



(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 I738632 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 09 月 11 日

(21)申請案號：104135105

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 10 月 26 日

(51)Int. Cl. : *A61K9/08 (2006.01)* *A61K9/19 (2006.01)*
A61K47/12 (2006.01) *A61K47/14 (2006.01)*
A61K47/36 (2006.01) *A61P27/02 (2006.01)*

(30)優先權：2014/12/05 美國 62/088,061
 2014/11/07 美國 62/076,770

(71)申請人：瑞士商諾華公司 (瑞士) NOVARTIS AG (CH)
 瑞士

(72)發明人：張 惠湘 ZHANG, HUIXIANG (US)；伯林 查爾斯 BORING, CHARLES (US)；
 庫爾司拉斯薩 艾洛克 K KULSHRESHTHA, ALOK K. (US)；曾 宇鴻 ZENG,
 YUHONG (US)；萬 力 WAN, LI (US)；阿拉尼 拉曼 ALANI, LAMAN (US)；
 賽斯提格 彼得 SALLSTIG, PETER (US)；舒密特 沃納 SCHMIDT, WERNER
 (US)；吉凱法 瑪格麗特 GEKKIEVA, MARGARITA (GB)；瓦柏頓 詹姆斯
 WARBURTON, JAMES (GB)；維奇賽柏格 安德列斯 WEICHSELBERGER,
 ANDREAS (GB)

(74)代理人：惲軼群

(56)參考文獻：

WO 2009/155724A2

審查人員：吳祖漢

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：4 共 51 頁

(54)名稱

穩定的含有高濃度抗 VEGF 抗體之蛋白質溶液調配物

(57)摘要

本發明提供調配成高濃度水性醫藥組合物的抗 VEGF 抗體，該等組合物適合用於注射，較佳用於玻璃體內注射。該等水性醫藥組合物可用於向患者遞送高濃度的該抗體活性成分而無高含量的抗體聚集且無高含量的次可見微粒物質。本發明之水性組合物包含具有至少 50mg/ml 之濃度的抗體。本發明之水性醫藥組合物包括糖、緩衝劑、及界面活性劑。

The present invention provides anti-VEGF antibodies formulated as high concentration, aqueous pharmaceutical compositions, suitable for an injection, preferably an intravitreal injection. The aqueous pharmaceutical compositions are useful for delivery of a high concentration of the antibody active ingredient to a patient without high levels of antibody aggregation and without a high level of sub-visible particulate matter. An aqueous composition of the invention comprises an antibody having a concentration of at least 50 mg/ml. An aqueous pharmaceutical composition of the invention includes a sugar, a buffering agent, and a surfactant.

指定代表圖：

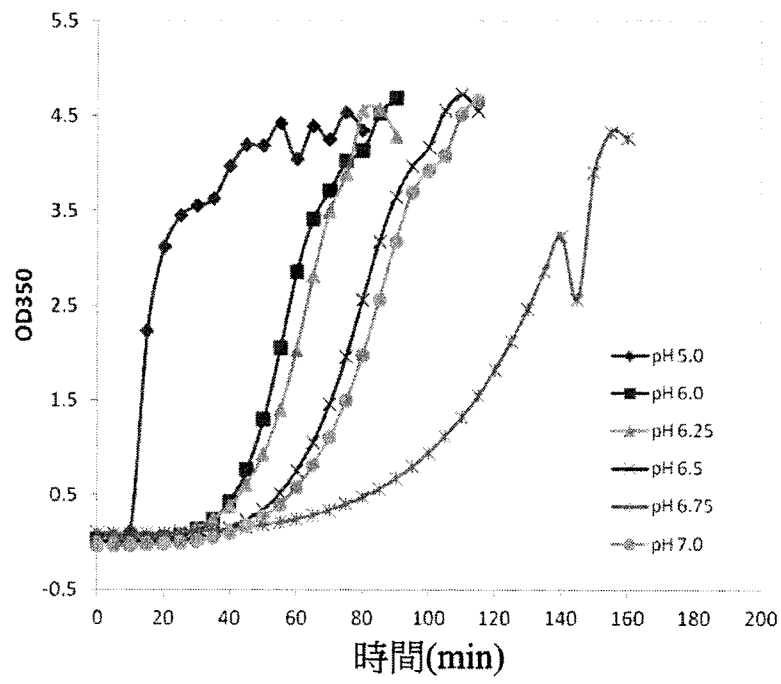


圖 1

發明摘要

※ 申請案號：104135105

※ 申請日：104.10.26

※IPC 分類：

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/14 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

穩定的含有高濃度抗 VEGF 抗體之蛋白質溶液調配物

STABLE PROTEIN SOLUTION FORMULATION CONTAINING HIGH
CONCENTRATION OF AN ANTI-VEGF ANTIBODY

【中文】

本發明提供調配成高濃度水性醫藥組合物的抗 VEGF 抗體，該等組合物適合用於注射，較佳用於玻璃體內注射。該等水性醫藥組合物可用於向患者遞送高濃度的該抗體活性成分而無高含量的抗體聚集且無高含量的次可見微粒物質。本發明之水性組合物包含具有至少 50 mg/ml 之濃度的抗體。本發明之水性醫藥組合物包括糖、緩衝劑、及界面活性劑。

【英文】

The present invention provides anti-VEGF antibodies formulated as high concentration, aqueous pharmaceutical compositions, suitable for an injection, preferably an intravitreal injection. The aqueous pharmaceutical compositions are useful for delivery of a high concentration of the antibody active ingredient to a patient without high levels of antibody aggregation and without a high level of sub-visible particulate matter. An aqueous composition of the invention comprises an antibody having a concentration of at least 50 mg/ml. An aqueous pharmaceutical composition of the invention includes a sugar, a buffering agent, and a surfactant.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

穩定的含有高濃度抗 VEGF 抗體之蛋白質溶液調配物

STABLE PROTEIN SOLUTION FORMULATION CONTAINING HIGH
CONCENTRATION OF AN ANTI-VEGF ANTIBODY

【技術領域】

【0001】 本發明係關於抗 VEGF 抗體之水性醫藥調配物、其製備方法、及該等調配物之用途。

【先前技術】

【0002】 血管內皮生長因子(VEGF)為一種已知的血管生成及新生血管形成之調節物，且已展示為與腫瘤及眼內病症相關聯的新血管形成之關鍵介導物(Ferrara 等人 Endocr. Rev. 18:4-25 (1997))。VEGF mRNA 過度表現於許多人類腫瘤中，且眼睛流體中 VEGF 之濃度與患有糖尿病及其他局部缺血相關的視網膜病的患者中血管活躍增生之存在高度相關(Berkman 等人, J Clin Invest 91:153-159 (1993)；Brown 等人 Human Pathol. 26:86-91 (1995)；Brown 等人 Cancer Res. 53:4727-4735 (1993)；Mattern 等人 Brit. J. Cancer. 73:931-934 (1996)；及 Dvorak 等人 Am J. Pathol. 146:1029-1039 (1995)；Aiello 等人 N. Engl. J. Med. 331:1480-1487 (1994))。此外，最近研究已展示受 AMD 影響的患者中脈絡膜新生血管膜中局部性 VEGF 的存在(Lopez 等人 Invest. Ophthalmo. Vis. Sci. 37:855-868 (1996))。抗 VEGF 中和抗體可用於抑制裸鼠中各種人類腫瘤細胞株的生長，其亦抑制缺血性視網膜病症之模型中的眼內血管生成(Kim 等人 Nature 362:841-844 (1993)；Warren 等人 J. Clin. Invest 95:1789-1797 (1995)；Borgstrom 等人 Cancer Res. 56:4032-4039 (1996)；及 Melnyk 等人 Cancer Res. 56:921-924 (1996)) (Adamis 等人 Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996))。

【0003】 許多抗體經批准用於人類及其他哺乳動物的治療用途，包括抗 VEGF 抗體。液體醫藥調配物中治療抗體之濃度取決於例如投與途徑而廣泛變化。當需要小體積時常常存在對抗體之高濃度調配物之需要。舉例

而言，高濃度調配物對於玻璃體內注射或皮下投與而言可為合意的。

【0004】 然而，具有高濃度抗體之調配物可具有短的儲存壽命，且經調配之抗體可能損失生物活性，其由儲存期間化學及物理不穩定性引起。已知聚集、脫醯胺及氧化為抗體降解之最普遍的原因。具體而言，聚集可潛在地引起患者中提高的免疫反應，從而引起安全性擔憂。因此，其必須被降至最低程度或防止。

【0005】 生物治療調配物中微粒之形成亦為主要的品質考慮，因為數十微米至至次毫米及毫米大小範圍中的微粒大體上可由人類裸眼看到(參見 Das, 2012, *AAPS PharmSciTech*, 13:732-746)。治療性眼用製劑中之微粒可造成對眼睛的損傷。因此，存在規定標準以確保眼用調配物中之次可見微粒物質內容物在一定限度內。舉例而言，美國藥典委員會(USP)已設置對於眼用溶液中微粒物質的要求，諸如 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 直徑之粒子的最大數目為 50/mL， $\geq 25\ \mu\text{m}$ 直徑之粒子的最大數目為 5/mL，且 $\geq 50\ \mu\text{m}$ 直徑之粒子的最大數目為 2/mL，其藉由顯微鏡方法微粒計數確定(參見 USP 通則<789>)。

【0006】 已知用於產生高濃度抗體調配物的方法。然而，不存在克服在各種醫藥賦形劑、緩衝劑等之存在下抗體之胺基酸序列對其傾向於形成聚集體或降解的無法預期的影響的通用方法。此外，製備具有高濃度蛋白質(諸如抗體)含有可接受含量的次可見粒子的眼用調配物具有挑戰性且為不可預測的。

【0007】 本發明之目的為提供另外的且改良的具有高濃度抗 VEGF 抗體以及低含量抗體聚集物及次可見粒子的調配物，其適於向人類，尤其向人類眼睛投與。

【發明內容】

【0008】 因此，本發明係關於一種水性醫藥組合物，其包含合適用於眼用注射的高濃度抗 VEGF 抗體。在某些態樣中，本發明之水性醫藥組合物展現低至不可偵測含量的抗體聚集或降解，其中在製造、製備、運輸及長期儲存期間極少至不損失生物活性，抗 VEGF 抗體之濃度為至少約 50 mg/ml、60 mg/ml、80 mg/ml、100 mg/ml、120 mg/ml、140 mg/ml、160 mg/ml、180 mg/ml、或 200 mg/ml。

【0009】 本發明提供水性醫藥組合物，其包含抗 VEGF 抗體、穩定劑、緩衝劑、及界面活性劑。在某些態樣中，水性醫藥組合物包含：(i)至少 50 mg/ml 抗 VEGF 抗體，(ii)作為穩定劑的蔗糖或海藻糖，(iii)檸檬酸鹽或組胺酸緩衝劑，(iv)作為界面活性劑的聚山梨醇酯 80。

【0010】 在某些態樣中，水性醫藥組合物包含約 4.5% - 11% w/v 蔗糖或 5% - 10%海藻糖、0.006%至 0.012%檸檬酸(w/v)、0.2%至 0.6%二水合檸檬酸三鈉(w/v)、及約 0.01%至 0.1%聚山梨醇酯 80 (w/v)，其中調配物之 pH 為 6.3 至 7.3。

【0011】 根據以下某些較佳實施例之更詳細描述及申請專利範圍，本發明之特定較佳實施例將變得明顯。

【圖式簡單說明】

【0012】 圖 1 展示對以不同 pH 調配的 1008 的濁度分析之結果之圖。x 軸展示在 55°C 下的培育時間；同時 y 軸展示在 350 nm 下監測的光密度。

【0013】 圖 2A 及圖 2B 展示監測在 55°C 下培育 180 min 的不同 1008 調配物之 OD₃₆₀ 的改變的濁度分析(圖 2A)。將在 60 min 內獲得的 OD₃₆₀ 曲線展開且展示於(圖 2B)中。圖 2A 及 2B 中的樣本編號對應於表 13 中的調配物編號。

【0014】 圖 3 展示具有為了簡單起見在 0 至 90 分鐘之間收集的資料的濁度分析。整個實驗為 180 分鐘。監測在 55°C 下培育的不同 1008 調配物之 OD₃₆₀ 的改變。圖中的樣本編號對應於表 15 中的調配物編號。

【0015】 圖 4 為展示在 40°C 下儲存 6 週期間八種所選的調配物中主峰之 SEC 結果的圖。

【實施方式】

【0016】 本發明提供水性醫藥組合物，其包含高濃度抗 VEGF 抗體。在某些實施例中，本發明之水性醫藥組合物在 2-8°C 下穩定至少 18 個月，且合適用於眼部投與，包括注射或輸注。在具體實施例中，本發明之水性醫藥組合物滿足 USP <789>相對於微粒物質之存在的要求。因此，在某些實施例中，本發明之水性醫藥組合物中 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 直徑之粒子的最大數目為 50/mL，本發明之水性醫藥組合物中 $\geq 25\ \mu\text{m}$ 直徑之粒子的最大數目為

5/mL，且本發明之水性醫藥組合物中 $\geq 50\ \mu\text{m}$ 直徑之粒子的最大數目為2/mL，該等粒子數目藉由光線遮蔽(light obscuration)及/或顯微鏡粒子技術方法如美國藥典委員會通則<789>所要求來確定。

【0017】 如本文所用，「水性」醫藥組合物為合適用於醫藥用途的組合物，其中水性載體為蒸餾水。合適用於醫藥用途的組合物可為無菌的、均質的及/或等滲的。水性醫藥組合物可以水性形式例如於準備使用的預填充的注射器中直接製備(「水性調配物」)，或呈在使用之前不久復原的凍乾物形式製備。如本文所用，術語「水性醫藥組合物」係指液體調配物或復原凍乾調配物。在某些實施例中，本發明之水性醫藥組合物合適用於向人類受試者眼用投與。在特定實施例中，本發明之水性醫藥組合物合適用於玻璃體內投與。在另一實施例中，本發明之水性醫藥組合物合適用於藉由玻璃體內輸注投與。

【0018】 本發明提供新的醫藥調配物，具體而言提供活性成分包含人類 VEGF 抗體的新的醫藥調配物。在一個態樣中，本發明係關於具有高濃度抗 VEGF 抗體之水性醫藥組合物。本發明之調配物中較佳抗 VEGF 抗體描述於 WO 2009/155724 中，其全部內容以引用之方式併入本文。

