



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202333787 A

(43) 公開日：中華民國 112 (2023) 年 09 月 01 日

(21) 申請案號：111146149

(22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 12 月 01 日

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

B01D15/26 (2006.01)

B01D15/42 (2006.01)

(30) 優先權：2021/12/01 日本

2021-195788

(71) 申請人：日商中外製藥股份有限公司 (日本) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (JP)

日本

瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

瑞士

(72) 發明人：副田康平 SOEDA, KOHEI (JP)；福田正和 FUKUDA, MASAKAZU (JP)；高橋昌也 TAKAHASHI, MASAYA (JP)；今井博貴 IMAI, HIROTAKA (JP)；齋藤智 SAITOH, SATOSHI (JP)；杜柏夫 傑瑞米 DUBOEUF, JEREMY (FR)；拉夫里基肖爾 RAVURI, KISHORE (IN)；柯普夫 羅伯特 KOPF, ROBERT (DE)；陳威 CHEN, WEI (NL)；奧爾特拉 努伊亞 桑喬 OLTRA, NURIA SANCHO (ES)

(74) 代理人：洪澄文；洪茂

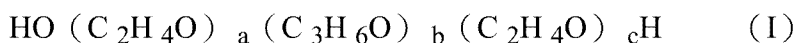
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：14 共 89 頁

(54) 名稱

含抗體製劑的調製方法

(57) 摘要

提供一種醫藥製劑，其已減少粒子的形成，所述粒子含有代替凝血因子 VIII 之抗凝血 IXa/X 因子抗體（雙特异性單株抗體）或阻礙與介白素 6 的受體的結合之抗 IL-6 受體抗體。提供一種醫藥製劑，其係包含含有聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（polyoxyethylene polyoxypropylene glycol）（泊洛沙姆（Poloxamer））之水溶液而成之醫藥製劑，泊洛沙姆係由式 I 所表示：



[式中，a 及 c 係獨立地選自 75 ~ 85 之整數，

b 係選自 22 ~ 33 之整數，

a、b 及 c 係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為 3% (w/w) 以上的比例包含在分子內含有 34 以上的 (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) 之泊洛沙姆分子。

指定代表圖：

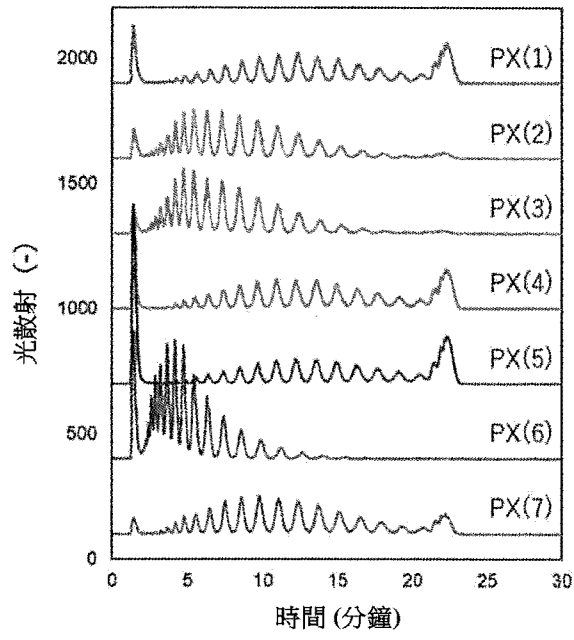


圖 1

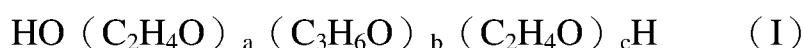


## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 含抗體製劑的調製方法  
【英文發明名稱】 METHOD FOR PREPARING ANTIBODY-CONTAINING FORMULATION

### 【中文】

提供一種醫藥製劑，其已減少粒子的形成，所述粒子含有代替凝血因子VIII之抗凝血IXa/X因子抗體（雙特異性單株抗體）或阻礙與介白素6的受體的結合之抗IL-6受體抗體。提供一種醫藥製劑，其係包含含有聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（polyoxyethylene polyoxypropylene glycol）（泊洛沙姆（Poloxamer））之水溶液而成之醫藥製劑，泊洛沙姆係由式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之整數，

b係選自22~33之整數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為3%（w/w）以上的比例包含在分子內含有34以上的（C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O）之泊洛沙姆分子。

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 含抗體製劑的調製方法

【英文發明名稱】 METHOD FOR PREPARING ANTIBODY-CONTAINING FORMULATION

### 【技術領域】

【0001】 本發明係關於含有抗體之穩定的醫藥製劑。

### 【先前技術】

【0002】 近年來，正開發各種抗體製劑並供實際使用，但在含抗體製劑中，會在水溶液中形成粒子一事成為問題。作為形成之粒子，為源自抗體之凝聚體，已知一般而言肉眼難見之 $1.5\ \mu\text{m}$ ~小於 $50\ \mu\text{m}$ 的粒徑的微粒亦即亞可見粒子（sub-visible particle，SVP）、在標準照度（ $2,000\sim 3,000\text{l x}$ 左右）下能藉由目視檢測的可見粒子（visible particle，VP，大於 $100\ \mu\text{m}$ ）等。此外，醫藥製劑中之可見粒子的由目視所進行之檢測率，依據實施者而差異大，但已報導在日本藥局方所規定之標準照度（ $2,000\sim 3,000\text{l x}$ 左右）下， $100\ \mu\text{m}$ 的粒徑的粒子的檢測感度為40%左右， $150\ \mu\text{m}$ 的粒徑的粒子的檢測感度為70%左右， $200\ \mu\text{m}$ 的粒徑的粒子的檢測感度幾乎成為100%（非專利文獻1）。又，藉由提高觀察醫藥製劑之照度、增長觀察時間，而實際上亦能以目視檢測至最小 $40\ \mu\text{m}$ 左右的更小粒徑的粒子。

【0003】 為了減少粒子的形成，已知使用界面活性劑。作為此種界面活性劑，可列舉包含泊洛沙姆（Poloxamer）188（PX188）等泊洛沙姆以及聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80等聚山梨醇酯之非離子性界面活性劑。但是，減少粒子形成的能力係依據界面活性劑的種類及等級而異（非專利文獻2~4、專利文獻1）。

第 1 頁，共 68 頁(發明說明書)

P220181300TWF

又，已知即使為同種類的界面活性劑，所含之高分子的結構亦不均一。已知泊洛沙姆188在批次間會有偏差，正研究用於提供更均一的泊洛沙姆188之方法（非專利文獻2、專利文獻2~5）。再者，作為界面活性劑的不均一性的結果，已報導所產生之疏水度的不同有可能影響粒子的形成（非專利文獻2）

[先行技術文獻]

[專利文獻]

**【0004】**

[專利文獻1] 日本特表2020—534260號公報

[專利文獻2] 日本特表2017—523828號公報

[專利文獻3] 日本特表2019—511606號公報

[專利文獻4] 日本特表2009—508132號公報

[專利文獻5] 日本特表2014—502656號公報

[非專利文獻]

**【0005】**

[非專利文獻1] James A. Melchore, AAPS PharmSciTech; 2011; 12 (1) : 215-221.

[非專利文獻2] Chen et al., J. Chromatogr. A 1652 (2021) 462353.

[非專利文獻3] Grapentin et al., J. Pharm. Sci. 109 (2020) 2393-2404.

[非專利文獻4] Vaclaw et al., J. Pharm. Sci. 110 (2021) 746-759.

