增加至 31%。該等結果表明，與在 AAPH 應激之情況下一樣，在 UV 光應激條件下 NAT 使 Fc 甲硫胺酸殘基之氧化水準增加。

【0233】 為了確定是否可藉由添加 L-甲硫胺酸來降低 NAT 對 Fc 甲硫胺酸之增敏作用，評價在 UV 光條件下單獨或組合形式之 NAT 及 L-甲硫胺酸之影響。添加單獨或與 0.3 mM NAT 組合之 5 mM L-甲硫胺酸對此氧化模型中之 CDR 及 Fv 殘基沒有有益影響(圖 4A)。UV 光誘導之 Fc 甲硫胺酸氧化因 5 mM L-甲硫胺酸而改良(圖 4B)，但效果不如 AAPH 模型中顯著。相對於無賦形劑條件或在此強 UV 光氧化模型中單獨使用 L-甲硫胺酸，L-甲硫胺酸(5 mM)及 NAT (0.3 mM)之組合使得 CDR 色胺酸或 Fc 甲硫胺酸受到輕微之光氧化保護。

NAT 及 L-甲硫胺酸之安全性評價

【0234】 鑒於 NAT 及甲硫胺酸存在於 FDA 非經腸調配物之非活性成分列表上且在急性環境下使用安全且未發現危險，故進行簡化之安全風險評價，以支持其用於意欲用於皮下或玻璃體內投與之調配物中。針對兩種新投與途徑，進行 NAT 及 L-甲硫胺酸之組合的活體內耐受性研究。此外，由於文獻報導表明 NAT 可能用作 NK-1 受體之拮抗劑，故針對 NAT 進行 NK-1 受體結合之電腦毒性評價及活體外評價。

NAT 之電腦評價

【0235】 Derek 為基於經驗/規則之系統，其藉由將測試化合物(亦即 NAT)之結構特徵與其資料庫中被認為負責毒性作用之分子部分(毒性載體(toxicophore))進行比較來得出預測。將 NAT 之結構提交至 Derek Nexus 資料庫，該資料庫返回「無報告」之結果。

【0236】 Leadscope[®]為定量結構-活性關係(QSAR)系統，其包括用於預測遺傳毒性之預訓練模型；該系統係與 US FDA 合作創建且已顯示高靈敏度及負預測性(Sutter 等人(2013) *Reg. Tox. Pharm.* 67(1):39-52)。Leadscope[®]評價總共 40 個模型中產生陽性結果之可能性。其中，僅 2 個模型經預測為陽性，其餘 38 個經預測為陰性(亦即未預測出毒性)。在遺傳毒性類別中，「其他細胞中之姊妹染色單體交換(SCE)」模型為陽性，且陽性預測概率為 0.829。相比之下，另外兩種 SCE 模型(活體外 SCE 及活體外 SCE CHO)皆為陰性。在嚙齒類動物致癌性類別中，「carc 小鼠雄性」模型經預測為陽性，且陽性預測概率為 0.622。在 Leadscope[®]工具中，0.4-0.6 之間的預測概率被視為邊際預測。模型之第二次運行返回陰性預測，且小鼠致癌性之總體預測(雄性及雌性組合)為陰性的。

活體外受體結合及功能評價

【0237】 參考化合物(Sar⁹, Met(O₂)¹¹)-SP 及 L 733,060)與 NK-1 受體之促效劑及拮抗劑結合之 IC₅₀分別為 4.2⁻¹⁰ M 及 4.7⁻¹⁰ M。相比之下，未能計算出 NAT 與 NK-1 受體之促效劑或拮抗劑結合之 IC₅₀ 值，此表明 NAT 在分析中所使用之條件下缺乏活性。

活體內耐受性評價-兔及食蟹猴毒理學研究

【0238】 在兔中藉由單劑量與重複劑量投與進行玻璃體內投與持續長達 6 週，含有高達 5 mM NAT 及 25 mM L-甲硫胺酸之媒劑調配物為良好耐受的。在食蟹猴中藉由每隔一週進行玻璃體內投與持續長達 7 週，且類似地，藉由皮

下投與進行每週投與持續長達 4 週，投與含 0.3 mM NAT 及 1 mM L-甲硫胺酸之媒劑調配物為良好耐受的。在任一物種中均未發現與媒劑相關之臨床觀察或體重變化、身體檢查、神經或眼科檢查、眼內壓、OCT、眼部照相術、螢光素血管造影、視網膜電描記術、血液學、凝血及臨床化學參數、尿液分析或者大體或微觀病理學。

【0239】 綜上所述，本文提供之研究表明，儘管 NAT 有效防止 CDR 色胺酸殘基受到由 AAPH 降解產生之 ROS 之影響，但其可能使 Fc 甲硫胺酸殘基對化學及光誘導之氧化敏感。將 L-甲硫胺酸添加至 NAT 中可有效防止色胺酸及甲硫胺酸殘基發生化學誘導之氧化，且使得光氧化水準等於或低於在所測試之條件下不含抗氧化劑之調配物中所發現之水準。該等研究表明，NAT 及 L-甲硫胺酸之組合能夠提供針對生物治療劑製造及儲存期間常見之氧化應激類型之保護。重要的是，安全性評價確認兩種賦形劑皆為良好耐受的。因此，本文呈現之證據表明，NAT 及 L-甲硫胺酸在生物治療調配物中作為抗氧化賦形劑可為安全且有效的，此為用於管控色胺酸及/或甲硫胺酸氧化之調配物開發提供重要之新選擇。

實例 2. 在 AAPH 應激測試中抗氧化劑減少氧化

【0240】 抗體 Mab3 為雙特異性抗體，將其用於評估 NAT +甲硫胺酸之抗氧化潛能。在存在或不存在 1 mM NAT 及 5 mM 甲硫胺酸之情況下，在 40℃ 下以 1 mg/mL 將 Mab3 與 1 mM AAPH 混合 16 小時。接著如上所述藉由質譜法量測 Mab3 之氧化，且藉由 ELISA 量測效力。結果呈現於表 1 中。

表 1. Mab3 之氧化

樣品	1	2
緩衝液及 pH	His-Ac pH 5.5	His-Ac pH 5.5
N-乙醯基-Trp	-	1 mM
L-met	-	5 mM

WW Ox%	96.6	12.3
與 Ag3 之結合(相對效力%)	受影響	89

【0241】 向溶液中添加 NAT +甲硫胺酸顯著減少 Mab3 之氧化。

實例 3. 添加抗氧化劑降低化學氧化風險

【0242】 Mab4 為 IgG1 抗體，將其以 100 mg/mL 在 20 mM 組胺酸鹽酸鹽、50 mM 氯化鈉、200 mM 蔗糖、0.04%泊洛沙姆 188 中加以調配。接著將抗體調配物在 AAPH 存在下，在 0、5、10 mM 或 10 mM AAPH + 1 mM NAT + 5 mM 甲硫胺酸下在 40℃ 下孵育 24 小時。接著如上所述藉由 MS 對樣品進行評估。

【0243】 結果顯示於圖 5 中。在 5 mM AAPH 下觀測到約 15%之 Fc M272 氧化。此對應於 10% trp 氧化。添加 1 mM NAT + 5 mM 甲硫胺酸使 Trp 之氧化減少約 50%，Fc Met 272 之氧化減少約 80%。在任一水準上皆未觀測到 Met CDR 之變化。如藉由 ELISA 所量測，添加 NAT + met 改良 Mab4 結合 Ag4 之特定活性之降低。