【0019】 如本文所用之術語「抗體」包括全抗體及其任何抗原結合片段(亦即，「抗原結合部分」、「抗原結合多肽」、或「免疫結合劑」)或單鏈。「抗體」包括包含藉由二硫鍵互連的至少兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈的醣蛋白，或其抗原結合部分。各重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為 V_H)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個結構域，即 CH1、CH2 及 CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為 V_L)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區由一個結構域 CL 組成。 V_H 區及 V_L 區可進一步再分成稱為互補決定區(CDR)之高變區，穿插有稱為構架區(FR)之較保守區。各 V_H 及 V_L 由三個 CDR 及四個 FR 構成，該等區域依以下順序自胺基端至羧基端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈可變區含有與抗原相互作用之結合域。抗體之恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子之結合，該等宿主組織或因子包括免疫系統之各種細胞(例如，效應細胞)及經典補體系統之第一組分(C1q)。

【0020】 術語抗體之「抗原結合部分」(或簡言之「抗體部分」)係指保留對抗原(例如，VEGF)特異性結合的能力的抗體之一或多個片段。已展示，抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段執行。涵蓋在術語抗體之「抗原結合部分」內的結合片段之實例包括(i) Fab 片段，由 V_L 、 V_H 、CL 及 CH1 結構域組成之單價片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，包含藉由鉸鏈區之二硫橋連接之兩個 Fab 片段之二價片段；(iii)由 V_H 及 CH1 結構域組成之 Fd 片段；(iv)由抗體單臂之 V_L 及 V_H 結構域組成之 Fv 片段；(v)單結構域或 dAb 片段(Ward 等人, (1989) *Nature* 341:544-546)，其由 V_H 結構域組成；及(vi)分離之互補決定區(CDR)；或(vii)兩種或兩種以上分離之 CDR 之組合，該等 CDR 可視情況藉由合成連接子連接。此外，儘管 Fv 片段之兩個結構域 V_L 及 V_H 由單獨的基因編碼，但是其可使用重組方法藉由合成連接子連接，該連接子使其能夠製造成單蛋白質鏈，在該單蛋白質鏈中 V_L 及 V_H 區成對形成單價分子(稱為單鏈 Fv (scFv)；參見例如，Bird 等人 (1988) *Science* 242:423-426；及 Huston 等人 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。該等單鏈抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內。此等抗體片段係使用熟習此項技術者已知之習知技術獲得，且該等片段經篩選以與完整抗體相同之方式應用。抗原結合部分可藉由重組 DNA 技術或藉由完整免疫球蛋白之酶促或化學裂解製造。抗體可為不同的同種型，例如，IgG (例如，IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 亞型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE、或 IgM 抗體。

【0021】 在較佳實施例中，本發明之水性醫藥組合物包含具有如 SEQ ID NO: 1 中所闡述的序列的可變重鏈及如 SEQ ID NO: 2 中所闡述的序列的可變輕鏈。

VH: SEQ ID NO:1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKG
LEWVGFIIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY
YCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTVSS

VL: SEQ ID NO: 2

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLI
YLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNVYLASTNG

ANFGQGTKLTVLG

【0022】 在另一較佳實施例中，抗 VEGF 抗體為單鏈 Fv (scFv) 抗體片段，其包含序列：

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLI
YLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNVYLASTNG
ANFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG
GSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATW
AKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 3)

【0023】 本發明之水性醫藥組合物中抗 VEGF 抗體可例如如 WO 2009/155724 中所述產生。scFv 可使用表現載體產生，如本文所述。來源於表現載體中起始密碼子的甲硫胺酸在其未轉譯後裂解之情況下存在於最終蛋白質中(參見實例中之 SEQ ID NO: 4)。

【0024】 在某些實施例中，本發明之水性醫藥組合物中抗 VEGF 抗體包含如 SEQ ID NO: 5、6、及 7 中所闡述的重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3，及如 SEQ ID NO: 8、9、及 10 中所闡述的輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3。

SEQ ID NO: 5	GFSLTDDYYMT
SEQ ID NO: 6	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 7	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 8	QASEIIHSWLA
SEQ ID NO: 9	LASTLAS
SEQ ID NO: 10	QNVYLASTNGAN

【0025】 在一個實施例中，本發明之水性醫藥組合物中抗 VEGF 抗體之濃度為至少 50 mg/ml。較佳地，本發明之水性醫藥組合物包含約 50 mg/ml、約 60 mg/ml、約 70 mg/ml、約 80 mg/ml、約 90 mg/ml、約 100 mg/ml、約 110 mg/ml、約 120 mg/ml、約 130 mg/ml、約 140 mg/ml、約 150 mg/ml、約 160 mg/ml、約 170 mg/ml、約 180 mg/ml、約 190 mg/ml、約 200 mg/ml、約 210 mg/ml、約 220 mg/ml、約 230 mg/ml、約 240 mg/ml、約 250 mg/ml 或約 300 mg/ml 抗 VEGF 抗體。

【0026】 在某些實施例中，本發明之水性醫藥組合物包含在 60 mg/ml 與 120 mg/ml 之間的抗 VEGF 抗體，例如包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 2 的抗體。

【0027】 在一個實施例中，本發明之水性醫藥組合物包含 60 mg/ml 抗 VEGF 抗體，其包含 SEQ ID NO: 3。

【0028】 在另一實施例中，本發明之水性醫藥組合物包含 120 mg/ml 抗 VEGF 抗體，其包含 SEQ ID NO: 3。

【0029】 本發明之水性醫藥組合物除抗 VEGF 抗體之外亦包括另外的組分，諸如以下中之一或多者：(i)穩定劑；(ii)緩衝劑；(iii)界面活性劑；及(iv)游離胺基酸。包括此類另外組分之各者可得到具有抗 VEGF 抗體之低聚集的組合物。較佳地，本發明之水性醫藥組合物除抗 VEGF 抗體之外亦包括：(i)穩定劑；(ii)緩衝劑；及(iii)界面活性劑。

【0030】 用於與本發明一起使用的合適的穩定劑可例如充當例如增黏劑、增積劑、助溶劑、及/或其類似物。穩定劑可為離子的或非離子的(例如糖)。作為糖其可包括但不限於單醣，例如，果糖、麥芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖及其類似物；雙醣，例如，乳糖、蔗糖、海藻糖、纖維雙糖、及其類似物；多醣，例如棉子糖、松三糖、麥芽糊精、葡聚糖、澱粉、及其類似物；及醛醣醇諸如甘露糖醇、木糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨醇(葡萄糖醇)及其類似物。舉例而言，糖可為蔗糖、海藻糖、棉子糖、麥芽糖、山梨醇或甘露糖醇。糖可為糖醇或胺基糖。蔗糖及海藻糖為較佳的。最佳的為蔗糖。作為離子穩定劑，其可包括鹽諸如 NaCl 或胺基酸組分諸如精胺酸-HCl。

【0031】 用於與本發明一起使用的合適的緩衝劑包括但不限於有機酸鹽諸如檸檬酸鹽、抗壞血酸鹽、葡萄糖酸鹽、碳酸鹽、酒石酸鹽、琥珀酸鹽、乙酸鹽或酞酸鹽；Tris、鹽酸胺基丁三醇(thomethamine hydrochloride)、或磷酸鹽緩衝劑。此外，胺基酸組分亦可用作緩衝劑。檸檬酸鹽或組胺酸緩衝劑為尤其可用的，包括 10-20 mM 組胺酸緩衝劑，例如 0.13%至 0.26% (w/v)組胺酸及 0.03% – 0.07% (w/v)三水合組胺酸鹽酸鹽，或 10-20 mM 檸檬酸鹽緩衝劑，例如 0.006%至 0.012%檸檬酸(w/v)及 0.2%至 0.6%二水合檸檬

酸三鈉(w/v)。用於本發明之調配物的檸檬酸可為任何水合形式，例如無水或單水合。

【0032】 水性醫藥組合物包括此類緩衝劑或pH調節劑以得到改良的pH控制。在某些實施例中，本發明之水性醫藥組合物具有在5.0與8.0之間、在5.0與7.0之間、在6.0與8.0之間、或在6.0與7.0之間的pH。在一個實施例中，本發明之水性醫藥組合物之pH為約6.3至約7.3。在特定實施例中，本發明之水性醫藥組合物具有約6.8的pH。

【0033】 如本文所用，本文中術語「界面活性劑」係指具有兩親結構的有機物質；亦即，其由相反溶解傾向之群，通常油溶性烴鏈及水溶性離子基團組成。針對生物材料之各種醫藥組合物及製劑，界面活性劑可視界面活性部分之電荷而分類成陰離子、陽離子及分散劑。

【0034】 用於與本發明一起使用的合適的界面活性劑包括但不限於非離子界面活性劑、離子界面活性劑及兩性離子界面活性劑。用於與本發明一起使用的典型的界面活性劑包括但不限於去水山梨醇脂肪酸酯(例如單辛酸去水山梨醇酯、單月桂酸去水山梨醇酯、單棕櫚酸去水山梨醇酯)、三油酸去水山梨醇酯、甘油脂肪酸酯(例如單辛酸甘油酯、單肉豆蔻酸甘油酯、單硬脂酸甘油酯)、聚甘油脂肪酸酯(例如單硬脂酸十甘油酯、二硬脂酸十甘油酯、單亞油酸十甘油酯)、聚氧乙烯去水山梨醇脂肪酸酯(例如聚氧乙烯去水山梨醇單月桂酸酯、聚氧乙烯去水山梨醇單油酸酯、聚氧乙烯去水山梨醇單硬脂酸酯、聚氧乙烯去水山梨醇單棕櫚酸酯、聚氧乙烯去水山梨醇三油酸酯、聚氧乙烯去水山梨醇三硬脂酸酯)、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯(例如聚氧乙烯梨糖醇四硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨醇四油酸酯)、聚氧乙烯甘油脂肪酸酯(例如聚氧乙烯甘油單硬脂酸酯)、聚乙二醇脂肪酸酯(例如聚乙二醇二硬脂酸酯)、聚氧乙烯烷基醚(例如聚氧乙烯月桂醚)、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚(例如聚氧乙烯聚氧丙烯二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯丙醚、聚氧乙烯聚氧丙烯十六醚)、聚氧乙烯烷基苯基醚(例如聚氧乙烯壬基苯基醚)、聚氧乙烯氫化蓖麻油(例如聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯氫化蓖麻油)、聚氧乙烯蜂蠟衍生物(例如聚氧乙烯山梨醇蜂蠟)、聚氧乙烯羊毛脂衍生物(例如聚氧乙烯羊毛脂)、及聚氧乙烯脂肪酸胺(例如聚氧乙烯硬脂酸胺)；C₁₀-C₁₈ 烷基硫酸

鹽(例如十六烷基硫酸鈉、月桂基硫酸鈉、油烯基硫酸鈉)、增加平均 2 至 4 莫爾環氧乙烷單元的聚氧乙烯 C₁₀-C₁₈ 烷基醚硫酸鹽(例如聚氧乙烯月桂基硫酸鈉)、及 C₁-C₁₈ 烷基磺基琥珀酸酯鹽(例如月桂基磺基琥珀酸酯鈉)；及天然界面活性劑諸如卵磷脂、甘油磷脂、鞘磷脂(例如神經鞘磷脂)、及 C₁₂₋₁₈ 脂肪酸之蔗糖酯。組合物可包括此等界面活性劑中之一或多者。較佳界面活性劑為聚氧乙烯去水山梨醇脂肪酸酯例如聚山梨醇酯 20、40、60 或 80。聚山梨醇酯 80 為尤其較佳的。

【0035】 用於與本發明一起使用的合適的游離胺基酸包括但不限於精胺酸、離胺酸、組胺酸、鳥胺酸、異白胺酸、白胺酸、丙胺酸、甘胺酸、麩胺酸或天冬胺酸。包括鹼性胺基酸為較佳的，亦即精胺酸、離胺酸及/或組胺酸。若組合物包括組胺酸則其可充當緩衝劑及游離胺基酸兩者，但當使用組胺酸緩衝劑時，包括非組胺酸游離胺基酸例如包括組胺酸緩衝劑及離胺酸為典型的。胺基酸可以 D-及/或 L-形式存在，但 L-形式為典型的。胺基酸可呈任何合適的鹽例如鹽酸鹽存在，諸如精胺酸-HCl。在一個較佳實施例中，本發明之水性醫藥組合物不包含任何此類游離胺基酸。

【0036】 在較佳實施例中，糖以例如凍乾物於水中復原之後，3%與 11% (w/v)之間的濃度存在於本發明之水性醫藥組合物中。在某些實施例中，糖為在約 4.5%至約 11%之濃度下的蔗糖、或在約 5%至約 10%之濃度下的海藻糖。6.75% (w/v)之濃度的蔗糖為較佳的。

【0037】 在較佳實施例中，緩衝劑以例如凍乾物於水中復原之後，在 1 mM 與 60 mM 之間，例如 10-40 mM、15-30 mM、15-25 mM 之濃度存在於本發明之水性醫藥組合物中。在某些實施例中，緩衝劑為檸檬酸鹽或組胺酸。15 mM 之濃度的檸檬酸鹽緩衝劑為較佳的。

【0038】 在較佳實施例中，界面活性劑以例如凍乾物於水中復原之後，至多 0.2% (按體積計)例如 0.01-0.1%、0.03-0.08%、0.04-0.08%之濃度存在於本發明之水性醫藥組合物中。0.05%之濃度的聚山梨醇酯 80 為較佳的。

【0039】 可用於本發明之水性醫藥組合物中的其他預期賦形劑包括例如抗微生物劑、抗氧化劑、抗靜電劑、脂質諸如磷脂或脂肪酸、類固醇

諸如膽固醇、蛋白質賦形劑諸如血清白蛋白(人類血清白蛋白)、重組人類白蛋白、明膠、酪蛋白、成鹽相對離子諸如鈉及其類似物。合適用於本發明之調配物中之此等及另外已知的醫藥賦形劑及/或添加劑為此項技術中已知的，例如，如以下中所列舉：The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第 4 版, Rowe 等人, 編, American Pharmaceuticals Association (2003)；及 Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 第 21 版, Gennaro, 編, Lippincott Williams & Wilkins (2005)。