**【發明內容】**

[發明所欲解決的問題]

**【0006】** 在代替凝血因子VIII之抗凝血IXa/X因子抗體（雙特異性單株抗體）或阻礙與介白素6的受體的結合之抗IL-6受體抗體中，尚未知界面活性劑

第2頁，共68頁(發明說明書)

P220181300TWF

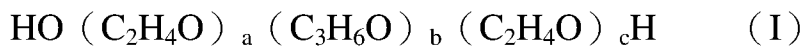
的疏水度為何種程度才會減少粒子的形成。又，對於粒子的形成，尚未知包含界面活性劑之溶液的表面張力及界面活性劑所含之不純物（例如，具有不飽和鍵之未反應的中間化合物等）的影響。正要求用於抑制粒子產生之最佳的界面活性劑。

[用以解決問題的手段]

【0007】 本發明人等發現，為了在包含特定抗體之醫藥製劑中減少粒子的形成，添加聚環氧丙烷嵌段長且含有疏水度高的成分之泊洛沙姆等界面活性劑是有效的。本說明書包含以下的發明的開示。

【0008】 [1-1]一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，所述水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（polyoxyethylene polyoxypropylene glycol）（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~40之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

其係在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中，相對於全峰面積，溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙烯基苯（styrene divinylbenzene）之HPLC管柱（1000Å，5 μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出配程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

(6) 管柱溫度：65±5°C

(7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

【0009】 [1-2]如[1-1]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自22~33之數。

[1-3]如[1-1]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自25~30之數。

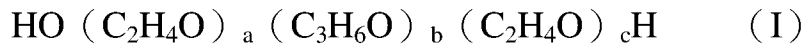
[1-4]如[1-1]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自35~40之數。

【0010】 [1-5]如[1-1]~[1-4]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，17分鐘以後的峰面積為6%以上、19%以上、33%以上或35%以上。

[1-6]一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，所述水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：

第4頁，共68頁(發明說明書)



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~40之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

其係在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中，相對於1.5分鐘以後的全峰面積，溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙基苯之HPLC管柱（1000Å，5 μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出配程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

(6) 管柱溫度：65±5°C

(7) 泊洛沙姆濃度 (超純水中) :  $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 。

【0011】 [1-7]如[1-6]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自22~33之數。

[1-8]如[1-6]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自25~30之數。

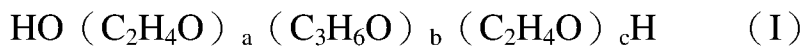
[1-9]如[1-6]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自35~40之數。

【0012】 [1-10]如[1-6]~[1-9]所記載之醫藥製劑，其中，17分鐘以後的峰面積為6%以上、20%以上、36%以上或46%以上。

[1-11]如[1-1]~[1-10]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，已填充大孔型苯乙烯二乙烯基苯之HPLC管柱為PLRP-S管柱。

【0013】 [1-12]一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，所述水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙二醇 (泊洛沙姆)，

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~40之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為3% (w/w) 以上的比例包含在分子內含有34以上的 (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) 之泊洛沙姆分子。

【0014】 [1-13]如[1-12]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自22~33之數。

[1-14]如[1-12]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自25~30之數。

【0015】 [1-15]如[1-12]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自35~40之數。

[1-16]如[1-12]~[1-15]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，相對於泊洛沙姆整體，以6%、20%、29%或36% (w/w) 以上的比例包含在分子內包含

34以上的(C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)之泊洛沙姆分子。

**【0016】** [1-17]如[1-1]~[1-16]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，泊洛沙姆的數量平均分子量被包含在7680~9510的範圍。

[1-18]如[1-1]~[1-17]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，水溶液中的泊洛沙姆的濃度為0.001~100mg/mL、0.01~10mg/mL、0.05~5mg/mL或0.1~1mg/mL。

**【0017】** [1-19]如[1-1]~[1-18]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，水溶液中的抗體的濃度為10~300mg/mL、20~200mg/mL或30~150mg/mL。

**【0018】** [1-20]如[1-1]~[1-19]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，水溶液包含選自糖、糖醇、緩衝劑、保存劑、載體、抗氧化劑、螯合劑、天然聚合物、合成聚合物、冷凍保護劑、增量劑及穩定化劑之1以上的藥學上可容許之賦形劑。

**【0019】** [1-21]如[1-1]~[1-20]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，泊洛沙姆為泊洛沙姆188或泊洛沙姆237。

[2-1]一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，所述水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及界面活性劑，

界面活性劑係含有0.5mg/mL的濃度的該界面活性劑之水溶液具有52.3mN/m以下的表面張力之界面活性劑。

**【0020】** [2-2]如[2-1]所記載之醫藥製劑，其中，界面活性劑係含有0.5mg/mL的濃度的該界面活性劑之水溶液具有52mN/m以下、51mN/m以下、50.7mN/m以下、50.5mN/m以下或39mN/m以下的表面張力之界面活性劑。

**【0021】** [2-3]如[2-1]或[2-2]所記載之醫藥製劑，其中，界面活性劑選

自泊洛沙姆或脂肪酸聚氧乙烯山梨醇酐（聚山梨醇酯）。

[2-4]如[2-1]~[2-3]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，界面活性劑為如[1-1]~[1-4]或[1-21]中任一者所記載之式I所表示之泊洛沙姆。

**【0022】** [2-5]如[2-3]所記載之醫藥製劑，其中，泊洛沙姆為泊洛沙姆188或泊洛沙姆237。

[2-6]如[2-4]或[2-5]所記載之醫藥製劑，其中，泊洛沙姆的數量平均分子量被包含在7680~9510的範圍。

**【0023】** [2-7]如[2-1]~[2-6]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，界面活性劑係選自聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯65或聚山梨醇酯80之聚山梨醇酯。

**【0024】** [2-8]如[2-1]~[2-7]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，界面活性劑係選自聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80之山梨醇酯。

[2-9]如[2-1]~[2-8]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，界面活性劑為聚山梨醇酯80。

**【0025】** [2-10]如[2-1]~[2-9]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，水溶液中的界面活性劑的濃度為0.001~100mg/mL、0.01~10mg/mL、0.05~5mg/mL或0.1~1mg/mL。

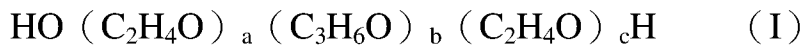
**【0026】** [2-11]如[2-1]~[2-10]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，水溶液中的抗體的濃度為10~300mg/mL、20~200mg/mL或30~150mg/mL。

**【0027】** [2-12]如[2-1]~[2-11]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，水溶液包含選自糖、糖醇、緩衝劑、保存劑、載體、抗氧化劑、螯合劑、天然聚合物、合成聚合物、冷凍保護劑、增量劑及穩定化劑之1以上的藥學上可容許之賦形劑。

**【0028】** [3-1]一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，所述水

溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~40之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

泊洛沙姆的不飽和度係小於0.018mEq/g。

**【0029】** [3-2]如[3-1]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自22~33之數。

[3-3]如[3-1]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自25~30之數。

[3-4]如[3-1]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自35~40之數。

**【0030】** [3-5]如[3-1]~[3-4]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，泊洛沙姆的數量平均分子量被包含於7680~9510的範圍。

[3-6]如[3-1]~[3-5]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，水溶液中的泊洛沙姆的濃度為0.001~100mg/mL、0.01~10mg/mL、0.05~5mg/mL或0.1~1mg/mL。

**【0031】** [3-7]如[3-1]~[3-6]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，水溶液中的抗體的濃度為10~300mg/mL、20~200mg/mL或30~150mg/mL。

**【0032】** [3-8]如[3-1]~[3-7]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，水溶液包含選自糖、糖醇、緩衝劑、保存劑、載體、抗氧化劑、螯合劑、天然聚合物、合成聚合物、冷凍保護劑、增量劑及穩定化劑之1以上的藥學上可容許之賦形劑。

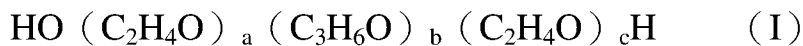
**【0033】** [3-9]如[3-1]~[3-8]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，泊洛