表 2. 抗體之效力

AAPH	特定活性%
0	106
5	63
10	43
10 + 1 mM NAT/5 mM 甲硫胺酸	88

實例 4. 添加 NAT/met 以降低光氧化風險

【0244】 進行研究以確定 NAT/met 是否能減少光氧化。Mab5 為具有不同於 IgG1 之同種型之 IgG 抗體，將其在不存在 NAT 及 met、存在 0.3 mM NAT + 5 mM 甲硫胺酸或 0.3 mM NAT + 10 mM 甲硫胺酸之情況下以 150 mg/ml 在 200 mM 精胺酸丁二酸鹽(pH 5.5)中加以調配。使樣品暴露於 300,000 勒克司小時以評價風險。結果呈現於表 3 中。

表 3. 環境光應激

NAT/met 水準	處理	Fc M251	CDR-H3 W104	HMWS	顏色
0 mM NAT/met	箔 (無光)	3.0%	1.6%	0.80%	B5.3
0 mM NAT/met	環境	15.5%	6.1%	1.30%	BY2.2
0.3 mM NAT/5 mM met	環境	6.1%	3.2%	0.90%	B5.1
0.3 mM NAT/10 mM met	環境	5.4%	3.0%	0.90%	B5.2

【0245】 NAT/met 防止 Mab5 發生環境光相關之氧化。

實例 5. 添加 NAT/met 提供氧化及效力保護

【0246】 抗體藥物產品在儲存壽命(通常在 5℃下超過 2 年)結束時可能顯示約 7-8%之 Met251 氧化。為了模擬此情況，用 5 mM AAPH 處理抗體，此產生約 15%之 Met251 氧化。用存在或不存在 NAT/met 之情況下用 5 mM AAPH 處理樣品，且接著分析 W104 及 M251 之氧化。亦量測抗體之效力。如表 4 中所示，向抗體彙集物中添加 0.3 mM NAT + 5 mM 甲硫胺酸使 W104 及 M251 之氧化降低，且使 AAPH 應激後抗體效力之減小降低。

表 4. NAT/met 提供氧化及效力保護

材料	NAT (mM)	Met (mM)	W104 氧化 %	Fc M251 氧化 %	效力
純系彙集物	0	0	36.6	12.2	約 70
純系彙集物	0.3	5	26.4	4.6	約 80

【0247】 此外，使純系彙集物經受如上所述之環境光應激。如表 5 中所示，純系彙集物經歷與上文所述相同之顏色變化。

表 5. 抗體之光保護

樣品	處理	HMWS	顏色
0 mM NAT/met	箔對照	0.71%	B5.3
0 mM NAT/met	環境光	0.92%	BY3.0
0.3 mM NAT/5 mM met	環境光	0.74%	B5.4

實例 6. NAT/met 降低化學氧化風險

【0248】 使用 AAPH 應激測試來評價 NAT 及/或甲硫胺酸之氧化保護。Mab6 為雙特異性抗體，將其在 40 C 下在存在或不存在 NAT 及/或甲硫胺酸之情況下，在 20 mM 組胺酸乙酸鹽中以 1 mg/mL 與 1 mM AAPH 一起孵育 16 小時。如上所述分析樣品之氧化。如表 X 中所示，0.1 至 0.5 mM 之 NAT 濃度提供氧化保護，單獨 met 亦提供針對 AAPH 之一定保護。

表 6. NAT/met 降低化學氧化風險

	1	2	3	4	5	6
NAT	0.1 mM	0.4 mM	0.5 mM	0.3 mM	0 mM	0 mM
Met	5 mM	5 mM	5 mM	0 mM	5 mM	0 mM
W104 氧化	25.6%	5.7%	3.5%	8.0%	49.0%	59.0%

實例 7. NAT/met 防止化學誘導之氧化.

【0249】 抗體 Mab7 為雙特異性抗體，藉由在 40°C 下在存在或不存在 NAT 及甲硫胺酸之情況下將該分子以 1 mg/mL 在 20 mM 組胺酸乙酸鹽中與 1 mM AAPH 一起孵育 16 小時來評估位置 W52 之化學誘導之氧化。藉由肽圖譜來分析樣品之氧化。如圖 6 中所示，NAT + met 之組合防止 W52 發生化學誘導之氧化。

【發明申請專利範圍】

- 【第 1 項】一種液體調配物，其包含多肽、N-乙醯基-DL-色胺酸(NAT)及 L-甲硫胺酸，其中該 NAT 係以足以防止該多肽中之一或多個色胺酸殘基氧化之量提供，且其中該 L-甲硫胺酸係以足以防止該多肽中之一或多個甲硫胺酸殘基氧化之量提供。
- 【第 2 項】如申請專利範圍第 1 項之液體調配物，其中該調配物中 NAT 之濃度為約 0.01 至約 25 mM。
- 【第 3 項】如申請專利範圍第 1 項或申請專利範圍第 2 項之液體調配物，其中該調配物中 NAT 之濃度為約 0.05 至約 1.0 mM。
- 【第 4 項】如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項之液體調配物，其中該調配物中 NAT 之濃度為約 0.05 至約 0.3 mM。
- 【第 5 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之液體調配物，其中該調配物中 NAT 之濃度為選自由以下組成之群的濃度：約 0.05 mM、約 0.1 mM、約 0.3 mM 及約 1.0 mM。
- 【第 6 項】如申請專利範圍第 1 項至第 5 項中任一項之液體調配物，其中該調配物中 L-甲硫胺酸之濃度為約 1 至約 125 mM。
- 【第 7 項】如申請專利範圍第 1 項至第 6 項中任一項之液體調配物，其中該調配物中 L-甲硫胺酸之濃度為約 5 至約 25 mM。
- 【第 8 項】如申請專利範圍第 1 項至第 7 項中任一項之液體調配物，其中該調配物中 L-甲硫胺酸之濃度為約 5 mM。
- 【第 9 項】如申請專利範圍第 1 項至第 8 項中任一項之液體調配物，其中該調配物中 NAT 之濃度為約 0.3 mM 且該調配物中 L-甲硫胺酸之濃度為約 5.0 mM。

- 【第 10 項】 如申請專利範圍第 1 項至第 8 項中任一項之液體調配物，其中該調配物中 NAT 之濃度為約 1.0 mM 且該調配物中 L-甲硫胺酸之濃度為約 5.0 mM。
- 【第 11 項】 如申請專利範圍第 1 項至第 10 項中任一項之液體調配物，其中該多肽為抗體。
- 【第 12 項】 如申請專利範圍第 11 項之液體調配物，其中該一或多個色胺酸殘基位於該抗體之可變區內。
- 【第 13 項】 如申請專利範圍第 11 項或申請專利範圍第 12 項之液體調配物，其中該一或多個色胺酸殘基包含 W103，其中殘基編號係根據 Kabat 編號來進行。
- 【第 14 項】 如申請專利範圍第 11 項至第 13 項中任一項之液體調配物，其中該一或多個色胺酸殘基位於該抗體之 HVR 內。
- 【第 15 項】 如申請專利範圍第 11 項至第 14 項中任一項之液體調配物，其中該一或多個色胺酸殘基位於該抗體之 HVR-H1 及/或 HVR-H3 內。
- 【第 16 項】 如申請專利範圍第 11 項至第 15 項中任一項之液體調配物，其中該一或多個色胺酸殘基包含 W33、W36、W52a、W99、W100a 及/或 W100b，其中殘基編號係根據 Kabat 編號來進行。
- 【第 17 項】 如申請專利範圍第 11 項至第 16 項中任一項之液體調配物，其中該一或多個甲硫胺酸殘基位於該抗體之可變區內。
- 【第 18 項】 如申請專利範圍第 11 項至第 17 項中任一項之液體調配物，其中該一或多個甲硫胺酸殘基包含 M34 及/或 M82，其中殘基編號係根據 Kabat 編號來進行。