【0040】 本發明之較佳調配物示出於以下實例中之表 40 中。

【0041】 在某些實施例中，預期抗 VEGF 抗體之凍乾得到用於治療患者的本發明之水性醫藥組合物。

【0042】 用於抗體之凍乾的技術為此項技術中已知的，例如參見 John F. Carpenter 及 Michael J. Pikal, 1997 (*Pharm. Res.* 14, 969-975)；Xialin (Charlie) Tang 及 Michael J. Pikal, 2004 (*Pharm. Res.* 21, 191-200)。

【0043】 在可將凍乾物向患者投與之前，應將其用水性復原劑復原。此步驟允許凍乾物中之抗體及其他組分重新溶解以得到合適用於向患者注射的溶液。

【0044】 用於復原的水性材料之體積決定所得醫藥組合物中抗體之濃度。用體積小於預凍乾體積的復原劑復原得到比凍乾之前更濃縮的組合物。復原倍數(凍乾之後調配物之體積:凍乾之前調配物之體積)可為 1:0.5 至 1:6。1:3 之復原倍數為可用的。如上文所提及，可將本發明之凍乾物復原以得到具有至少 50 mg/ml (亦即至少 60 mg/ml、70 mg/ml、80 mg/ml、90 mg/ml、100 mg/ml、110 mg/ml、120 mg/ml、或 130 mg/ml)至抗 VEGF 抗體濃度之水性組合物，且可相應地選擇復原物之體積。需要時，在向患者投與之前適當時，可將復原調配物稀釋，以遞送預計劑量。

【0045】 凍乾抗體之典型復原物包括無菌水或緩衝劑，視情況含有防腐劑。若凍乾物包括緩衝劑，則復原物可進一步包括緩衝劑(其可與凍乾物之緩衝劑相同或不同)，或其可替代地不包括緩衝劑(例如 WFI (注射用水)、或生理鹽水)。

【0046】 包含抗 VEGF 抗體的本發明之水性醫藥組合物可用於治療

各種疾病或病症。包含抗 VEGF 抗體的醫藥組合物尤其可用於治療受試者之新生血管眼部疾病。

【0047】 可使用本發明之水性醫藥組合物治療的「新生血管眼部疾病」包括與眼部新生血管形成相關聯之病狀、疾病、或病症，其包括但不限於異常的血管生成、脈絡膜新生血管形成(CNV)、視網膜血管透過性、視網膜水腫、糖尿病性視網膜病(具體而言增生性糖尿病性視網膜病)、糖尿病性黃斑水腫、新生血管(滲出性)年齡相關的黃斑變性(AMD)、包括與 nAMD (新生血管 AMD)相關聯的 CNV、與視網膜局部缺血相關聯的後遺症、中心視網膜靜脈阻塞(CRVO)、及後段新生血管形成。

【0048】 本發明之水性醫藥組合物可進一步包括除抗 VEGF 抗體之外的活性成分。另外的藥理學試劑可包括例如可用於治療眼部疾病的其他抗體。

【0049】 本發明之水性醫藥組合物可向患者投與。如本文所用，術語「受試者」或「患者」係指人類及非人類哺乳動物，包括但不限於靈長類、兔、豬、馬、狗、貓、綿羊、及母牛。較佳地，受試者或患者為人類。

【0050】 投與將通常經由注射器。因此，本發明提供一種遞送裝置(例如注射器)，其包括本發明之醫藥組合物(例如，預填充的注射器)。患者將接受作為主要活性成分(亦即，足以達成或至少部分地達成所要效應的量的有效量的抗 VEGF 抗體。治療有效劑量為足夠的，若其可甚至產生與疾病相關聯的症狀或病狀的增加的改變。治療有效劑量不必完全治癒疾病或完全消除症狀。較佳地，治療有效劑量可至少部分地遏制已罹患該疾病之患者之疾病及其併發症。有效用於此用途的量將取決於正在治療的病症之嚴重程度及患者之自身免疫系統之一般狀態。

【0051】 劑量用量可由具有治療該疾病或病狀的一般技術的醫師使用已知的劑量調整技術容易地確定。舉例而言，本發明之水性醫藥組合物中所用的治療有效量的抗 VEGF 抗體藉由考慮到所要的劑量體積及投與方式來確定。通常，治療有效的組合物係以在 0.001 mg/ml 至約 200 mg/ml 每劑量範圍內的劑量投與。較佳地，本發明之方法中所用的劑量為約 60 mg/ml 至約 120 mg/ml (亦即，約 60 mg/ml、70 mg/ml、80 mg/ml、90 mg/ml、100

mg/ml、110 mg/ml、或 120 mg/ml)。在較佳實施例中，本發明之方法中所用的抗 VEGF 抗體之劑量為 60 mg/ml 或 120 mg/ml。

【0052】 在某些實施例中，將劑量直接向患者之眼睛投與。在一個實施例中，每只眼睛的劑量為至少約 0.5 mg 至約 6 mg。較佳的每只眼睛的劑量包括約 0.5 mg、0.6 mg、0.7 mg、0.8 mg、0.9 mg、1.0 mg、1.2 mg、1.4 mg、1.6 mg、1.8 mg、2.0 mg、2.5 mg、3.0 mg、3.5 mg、4.0 mg、4.5 mg、5.0 mg、5.5 mg、及 6.0 mg。劑量可以合適用於眼用投與的各種體積投與，諸如 50 μ l 或 100 μ l，例如，包括 3 mg/50 μ l 或 6 mg/50 μ l。亦可使用較小體積，包括 10 μ l 或更小，例如約 10 μ l 或約 8.0 μ l。在某些實施例中，將 1.2 mg/10 μ l 或 1 mg/8.0 μ l (例如，1 mg/8.3 μ l) 之劑量遞送至患者之眼睛用於治療或改善上文所述之疾病及病症中之一或多者。可例如藉由玻璃體內注射或輸注遞送。

【0053】 本發明亦提供用作藥物的本發明之調配物(亦即，水性醫藥組合物)，例如用於向患者遞送抗體，或用於治療或改善上文所述之疾病及病症中之一或多者。

【0054】 本發明進一步提供一種用於向患者遞送抗 VEGF 抗體之方法，其包含向患者投與本發明之水性醫藥組合物之步驟。

【0055】 在某些實施例中，本發明之向患者遞送抗 VEGF 抗體之方法包含以下步驟：(i)將本發明之凍乾物復原以得到水性調配物，及(ii)向患者投與水性調配物。步驟(ii)理想地發生在步驟(i)之 24 小時內(例如，在 12 小時內、在 6 小時內、在 3 小時內、或在 1 小時內)。

【0056】 如下文所標號描述本發明之某些特定實施例：

1. 一種水性醫藥組合物，其包含(i)至少 50 mg/ml 抗 VEGF 抗體，其包括分別 SEQ ID NO: 5、6、及 7 之重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3，及分別 SEQ ID NO: 8、9、及 10 之輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3，(ii)蔗糖或海藻糖，(iii)檸檬酸鹽或組胺酸緩衝劑，及(iv)作為界面活性劑的聚山梨醇酯 80。

2. 如實施例 1 之水性醫藥組合物，其包含 4.5%至 11% (w/v)蔗糖或 5%至 10%海藻糖、0.006%至 0.012%檸檬酸(w/v)、0.2%至 0.6%二水合檸檬酸三鈉(w/v)、及 0.01%至 0.1%聚山梨醇酯 80 (w/v)，其中該組合物之 pH 為約

6.3 至約 7.3。

3. 如實施例 2 之水性醫藥組合物，其中蔗糖之濃度為 6.75% (w/v)，檸檬酸之濃度為約 0.01% (w/v)，二水合檸檬酸三鈉之濃度為約 0.428% (w/v)，聚山梨醇酯 80 之濃度為約 0.05% (w/v)，且 pH 為約 6.8。

4. 如實施例 1-3 中任一項之水性醫藥組合物，其中該抗 VEGF 抗體之濃度為至少 60 mg/ml、至少 70 mg/ml、至少 80 mg/ml、至少 90 mg/ml、至少 100 mg/ml、至少 110 mg/ml、至少 120 mg/ml、至少 130 mg/ml、至少 140 mg/ml、或至少 150 mg/ml。

5. 如實施例 1-4 中任一項之水性醫藥組合物，其中該抗 VEGF 抗體之濃度為約 60 mg/ml、約 70 mg/ml、約 80 mg/ml、約 90 mg/ml、約 100 mg/ml、約 110 mg/ml、約 120 mg/ml、約 130 mg/ml、約 140 mg/ml、或約 150 mg/ml。

6. 如實施例 1-5 中任一項之水性醫藥組合物，其中該抗 VEGF 抗體包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 2 之序列。

7. 如實施例 1-6 中任一項之水性醫藥組合物，其中該抗 VEGF 抗體包含 SEQ ID NO: 3 之序列。

8. 如實施例 1-7 中任一項之水性醫藥組合物，其中該抗 VEGF 抗體之濃度為約 60 mg/ml 或約 120 mg/ml。

9. 一種遞送裝置，其包括實施例 1-8 中任一項之水性醫藥組合物。

10. 如實施例 9 之遞送裝置，其為預填充的注射器。

11. 一種用於向受試者遞送抗 VEGF 抗體之方法，其包含向該受試者投與實施例 1-8 中任一項之水性醫藥組合物之步驟。

12. 一種治療由 VEGF 介導的眼部疾病或病症之方法，其包含向受試者投與實施例 1-8 中任一項之水性醫藥組合物。

13. 如實施例 12 之方法，其中該眼部疾病或病症為眼部新生血管疾病。

14. 一種凍乾調配物，其藉由將實施例 1-8 中任一項之水性醫藥組合物凍乾而製備。

15. 一種用於製備凍乾物之方法，其包含以下步驟：(i)製備抗 VEGF 抗體、蔗糖或海藻糖、檸檬酸鹽或組胺酸緩衝劑、及界面活性劑之水溶液；及(ii)將該水溶液凍乾。

16. 如實施例 15 之方法，其中該抗 VEGF 抗體包括分別 SEQ ID NO: 5、6、及 7 之重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3，及分別 SEQ ID NO: 8、9、及 10 之輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3。

17. 如實施例 16 之方法，其中該抗 VEGF 抗體包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 2 之序列。

18. 如實施例 16-17 中任一項之方法，其中該抗 VEGF 抗體包含 SEQ ID NO: 3 之序列。

19. 一種用於向受試者遞送抗 VEGF 抗體的實施例 1-8 中任一項之水性醫藥組合物，其包含向受試者投與該水性醫藥組合物之步驟。

20. 一種用於治療由 VEGF 介導的眼部疾病或病症的實施例 1-8 中任一項之水性醫藥組合物，其包含向受試者投與該水性醫藥組合物。

21. 如實施例 20 之用途，其中該眼部疾病或病症為眼部新生血管疾病。

【0056】 除非另外說明，否則如本所用，所有百分比為重量百分比。

【0057】 如本文所用且除非另外指明，否則術語「一個」及「一種」用於意謂「一個(種)」、「至少一個(種)」或「一或多個(種)」。除非另外為上下文所需，否則本文所用之單數術語將包括複數且複數術語將包括單數。

【0058】 本說明書中通篇所引用的任何專利、專利申請案、及參考文獻之內容以全文引用之形式併入本文。

【0059】 自本文所揭露之本發明之說明書及實施之考慮，本發明之其他實施例對熟習此項技術者將為顯而易見的。意欲本發明說明書及實例被視為僅具有示範性，且本發明之真實範疇及精神由以下申請專利範圍及其等效物指示。

實例

【0060】 以下實例描述調配物開發成果，其經設計以鑑別合適的穩定方法及組合物以得到包含抗體 1008 的穩定的、高度濃縮的溶液，從而使得滿足對眼用產品的規定要求具有在冷凍儲存條件下至少 18 個月儲存壽命的 IVT 調配物成為可能。

【0061】 1008 抗體為單鏈抗體，其結合至人類血管內皮生長因子 A (VEGF-A) 且抑制人類血管內皮生長因子 A 之生物活性。表現的 1008 之胺基

酸序列為：

MEIVMTQSPS TLSASVGDRV IITCQASEII HSWLAWYQQK PGKA
PKLLIY LASTLASGVP SRFSGSGSGA EFTLTSSLQ PDDFATYYCQ NV
YLASTNGANFGQGTKLTV LGGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSEVQLV
ESG GGLVQPGGSL RLSCTASGFS LTDYYYMTWV RQAPGKGLEW V
GFIDPDDDP YYATWAKGRF TISRDNSKNT LYLQMNSLRA EDTAVYY
CAG GDHNSGWGLD IWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO: 4)

【0062】 當將1008調配成於pH 6.25下具有0.001%聚山梨醇酯20的15 mM檸檬酸鹽緩衝液中之等滲溶液時，在60 mg/ml 1008之濃度下觀察到顯著量的次可見微粒。在此起始調配物之情況下的主要問題為即使當在-20℃下儲存時，微粒物質超過眼用注射用溶液之規定限制(USP<789>)。

【0063】 以下實例概述在2-8℃下儲存至少18個月穩定的60 mg/ml及120 mg/ml 1008玻璃體內(IVT)溶液之調配物開發。調配物開發成果集中於次可見粒子之形成之抑制及滿足針對含量、純度及效力的USP要求。

分析方法

【0064】 如所指明實例通篇使用以下方法。

微血流成像(MFI)方法

【0065】 用於賦形劑篩選的 MFI 方法，針對 60 mg/ml 最佳化研究的研究 1 及研究 2 如下：

所用的總樣本體積 0.50 mL

沖洗體積：0.20 mL

分析體積：0.26 mL

【0066】 用純化的經過濾的不含粒子的水進行最佳化照明步驟。

【0067】 用於分析 120mg/ml 1008 研究 3 及研究 4 的 MFI 方法：

所用的總樣本體積 0.80 mL

沖洗體積：0.23 mL

分析體積：0.48 mL

【0068】 用純化的經過濾的不含粒子的水進行最佳化照明步驟。

SEC方法

【0069】 SE-HPLC (粒徑排阻層析法)根據蛋白質之大小分離蛋白質。藉由樣本分子在其穿過多孔粒子固定相時的微分排阻、或納入達成分離。高效液相層析系統能夠保持0.25 ml/分鐘之流動速率及4℃之樣本溫度，裝備有TOSOH SuperSW3000柱(Tosoh Bioscience LLC, King of Prussia, PA)，且能夠同時在214 nm及280 nm下操作。此方法用於純度測試。