沙姆為泊洛沙姆188或泊洛沙姆237。

[4-1]一種方法，其係在水溶液中包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，所述單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

該方法包含在水溶液中添加聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~40之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

並且，包含在水溶液中添加在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中相對於全峰面積而溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上之泊洛沙姆：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙基苯之HPLC管柱（1000Å，5 μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出梯度程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

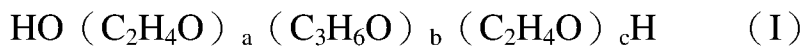
(6) 管柱溫度：65±5°C

(7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

**【0034】** [4-2]一種方法，其係在水溶液中包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，所述單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

該方法包含在水溶液中添加聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~40之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

並且，包含在水溶液中添加在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中相對於1.5分鐘以後的全峰面積而溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上之泊洛沙姆：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙烯基苯之HPLC管柱（1000Å，5 μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出梯度程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

(6) 管柱溫度：65±5°C

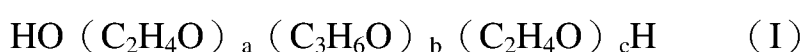
(7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

**【0035】** [4-3]如[4-1]或[4-2]所記載之方法，其中，已填充大孔型苯乙烯二乙基苯之HPLC管柱為PLRP-S管柱。

[4-4]一種方法，其係在包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，所述單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

其中，包含在水溶液中添加聚氧乙烯聚氧丙稀二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~40之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為3% (w/w) 以上的比例包含在分子內含有34以上的 (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) 之泊洛沙姆分子。

**【0036】** [4-5]如[4-1]~[4-4]中任一者所記載之方法，其中，b係選自22~33之數。

[4-6]如[4-1]~[4-4]中任一者所記載之方法，其中，b係選自25~30之數。

**【0037】** [4-7]如[4-1]~[4-4]中任一者所記載之方法，其中，b係選自35~40之數。

[4-8]如[4-1]~[4-7]中任一者所記載之方法，其中，泊洛沙姆為泊洛沙姆188或泊洛沙姆237。

**【0038】** [4-9]一種方法，其係在包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，所述單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

其中，包含在水溶液中添加在0.5mg/mL的濃度的界面活性劑水溶液中具有52.3mN/m以下的表面張力之界面活性劑作為界面活性劑。

**【0039】** [4-10]如[4-9]所記載之方法，其中，界面活性劑選自泊洛沙姆或脂肪酸聚氧乙炔山梨醇酐（聚山梨醇酯）。

[4-11]如[4-9]或[4-10]所記載之方法，其中，界面活性劑為如[1-1]~[1-4]或[1-21]中任一者所記載之式I所表示之泊洛沙姆。

**【0040】** [4-12]如[4-11]所記載之方法，其中，泊洛沙姆的數量平均分子量被包含於7680~9510的範圍。

[4-13]如[4-9]~[4-12]中任一者所記載之方法，其中，界面活性劑係選自聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯65或聚山梨醇酯80之聚山梨醇酯。

【0041】 [4-14]如[4-9]~[4-13]中任一者所記載之方法，其中，界面活性劑係選自聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80之聚山梨醇酯。

[4-15]如[4-9]~[4-14]中任一者所記載之方法，其中，界面活性劑為聚山梨醇酯80。

【0042】 [4-16]如[4-1]~[4-15]中任一者所記載之方法，其中，以在水溶液中成為0.001~100mg/mL、0.01~10mg/mL、0.05~5mg/mL或0.1~1mg/mL的濃度之方式添加界面活性劑。

【0043】 [4-17]如[4-1]~[4-16]中任一者所記載之方法，其中，水溶液中的抗體的濃度為10~300mg/mL、20~200mg/mL或30~150mg/mL。

【0044】 [4-18]如[4-1]~[4-17]中任一者所記載之方法，其中，水溶液包含選自糖、糖醇、緩衝劑、保存劑、載體、抗氧化劑、螯合劑、天然聚合物、合成聚合物、冷凍保護劑、增量劑及穩定化劑之1以上的藥學上可容許之賦形劑。

【0045】 [4-19]如[4-1]~[4-18]中任一者所記載之方法，其中，前述粒子係源自蛋白質。

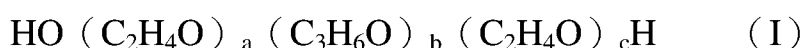
[4-20]如[4-1]~[4-19]中任一者所記載之方法，其中，前述粒子具有40  $\mu$ m以上的粒徑。

[5-1]一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，所述水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇(泊洛沙姆)，

泊洛沙姆的數量平均分子量被包含於7680~9510的範圍。

[5-2]如[5-1]所記載之醫藥製劑，其中，

泊洛沙姆係以式I所表示：



第 14 頁，共 68 頁(發明說明書)

[式中，a及c係獨立地選自60~85之數，

b係選自22~40之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]。

[5-3]如[5-2]所記載之醫藥製劑，其中，a及c係獨立地選自60~68之數。

[5-4]如[5-3]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自22~33之數。

[5-5]如[5-3]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自25~30之數。

[5-6]如[5-3]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自35~40之數。

[5-7]如[5-2]所記載之醫藥製劑，其中，a及c係獨立地選自75~85之數。

[5-8]如[5-7]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自22~33之數。

[5-9]如[5-7]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自25~30之數。

[5-10]如[5-7]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自35~40之數。

[5-11]如[5-2]所記載之醫藥製劑，其中，a及c係獨立地選自75~85之數，  
b係選自25~30之數。

[5-12]如[5-2]所記載之醫藥製劑，其中，a及c係獨立地選自60~68之數，  
b係選自35~40之數。

[5-13]

如[5-1]~[5-12]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中，相對於1.5分鐘以後的全峰面積，溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙基苯之HPLC管柱(1000Å，5μm，50×2.1mm)

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出配程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測醫藥製劑：蒸發光散射檢測（漂移管溫度： $50\pm 25^{\circ}\text{C}$ ，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

(6) 管柱溫度： $65\pm 5^{\circ}\text{C}$

(7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

[5-14]如[5-13]所記載之醫藥製劑，其中，在高速液體層析法中，相對於全峰面積，溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上。

[5-15]如[5-13]或[5-14]所記載之醫藥製劑，其中，17分鐘以後的峰面積為6%以上、19%以上、20%以上、33%以上、35%以上、36%以上或46%以上。

[5-16]如[5-13]~[5-15]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，已填充大孔型苯乙烯二乙烯基苯之HPLC管柱為PLRP-S管柱。

[5-17]如[5-1]~[5-16]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為3%（w/w）以上的比例包含在分子內含有34以上的（ $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ）之泊洛沙姆分子。

[5-18]如[5-1]~[5-17]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，泊洛沙姆以

相對於泊洛沙姆整體為6%、20%、29%或36% (w/w) 以上的比例包含在分子內含有34以上的 (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) 之泊洛沙姆分子。

[5-19]如[5-1]~[5-18]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，泊洛沙姆的不飽和度係小於0.018mEq/g。

[5-20]如[5-1]~[5-19]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，泊洛沙姆的數量平均分子量被包含於6840~8830的範圍。

[5-21]如[5-1]~[5-20]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，水溶液中的泊洛沙姆的濃度為0.001~100mg/mL、0.01~10mg/mL、0.05~5mg/mL或0.1~1mg/mL。

[5-22]如[5-1]~[5-21]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，水溶液中的抗體的濃度為10~300mg/mL、20~200mg/mL或30~150mg/mL。

[5-23]如[5-1]~[5-22]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，水溶液包含選自糖、糖醇、緩衝劑、保存劑、載體、抗氧化劑、螯合劑、天然聚合物、合成聚合物、冷凍保護劑、增量劑及穩定化劑之1以上的藥學上可容許之賦形劑。