【第 19 項】 如申請專利範圍第 11 項至第 18 項中任一項之液體調配物，其中該一或多個甲硫胺酸殘基位於該抗體之恆定區內。

【第 20 項】 如申請專利範圍第 11 項至第 19 項中任一項之液體調配物，其中該一或多個甲硫胺酸殘基包含 M252 及/或 M428，其中殘基編號係根據 EU 編號來進行。

【第 21 項】 如申請專利範圍第 11 項至第 20 項中任一項之液體調配物，其中該抗體為 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗體。

【第 22 項】 如申請專利範圍第 11 項至第 21 項中任一項之液體調配物，其中該抗體為多株抗體、單株抗體、人類化抗體、人類抗體、嵌合抗體、多特異性抗體或抗體片段。

【第 23 項】 如申請專利範圍第 1 項至第 22 項中任一項之液體調配物，其中該多肽中該一或多個色胺酸殘基之氧化相對於缺少 NAT 之液體調配物中該多肽中之一或多個相應色胺酸殘基之氧化有所減少。

【第 24 項】 如申請專利範圍第 1 項至第 23 項中任一項之液體調配物，其中該多肽中該一或多個甲硫胺酸殘基之氧化相對於缺少 L-甲硫胺酸之液體調配物中該多肽中之一或多個相應甲硫胺酸殘基之氧化有所減少。

【第 25 項】 如申請專利範圍第 1 項至第 24 項中任一項之液體調配物，其中該多肽中該一或多個色胺酸殘基及該一或多個甲硫胺酸殘基之氧化相對於缺少 NAT 及 L-甲硫胺酸之液體調配物中該多肽中之一或多個相應色胺酸殘基及一或多個相應甲硫胺酸殘基之氧化有所減少。

【第 26 項】 如申請專利範圍第 23 項至第 25 項中任一項之液體調配物，其中該氧化減少約 40%、約 50%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%或約 99%。

- 【第 27 項】 如申請專利範圍第 1 項至第 26 項中任一項之液體調配物，其中該調配物中之多肽濃度為約 1 mg/mL 至約 250 mg/mL。
- 【第 28 項】 如申請專利範圍第 1 項至第 27 項中任一項之液體調配物，其中該調配物具有約 4.5 至約 7.0 之 pH 值。
- 【第 29 項】 如申請專利範圍第 1 項至第 28 項中任一項之液體調配物，其中該調配物進一步包含一或多種賦形劑。
- 【第 30 項】 如申請專利範圍第 29 項之液體調配物，其中該一或多種賦形劑係選自由以下組成之群：穩定劑、緩衝劑、表面活性劑及張力劑。
- 【第 31 項】 如申請專利範圍第 1 項至第 30 項中任一項之液體調配物，其中該調配物為適合於向個體投與之醫藥調配物。
- 【第 32 項】 如申請專利範圍第 31 項之液體調配物，其中該醫藥調配物適合於皮下、靜脈內或玻璃體內投與。
- 【第 33 項】 如申請專利範圍第 31 項或申請專利範圍第 32 項之液體調配物，其中該個體為人類。
- 【第 34 項】 一種製品或套組，其包含如申請專利範圍第 1 項至第 33 項中任一項之液體調配物。
- 【第 35 項】 一種減少水性調配物中之多肽之氧化的方法，該方法包括將 NAT 及 L-甲硫胺酸添加至該調配物中，其中該 NAT 係以足以防止該多肽中之一或多個色胺酸殘基氧化之量提供，且其中該 L-甲硫胺酸係以足以防止該多肽中之一或多個甲硫胺酸殘基氧化之量提供。
- 【第 36 項】 如申請專利範圍第 35 項之方法，其中將該 NAT 添加至該調配物中，達至約 0.01 至約 25 mM 之濃度。

- 【第 37 項】 如申請專利範圍第 35 項或申請專利範圍第 36 項之方法，其中將該 NAT 添加至該調配物中，達至約 0.05 至約 1 mM 之濃度。
- 【第 38 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 37 項中任一項之方法，其中將該 NAT 添加至該調配物中，達至約 0.05 至約 0.3 mM 之濃度。
- 【第 39 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 38 項中任一項之方法，其中將該 NAT 添加至該調配物中，達至選自由以下組成之群的濃度：約 0.05 mM、約 0.1 mM、約 0.3 mM 及約 1.0 mM。
- 【第 40 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 39 項中任一項之方法，其中將該 L-甲硫胺酸添加至該調配物中，達至約 1 至約 125 mM 之濃度。
- 【第 41 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 40 項中任一項之方法，其中將該 L-甲硫胺酸添加至該調配物中，達至約 5 至約 25 mM 之濃度。
- 【第 42 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 41 項中任一項之方法，其中將該 L-甲硫胺酸添加至該調配物中，達至約 5 mM 之濃度。
- 【第 43 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 42 項中任一項之方法，其中將該 NAT 添加至該調配物中，達至約 0.3 mM 之濃度，且其中將該 L-甲硫胺酸添加至該調配物中，達至約 5.0 mM 之濃度。
- 【第 44 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 42 項中任一項之方法，其中將該 NAT 添加至該調配物中，達至約 1.0 mM 之濃度，且其中將該 L-甲硫胺酸添加至該調配物中，達至約 5.0 mM 之濃度。
- 【第 45 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 44 項中任一項之方法，其中該多肽為抗體。
- 【第 46 項】 如申請專利範圍第 45 項之方法，其中該一或多個色胺酸殘基位於該抗體之可變區內。

- 【第 47 項】 如申請專利範圍第 45 項或申請專利範圍第 46 項之方法，其中該一或多個色胺酸殘基包含 W103，其中殘基編號係根據 Kabat 編號來進行。
- 【第 48 項】 如申請專利範圍第 45 項至第 47 項中任一項之方法，其中該一或多個色胺酸殘基位於該抗體之 HVR 內。
- 【第 49 項】 如申請專利範圍第 45 項至第 48 項中任一項之方法，其中該一或多個色胺酸殘基位於該抗體之 HVR-H1 及/或 HVR-H3 內。
- 【第 50 項】 如申請專利範圍第 45 項至第 49 項中任一項之方法，其中該一或多個色胺酸殘基包含 W33、W36、W52a、W99、W100a 及/或 W100b，其中殘基編號係根據 Kabat 編號來進行。
- 【第 51 項】 如申請專利範圍第 45 項至第 50 項中任一項之方法，其中該一或多個甲硫胺酸殘基位於該抗體之可變區內。
- 【第 52 項】 如申請專利範圍第 45 項至第 51 項中任一項之方法，其中該一或多個甲硫胺酸殘基包含 M34 及/或 M82，其中殘基編號係根據 Kabat 編號來進行。
- 【第 53 項】 如申請專利範圍第 45 項至第 52 項中任一項之方法，其中該一或多個甲硫胺酸殘基位於該抗體之恆定區內。
- 【第 54 項】 如申請專利範圍第 45 項至第 53 項中任一項之方法，其中該一或多個甲硫胺酸殘基包含 M252 及/或 M428，其中殘基編號係根據 EU 編號來進行。
- 【第 55 項】 如申請專利範圍第 45 項至第 54 項中任一項之方法，其中該抗體為 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗體。