IEX-HPLC方法

【0070】 AIEX-HPLC (陰離子交換高效液相層析法)根據蛋白質之淨電荷分離蛋白質。此過程使用高效液相層析法(HPLC)進行，其能夠保持0.8 ml/分鐘之流動速率，具有含有強陰離子交換柱的溫控柱隔室(設置在25℃下)、自動取樣器(設置在4℃下)、及能夠在280 nm下操作的可變波長UV偵測器。

CGE方法

【0071】 藉由 SDS 凝膠毛細管電泳進行毛細管凝膠電泳方法用於確定在 10 kDa 與 225 kDa 之分子量之間的蛋白質之同一性及純度。毛細管動態地填充有 Beckman Coulter 0.2% SDS 凝膠緩衝劑，pH 8，專屬調配物。藉由分子篩電泳進行蛋白質之分離。蛋白質分子量之對數與其倒數的電泳移動率成線性關係。藉由將蛋白質之遷移與分子量標準比較確定蛋白質之同一性。藉由母峰及雜質之面積百分比分析確定純度。光電二極體陣列偵測器(PDA)用以在 220 nm 下分析樣本。

效力分析

【0072】 競爭ELISA用於效力測定。量測競爭ELISA，1008與VEGFR2/Fc針對生物素化的VEGF競爭之能力。所觀察到的訊號與1008之濃度成反比，因為遞增量的1008有效地阻止生物素化的VEGF與其受體VEGFR2/Fc之結合。於96孔微量滴定板中相對於1008參考標準分析各樣本，且報導相對於參考標準之效力的樣本之效力。

實例1

賦形劑篩選

【0073】 於pH 6.25之檸檬酸鹽緩衝劑中調配1008。調配物組成示出於表1中。

表1

組成	濃度(W/V%)
1008	6%
檸檬酸三鈉(二水合)	0.59%
氯化鈉	0.73%
聚山梨醇酯 20	0.001%
鹽酸	pH 6.25
注射用水	Qs 100

【0074】 於上文調配物中觀察到顯著數目的次可見微粒。甚至在-20℃之儲存下，微粒物質超過對於眼用注射用水的規定限制USP<789>。

【0075】 研究各種賦形劑對次可見微粒之形成的作用以開發1008之更穩定的液體溶液。將在60 mg/ml下含有不同賦形劑的蛋白質溶液儲存在40℃下且藉由MFI分析大小為1 - 100 μm之微粒。實驗資料證明，所測試的大部分賦形劑，包括精胺酸、葡聚糖、抗壞血酸、甲硫胺酸、及乙酸銨，並不降低微粒之形成。僅在非還原糖，諸如蔗糖及海藻糖之存在下，微粒形成顯著降低。

【0076】 進行另外的賦形劑篩選。於 ~60 mg/ml 1008 溶液中評估賦形劑對 1008 穩定性的作用。將含有 0.1%人類血清白蛋白(HSA)、0.1%泊洛沙姆(poloxamer) 407、0.1%玻雷吉(Brij) 35、3%甘油、50 mM 甘胺酸之蛋白質溶液儲存在 40℃下，且在儲存 8 日、21 日、及 28 日之後藉由 MFI、SEC 及 IEX 分析樣本。結果示出於表 2 中。實驗資料證明在所測試的賦形劑之存在下蛋白質之不穩定性。

表 2

賦形劑篩選之結果

賦形劑	0.1% HSA	0.1%泊洛沙姆 407	0.1%玻雷吉 35	3%甘油	50 mM 甘胺酸
時間(日)	8				
≥ 10 um 藉由 MFI	19	8	18	329	47
≥ 25 um 藉由 MFI	5	5	6	43	8
≥ 50 um 藉由 MFI	1	0	1	3	0
總計藉由 MFI	538	381	378	24805	2436
SEC (初始%)	96.2	95.5	81.8	96.3	95.8
IEX (初始%)	95.1	94.3	82.7	95.0	95.6
時間(日)	21				
≥ 10 um 藉由 MFI	30	5	12	95	36

≥ 25 um 藉由 MFI	7	0	5	14	10
≥ 50 um 藉由 MFI	1	0	0	2	1
總計藉由 MFI	495	197	1091	5622	1037
SEC (初始%)	88.2	87.7	63.2	89.4	89.4
IEX (初始%)	87.8	86.1	63.2	87.9	87.1
時間(日)	28				
≥ 10 um 藉由 MFI	69	382	595	365	466
≥ 25 um 藉由 MFI	21	39	68	65	72
≥ 50 um 藉由 MFI	5	4	6	9	15
總計藉由 MFI	505	7718	2208	10690	52375
SEC (初始%)	85.7	84.7	65.3	86.1	84.5
IEX (初始%)	82.7	80.9	60.0	83.4	82.3

【0077】 於 pH 6.25 的 20 mM 磷酸鹽緩衝劑中研究 57 mg/ml 1008 之穩定性。在 40°C 下儲存 6 日、14 日及 27 日之後分析含有 9% 蔗糖及 0.1% PS80 的調配物。結果列舉於表 3 中。

表 3

20 mM 磷酸鹽緩衝劑中 57 mg/ml 1008 之穩定性

在 40°C 下的時間(日)	6	14	27
≥ 10 um 藉由 MFI (#/mL)	43	42	11
≥ 25 um 藉由 MFI (#/mL)	3	13	3
≥ 50 um 藉由 MFI (#/mL)	1	4	0
總計藉由 MFI (#/mL)	1418	1650	425
SEC (初始%)	97.3	91.9	82.1
IEX (初始%)	98.3	92.2	79.2

實例2

新調配物開發

研究1

賦形劑篩選

【0078】 將於pH 6.25的含有0.001%聚山梨醇酯20及0.73% NaCl的20 mM檸檬酸鹽緩衝劑中之60 mg/ml 1008之蛋白質溶液用於樣本製備。爲了移除原始蛋白質溶液中之界面活性劑，首先使用不含聚山梨醇酯20的媒劑進行使用NAP-25柱的緩衝劑交換。隨後使用具有10kDa MWCO的Vivaspin過濾器將交換的蛋白質溶液濃縮至約60 mg/ml。個別地摻入(spike) HSA、甘胺酸、甘油、泊洛沙姆407、及玻雷吉35之賦形劑。隨後將所製備的樣本經0.2 um PVDF膜注射器過濾至4 mL透明玻璃小瓶中。將約100 µL樣本用於初始



分析，同時將剩餘樣本在40℃下儲存。在40℃下儲存8日、21日、及28日將各調配物之一毫升樣本取出(pull)用於藉由MFI、SEC及IEX分析。

緩衝劑、糖及界面活性劑之組分選擇

【0079】 基於在內部進行的賦形劑篩選研究，選擇兩種緩衝劑(檸檬酸鹽及組胺酸)、糖(蔗糖及海藻糖)、及界面活性劑(聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80)用於調配物組分選擇。選擇20 mM之緩衝劑強度、264 mM之糖濃度、及0.1%之界面活性劑濃度用於研究。如以下表中所示設計全因子實驗研究。

表4

針對研究1的因子及設計

因子	設計
緩衝劑	20 mM檸檬酸鹽或20 mM組胺酸
糖	264 mM (9%)蔗糖或264 mM (9%)海藻糖
界面活性劑	0.1%聚山梨醇酯20或0.1%聚山梨醇酯80

【0080】 所用的全設計示出於以下表5中：

表5

針對研究1的三因子全因子設計

編號	緩衝劑(mM)	糖	界面活性劑
1	20 mM檸檬酸鹽	264 mM海藻糖	0.1% PS 20
2	20 mM檸檬酸鹽	264 mM海藻糖	0.1% PS 80
3	20 mM檸檬酸鹽	264 mM蔗糖	0.1% PS 20
4	20 mM檸檬酸鹽	264 mM蔗糖	0.1% PS 80
5	20 mM組胺酸	264 mM海藻糖	0.1% PS 20
6	20 mM組胺酸	264 mM海藻糖	0.1% PS 80
7	20 mM組胺酸	264 mM蔗糖	0.1% PS 20
8	20 mM組胺酸	264 mM蔗糖	0.1% PS 80

其他參數：

濃度/pH	在pH 6.25下50 - 60 mg/ml 1008
緩衝劑交換	NAP25柱，用Vivaspin 10kDa MWCO濃縮
樣本大小/Package	2-2.5 mL於具有螺旋蓋的4 mL透明玻璃小瓶中
儲存/取出	40℃/0、1週、2週及4週
分析	MFI、SEC及IEX

【0081】 將於含有0.001%聚山梨醇酯20的原始緩衝劑中之60 mg/ml

1008之蛋白質溶液用於樣本製備。製備具有不同的緩衝劑/糖組合(20 mM檸檬酸鹽/264 mM海藻糖、20 mM檸檬酸鹽/264 mM蔗糖、20 mM組胺酸/264 mM海藻糖、20 mM組胺酸/264 mM蔗糖)的四種新的媒劑緩衝劑。首先使用Illustra NAP-25柱(GE Healthcare)將1008藥物物質(DS)交換至媒劑緩衝劑中。用25 mL檸檬酸鹽緩衝劑將柱平衡。隨後將2 mL 1008 DS裝載至柱上。在DS溶液完全移動至柱中之後，將柱用2 mL平衡柱所用的相同緩衝劑洗滌。於Vivaspin 6濃縮器(10KD MWCO，GE Healthcare)中收集6 mL自柱溶離的溶液。隨後使用Beckman GS-15R離心機在9384 ×g及4℃下將6 mL溶離溶液濃縮至約2 mL。隨後使用OD280用NanoDrop 1000分光光度計量測蛋白質之濃度。將聚山梨醇酯20 (PS20)或聚山梨醇酯80 (PS80)摻入至調配物中至0.1%之最終濃度。隨後將所製備的樣本經0.2 μm PVDF注射器過濾器過濾且填充至4 mL透明玻璃小瓶中。將約100 μL樣本用於初始分析，同時將剩餘樣本在40℃下儲存。在40℃下儲存1週、2週及4週之後將一毫升樣本取出用於藉由MFI、SEC及IEX分析。

【0082】 進行定性研究以選擇調配物之最佳糖/界面活性劑/緩衝劑組成。如上文所討論將兩種緩衝劑(檸檬酸鹽及組胺酸)、糖(蔗糖及海藻糖)、界面活性劑(聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80)用於研究設計。在加速的條件(40℃)下進行四週穩定性研究。藉由SEC、IEX及MFI分析樣本穩定性。表6示出藉由SEC、IEX的穩定性結果及藉由μDSC的熔點(Tm)。

表 6
在 40℃下 60 mg/ml 1008 之因子的定性分析

編號	1 週/40 ℃ (SEC)*	2 週/40 ℃ (SEC)	4 週/40 ℃ (SEC)	1 週/40 ℃ (IEX)*	2 週/40 ℃ (IEX)	4 週/40 ℃ (IEX)	Tm (℃) 藉由 μDSC
1	2.9	10.7	26.6	5.0	13.7	20.2	71.53
2	2.4	7.8	18.3	4.2	10.5	13.6	71.97
3	2.9	11.1	27.1	4.9	13.2	17.5	71.41
4	2.3	7.5	20.9	4.1	10.6	11.7	71.97
5	3.2	11.7	26.8	5.6	14.7	23.4	71.66
6	2.7	8.1	19.1	5.1	12.1	19.9	72.28
7	3.5	13.2	31.4	6.1	16.4	25.2	71.53
8	2.8	8.6	21.2	5.4	13.1	15.1	72.15

*使用相對峰面積的損失%

【0083】 使用 Minitab (Minitab 公司，State College PA)分析穩定性結果。因為 SEC 及 IEX 示出相同趨勢，所以僅藉由 Minitab 分析且報導 SEC 資料。SEC 結果證明，界面活性劑為唯一顯著因子；似乎影響反應的其他因子包括緩衝劑選擇及在緩衝劑與糖之間的相互作用(程度較低)。SEC 資料表明最佳調配物組分為作為緩衝劑的檸檬酸鹽、作為界面活性劑的聚山梨醇酯 80 及作為糖的蔗糖。

【0084】 亦藉由 Minitab 分析藉由 MFI 對微粒的實驗結果。所評估的所有三個因子(糖、界面活性劑、及緩衝劑)似乎為無意義的($\alpha=0.05$)。比較對微粒的主要作用，檸檬酸鹽優於組胺酸；PS80 優於 PS20；蔗糖類似於或略優於海藻糖。因此，選擇檸檬酸鹽作為緩衝劑、聚山梨醇酯 80 作為界面活性劑及蔗糖作為糖用於進一步研究。

研究2

緩衝劑、糖及界面活性劑之濃度的最佳化

【0085】 分別於檸檬酸鹽及組胺酸緩衝劑中進行在具有兩個中心點的兩個水平下含有三種因子的全因子研究，以確定各所選的調配物組分之最佳濃度。三種因子為緩衝劑(檸檬酸鹽或組胺酸)、聚山梨醇酯80及蔗糖。因子及設計空間列表於表7中且詳細的實驗設計示出於表8及9中。

表7
因子及設計研究2

因子	設計	
檸檬酸鹽緩衝劑	10 - 20 mM	NA
組胺酸緩衝劑	NA	10 -20 mM
聚山梨醇酯80	0.001 - 0.1%	0.001 - 0.1%
蔗糖	4.5 - 9%	4.5 - 9%

表8
檸檬酸鹽緩衝劑中的全因子設計

操作順序	緩衝劑(mM)	蔗糖(%)	聚山梨醇酯80 (%)
C1	10	4.5	0.001
C2	20	4.5	0.001
C3	10	9	0.001
C4	20	9	0.001
C5	10	4.5	0.1
C6	20	4.5	0.1
C7	10	9	0.1

C8	20	9	0.1
C9	15	6.75	0.0505
C10	15	6.75	0.0505

表9
組胺酸緩衝劑中的全因子設計

(在具有2個中心點的2個水平下的3種因子)