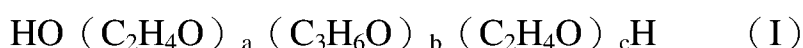
[5-24]如[5-1]~[5-23]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，泊洛沙姆為泊洛沙姆188或泊洛沙姆237。

[6-1]一種方法，其係在水溶液中包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，所述單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

其中，包含在水溶液中添加聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），泊洛沙姆的數量平均分子量被包含於7680~9510的範圍。

[6-2]如[6-1]所記載之方法，其中，

泊洛沙姆係以式I所表示：



第 17 頁，共 68 頁(發明說明書)

[式中，a及c係獨立地選自60~85之數，

b係選自22~40之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]。

[6-3]如[6-2]所記載之方法，其中，a及c係獨立地選自60~68之數。

[6-4]如[6-3]所記載之方法，其中，b係選自22~33之數。

[6-5]如[6-3]所記載之方法，其中，b係選自25~30之數。

[6-6]如[6-3]所記載之方法，其中，b係選自35~40之數。

[6-7]如[6-2]所記載之方法，其中，a及c係獨立地選自75~85之數。

[6-8]如[6-7]所記載之方法，其中，b係選自22~33之數。

[6-9]如[6-7]所記載之方法，其中，b係選自25~30之。

[6-10]如[6-7]所記載之方法，其中，b係選自35~40之數。

[6-11]如[6-2]所記載之方法，其中，a及c係獨立地選自75~85之數，b係選自25~30之數。

[6-12]如[6-2]所記載之方法，其中，a及c係獨立地選自60~68之數，b係選自35~40之數。

[6-13]如[6-1]~[6-12]中任一者所記載之方法，其中，包含在水溶液中添加在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中相對於1.5分鐘以後的全峰面積而溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上之泊洛沙姆：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙烯基苯之HPLC管柱(1000Å，5 μm，50×2.1mm)

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

## (3) 溶出梯度程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

## (4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度： $50\pm 25^{\circ}\text{C}$ ，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

(6) 管柱溫度： $65\pm 5^{\circ}\text{C}$ (7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）： $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 。

[6-14]如[6-13]所記載之方法，其中，在高速液體層析法中，相對於全峰面積，溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上。

[6-15]如[6-13]或[6-14]所記載之方法，其中，17分鐘以後的峰面積為6%以上、19%以上、20%以上、33%以上、35%以上、36%以上或46%以上。

[6-16]如[6-13]~[6-15]中任一者所記載之方法，其中，已填充大孔型苯乙烯二乙烯基苯之HPLC管柱為PLRP-S管柱。

[6-17]如[6-1]~[6-16]中任一者所記載之方法，其中，泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為3%（w/w）以上的比例包含在分子內含有34以上的（ $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ）之泊洛沙姆分子。

[6-18]如[6-1]~[6-17]中任一者所記載之方法，其中，泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為6%、20%、29%或36%（w/w）以上的比例包含在分子內

含有34以上的(C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)之泊洛沙姆分子。

[6-19]如[6-1]~[6-18]中任一者所記載之方法，其中，泊洛沙姆的不飽和度係小於0.018mEq/g。

[6-20]如[6-1]~[6-19]中任一者所記載之方法，其中，泊洛沙姆的數量平均分子量被包含於6840~8830的範圍。

[6-21]如[6-1]~[6-20]中任一者所記載之方法，其中，泊洛沙姆為泊洛沙姆188或泊洛沙姆237。

[6-22]一種方法，其係在水溶液中包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，所述單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

其中，包含在水溶液中添加在0.5mg/mL的濃度的界面活性劑水溶液中具有52.3mN/m以下的表面張力之界面活性劑作為界面活性劑。

[6-23]如[6-22]所記載之方法，其中，界面活性劑選自泊洛沙姆或脂肪酸聚氧乙烯山梨醇酐（聚山梨醇酯）。

[6-24]如[6-22]或[6-23]所記載之方法，其中，界面活性劑為如[6-2]~[6-12]或[6-21]中任一者所記載之式I所表示之泊洛沙姆。

[6-25]如[6-22]~[6-24]中任一者所記載之方法，其中，界面活性劑係選自聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯65或聚山梨醇酯80之聚山梨醇酯。

[6-26]如[6-22]~[6-25]中任一者所記載之方法，其中，界面活性劑係選自聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80之聚山梨醇酯。

[6-27]如[6-22]~[6-25]中任一者所記載之方法，其中，界面活性劑為聚山梨醇酯80。

[6-28]如[6-1]~[6-27]中任一者所記載之方法，其中，以在水溶液中成為0.001~100mg/mL、0.01~10mg/mL、0.05~5mg/mL或0.1~1mg/mL的

濃度之方式添加界面活性劑。

[6-29]如[6-1]~[6-28]中任一者所記載之方法，其中，水溶液中的抗體的濃度為10~300mg/mL、20~200mg/mL或30~150mg/mL。

[6-30]如[6-1]~[6-29]中任一者所記載之方法，其中，水溶液包含選自糖、糖醇、緩衝劑、保存劑、載體、抗氧化劑、螯合劑、天然聚合物、合成聚合物、冷凍保護劑、增量劑及穩定化劑之1以上的藥學上可容許之賦形劑。

[6-31]如[6-1]~[6-30]中任一者所記載之方法，其中，前述粒子係源自蛋白質。

[6-32]如[6-1]~[6-31]中任一者所記載之方法，其中，前述粒子具有40  $\mu\text{m}$ 以上的粒徑。

#### [發明功效]

【0046】 根據本發明的一態樣，提供已減少粒子的形成之包含水溶液之醫藥製劑，所述水溶液包含代替凝血因子VIII之抗凝血IXa/X因子抗體（雙特異性單株抗體）或阻礙與介白素6的受體的結合之抗IL-6受體抗體及界面活性劑。

#### 【圖式簡單說明】

##### 【0047】

圖1為表示經由逆相層析法所進行之7種類的PX188的成分的分析結果之層析圖。

圖2為表示7種類的PX188及1種類的PS80的表面張力值的測量結果之圖表。

圖3為表示在PX188所含之成分中之緩慢溶出物的比例（%）與表面張力值的相關性之圖表。

圖4表示機械應力（包含1組或4組的振動應力）的操作。

圖5表示賦予機械應力的操作。

圖6表示僅由具代表性的蛋白質所構成之粒子（Protein-only）及由蛋白質與聚二

甲基矽氧烷（PDMS）的複合體所構成之粒子（Protein-PDMS）的拉曼光譜。

圖7為表示PX188的緩慢溶出物的比例與在mAb1的熱應力條件下之粒子的產生率之相關性之圖表。

圖8為表示PX188的緩慢溶出物的比例與在mAb2的熱應力條件下之能藉由目視檢測的粒子的產生率之相關性之圖表。

圖9為分別表示PX188的緩慢溶出物的比例（%）、不飽和度（Unsaturation）及合成變數與在mAb1的機械應力條件下之能藉由目視檢測的粒子的產生率之相關性之圖表。

圖10係分別表示PX188的緩慢溶出物的比例、不飽和度（Unsaturation）及合成變數與在mAb2的機械應力條件下之能藉由目視檢測的粒子的產生率之相關性之圖表。

圖11為由PX188的界面吸附所進行之抗體保護的形象圖。

圖12為PX188的表面張力值的圖表。

圖13表示PX237的經由逆相層析法所進行之成分分析的結果。

圖14為表示PX237的表面張力值的測量結果之圖表。

## 【實施方式】

[用以實施發明的形態]

### 【0048】 1.抗體

本說明書中，用語「抗體」係以最廣的意義使用，且只要會表現所期望的抗原結合活性，則不受限於此等，但包含各種抗體結構，所述各種抗體結構包含單株抗體、多株抗體、多重特異性抗體（例如，雙重特異性抗體）及抗體片段。