【第 56 項】 如申請專利範圍第 45 項至第 55 項中任一項之方法，其中該抗體為多株抗體、單株抗體、人類化抗體、人類抗體、嵌合抗體、多特異性抗體或抗體片段。

【第 57 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 56 項中任一項之方法，其中該多肽中該一或多個色胺酸殘基之氧化相對於缺少 NAT 之液體調配物中該多肽中之一或多個相應色胺酸殘基之氧化有所減少。

【第 58 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 57 項中任一項之方法，其中該多肽中該一或多個甲硫胺酸殘基之氧化相對於缺少 L-甲硫胺酸之液體調配物中該多肽中之一或多個相應甲硫胺酸殘基之氧化有所減少。

【第 59 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 58 項中任一項之方法，其中該多肽中該一或多個色胺酸殘基及該一或多個甲硫胺酸殘基之氧化相對於缺少 NAT 及 L-甲硫胺酸之液體調配物中該多肽中之一或多個相應色胺酸殘基及一或多個相應甲硫胺酸殘基之氧化有所減少。

【第 60 項】 如申請專利範圍第 57 項至第 59 項中任一項之方法，其中該氧化減少約 40%、約 50%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%或約 99%。

【第 61 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 60 項中任一項之方法，其中該調配物中之多肽濃度為約 1 mg/mL 至約 250 mg/mL。

【第 62 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 61 項中任一項之方法，其中該調配物具有約 4.5 至約 7.0 之 pH 值。

【第 63 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 62 項中任一項之方法，其中該調配物進一步包含一或多種賦形劑。

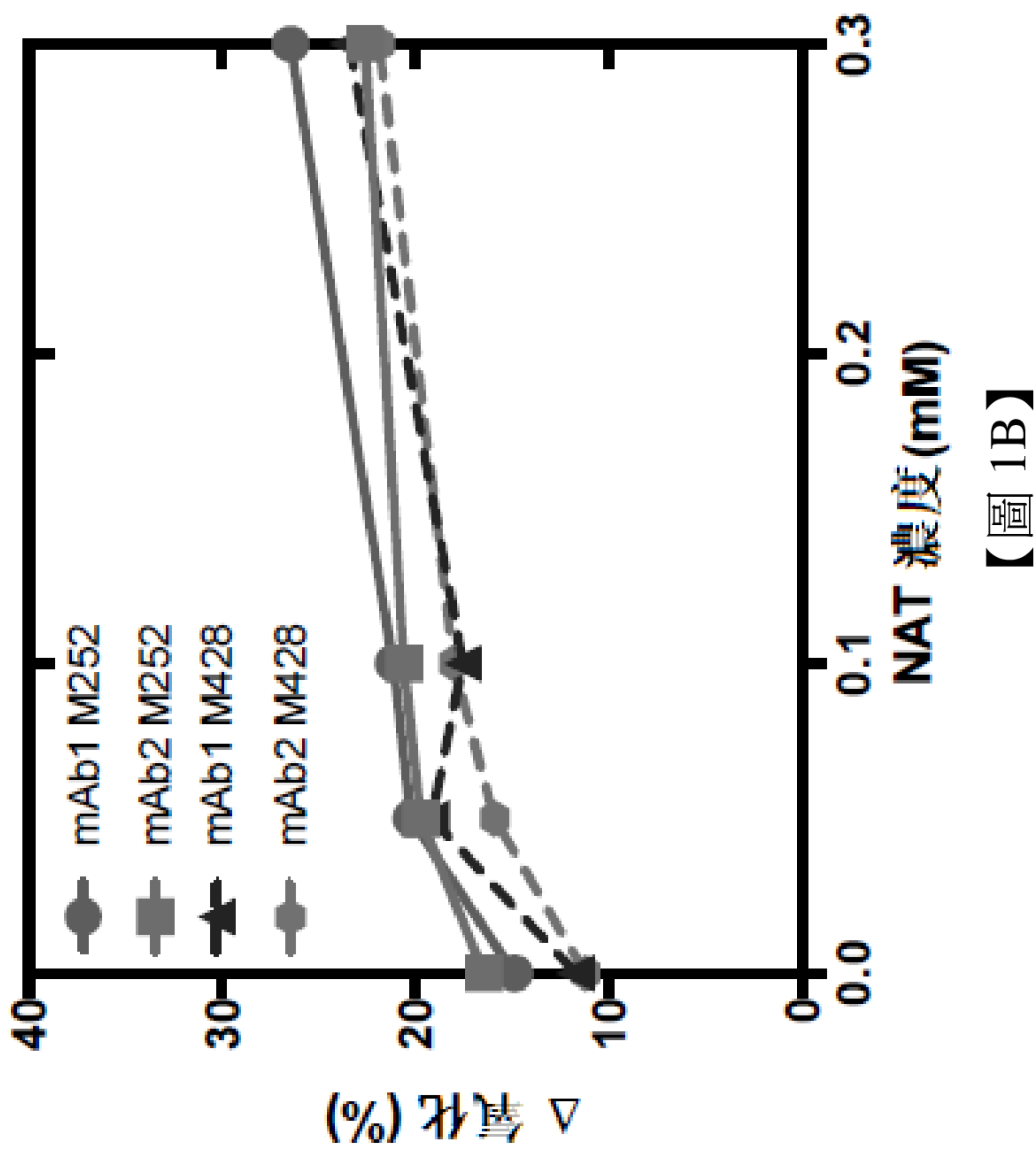
【第 64 項】 如申請專利範圍第 63 項之方法，其中該一或多種賦形劑係選自由以下組成之群：穩定劑、緩衝劑、表面活性劑及張力劑。