操作順序	緩衝劑 (mM)	蔗糖(%)	聚山梨醇酯 80 (%)
H1	10	4.5	0.001
H2	20	4.5	0.001
H3	10	9	0.001
H4	20	9	0.001
H5	10	4.5	0.1
H6	20	4.5	0.1
H7	10	9	0.1
H8	20	9	0.1
H9	15	6.75	0.0505
H10	15	6.75	0.0505

【0086】 為製備個別的調配物，使用於pH 6.25的含有0.001%聚山梨醇酯20/0.73% NaCl的檸檬酸鹽緩衝劑中之60 mg/ml 1008之蛋白質溶液。首先使用NAP-25柱將蛋白質溶液緩衝劑交換成媒劑。此媒劑含有在其目標濃度下的緩衝劑及蔗糖。使用Vivaspin 10 kDa MWCO將交換的蛋白質溶液濃縮至約60 mg/ml之濃度。

【0087】 隨後添加一批量的聚山梨醇酯80及氯化鈉以製造最終調配物組合物。使用藉由在280 nm下的UV所量測的吸光度，各樣本中之蛋白質濃度隨理論消光係數而變化。

【0088】 隨後將所製備的調配物經0.2 µm PVDF注射器過濾器過濾至4 mL透明玻璃小瓶中。藉由SEC及IEX將約100 µL樣本用於初始分析，同時將約2-2.5 mL樣本在40℃下儲存。在40℃下儲存11週、20週及27週之後將約600 µL樣本取出用於藉由MFI、SEC及IEX分析。

【0089】 基於研究1結果，分別於檸檬酸鹽及組胺酸緩衝劑中進行在具有兩個中心點的兩個水平下含有三種因子的全因子研究，以確定各所選的調配物組分之最佳濃度。將所測試的樣本在40℃下儲存，且在0、1.6週、2.9週及4週取出用於MFI、SEC及IEX分析。結果列表於表10及11中。



表 10

檸檬酸鹽緩衝的溶液之穩定性結果

時間(週)	0	1.6	2.9	4	0	1.6	2.9	4
條件	10 mM 檸檬酸鹽/4.5%蔗糖 /0.001% PS80				20 mM 檸檬酸鹽/4.5%蔗糖 /0.001% PS80			
1008 (mg/ml)	59.1				58.7			
粒子 ≥ 10 μm #/mL 藉由 MFI	-	61.1	91.7	36518	-	27	203	51209
粒子 ≥ 25 μm #/mL 藉由 MFI	-	7.64	15.29	6508	-	4	27	5071
粒子 ≥ 50 μm #/mL 藉由 MFI	-	0	0	325	-	0	4	61
總計粒子 #/mL 藉由 MFI	-	2881	7165	82439	-	627	26078	57734 5
SEC (初始%)	99.2	93.4	89.6	85.8	99.3	93.8	90.1	86.4
IEX (初始%)	97.7	91.4	85.3	81.4	96.8	92.7	87.2	83.3
條件	10 mM 檸檬酸鹽/9%蔗糖 /0.001% PS80				20 mM 檸檬酸鹽/9%蔗糖 /0.001% PS80			
1008 (mg/ml)	54.2				53.3			
粒子 ≥ 10 μm #/mL 藉由 MFI	-	38	57	84	-	19	42	126
粒子 ≥ 25 μm #/mL 藉由 MFI	-	4	0	8	-	8	0	11
粒子 ≥ 50 μm #/mL 藉由 MFI	-	0	0	0	-	0	0	0
總計粒子 #/mL 藉由 MFI	-	791	1838	6993	-	841	1594	8472
SEC (初始%)	99.2	93.5	89.7	86.2	99.5	93.4	89.9	86.5
IEX (初始%)	97.5	91.1	85.3	81.4	97.4	91.8	86.3	82.6
條件	10 mM 檸檬酸鹽/4.5%蔗糖 /0.1% PS80				20 mM 檸檬酸鹽/4.5%蔗糖 /0.1% PS80			
1008 (mg/ml)	58.7				58.7			
粒子 ≥ 10 μm #/mL 藉由 MFI	-	76	27	31	-	34	149	187
粒子 ≥ 25 μm #/mL 藉由 MFI	-	0	4	8	-	11	31	31
粒子 ≥ 50 μm #/mL 藉由 MFI	-	0	0	0	-	4	0	0
總計粒子 #/mL 藉由 MFI	-	1104	803	23839	-	860	1494	31451
SEC (初始%)	99.2	92.4	87.5	82.3	99.5	92.3	87.4	82.5
IEX (初始%)	97.5	90.2	83.1	78.0	97.5	90.6	84.0	78.8

條件	10 mM 檸檬酸鹽/9%蔗糖 /0.1% PS80				20 mM 檸檬酸鹽/9%蔗糖/0.1% PS80			
1008 (mg/ml)	54.7				52.5			
粒子 ≥ 10 μm #/mL 藉由 MFI	-	103	187	164	-	88	65	99
粒子 ≥ 25 μm #/mL 藉由 MFI	-	23	42	27	-	23	11	19
粒子 ≥ 50 μm #/mL 藉由 MFI	-	0	4	2	-	0	4	0
總計粒子 #/mL 藉由 MFI	-	2538	3642	4055	-	1062	1613	2117
SEC (初始%)	98.9	93.2	88.5	84.0	99.4	92.8	88.3	84.0
IEX (初始%)	97.2	90.9	83.8	79.1	97.1	91.3	84.3	79.7
條件	15 mM 檸檬酸鹽/6.75%蔗糖 /0.0505% PS80				15 mM 檸檬酸鹽/6.75%蔗糖 /0.0505% PS80			
1008 (mg/ml)	50.8				51.3			
粒子 ≥ 10 μm #/mL 藉由 MFI		42	54	42		31	15	
粒子 ≥ 25 μm #/mL 藉由 MFI		8	8	0		4	4	
粒子 ≥ 50 μm #/mL 藉由 MFI		0	4	0		0	0	
總計粒子 #/mL 藉由 MFI		439	1368	1536		1162	1727	
SEC (初始%)	99.1	93.6	88.8	84.7	99.4	92.9	88.3	84.1
IEX (初始%)	97.0	91.5	85.0	80.6	97.0	91.4	84.7	80.0

表 11

組胺酸緩衝的溶液之穩定性結果

時間(週)	0	1.6	2.9	4	0	1.6	2.9	4
條件	10 mM 組胺酸/4.5%蔗糖 /0.001% PS80				20 mM 組胺酸/4.5%蔗糖 /0.001% PS80			
1008 (mg/ml)	48.8				50.6			
粒子 ≥ 10 μm #/mL 藉由 MFI	-	26.75	152.86	596		30.57	95.54	4265
粒子 ≥ 25 μm #/mL 藉由 MFI	-	15.29	11.46	76.43		0	7.64	172
粒子 ≥ 50 μm #/mL 藉由 MFI	-	0	0	7.64		0	0	3.82
總計粒子	-	634	2927	42083		592	14204	246370

#/mL 藉由 MFI								
SEC (初始 %)	99.6	93.4	89.5	85.9	99.6	93.3	89.6	86.4
IEX (初始 %)	96.7	91.9	86.2	82.5	96.9	91.9	86.2	82.4
條件	10 mM 組胺酸/9%蔗糖/0.001% PS80				20 mM 組胺酸/9%蔗糖/0.001% PS80			
1008 (mg/ml)	54.8				55.6			
粒子 ≥ 10 μm #/mL 藉由 MFI		19.11	64.97	202.54		15.29	103.18	149.04
粒子 ≥ 25 μm #/mL 藉由 MFI		7.64	7.64	26.75		0	15.29	15.29
粒子 ≥ 50 μm #/mL 藉由 MFI		0	0	0		0	11.46	3.82
總計粒子 #/mL 藉由 MFI		684	2538	7505		806	3565	8102
SEC (初始 %)	99.7	92.8	88.9	85.5	98.8	93.4	89.5	85.9
IEX (初始 %)	97.0	90.78	84.8	81.1	97.1	90.6	84.4	80.3
條件	10 mM 組胺酸/4.5%蔗糖/0.1% PS80				20 mM 組胺酸/4.5%蔗糖/0.1% PS80			
1008 (mg/ml)	48.8				49.8			
粒子 ≥ 10 μm #/mL 藉由 MFI	-	68.8	76.4	126		34	42	54
粒子 ≥ 25 μm #/mL 藉由 MFI	-	15.3	3.82	19.1		0	4	8
粒子 ≥ 50 μm #/mL 藉由 MFI	-	7.64	0	0		0	4	0
總計粒子 #/mL 藉由 MFI	-	753	2033	2782		1311	1704	1724
SEC (初始 %)	99.7	92.7	87.6	83.9	99.7	92.7	88.0	83.8
IEX (初始 %)	96.9	90.7	84.5	78.7	97.0	91.0	84.4	78.1

%)								
條件	10 mM 組胺酸/9%蔗糖/0.1% PS80				20 mM 組胺酸/9%蔗糖/0.1% PS80			
1008 (mg/ml)	54.1				54.6			
粒子 ≥ 10 μm #/mL 藉由 MFI		22.93	42.04	68.79		64.97	72.61	80.25
粒子 ≥ 25 μm #/mL 藉由 MFI		3.82	3.82	0		0	7.64	3.82
粒子 ≥ 50 μm #/mL 藉由 MFI		0	0	0		0	0	3.82
總計粒子 #/mL 藉由 MFI		783	1330	6111		1716	2469	3844
SEC (初始 %)	99.3	92.8	88.2	84.0	99.7	92.7	87.6	83.3
IEX (初始 %)	97.0	90.5	83.4	78.7	96.8	90.9	83.3	78.3
條件	15 mM 組胺酸/6.75%蔗糖 /0.0505% PS80				15 mM 組胺酸/6.75%蔗糖 /0.0505% PS80			
1008 (mg/ml)	50.3				49.6			
粒子 ≥ 10 μm #/mL 藉由 MFI		19	46	172		31	80	114
粒子 ≥ 25 μm #/mL 藉由 MFI		0	0	19		7.6	15.3	22.9
粒子 ≥ 50 μm #/mL 藉由 MFI		0	0	0		0	7.6	3.8
總計粒子 #/mL 藉由 MFI		1005	1788	4242		760	1823	3053
SEC (初始 %)	99.3	92.9	87.9	84.2	99.6	92.5	87.7	83.9
IEX (初始 %)	97.1	90.9	84.3	79.6	96.9	91.0	84.6	79.8

【0090】 藉由 Minitab 分析實驗資料。對於檸檬酸鹽緩衝劑中之 SEC 結果，界面活性劑為影響蛋白質聚集的主要因子，同時蔗糖、在蔗糖與聚山梨醇酯 80 之間的相互作用、及緩衝劑強度起較不顯著的作用。較高蔗糖

濃度及較低聚山梨醇酯 80 濃度有利於蛋白質穩定性。蛋白質穩定性略微影響聚集，且較高檸檬酸鹽緩衝劑強度促進略優良的蛋白質穩定性。

【0091】 對於檸檬酸鹽緩衝劑中之 MFI 結果，蔗糖及聚山梨醇酯 80 之因子以及蔗糖與山梨醇酯 80 之相互作用在微粒形成中起相等重要的作用。高蔗糖及高聚山梨醇酯 80 顯著地抑制微粒形成，同時在 10-20 mM 範圍內的緩衝劑強度略微影響微粒形成，較低緩衝劑強度為較佳的。

【0092】 藉由組胺酸緩衝劑溶液之 Minitab 分析的結果展示，界面活性劑聚山梨醇酯 80 為影響蛋白質聚集的主要因子，同時在緩衝劑強度與聚山梨醇酯 80 之間的相互作用以及蔗糖起較不顯著的作用。較少聚山梨醇酯 80 有利於蛋白質穩定性。緩衝劑強度及蔗糖濃度似乎並不影響蛋白質聚集。

【0093】 對於組胺酸緩衝劑中的 MFI 結果，聚山梨醇酯 80、蔗糖、及蔗糖與山梨醇酯 80 之相互作用在微粒形成中起顯著作用。高蔗糖及低聚山梨醇酯 80、及低緩衝劑強度為抑制微粒形成較佳的。

pH最佳化

【0094】 於含有0.1% NaCl、6.75%蔗糖及0.05% PS80的15 mM檸檬酸鹽緩衝劑中在六個pH條件(5.0、6.0、6.25、6.50、6.75及7.0)下研究pH對1008之聚集行為的影響。首先使用Illustra NAP-10柱(GE Healthcare)將1008藥物物質交換至具有不同pH之媒劑(不含PS80)中。首先用15 mL檸檬酸鹽緩衝劑將柱平衡。隨後將1 mL 1008 DS裝載至柱上。在DS溶液完全移動至柱中之後，將柱用2 mL平衡柱所用的相同檸檬酸鹽緩衝劑洗滌。於Vivaspin 2濃縮器(10KD MWCO, GE Healthcare)中收集2 mL自柱溶離的溶液。隨後使用Beckman GS-15R離心機在9384 ×g及4℃下將2 mL溶離溶液濃縮至約1 mL。隨後用NanoDrop 1000分光光度計量測蛋白質之濃度。確定此研究之最終1008濃度為約70 mg/ml。將PS80摻入至調配物中至0.05%之最終目標濃度。使用具有兩位槽架及用於溫度調節的水浴的PerkinElmer Lambda 35分光光度計進行動力學濁度分析。於具有1 cm路徑長度的Starna次微體積石英槽(Starna Scientific公司，英國)中，添加250 µL 1008調配物或對應的媒劑。將槽置於預加熱至55℃的槽架中。監測1008調配物中OD350之改變120分鐘。隨後將不同pH的調配之所獲得的OD350資料對時間繪圖用於比較。

【0095】 使用基於濁度的動力學分析，用含有約70 mg/ml 1008之pH 5.0至7.0的調配物研究pH對1008之聚集行為的影響。對於濁度分析，OD₃₅₀之急劇增大與蛋白質之主要聚集事件相關聯。因此，各調配物之OD₃₅₀增大所需的培育時間中的差異可反映出調配物中之蛋白質之不同的物理穩定性。如圖1中所示，在所測試調配物條件下1008似乎在pH 6.75下最穩定，因為其在OD₃₅₀之急劇增大之前具有最長的培育時間。重複實驗具有類似結果證實所測試調配物在pH 6.75下最穩定。