【0049】 抗體的「類別（class）」係指抗體的重鏈所具備之恆定區或恆定

第 22 頁，共 68 頁(發明說明書)

區域的類型。抗體有5個主要的類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM。而且，其中一些亦可更進一步被分成亞類別（subclass）（同型）。例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。將與不同類別的免疫球蛋白對應之重鏈恆定區分別稱為 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 及 $\mu$ 。

**【0050】** 本說明書中，用語「單株抗體」係指能由實質上同質的抗體群所得之抗體。亦即，構成所述群之各個抗體係排除能產生之變異抗體（例如，包含自然產生的變異之變異抗體或在單株抗體調製物的製造中所產生之變異抗體。此種變異體通常存在些許的量）並與同一及／或相同表位（epitope）結合。對照於典型地包含針對不同決定基（表位）之不同抗體之多株抗體調製物，單株抗體調製物的各單株抗體係針對抗原上的單一決定基。因此，修飾語「單株」表示能由實質上同質的抗體群所得之抗體的特徵，不應被解釋為要求利用某種特定方法製造抗體。例如，遵循本發明所能使用之單株抗體並不受限於此等，但可藉由包含融合瘤法、重組DNA法、噬菌體展示法、利用包含人類免疫球蛋白基因座的全部或一部分之基因轉殖動物之方法之各種的手法而作成，用於製作單株抗體之此種方法及其他例示的方法被記載於本說明書。

**【0051】** 本說明書中，用語「Fc區域」係為了定義至少包含恆定區域的一部分之免疫球蛋白重鏈的C端區域而使用。此用語包含天然型序列的Fc區域及變異體Fc區域。

**【0052】** 用語「可變區域」或「可變區」係指與使抗體結合至抗原相關聯之抗體的重鏈或輕鏈的區。天然型抗體的重鏈及輕鏈的可變區（分別為VH及VL）通常具有包含保存4個各區之框架區域（FR）及3個超可變區域（HVR）之類似的結構。（例如參照Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91（2007））在1個VH或VL區中，足以賦予抗原結合特異性。再者，與某特定的抗原結合之抗體可使用來自與該抗原結合之抗體的可變區而分別篩

選VL或VH區的互補庫（complementary library）並進行分離。例如參照Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)。

**【0053】** 「框架（framework）」或「FR」係指超可變區域（HVR）殘基以外的可變區殘基。可變區的FR通常由4個FR區：FR1、FR2、FR3及FR4所構成。因應於此，HVR及FR的序列通常以下述順序出現在VH（或VL）：FR1—H1（L1）—FR2—H2（L2）—FR3—H3（L3）—FR4。

**【0054】** 本說明書中所能使用之用語「超可變區域」或「HVR」係指在序列中為超可變（「互補決定區域」或「CDR」（complementarity determining region））及／或形成結構上固定的環圈（loop）（「超可變環圈」）及／或包含抗原接觸殘基（「抗原接觸」）之抗體的可變區各區域。通常，抗體包含6個HVR：VH中為3個（H1、H2、H3）及VL中為3個（L1、L2、L3）。

**【0055】** 在本發明的一態樣中，抗體為（a）凝血IX因子（FIX）及／或活性化凝血IX因子（FIXa）以及（b）與凝血X因子（FX）及／或活性化凝血因子FX（FXa）特異性結合且模仿凝血因子VIII（FVIII）的輔助因子功能之雙重特異性抗體（例如，艾美賽珠單抗（emicizumab））、或阻礙與介白素6的受體的結合之抗IL—6受體抗體（例如，薩特利珠單抗（satralizumab）（SA237））。

**【0056】** 艾美賽珠單抗係具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之雙重特異性抗體。

本發明所使用之抗IL—6受體抗體係藉由與IL—6受體結合而阻礙IL—6對於IL—6受體的結合，並阻斷IL—6往生物學活性的細胞內的傳遞。作為此種抗IL—6受體抗體的例子，可列舉具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之單株抗體（薩特利珠單抗（SA237））。

**【0057】** 在本發明的一態樣中，抗體為包含嵌合、人源化（humanized）或人類抗體（human antibody）之單株抗體。在一態樣中，抗體例如為Fv、Fab、

Fab'、scFv、雙價抗體（diabody）或F（ab'）<sub>2</sub>片段等抗體片段。在另一態樣中，抗體例如為完全IgG1、IgG2、IgG3及IgG4抗體或本說明書所定義之其他抗體類別或同型的全長抗體。

**【0058】** 在本發明的一態樣中，作為所使用之單株抗體，不僅源自人類、小鼠、大鼠、倉鼠、兔、羊、駱駝、猴等動物的單株抗體，亦包含嵌合抗體、人源化抗體、雙特異性抗體等經人為改變之基因重組型抗體。再者，亦包含為了進行以改善血液滯留性或體內動態為目的之抗體分子的物性的改變（具體而言，等電點（pI）改變、Fc受體的親和性改變等）而人為改變抗體的恆定區域等而成之基因重組型抗體。

**【0059】** 在本發明的一態樣中，所使用之抗體可藉由習知的方法而製作。基本上可使用習知技術並如以下般進行而製作產生單株抗體之融合瘤。亦即，可藉由將所期望的抗原或表現所期望的抗原之細胞使用作為致敏化抗原，且遵循一般的免疫方法將其進行免疫，並藉由一般的細胞融合法而使所得之免疫細胞與習知的親細胞進行融合，並藉由一般的篩選法而篩選單株的抗體產生細胞（融合瘤）而製作。融合瘤的製作例如可依循Milstein人等的方法（Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46）等而進行。在抗原的免疫原性低之情形中，只要使其與白蛋白等具有免疫原性之巨大分子結合而進行免疫即可。

**【0060】** 又，可使用從融合瘤選殖抗體基因，裝入適當的載體，將此導入宿主，使用基因重組技術所產生之基因重組型抗體（例如參照Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, *THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES*, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990）。具體而言，使用反轉錄酵素從融合瘤的mRNA合成抗體的可變區域（V區域）的cDNA。若獲得編碼目標抗體的V區域之DNA，則將此與編碼所期望的抗體恆定

區域（C區域）之DNA連結，並將此裝入表現載體。或者，亦可將編碼抗體的V區域之DNA裝入包含抗體C區域的DNA之表現載體。將其裝入表現載體以在表現控制區域例如強化子、啟動子的控制下進行表現。接著，可藉由此表現載體而將宿主細胞進行轉形，使抗體表現。

**【0061】** 在本發明的一態樣中，可使用以使對於人類之異種抗原性降低等為目的而經人為改變之基因重組型抗體，例如，嵌合抗體、人源化抗體等。可使用既知的方法而製造此等改變抗體。嵌合抗體為由人類以外的哺乳動物例如小鼠抗體的重鏈、輕鏈的可變區域與人類抗體的重鏈、輕鏈的恆定區域所構成之抗體，且可藉由以下方式獲得：將編碼小鼠抗體的可變區域之DNA與編碼人類抗體的恆定區域之DNA連結，將此裝入表現載體並導入宿主而產生。

**【0062】** 人源化抗體亦被稱為再構成（reshaped）人類抗體，且為將人類以外的哺乳動物例如小鼠抗體的互補決定區域（CDR，complementarity determining region）移植至人類抗體的相補性決定區而成者，其一般的基因重組手法已為人所知。具體而言，藉由PCR法而從以在末端部具有重疊部分之方式所製作之多個寡核苷酸合成以將小鼠抗體的CDR與人類抗體的框架區域（framework region，FR）進行連結之方式所設計之DNA序列。藉由將所得之DNA與編碼人類抗體恆定區域之DNA進行連結，接著裝入表現載體，將此導入宿主並使其產生而得（參照歐洲專利申請公開第239400號、WO 96/02576）。透過CDR所連結之人類抗體的FR係選擇互補決定區域形成良好的抗原結合部位者。因應需要，亦可以再構成人類抗體的互補決定區域形成適當的抗原結合部位之方式，取代抗體的可變區域的框架區域的胺基酸（Sato, K.et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