【第 65 項】 如申請專利範圍第 35 項至第 64 項中任一項之方法，其中該調配物為適合於向個體投與之醫藥調配物。

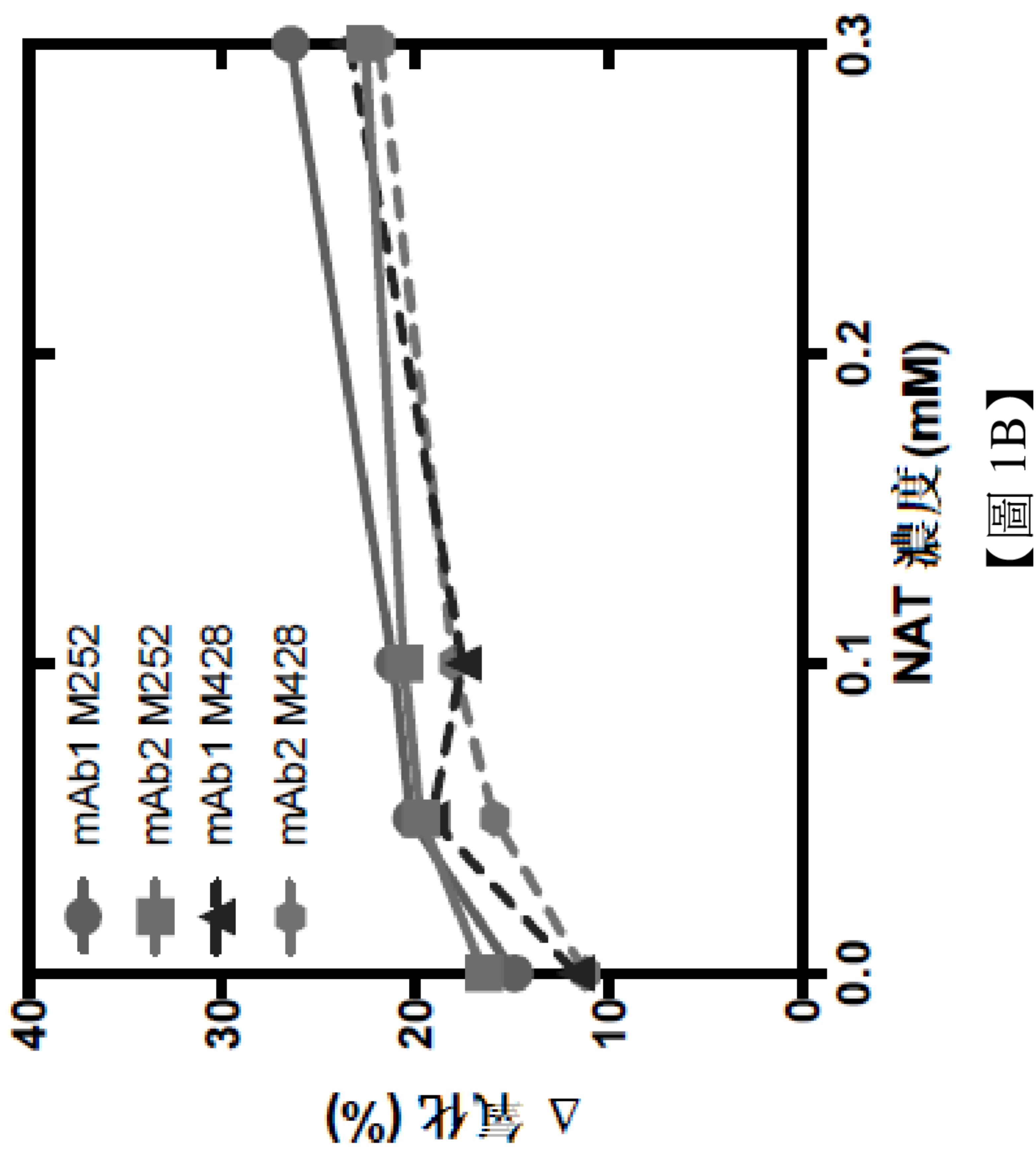
【第 66 項】 如申請專利範圍第 65 項之方法，其中該醫藥調配物適合於皮下、靜脈內或玻璃體內投與。