研究3

賦形劑及高活性濃度之影響

【0096】 進行半因子研究(表12)以研究主要調配物條件之影響，包括蛋白質(60-120 mg/ml)、蔗糖(4.5 - 9.0%)、檸檬酸鹽緩衝劑(10至20 mM)及聚山梨醇酯80 (0.01 - 0.1%)之濃度。

表 12

研究 3 之研究設計

操 作 順序	中 心 點	集 區 (block)	1008 (mg/ml)	蔗糖 (w/w %)	緩衝劑 (mM)	聚 山 梨 醇 酯 80 (%)
1	1	1	60	4.5	10	0.01
2	1	1	120	4.5	10	0.1
3	1	1	60	9	10	0.1
4	1	1	120	9	10	0.01
5	1	1	60	4.5	20	0.1
6	1	1	120	4.5	20	0.01
7	1	1	60	9	20	0.01
8	1	1	120	9	20	0.1
9	0	1	90	6.75	15	0.055
10	0	1	90	6.75	15	0.055

【0097】 為製備上文調配物，首先製備在pH 6.5下的20%檸檬酸鹽緩衝劑及於pH 6.5的20 mM檸檬酸鹽緩衝劑中的30%蔗糖儲備液。隨後將檸檬酸鹽緩衝劑、蔗糖儲備液及注射用水以適當比率混合以得到具有PS80的五種緩衝劑，其為4.5%蔗糖於10 mM檸檬酸鹽中、9%蔗糖於10 mM檸檬酸鹽中、4.5%蔗糖於20 mM檸檬酸鹽中、9%蔗糖於20 mM檸檬酸鹽中及6.75%蔗糖於15 mM檸檬酸鹽中。隨後使用Illustra NAP-25柱(GE Healthcare)將1008 DS交換至此等五種緩衝劑中，接著用Vivaspin 6濃縮器(5 KD MWCO,

GE Healthcare)在8000 ×下在5℃下濃縮。在離心期間用NanoDrop 2000分光光度計確定各樣本中之蛋白質濃度。對於前四種緩衝劑中之樣本，當1008濃度達到~70 mg/ml時，將樣本之一部分自濃縮器移除且用於藉由添加適當量的對應緩衝劑且摻入於10% PS80中用60 mg/mlAPI製備調配物(表12中之#1、3、5及7)。將剩餘樣本進一步濃縮至高於130 mg/ml且隨後添加緩衝劑及10% PS80以獲得最終調配物(表12中之#2、4、6及8)。藉由將交換至緩衝劑#5中之1008樣本濃縮至約108 mg/ml且隨後與緩衝劑及10% PS80混合以達到最終調配物濃度來製備表12中之調配物#9及10。量測所有最終調配物之pH值且調節至6.5。

【0098】 自上文所述之分析改良的濁度分析用作評估的分析工具。在此改良的濁度分析中，使用12槽位Cary 100 UV-Vis分光光度計。此分析中所使用之光析管為具有塞子的1 mm石英光析管。於各光析管中，添加300 µL樣本用於測試。對在55℃下培育的調配物監測在360 nm下的光密度改變。

賦形劑及高活性濃度之影響

【0099】 研究 3 之所有調配之所量測的 1008 濃度及最終 pH 概述於表 13 中。在 55℃下培育具有低、中及高 1008 濃度(表 4.3.1.-1)具有不同蔗糖、PS80 濃度及緩衝劑強度的調配物且監測 OD₃₆₀ 之改變。如圖 2 中所示，對於調配物觀察到不同的聚集傾向。當培育開始時不久便幾乎聚集的兩種調配物為調配物 2 及 6，其含有相對較高的 1008 濃度(~120 mg/ml)及較低的蔗糖濃度(4.5%)。另一方面，含有相對較低的 1008 濃度(~60 mg/ml)及較高的蔗糖濃度(9%)的調配 3 及 7 聚集慢於其他調配物。培養基 1008 及蔗糖濃度之其他組合之聚集傾向在上文兩組之間。

表 13

研究 3 之最終調配物條件

調配物#	賦形劑濃度	最終 1008 濃度(mg/ml)	最終 pH
1	10 mM 檸檬酸鹽/4.5%蔗糖/0.01% PS80	58.223 (較低)	6.56
2	10 mM 檸檬酸鹽/4.5%蔗糖/0.1% PS80	113.554 (較高)	6.53
3	10 mM 檸檬酸鹽/9%蔗糖/0.1% PS80	59.034 (較低)	6.55
4	10 mM 檸檬酸鹽/9%蔗糖/0.01% PS80	117.489 (較高)	6.48

5	20 mM 檸檬酸鹽/4.5%蔗糖/0.1% PS80	58.910 (較低)	6.53
6	20 mM 檸檬酸鹽/4.5%蔗糖/0.01% PS80	116.712 (較高)	6.50
7	20 mM 檸檬酸鹽/9%蔗糖/0.01% PS80	57.431 (較低)	6.47
8	20 mM 檸檬酸鹽/9%蔗糖/0.1% PS80	116.466 (較高)	6.45
9	15 mM 檸檬酸鹽/6.75%蔗糖/0.055% PS80	87.555 (中等)	6.48
10	15 mM 檸檬酸鹽/6.75%蔗糖/0.055% PS80	87.769 (中等)	6.49

【0100】 使用各調配物之OD₃₆₀達到0.25之時間作為標準，比較不同調配物因子之影響。結果表明，蔗糖對1008的聚集影響最大，接著為API濃度。蔗糖及API濃度之影響為相反的，指明對於較優的調配物穩定性，較高蔗糖及較低API濃度為較佳的。其他兩個因子，緩衝劑強度及PS80展示影響較小。

研究4

活性及蔗糖濃度之進一步研究

【0101】 基於上文研究3之結果，進行研究4以進一步研究於pH6.50的含有0.05% PS80的15 mM檸檬酸鹽緩衝劑中之蛋白質濃度(60 - 120 mg/ml)及蔗糖濃度(在6%至9%之較窄範圍之情況下)之影響。研究設計展示於下表中。

表 14
研究 4 之研究設計

操作順序	中心點	集區	1008 (mg/ml)	蔗糖(w/w%)
1	1	1	60	6
2	1	1	120	6
3	1	1	60	9
4	1	1	120	9
5	-1	1	47.6	7.5
6	-1	1	132.4	7.5
7	-1	1	90	5.4
8	-1	1	90	9.6
9	0	1	90	7.5
10	0	1	90	7.5
11	0	1	90	7.5
12	0	1	90	7.5

【0102】 為製備調配物，將約80 g 1008 藥物物質裝載至TFF系統中

且隨後用在約5倍藥物物質之體積下含有6%蔗糖的15 mM檸檬酸緩衝劑進行緩衝劑交換。在緩衝劑交換之後，使用TFF系統將蛋白質溶液之體積減小至初始體積之約一半。將約44 g濃縮的1008溶液回收，且藉由NanoDrop 2000分光光度計量測所濃縮的蛋白質為約112 mg/ml。隨後將濃縮的1008溶液用於製備調配物#1、3、5、7-12，其藉由與適當量的10% PS80及含有0、6%及/或40%蔗糖的15 mM檸檬酸鹽緩衝劑混合以獲得此等調配物中之各者之對應的最終API、蔗糖及PS80濃度。將剩餘1008溶液進一步濃縮至約132 mg/ml以相同方式製備調配物#2及4。最後，藉由將1008溶液濃縮至約171 mg/ml製備調配物#6，且用10% PS80及含有0、6%及/或40%蔗糖的15 mM檸檬酸鹽緩衝劑調節蛋白質、蔗糖及PS80之濃度。各調配物中1008之最終濃度用NanoDrop 2000分光光度計確定且將pH調節至6.5。

【0103】 使用上文所述的濁度分析來分析樣本。亦將八種所選的調配物(#1-4及#7-10)於40°C探索性培育箱中儲存6週且在不同時間點用MIF、IEX及SEC分析。

【0104】 研究如表15中所列舉的十二種調配物。

表 15

研究 4 之最終調配物濃度及濁度分析之 T_m

調配物#	蔗糖濃度	最終 1008 (mg/ml)	最終 pH	T_m (分鐘)
1	6%	61.6	6.49	62.0
2	6%	122.8	6.49	27.4
3	9%	60.0	6.50	86.3
4	9%	119.0	6.51	34.2
5	7.5%	47.7	6.50	97.0
6	7.5%	134.5	6.50	24.2
7	5.38%	94.6	6.50	33.1
8	9.62%	86.2	6.50	49.4
9	7.5%	91.7	6.50	41.2
10	7.5%	89.5	6.50	44.5
11	7.5%	88.4	6.48	38.6
12	7.5%	90.1	6.52	40.0

【0105】 在 55°C 下的濁度分析用以監測調配物之聚集。如圖 3 中所示，藉由在相同熱應力下的調配物展示不同的聚集度。具有相對較高 1008 及較低蔗糖濃度的調配物(諸如表 15 中之調配物#2 及 6)為在培育之後快速聚集的調配物。具有相對較低 1008 及高蔗糖濃度的調配物(表 15 中之調配

物#3 及 5)聚集慢於所有剩餘調配物。將根據各種調配物之濁度分析所獲得的曲線擬合至 S 形曲線函數。將培育時間對應於轉變之中點記錄為各調配物之 T_m (轉變中點時間)。結果列舉於表 15 中。相對於蔗糖及 1008 濃度的 T_m 值展示出蔗糖及 1008 濃度對蛋白質聚集的相反作用。

【0106】 除了使用在 55°C 下的濁度分析的研究，亦藉由 MFI、SEC 及 IEX 經 6 週監測在 40°C 下八種所選的調配物之穩定性。調配物及結果列舉於表 16 至 23 中。與濁度分析抑制，MFI 結果展示，與具有較低 API 濃度的調配物相比較，具有高 1008 濃度(~120 mg/ml)的調配物形成更多粒子，特定言之大於 25 μm 的粒子。MFI 結果不展示對於具有類似量 1008 的調配物(調配物#7 至 10)而言蔗糖濃度的清晰的影響。如圖 4 中所示，在 40°C 下儲存 6 週之後，具有高 1008 濃度的兩種調配物(#2 及 4)降低最大，其中具有~60 mg/ml 1008 的調配物降低小於所有其他調配物。至於具有~90 mg/ml 1008 的調配物，在較高蔗糖濃度(調配物#8)觀察到比較低蔗糖濃度(調配物#7)略微較小的降低。IEX 結果展示與 SEC 相同的趨勢。

表 16

根據研究 4 調配物#1 在 40°C 下加速穩定性研究之結果

調配物條件	F1: 61.6 mg/ml 1008 於 15 mM 檸檬酸鹽、6%蔗糖、0.05% PS80 中，pH 6.5			
時間	初始	2 週	4 週	6 週
藉由 MFI 的微粒				
$\geq 10 \mu\text{m}, < 100 \mu\text{m}$ (#/mL)	42	18	107	26
$\geq 25 \mu\text{m}, < 100 \mu\text{m}$ (#/mL)	6	2	4	4
$\geq 50 \mu\text{m}, < 100 \mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	0	0
$\geq 2 \mu\text{m}, < 100 \mu\text{m}$ (#/mL)	1076	656	12911	2076
SEC (初始%)	99.9	93.6	83.0	77.1
IEX (初始%)	97.7	92.8	83.2	76.8

表 17

根據研究 4 調配物#2 在 40°C 下加速穩定性研究之結果

調配物條件	F2: 122.8 mg/ml 1008 於 15 mM 檸檬酸鹽、6%蔗糖、0.05% PS80 中，pH 6.5			
時間	初始	2 週	4 週	6 週
藉由 MFI 的微粒				
$\geq 10 \mu\text{m}, < 100 \mu\text{m}$ (#/mL)	36	8	16	32
$\geq 25 \mu\text{m}, < 100 \mu\text{m}$ (#/mL)	8	2	2	2

≥50 μm, < 100 μm (#/mL)	2	2	0	0
≥2 μm, < 100 μm (#/mL)	1267	994	235	4856
SEC (初始%)	100.0	91.2	78.7	63.3
IEX (初始%)	97.8	91.0	79.1	69.3

表 18

根據研究 4 調配物#3 在 40℃下加速穩定性研究之結果

調配物條件	F3 : 60.0 mg/ml 1008 於 15 mM 檸檬酸鹽、 9%蔗糖、0.05% PS80 中，pH 6.5			
時間	初始	2 週	4 週	6 週
藉由 MFI 的微粒				
≥10 μm, < 100 μm (#/mL)	10	22	16	28
≥25 μm, < 100 μm (#/mL)	0	0	0	2
≥50 μm, < 100 μm (#/mL)	0	0	0	0
≥2 μm, < 100 μm (#/mL)	959	782	897	2428
SEC (初始%)	100.0	94.0	84.8	77.7
IEX (初始%)	97.8	93.1	84.4	76.9

表 19

根據研究 4 調配物#4 在 40℃下加速穩定性研究之結果

調配物條件	F4 : 119.0 mg/ml 1008 於 15 mM 檸檬酸鹽、 9%蔗糖、0.05% PS80 中，pH 6.5			
時間	初始	2 週	4 週	6 週
藉由 MFI 的微粒				
≥10 μm, < 100 μm (#/mL)	12	24	4	16
≥25 μm, < 100 μm (#/mL)	0	0	0	4
≥50 μm, < 100 μm (#/mL)	0	0	0	2
≥2 μm, < 100 μm (#/mL)	366	581	384	2659
SEC (初始%)	100.0	92.5	79.1	63.6
IEX (初始%)	97.8	92.2	81.3	69.1

表 20

根據研究 4 調配物#7 在 40℃下加速穩定性研究之結果

調配物條件	F7 : 94.6 mg/ml 1008 於 15 mM 檸檬酸鹽、 5.4%蔗糖、0.05% PS80 中，pH 6.5			
時間	初始	2 週	4 週	6 週
微粒(MFI)				
≥10 μm, < 100 μm (#/mL)	14	20	6	6
≥25 μm, < 100 μm (#/mL)	0	0	0	0
≥50 μm, < 100 μm (#/mL)	0	0	0	0
≥2 μm, < 100 μm (#/mL)	626	1647	843	2896
SEC (初始%)	100.0	93.1	82.2	70.3
IEX (初始%)	97.9	92.5	82.6	71.5