**【0063】** 作為為了改善抗體的活性、物性、藥物動態、安全性等而取代抗體的胺基酸之技術，例如亦已知以下所述之技術，並且在本發明的一態樣中，

在所使用之抗體中亦包含已實施此種胺基酸的取代（亦包含缺損、加成等）而成之抗體。

【0064】 對IgG抗體的可變區域實施胺基酸取代之技術，已報導以人源化（Tsurushita N, Hinton PR、Kumar S. , Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax., Methods.2005 May;36（1）:69-83.）為首，用於使結合活性增強之由互補決定區域（CDR）的胺基酸取代所導致之親和力成熟（affinity maturation）（Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R. , A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries., Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 14;102（24）:8466-71.）、由框架（FR）的胺基酸取代所導致之物理化學的穩定性的提升（Ewert S, Honegger A, Pluckthun A. , Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. , Methods. 2004 Oct;34（2）:184-99. Review）。又，作為實施IgG抗體的Fc區域的胺基酸取代之技術，已知使抗體依賴性細胞毒性（ADCC）活性、補體依賴性細胞毒性（CDC）活性等增強之技術（Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., Mol Cells. 2005 Aug 31;20（1）:17-29. Review.）。再者，已報導不僅使此種效用功能（effector function）增強，亦使抗體的血中半衰期提升之Fc的胺基酸取代之技術（Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life.、J Immunol. 2006 Jan 1;176（1）:346-56.,Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., Nat Biotechnol. 1997 Jul;15（7）:637-40.）。再者，亦已知以抗體的物性改善為目的之恆定區域的各種胺基酸取代技術（WO 09/41613）。

第 27 頁，共 68 頁(發明說明書)

P220181300TWF

【0065】 又，亦已知人類抗體的取得方法。例如，亦可將人類淋巴球在活體外以所期望的抗原或表現所期望的抗原之細胞進行致敏化，並使致敏化淋巴球與人類骨髓瘤細胞例如U266進行融合，而獲得具有對於抗原的結合活性之所期望的人類抗體（參照日本特公第平1-59878號公報）。又，藉由將具有人類抗體基因的全部組庫（*repertoire*）之基因轉殖動物以抗原進行免疫，而可取得所期望的人類抗體（參照WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735）。再者，亦已知使用人類抗體庫並藉由淘選（*panning*）而取得人類抗體之技術。例如，可將人類抗體的可變區域作為單股抗體（*scFv*），藉由噬菌體展示法而使其在噬菌體的表面表現，而選擇與抗原結合之噬菌體。只要將所選擇之噬菌體的基因進行分析，便可決定編碼與抗原結合之人類抗體的可變區域之DNA序列。若得知與抗原結合之*scFv*的DNA序列，則可製作包含該序列之適當的表現載體，並取得人類抗體。此等方法已眾所周知，可參考WO 92/01047、WO 92/20791、WO 93/06213、WO 93/11236、WO 93/19172、WO 95/01438、WO 95/15388。在本發明的一態樣中，在所使用之抗體中亦包含此種人類抗體。

【0066】 在將抗體基因暫時分離並導入適當的宿主而製作抗體之情形中，可使用適當的宿主與表現載體之組合。使用真核細胞作為宿主之情形，可使用動物細胞、植物細胞、真菌細胞。作為動物細胞，已知（1）哺乳類細胞，例如CHO、COS、骨髓瘤、BHK（*baby hamster kidney*，小倉鼠腎臟）、HeLa、Vero；（2）兩生類細胞，例如爪蟾卵母細胞（*Xenopus oocyte*）；或（3）昆蟲細胞，例如sf9、sf21、Tn5等。作為植物細胞，已知源自菸草屬（*Nicotiana*）例如菸草（*Nicotiana tabacum*）的細胞，只要將此進行癒傷組織培養即可。作為真菌細胞，已知酵母例如酵母菌屬（*Saccharomyces*）例如釀酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、絲菌例如麴菌屬（*Aspergillus*）例如黑麴黴（*Aspergillus niger*）等。

使用原核細胞之情形，有使用細菌細胞之產生系統。作為細菌細胞，已知大腸桿菌（*E. coli*）、枯草桿菌。在此等細胞中，藉由轉形而導入目標的抗體基因，將經轉形之細胞在活體外進行培養，藉此能獲得抗體。

**【0067】** 再者，在醫藥製劑中所使用之抗體中包含抗體修飾物。例如，亦可使用已與聚乙二醇（PEG）、細胞毒性藥劑等各種分子結合之抗體（*Farmaco.* 1999 Aug 30;54（8）：497-516.、*Cancer J.* 2008 May-Jun;14（3）：154-69）。此種抗體修飾物可藉由對抗體施加化學性修飾而得。此等方法在此領域中已確立。

**【0068】** 在本發明的一態樣中，本公開中之抗體可為嵌合抗體。嵌合抗體例如被記載於US Patent No. 4,816,567、Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855（1984）等。嵌合抗體亦可包含非人類可變區域（例如，源自如猴般的非人類靈長類、或小鼠、大鼠、倉鼠或者兔等之可變區域）與人類的恆定區域。

**【0069】** 在本發明的一態樣中，本公開中之抗體可為人源化抗體。典型而言，非人類抗體係為了一邊維持親代的非人類抗體的特異性與親和性一邊使在人類中的免疫原性減少而被人源化。典型而言，人源化抗體包含一個以上的可變區域，其中存在HVR，例如源自非人類抗體之CDR（或其一部分）與源自人類抗體序列之FR（或其一部分）。人源化抗體可任意包含人類恆定區域的至少一部分。在一實施態樣中，人源化抗體內的FR的胺基酸殘基例如為了維持或改善抗體的特異性或親和性，而亦可被取代為非人類抗體（例如成為HVR殘基的來源之抗體）所對應之胺基酸殘基。

**【0070】** 人源化抗體及其製作方法，例如在以下綜述（Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633（2008）），再者，例如被記載於以下：Riechmann et al., *Nature* 332:323-329（1988）；Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033（1989）；US Patent Nos. 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, and

7,087,409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (describing specificity determining region (SDR) grafting); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (describing "resurfacing"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (describing "FR shuffling"); and Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) and Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (describing the "guided selection" approach to FR shuffling)。

**【0071】** 在本發明的一態樣中，被使用於人源化之人類框架例如可包含使用「最適 (best-fit)」法 (Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)) 所選擇之框架、源自重鏈或輕鏈的可變區域的某特定的亞群 (subgroup) 的人類抗體的共通序列 (consensus sequence) 之框架 (Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992) and Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993))、源自FR庫的篩選之框架區域 (Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 與 Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

**【0072】** 在本發明的一態樣中，本公開中之抗體可為人類抗體。可利用各種技術製作人類抗體。人類抗體例如在 van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-374 (2001)、Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008) 等中被概述。人類抗體可藉由對基因轉殖動物投予免疫原而製備，所述基因轉殖動物係以對抗原進行反應而產生完全人類抗體或具有人類可變區域之完全抗體的方式經改變之基因轉殖動物。該種動物典型而言包含人類免疫球蛋白基因座的全部或者一部分，人類免疫球蛋白基因座的全部或者一部分係取代內因性的免疫球蛋白基因座，或者以在染色體外或在被隨機裝入該動物的染色體內之狀態存在。在該種基因轉殖小鼠中，內因性的免疫球蛋白基因座通常被去活性化。作為從基因轉殖動物獲得人類抗體之方法的綜述，參照 Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。又，例如參照已記載 XENOMOUSE (商標) 技術之 US Patent