【第 67 項】 如申請專利範圍第 65 項或申請專利範圍第 66 項之方法，其中該個體為人類。

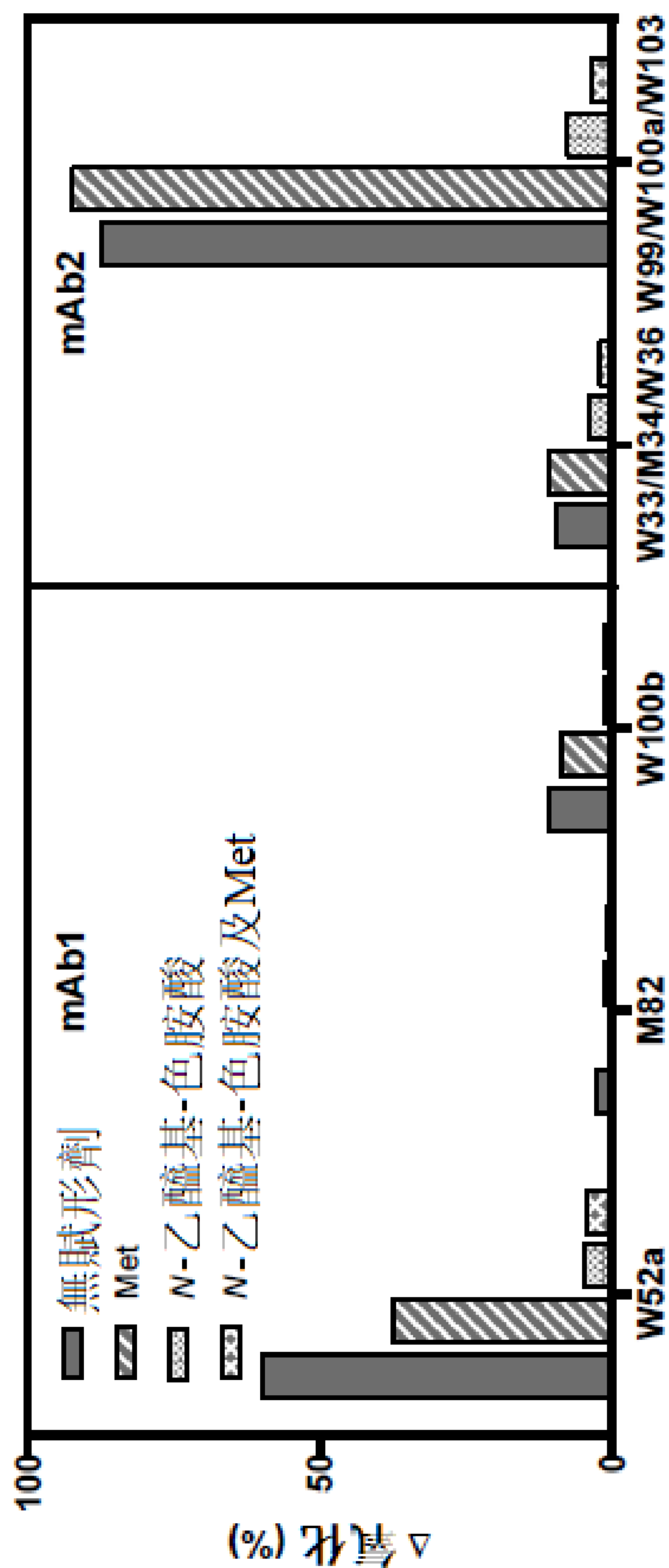
【發明圖式】



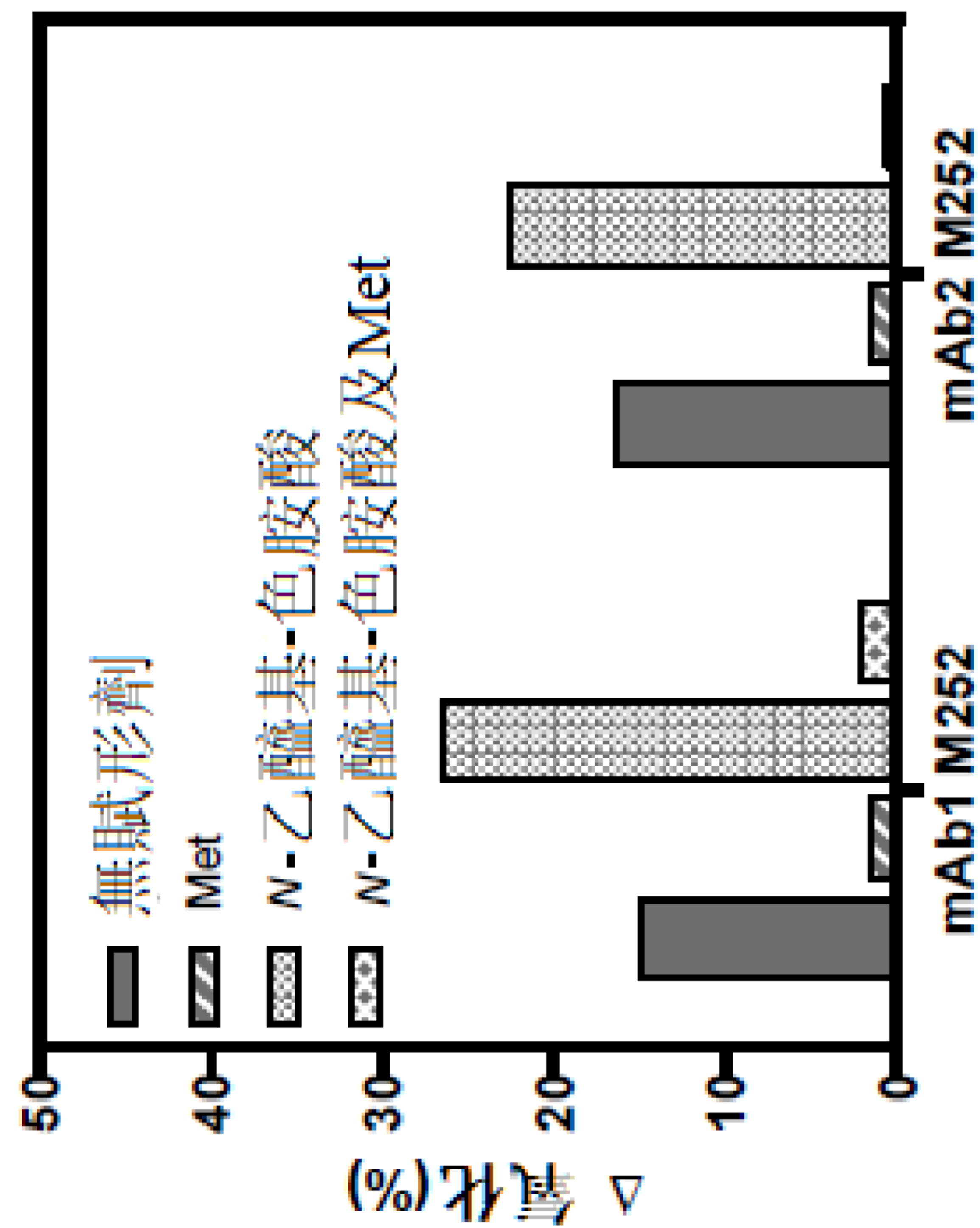