表 21

根據研究 4 調配物#8 在 40°C 下加速穩定性研究之結果

調配物條件	F8 : 86.2 mg/ml 1008 於 15 mM 檸檬酸鹽、 9.6%蔗糖、0.05% PS80 中，pH 6.5			
時間	初始	2 週	4 週	6 週
藉由 MFI 的微粒				
≥10 μm, < 100 μm (#/mL)	4	18	8	8
≥25 μm, < 100 μm (#/mL)	0	0	0	0
≥50 μm, < 100 μm (#/mL)	0	0	0	0
≥2 μm, < 100 μm (#/mL)	533	1810	1281	2162
SEC (初始%)	100.0	93.3	83.2	73.8
IEX (初始%)	97.8	93.1	83.6	73.9

表 22

根據研究 4 調配物#9 在 40°C 下加速穩定性研究之結果

調配物條件	F9 : 91.7 mg/ml 1008 於 15 mM 檸檬酸鹽、 7.5%蔗糖、0.05% PS80 中，pH 6.5			
時間	初始	2 週	4 週	6 週
藉由 MFI 的微粒				
≥10 μm, < 100 μm (#/mL)	6	20	6	28
≥25 μm, < 100 μm (#/mL)	0	0	2	0
≥50 μm, < 100 μm (#/mL)	0	0	0	0
≥2 μm, < 100 μm (#/mL)	678	682	1068	4003
SEC (初始%)	100.0	93.8	83.0	71.0
IEX (初始%)	97.8	93.2	83.7	72.2

表 23

根據研究 4 調配物#10 在 40°C 下加速穩定性研究之結果

調配物條件	F10 : 89.5 mg/ml 1008 於 15 mM 檸檬酸鹽、 7.5%蔗糖、0.05% PS80 中，pH 6.5			
時間	初始	2 週	4 週	6 週
藉由 MFI 的微粒				
≥10 μm, < 100 μm (#/mL)	18	10	22	44
≥25 μm, < 100 μm (#/mL)	0	2	4	0
≥50 μm, < 100 μm (#/mL)	0	0	0	0
≥2 μm, < 100 μm (#/mL)	352	638	1068	2536
SEC (初始%)	100.0	93.9	83.4	72.0
IEX (初始%)	97.9	93.5	83.7	72.9

實例 3

探索性穩定性研究

對照調配物

【0107】 對在 pH 6.25 下於 20 mM 檸檬酸、0.001% PS20 中之 60 mg/ml 1008 溶液的調配物作為對照進行探索性穩定性。將對照調配物經 0.2 μ m 注射器過濾器過濾且在 40°C 下、環境室溫、及冰箱中儲存。對於 40°C 樣本在 0、2 週及 5 週取出樣本，且對於儲存在環境室溫及冰箱的樣本在 26 週取出樣本。藉由 A280、SEC、IEX CGE 及 ELISA 測試所選的穩定性樣本之 pH、滲透壓、含量。結果示出於表 24 中。

表 24

對照調配物(在 pH6.25 下 60 mg/ml 1008 於 20 mM 檸檬酸鹽、0.001% PS20 中)之探索性穩定性結果

溫度	40°C			RT	2-8°C
時間(週)	0	2	5	26	26
藉由 A280 的濃度 (mg/ml)	na	62	61*	na	na
pH	na	6.297	6.333	na	na
滲透壓	na	312	310	na	na
SEC (初始%)	100	90.6	75.6	88.8	99.4
IEX (初始%)	100	91.3	70.9	88.5	99.3
CGE	na	99.3	98.3	na	na
ELISA	na	na	1.0	na	na

*目視觀察到樣本為混濁具有白色沉澱。

【0108】 對於在 pH 6.25 下於 20 mM 檸檬酸鹽、0.001% PS20 及 0.73% NaCl 中之 60 mg/ml 1008 溶液進行對照調配物之另一研究。將調配物經 0.2 μ m 注射器過濾器過濾且於 40°C 中儲存。在 1 週、2 週、3 週、及 4 週將樣本取出用於 MFI 分析。結果示出於表 25 中。

表 25

在 40°C 下 POC 調配物(在 pH 6.25 下 60 mg/ml 1008 於 20 mM 檸檬酸鹽、0.001% PS20 中)之穩定性結果

時間(週)	0	1	2	3	4
$\geq 10 \mu$ m 藉由 MFI (#/mL)	na	172	894	2946	3183
$\geq 25 \mu$ m 藉由 MFI (#/mL)	na	23	157	539	1189
$\geq 50 \mu$ m 藉由 MFI (#/mL)	na	4	19	92	248
總計粒子藉由 MFI (#/mL)	na	2381	8954	29716	17705

具有 9% 蔗糖及 0.5% 聚山梨醇酯 80 的 60 mg/ml 1008 之探索性穩定性研究

【0109】 對含有9%蔗糖及0.5% PS80的60 mg/ml 1008調配物進行探索性穩定性。將調配物經0.2 μm注射器過濾器過濾且在40℃下儲存。在1.6週、2.9週及4週將樣本取出且藉由MFI、SEC及IEX分析。結果列表於表26中。

表 26

在 40℃下 60 mg/ml 1008 調配物(在 pH 6.25 下 60 mg/ml 1008 於 20 mM 檸檬酸鹽、9%蔗糖及 0.5% PS80 中)之穩定性結果

時間(週)	0	1.6	2.9	4
≥ 10 um 藉由 MFI (#/mL)	-	12	80	130
≥ 25 um 藉由 MFI (#/mL)	-	4	12	12
≥ 50 um 藉由 MFI (#/mL)	-	0	4	0
總 計 粒 子 藉 由 MFI (#/mL)	-	688	2900	4876
SEC (初始%)	98.4	93.3	88.6	84.1
IEX (初始%)	97.0	91.3	83.9	78.9

在 pH 6.25 下 60 mg/ml 1008、9%蔗糖、20 mM 檸檬酸鹽、0.1% PS80 之試驗性穩定性研究

【0110】 對如表27中所示的在pH 6.25下含有9%蔗糖、20 mM檸檬酸鹽、0.1% PS80的調配物進行60 mg/ml 1008溶液之即時穩定性研究。將穩定性樣本儲存在2-8℃、25℃、40℃及光箱(LC)下；亦使其經歷三個循環的凍融(FT)。根據表28中所示的方案取出樣本，且藉由各種分析方法諸如pH、滲透壓、MFI、含量、SEC、IEX、CGE及效力分析。

表27

試驗性穩定性調配物之組成

組成	濃度(W/V%)
1008	6
檸檬酸鹽，無水	0.012
檸檬酸三鈉(二水合)	0.57
蔗糖	9
聚山梨醇酯80	0.1
鹽酸或 氫氧化鈉	pH 6.25
注射用水	qs 100

表28

試驗性穩定性研究之儲存條件及取出方案

條件	取出
2-8℃ (冰箱)	0、4週、6.9週、8週、12週、及26週
25℃	2週、4週、6.9週、8週、12週、及26週
40℃	1.1週、2週、及4週
光箱(LC)	6週
凍融(FT)	3 個循環

【0111】 在早期階段，開始 60 mg/ml 1008 溶液之即時穩定性研究。如表 29 中所示，調配物含有在 pH 6.25 下 9%蔗糖、20 mM 檸檬酸鹽、0.1% PS80。將樣本儲存在 2-8℃、25℃、40℃及光箱(LC)下；亦使其經歷三個循環的凍融(FT)。根據表 30 中所示的方案取出樣本，且藉由各種分析方法分析。穩定性結果列表於表 31-33 中。

表 29

試驗性穩定性調配物 60 mg/ml 1008 (1008)溶液之組成

組成	濃度(W/V%)
1008	6
檸檬酸鹽，無水	0.012
檸檬酸三鈉(二水合)	0.57
蔗糖	9
聚山梨醇酯80	0.1
鹽酸或 氫氧化鈉	pH 6.25
注射用水	qs 100

表 30

試驗性穩定性研究之儲存條件及取出方案

條件	取出
2-8℃ (冰箱)	0、4 週、6.9 週、8 週、12 週、及 26 週
25℃	2 週、4 週、6.9 週、8 週、12 週、及 26 週
40℃	1.1 週、2 週、及 4 週
光箱(LC)	6 週
凍融(FT)	3 個循環

表 31

在 pH 6.25 下 6% 1008、9% 蔗糖、20 mM 檸檬酸鹽、0.1% PS80 之試驗性
穩定性研究之結果(部分 1/3)

溫度	2-8℃					
時間(週)	0	4	6.9	8	12	26
≥ 10 um 藉由 MFI (#/mL)	31	57	134	8	19	42
≥ 25 um 藉由 MFI (#/mL)	8	4	31	4	0	11
≥ 50 um 藉由 MFI (#/mL)	0	0	8	0	0	4
總計粒子藉由 MFI (#/mL)	1284	4620	6848	5916	1047	4976
外觀						
濃度(mg/ml)	58	64	66			
pH	6.197	6.184	6.184			
滲透壓	349	349	356			
UV 280 (mg/ml)						
SEC (初始%)	100			99.5	99.4	99.9
IEX (初始%)	100			99.3	99.3	98.9
CGE	99.83			99.7	99.5	
ELISA	0.86			1.2	0.97	1.1

表 32

在 pH 6.25 下 6% 1008、9% 蔗糖、20 mM 檸檬酸鹽、0.1% PS80 之試驗性
穩定性研究之結果(部分 2/3)

溫度	25℃					
時間(週)	2	4	6.9	8	12	26
≥ 10 um 藉由 MFI (#/mL)	46	50	206	27	38	157
≥ 25 um 藉由 MFI (#/mL)	4	4	50	4	0	19
≥ 50 um 藉由 MFI (#/mL)	0	0	11	0	0	0
總計粒子藉由 MFI (#/mL)	8186	6581	8679	2553	4143	10681
外觀						
濃度(mg/ml)	66	75	69			
pH	6.209	6.198	6.196			
滲透壓	356	353	350			
UV 280 (mg/ml)						
SEC (初始%)	99.3	98.1	95.8	95.2	93.8	86.6
IEX (初始%)	99.8	97.2	95.0	94.2	91.5	85.7
CGE	99.6	99.7		99.6	99.3	
ELISA	-	-	-	1.1	0.92	1.1

表 33

在 pH 6.25 下 6% 1008、9%蔗糖、20 mM 檸檬酸鹽、0.1% PS80 之試驗性
穩定性研究之結果(部分 3/3)

溫度	40℃				LC	FT
時間(週)	0	1.1	2	4	6	3 個循環
≥ 10 um 藉由 MFI (#/mL)	31	34	161	88	287	138
≥ 25 um 藉由 MFI (#/mL)	8	4	50	15	31	19
≥ 50 um 藉由 MFI (#/mL)	0	0	15	4	0	0
總計粒子藉由 MFI (#/mL)	1284	3871	6306	29372	16081	8415
外觀				觀察到混濁、白色沉澱物	黃色	
濃度(mg/ml)	58	66	65	74	57	63
pH	6.20	6.18	6.22	6.24	6.16	6.19
滲透壓(mOsm/Kg)	349	348	350	353	353	349
UV 280 (mg/ml)						
SEC (初始%)	100	95.6	88.6	72.9	10.5	100
IEX (初始%)	100	98.1	89.1	71.3	n/a	100
CGE	99.8	99.8	99.0	98.6	34.9	99.5
ELISA	0.86	-	-	0.87		

檸檬酸緩衝劑中：60 mg/ml 1008於15mM檸檬酸鹽/6.75%蔗糖/0.05% PS80 /pH 6.75的探索性穩定性

【0112】 對60 mg/ml1008於15mM檸檬酸鹽/6.75%蔗糖/0.05% PS80 /pH6.75之調配物進行檸檬酸鹽緩衝劑中的探索性穩定性。將穩定性樣本儲存在5℃及25℃下，以及經歷凍融循環。根據下表中所示的方案取出樣本，且分析外觀、pH、滲透壓、MFI、含量、SEC、及IEX。

表34

臨時穩定性研究之儲存條件及取出方案

條件	取出
25℃	0、1個月、3個月、6個月、及9個月
5℃	3個月、6個月、及9個月
凍融(FT)	3個循環

【0113】 類似地，對60 mg/ml 1008於15mM組胺酸/6.75%蔗糖/0.05% PS80 /pH6.75之調配物進行組胺酸緩衝劑中的探索性穩定性。將穩定性樣本儲存在5℃及25℃下。亦使樣本經歷凍融循環。根據下表中所示的方案取出

樣本，且分析外觀、pH、滲透壓、MFI、含量、SEC、及IEX。

表35

臨時穩定性研究之儲存條件及取出方案

條件	取出
25°C	0、1個月、3個月、及6個月
5°C	3個月及6個月
凍融(FT)	3 個循環

【0114】 實驗資料列表於下表中。

表 36 在 25°C 下 60 mg/ml 1008 於 15 mM 檸檬酸鹽/6.75%蔗糖/0.05% PS80 /pH6.75 中之臨時穩定性研究之結果(部分 1/2)

時間(月)	初始	1	3	6	9
微粒					
≥ 10 um 藉由 MFI (#/mL)	28	42	49	70	
≥ 25 um 藉由 MFI (#/mL)	3	0	3	3	
≥ 50 um 藉由 MFI (#/mL)	0	0	0	0	
總計粒子藉由 MFI (#/mL)	400	1819	2279	8355	
≥ 10 um 藉由 HIAC (#/mL)	218.3				
≥ 25 um 藉由 HIAC (#/mL)	38.7				
≥ 50 um 藉由 HIAC (#/mL)	7.0				
總計粒子藉由 HIAC (#/mL)	11170				
外觀					
顏色	無色	無色	無色	無色	
澄清度	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1	
pH	6.74	6.72	6.76		
滲透壓(mOsm)	320				
SEC (初始%)	99.9 (%面積)	98.6	94.2	97.4	
IEX (初始%)	97.0 (%面積)	98.4	94.2	91.0	89.9

表 37

60 mg/ml 1008 於 15 mM 檸檬酸鹽/6.75%蔗糖/0.05% PS80 /pH6.75 中之臨時穩定性研究之結果(部分 2/2)