第 30 頁，共 68 頁(發明說明書)

P220181300TWF

No. 6,075,181、6,150,584號；已記載HUMAB（註冊商標）技術之US Patent No. 5,770,429；已記載K-M MOUSE（註冊商標）技術之US Patent No. 7,041,870；以及，已記載VELOCIMOUSE（註冊商標）技術之US2007/0061900。來自藉由此種動物所生成之完全抗體的人類可變區域，例如可與不同的人類恆定區域進行組合等而被進一步修飾。

**【0073】** 在本發明的另一態樣中，可利用基於融合瘤之方法而製作人類抗體。用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤細胞及小鼠－人類雜交骨髓瘤（heteromyeloma）細胞株被記述於以下（例如，Kozbor J. Immunol., 133: 3001（1984）；Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63（Marcel Dekker, Inc., New York, 1987）；及Boerner et al., J. Immunol., 147: 86（1991））。透過人類B細胞融合瘤技術所生成之人類抗體被記述於Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562（2006）。作為其他方法，可列舉例如US Patent No. 7,189,826（記載來自融合瘤細胞株的單株人類IgM抗體的製造）及Ni, Xiandai Mianyixue, 26（4）:265-268（2006）（記載人類－人類融合瘤）。人類融合瘤技術（三源雜交瘤（trioma）技術）被記載於Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20（3）:927-937（2005）及Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27（3）:185-91（2005）。

**【0074】** 在本發明的另一態樣中，人類抗體亦可藉由將選自源自人類的噬菌體展示庫之Fv殖株可變區序列進行分離而生成。此種可變區域序列後續可與所期望的人類恆定區域進行組合。從抗體庫選擇人類抗體之手法係參照以下。

**【0075】** 在本發明的一態樣中，本公開中之抗體可藉由針對具有所期望的1個或多個活性之抗體篩選組合庫而分離。在該技術領域中，例如已知噬菌體展示庫的製作方法、針對具有所期望的結合特性之抗體篩選該種庫之方法等。該

種方法係在Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) 中被綜述，再者，例如被記載於McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, *Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004); Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284 (1-2): 119-132 (2004)。

**【0076】** 在本發明的一態樣中之特定的噬菌體展示法中，VH及VL的組庫可藉由聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 而被個別地選殖，並隨機地在噬菌體庫中被再結合，該噬菌體庫可如Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994) 所記載般進行，並針對抗原結合噬菌體進行篩選。噬菌體例如提示scFv、Fab等抗體片段。來自經免疫化之供給源的庫不需要構築融合瘤便可提供針對免疫原之高親和性抗體。在另一實施態樣中，亦可如Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993) 所記載般，不進行免疫化地選殖初始組庫 (例如，從人類)，提供廣範圍的非自體或自體抗原的單一來源的抗體。再者，在另一實施態樣中，如Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992) 所記載般，從幹細胞選殖再編成前的V-基因部分 (V-gene segment)，並使用PCR引子，所述PCR引子包含編碼超可變區域CDR3且用於在活體外達成再構成之隨機序列，藉此亦可合成性的製作初始庫。已記載人類抗體噬菌體庫之專利文獻，可列舉例如US Patent No. 5,750,373、US2005/0079574、US2005/0119455、US2005/0266000、US2007/0117126、US2007/0160598、US2007/0237764、US2007/0292936、US2009/0002360。

**【0077】** 從人類抗體庫所分離之抗體或抗體片段，在本說明書中視為人類

抗體或人類抗體片段。

在本發明的一態樣中，本公開中之抗體為多重特異性抗體（例如，雙重特異性抗體）。多重特異性抗體為對至少2個不同的部位具有結合特異性之抗體（例如單株抗體）。在一實施態樣中，結合特異性之一是針對抗原，其他則是針對另外的抗原。在另一實施態樣中，雙重特異性抗體可與抗原不同的2個表位結合。雙重特異性抗體可為了在表現抗原之細胞中將細胞毒性劑局部存在化而使用。雙重特異性抗體可被製備作為全長抗體或作為抗體片段。

**【0078】** 作為多重特異性抗體的製作手法，並未被限定，但可列舉具有不同特異性之2個免疫球蛋白重鏈－輕鏈配對的重組共表現（例如Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)、WO93/08829及Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)）及knob-in-hole技術（例如US Patent No. 5,731,168）。多重特異性抗體可藉由以下方法而製作：為了製作Fc異二聚體分子而操作靜電轉向效果（electrostatic steering effects）（例如WO2009/089004A1）；將2個以上的抗體或抗體片段進行交聯（例如US Patent No. 4,676,980及Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)）；使用白胺酸拉鍊而作成具有2種特異性之抗體（例如Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5):1547-1553 (1992)）；使用「雙價抗體」技術而製作雙重特異性抗體片段（例如Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)）；使用scFv二聚體（例如Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)）；製備三重特異性抗體（例如Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991)）。再者，亦可為包含「章魚抗體（Octopus antibodies）」之以具有3個以上的功能性抗原結合部位之方式所操作之抗體（例如US2006/0025576）。

**【0079】** 在本發明的一態樣中，本公開中之抗體或其抗體片段可為「雙重作用Fab（Dual Acting Fab）」或「DAF」，其包含與抗原及別的不同抗原結合之1個抗原結合部位（例如US2008/0069820）。

**【0080】** 在本發明的一態樣中，本公開中之抗體的胺基酸序列的改變體（變異體）能藉由在編碼抗體的分子之核酸中導入適當的修飾、或合成肽而製備。此種修飾可在胺基酸序列中適當組合一或多個任意的胺基酸（殘基）的任意的缺失、插入、取代而進行。只要最終構築物具有所期望的特徵（例如，抗原結合性），則可利用缺失、插入、取代的任意的組合。

**【0081】** 在本發明的一態樣中，在提供已進行一或多個胺基酸取代之抗體改變體（變異體）之情形中，取代性變異導入的目標部位能包含HVR及FR。

在本發明的一態樣中，水溶液中的抗體的濃度可為10~300mg/mL、20~200mg/mL或30~150mg/mL的範圍。

**【0082】 2.界面活性劑**

在本發明的一態樣中，醫藥製劑中，作為界面活性劑，進一步包含泊洛沙姆188等泊洛沙姆、聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80等聚山梨醇酯、曲拉通（triton）（註冊商標）X-100及曲拉通X-114等曲拉通X、Brij（註冊商標）-35及Brij-58等Brij、Nonidet（商標）P-40、辛基葡萄糖苷、辛硫葡萄糖苷等非離子性界面活性劑，但不受限於此等。

**【0083】** 在本發明的一態樣中，醫藥製劑所添加之界面活性劑的添加量，一般而言為0.001~100mg/mL，較佳為0.01~10mg/mL，0.05~5mg/mL，再佳為0.1~1mg/mL。

**【0084】 （1）泊洛沙姆**

在本說明書中，泊洛沙姆為環氧乙烷與環氧丙烷的嵌段共聚物。在本說明書中，「聚環氧乙烷／聚環氧丙烷共聚物」、「PPC」、「PX」或「泊洛沙姆」意指一種嵌段共聚物，其係藉由以下的式Ia所表示：