【圖 1A】



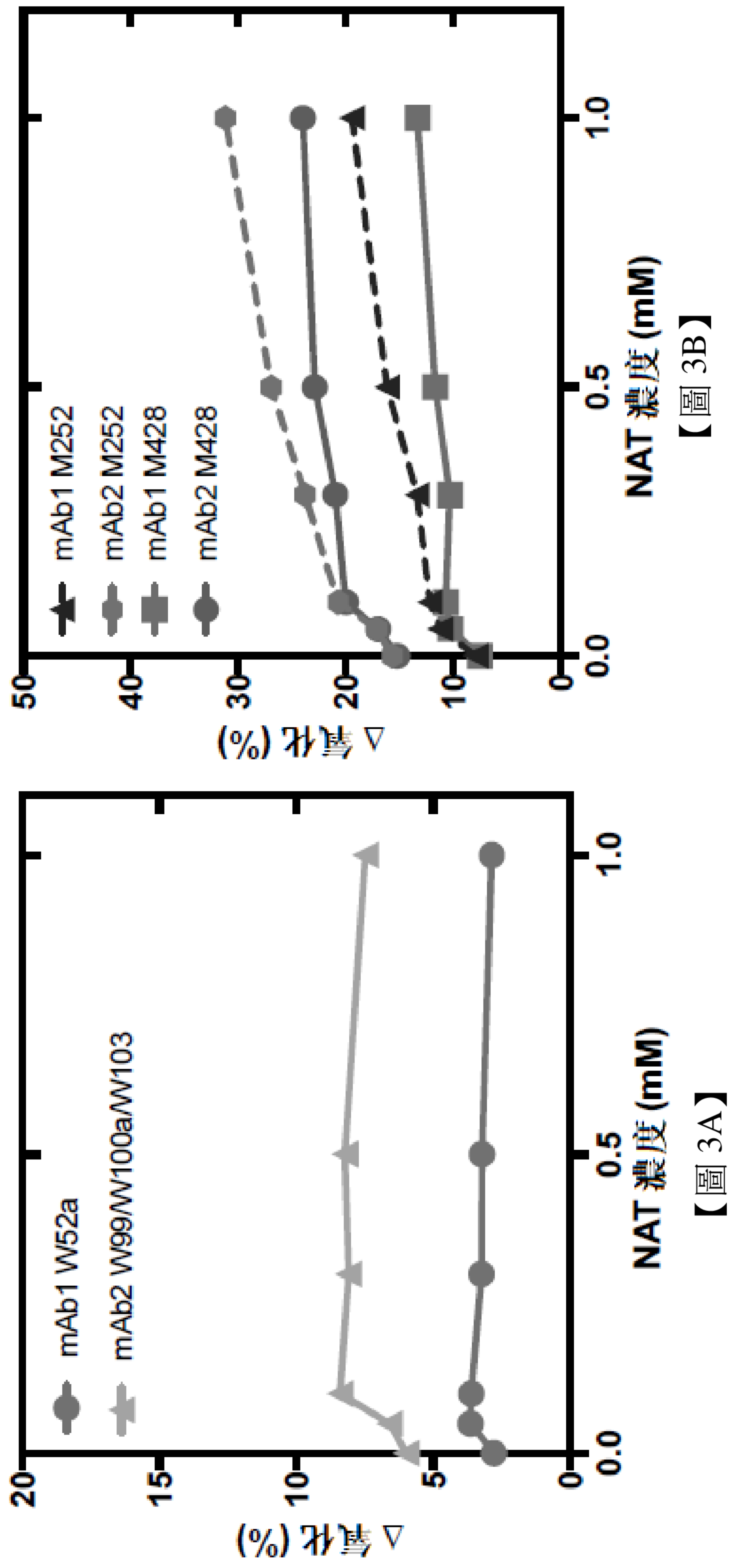
【圖 1B】

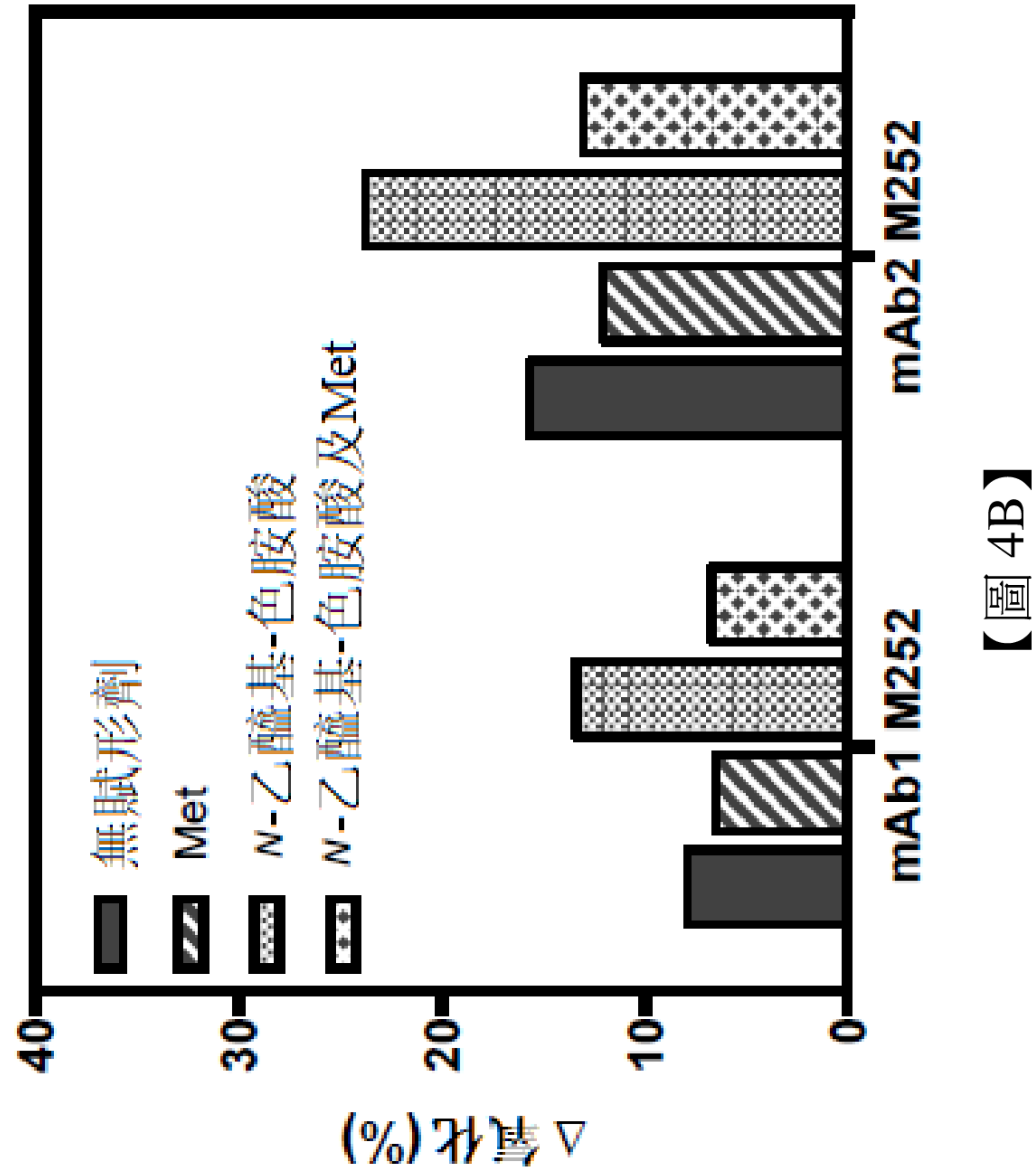


【圖 2A】

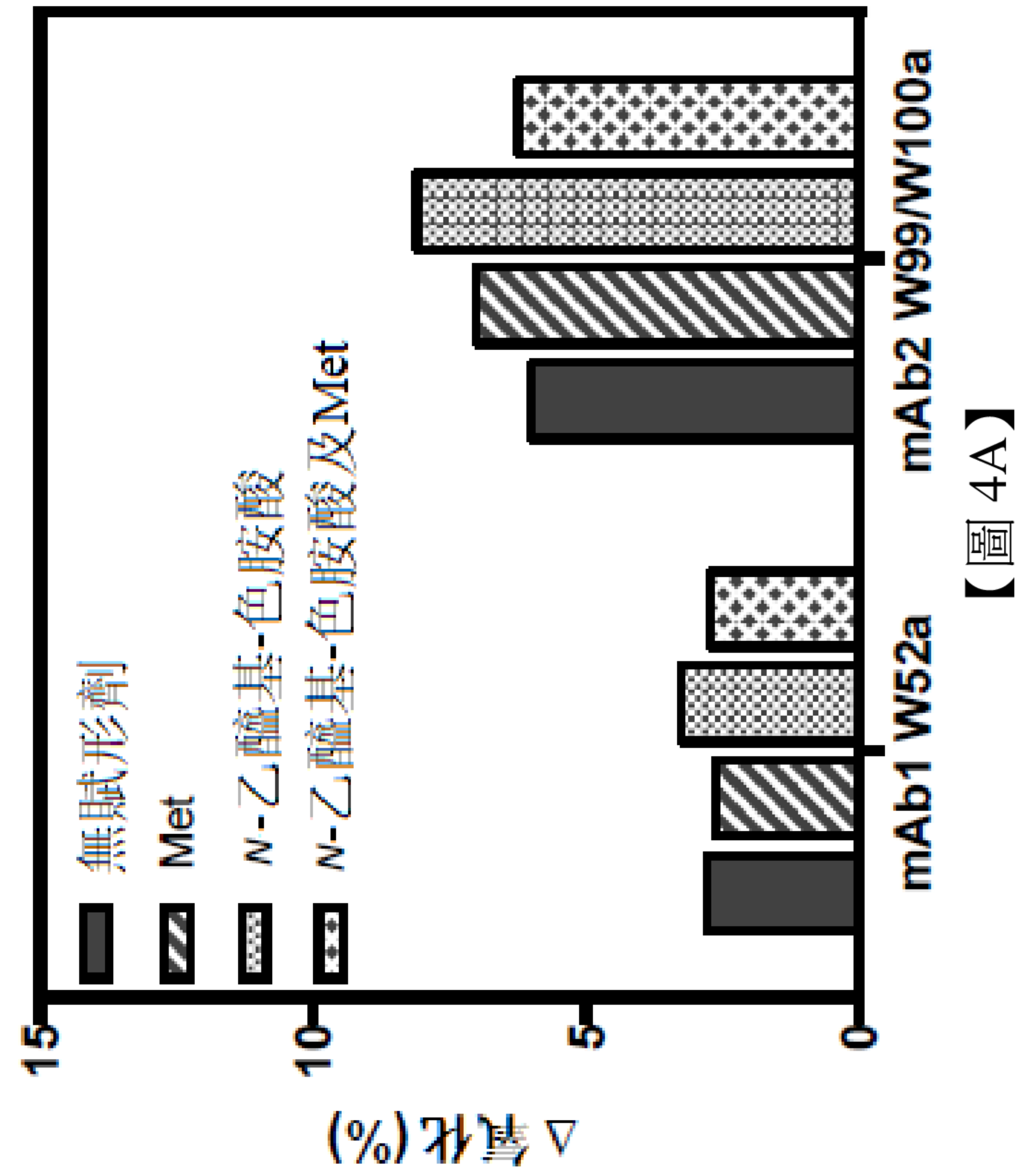