條件	5°C			凍融
時間(月)	3	6	9	3 個循環
微粒				
≥ 10 um 藉由 MFI (#/mL)	56	63		24
≥ 25 um 藉由 MFI (#/mL)	14	6.95		3
≥ 50 um 藉由 MFI (#/mL)	0	0		0
總計粒子藉由 MFI (#/mL)	1092	6322		29052
≥ 10 um 藉由 HIAC (#/mL)				441
≥ 25 um 藉由 HIAC (#/mL)				67

≥ 50 um 藉由 HIAC (#/mL)				18
總計粒子藉由 HIAC (#/mL)				27700
外觀				
顏色	無色	無色		ND
澄清度	NMT EP1	NMT EP1		ND
pH	6.72	-		6.71
滲透壓(mOsm)	-	-		306
SEC (初始%)	99.8	99.8		99.7
IEX (初始%)	100.0	99.4	99.9	99.5

表 38

在 25℃ 下 60 mg/ml 1008 於 15 mM 組胺酸/6.75%蔗糖/0.05% PS80 /pH6.75 中之臨時穩定性研究之結果(部分 1/2)

時間(月)	初始	1	3	6
微粒				
≥ 10 um 藉由 MFI (#/mL)	14	642	153	56
≥ 25 um 藉由 MFI (#/mL)	3	54	14	3
≥ 50 um 藉由 MFI (#/mL)	0	4	0	0
總計粒子藉由 MFI (#/mL)	302	20483	9805	13374
≥ 10 um 藉由 HIAC (#/mL)	1493			
≥ 25 um 藉由 HIAC (#/mL)	127			
≥ 50 um 藉由 HIAC (#/mL)	15			
總計粒子藉由 HIAC (#/mL)	17341			
外觀				
顏色	無色	無色	無色	無色
澄清度	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1
pH	6.72	6.70	6.70	
滲透壓(mOsm)	286			
SEC (初始%)	99.9 (%面積)	98.3	93.6	97.5
IEX (初始%)	97.1 (%面積)	97.9	92.5	87.8

表 39

60 mg/ml 1008 於 15 mM 組胺酸/6.75%蔗糖/0.05% PS80 /pH6.75 中之臨時穩定性研究之結果(部分 2/2)

條件	5℃		凍融
時間(月)	3	6	3 個循環
微粒			
≥ 10 um 藉由 MFI (#/mL)	167	59	17
≥ 25 um 藉由 MFI (#/mL)	10	7	0
≥ 50 um 藉由 MFI (#/mL)	3	0	0

總計粒子藉由 MFI (#/mL)	17404	7368	7607
≥ 10 um 藉由 HIAC (#/mL)			756
≥ 25 um 藉由 HIAC (#/mL)			175
≥ 50 um 藉由 HIAC (#/mL)			51
總計粒子藉由 HIAC (#/mL)			27698
外觀			
顏色	無色	無色	ND
澄清度	NMT EP1	NMT EP1	ND
pH	6.70		6.70
滲透壓(mOsm)	-	-	271
SEC (初始%)	99.7	100.0	99.9
IEX (初始%)	99.2	99.2	99.2

【0115】 實驗資料指明，相較於在60 mg/ml之蛋白質濃度下的對照調配物之穩定性，所測試的調配物之穩定性顯著提高，特定言之在抑制微粒物質之形成中。

【0116】 如表40中所示，經鑑定穩定溶液調配物含有15 mM檸檬酸鹽/6.75%蔗糖/0.0505% PS80。

表 40

組成	濃度(W/V%)	濃度範圍(W/V%)
1008	12	6-12
檸檬酸鹽，無水	0.009	0.006 – 0.012
檸檬酸三鈉(二水合)	0.428	0.285 – 0.57
蔗糖	6.75	6.75
聚山梨醇酯 80	0.05%	0.05%
鹽酸或 氫氧化鈉	pH 6.75	pH 6.75
注射用水	qs 100	qs 100

【0117】 已詳細描述本發明及其實施例。然而，本發明之範疇並不意欲限制說明書中所述的製程、製造、物質之組成、化合物、方式、方法、及/或步驟之具體實施例。可對所揭露的材料做出各種修改、替代、及變化而不背離本發明之精神及/或基本特徵。因此，所屬技術之一般技藝人士根據本揭露將容易地理解，可根據本發明之此類相關實施例使用隨後的修改、替代、及/或變化，所述修改、替代、及/或變化進行與本文所述之實施例實質上相同的功能或達成與本文所述之實施例實質上相同的結果。因此，以下申請專利範圍意欲在其範疇內涵蓋對本文所揭露之製程、製造、物質之組成、化合物、方式、及/或步驟的修改、替代、及變化。除非對其

作用另有說明，否則申請專利範圍不應理解為限制所述順序或元件。應理解，可對形式及細節做出各種變化而不背離所附申請專利範圍之範疇。

【符號說明】

(無)

申請專利範圍

1. 一種水性眼用醫藥組合物，其包含(i)至少 60 mg/ml 抗 VEGF 抗體，該抗 VEGF 抗體包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 2 之序列，(ii)蔗糖或海藻糖，(iii)檸檬酸鹽或組胺酸緩衝劑，及(iv)作為界面活性劑的聚山梨醇酯 80，其中在該水性眼用醫藥組合物中 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 直徑之粒子的最大數目為 50/mL。
2. 如請求項 1 之水性眼用醫藥組合物，其包含約 4.5%至 11% (w/v)蔗糖或約 5%至 10% (w/v)海藻糖、0.006%至 0.012%檸檬酸(w/v)、0.2 至 0.6 二水合檸檬酸三鈉(w/v)、及 0.01%至 0.1%聚山梨醇酯 80 (w/v)，其中該組合物之 pH 為約 6.3 至約 7.3。
3. 如請求項 2 之水性眼用醫藥組合物，其中該組合物之 pH 為約 6.8。
4. 如請求項 1 之水性眼用醫藥組合物，其中該抗體包含 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 之序列。
5. 如請求項 1 之水性眼用醫藥組合物，其中該抗 VEGF 抗體之濃度為約 60 mg/ml，蔗糖之濃度為約 6.75% (w/v)，檸檬酸之濃度為約 0.01% (w/v)，二水合檸檬酸三鈉之濃度為約 0.428% (w/v)，且聚山梨醇酯 80 之濃度為約 0.05% (w/v)。
6. 如請求項 5 之水性眼用醫藥組合物，其中該抗 VEGF 抗體包含 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 之序列，且 pH 為約 6.8。
7. 如請求項 1 之水性眼用醫藥組合物，其中該抗 VEGF 抗體之濃度為約 120 mg/ml，蔗糖之濃度為約 6.8% (w/v)，檸檬酸之濃度為約 0.01% (w/v)，二水合檸檬酸三鈉之濃度為約 0.428% (w/v)，且聚山梨醇酯 80 之濃度為約 0.05% (w/v)。
8. 如請求項 7 之水性眼用醫藥組合物，其中該抗 VEGF 抗體包含 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 之序列，且 pH 為約 6.8。
9. 一種遞送裝置，其包括如請求項 1 至 8 中任一項之水性眼用醫藥組合物。
10. 如請求項 9 之遞送裝置，其為預填充的注射器。
11. 一種如請求項 1 至 8 中任一項之水性醫藥組合物於製備藥劑之用途，該藥劑供用於治療由 VEGF 介導的眼部疾病或病症。

12. 如請求項 11 之用途，其中該眼部疾病或病症為眼部新生血管疾病。
13. 如請求項 12 之用途，其中該眼部新生血管疾病係選自於由下列組成之群組：異常的血管生成、脈絡膜新生血管形成(CNV)、視網膜血管透過性、視網膜水腫、糖尿病性視網膜病(具體而言增生性糖尿病性視網膜病)、糖尿病性黃斑水腫、新生血管(滲出性)年齡相關的黃斑變性(AMD)、包括與 nAMD (新生血管 AMD)相關聯的 CNV、與視網膜局部缺血相關聯的後遺症、中心視網膜靜脈阻塞(CRVO)、及後段新生血管形成。
14. 一種凍乾調配物，其係藉由將如請求項 1 至 8 中任一項之水性眼用醫藥組合物凍乾而製備。

圖式

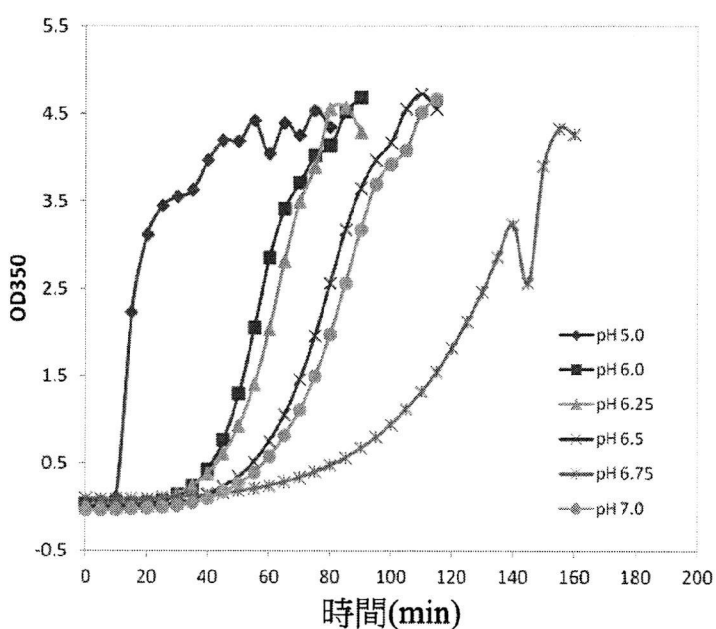


圖 1

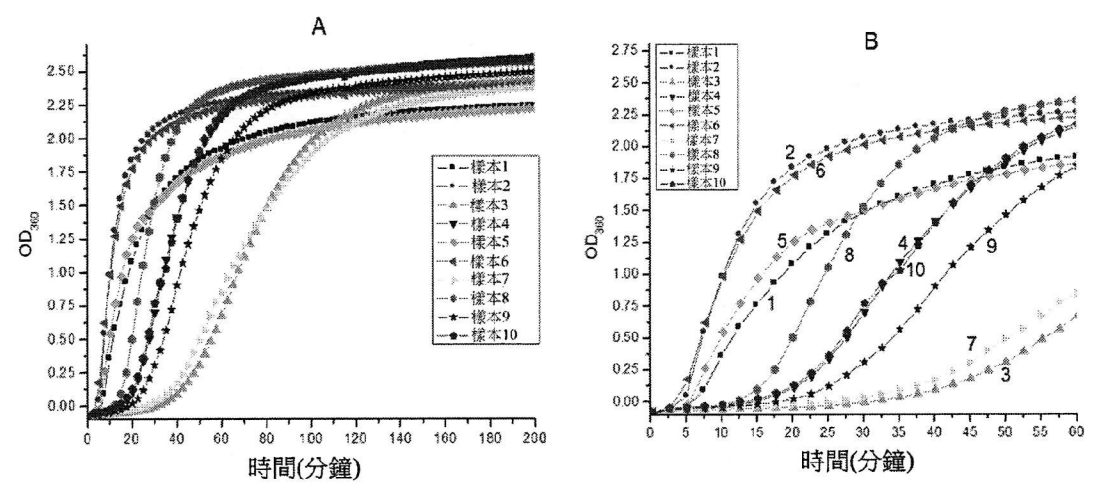


圖 2

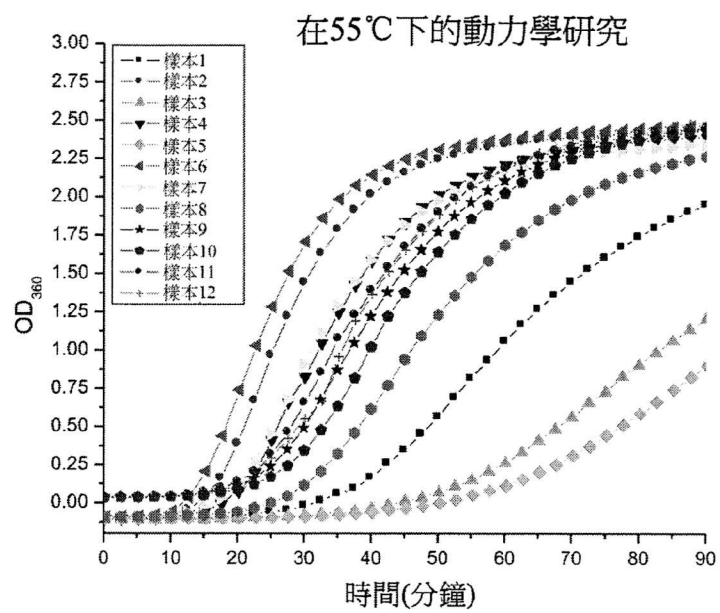


圖 3

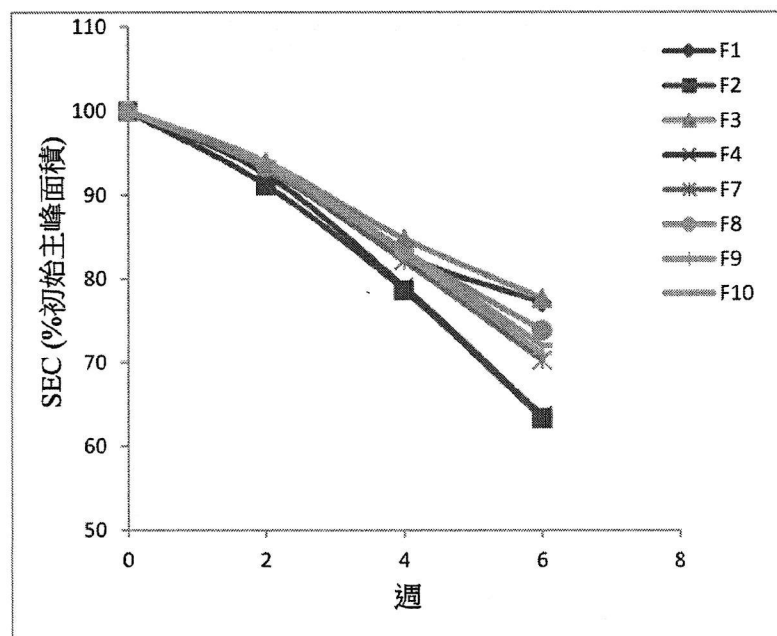


圖 4