【圖 2B】

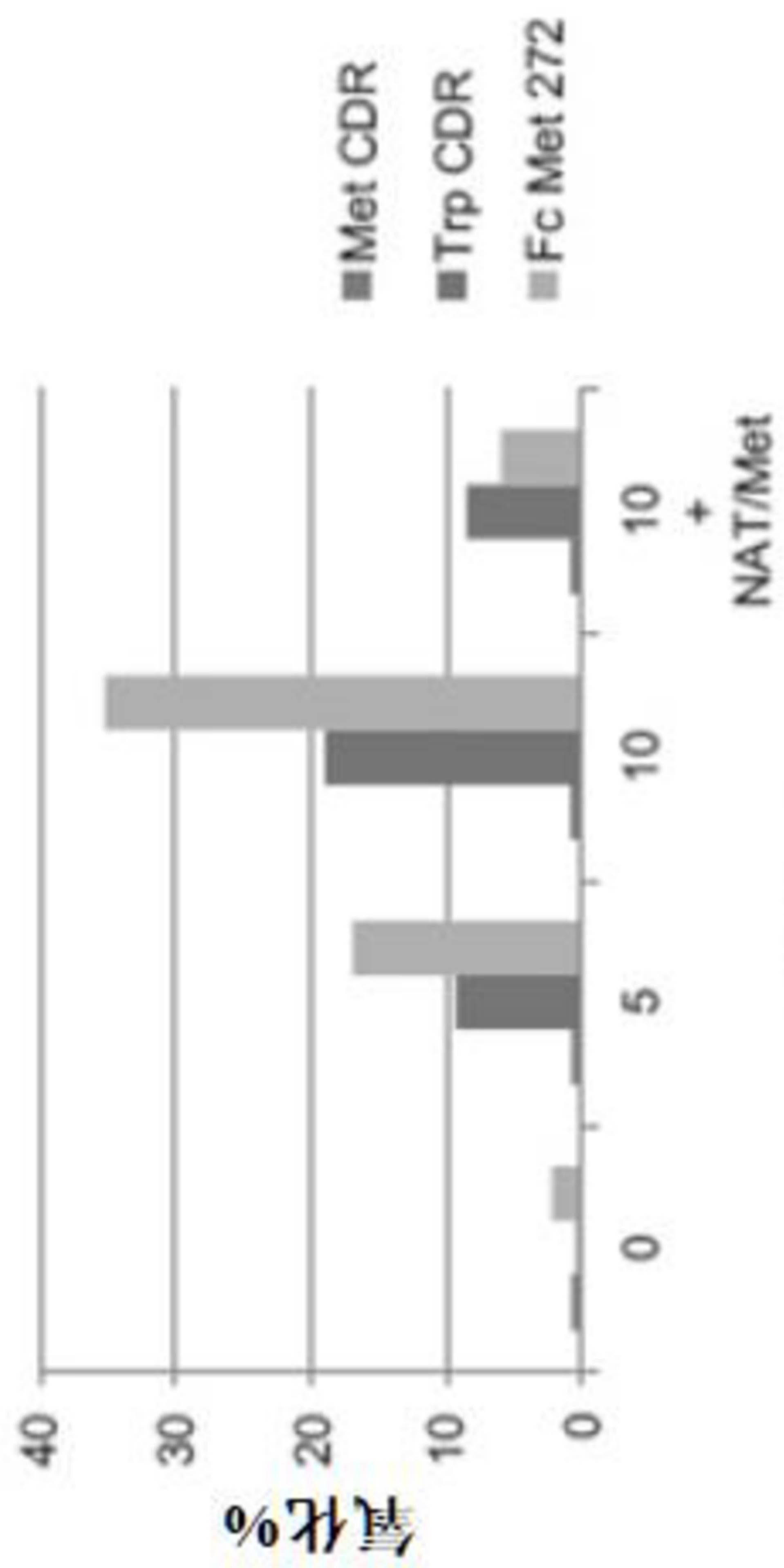




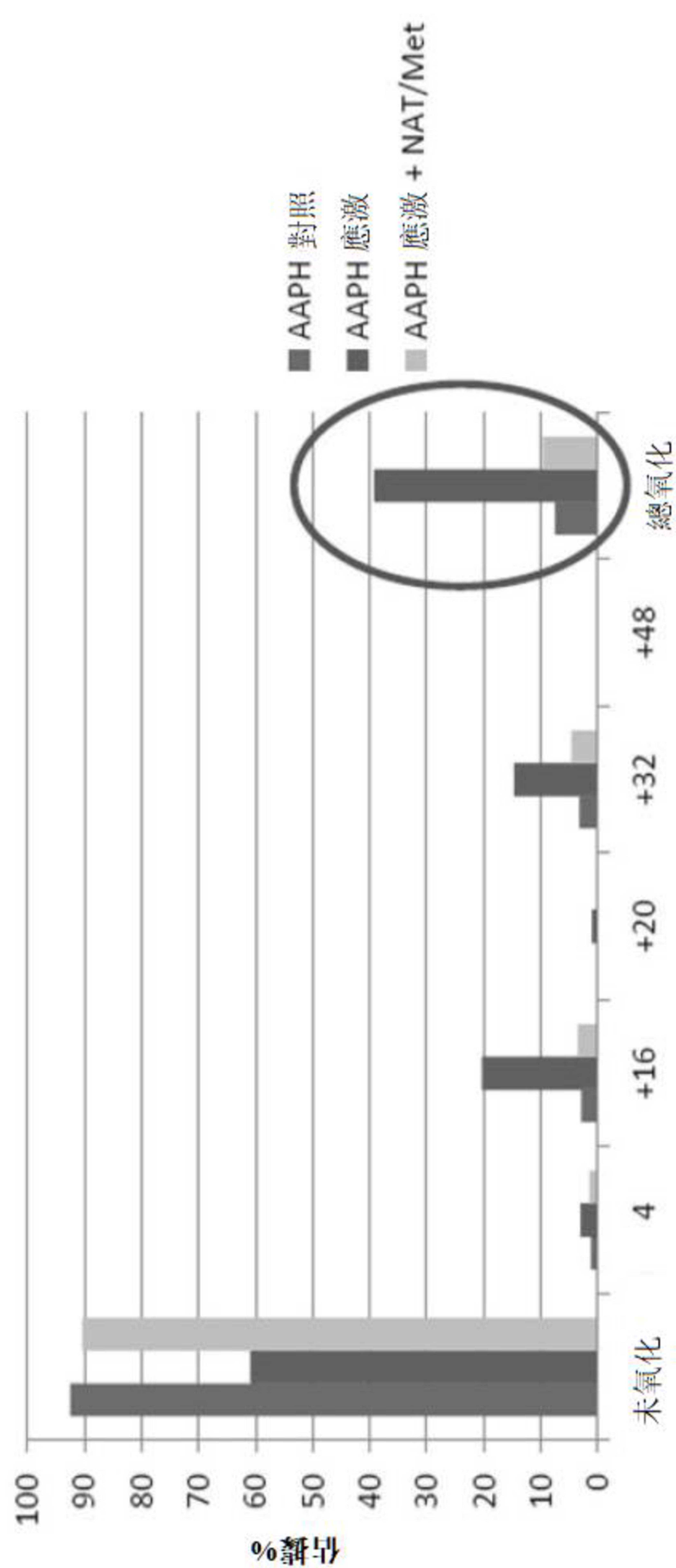
【圖 4B】



【圖 4A】



【圖 5】



【圖 6】