並且，具有聚環氧丙烷（PPO）作為中央嵌段，且包含在其兩側具有聚環氧

乙烷 (PEO) 的嵌段之聚環氧丙烷 (PPO) 的中央嵌段。上述式中：a, b及c為平均的數，a及c可相同或不同。a及c分別為如藉由 (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O) 所表示之親水性部分 (亦即，共聚物的聚環氧乙烷部分) 構成共聚物的約60重量%~90重量%例如共聚物的70重量%~90重量%般的數；b為如藉由 (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)<sub>b</sub> 所表示之疏水性物質 (亦即，共聚物的聚環氧丙烷部分) 具有約950~4,000道耳頓 (Da) 例如約1,200~3,500Da、例如1,200~2,300Da、1,500~2,100Da、1,400~2,000Da或1,700~1,900Da的分子量般的數。例如，親水性部分的分子量能為5,000~15,000Da。具有上述通式之例示的泊洛沙姆係a或c為5~150的數且b為15~75的數之泊洛沙姆，例如a及c為約60~85之間的數，較佳為75~85之間的數，例如為79，b為22~40之間的數，較佳為22~33、25~30或35~40之間的數，最佳為22~33之間的數。化合物的平均全分子量為約6,840~9,510Da，較佳為6,840~8,830Da或7,680~9,510Da，例如大概8,400~8,800Da，例如約8,400Da或8,400Da。作為泊洛沙姆，可列舉泊洛沙姆188 (例如，以Pluronic (註冊商標) F-68、Synperonic (商標) PE/F 68、Flocor (註冊商標)、Kolliphor (註冊商標) 及Lutrol (註冊商標)、泊洛沙姆 188 EMPROVE (註冊商標) EXPERT、Pronon (註冊商標) 所販售者)。市售等級的泊洛沙姆188的品質係依據供給業者而異。又，泊洛沙姆188即使為相同供給業者的相同等級者，品質亦會依據批次而異。再者，作為泊洛沙姆，可列舉泊洛沙姆237 (例如，以Pluronic (註冊商標) F-87、Synperonic (商標) PE/F 87所販售者)。

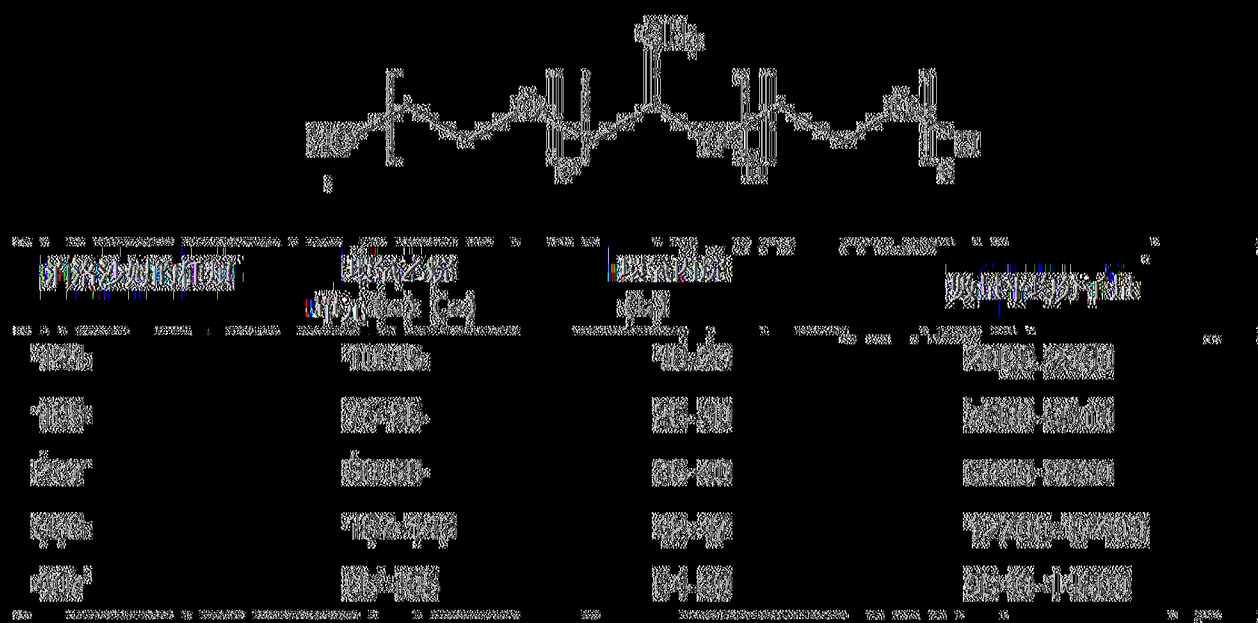
**【0085】** 聚環氧乙烷／聚環氧丙烷共聚物的命名法係與單體組成相關。若將泊洛沙姆數的前2位數乘以100，則成為疏水性聚環氧丙烷嵌段的大約分子量。若將後1位數乘以10，則能獲得親水性聚環氧乙烷含量的大約重量百分比。例如，泊洛沙姆188表示親水性聚環氧乙烷嵌段含量為全分子量的約80%且包含約1,800Da的聚環氧丙烷疏水性物質之聚合物。又，泊洛沙姆237表示親水性聚環

氧乙烷嵌段含量為全分子量的約70%且包含約2,300Da的聚環氧丙烷疏水性物質之聚合物。於此，聚環氧乙烷亦被稱為聚氧乙烯，聚環氧丙烷亦被稱為聚氧基丙烷。

[(0086)] 泊洛沙姆可藉由兩步驟，首先構築聚環氧丙烷中心，接著在聚環氧丙烷中心的末端加成聚環氧乙烷而進行合成。為了在兩步驟中的聚合速度之變動，泊洛沙姆包含各種的分子量不均一聚合物種類。聚合物種類的分布並未受限，但可使用以凝膠滲透層析法（GPC）為首之標準技術而進行特性評價。

[(0087)] 作為本發明的一態樣，在表1揭示各種的泊洛沙姆所含之聚環氧乙烷及聚環氧丙烷嵌段的平均數以及數量平均分子量。

[(0088)] [表1]



[(0089)] 本說明書中表示泊洛沙姆之式I：



中之a及c以及b，分別為泊洛沙姆中的 $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ 單元及 $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ 單元的平均的數。於此， $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$ 意指 $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n\text{O}$ 且亦被稱為環氧乙烷(EO)單元。

$(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ 意指 $(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O})$ 且亦被稱為環氧丙烷(PO)單元。環氧乙烷單元及環氧丙烷單元的平均係藉由NMR而獲得目標泊洛沙姆部分(fraction)

的EO/PO比，再者，可算出針對該部分進行MALDI-FTICR-MS所得之分子量以作為輸入值。EO/PO比係在NMR中將甲基的峰設為環氧丙烷的面積積分 $I_{PO}$ ，將合併環氧乙烷（氫，4個）與環氧丙烷（氫，3個）之面積積分設為 $I_{EO+PO}$ 並基於以下的公式所算出（非專利文獻2）。

$$\text{【0090】 } EO/PO = (I_{EO+PO}/I_{PO} - 1) \times (3/4)$$

在本發明的一態樣中，泊洛沙姆188（亦被稱為P-188、PX188或P188）係指具有以下的式Ia之聚環氧乙烷/聚環氧丙烷共聚物：



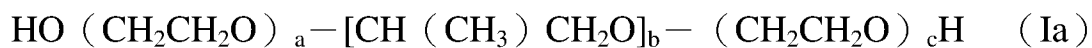
式中，a、b及c為平均的數，a及c能相同或不同且分別係如藉由（ $C_2H_4O$ ）所表示之親水性部分（亦即，共聚物的聚環氧乙烷部分）構成約60%~90%例如約80%般的數，以及b係如藉由（ $C_3H_6O$ ）所表示之疏水性物質具有約1,300~2,300Da例如1,400~2,000Da例如約1,750Da的分子量般的數。例如，a及c為約75~85之間的數，例如為79，b為25~30之間的數或較佳為22~33之間的數，例如為28。化合物的平均全分子量為約7,680~9,510Da，例如大概8,400~8,800Da，例如約8,400Da或8,400Da。泊洛沙姆188聚合物能包含非均質的聚合物種類的分布，所述非均質的聚合物種類雖整體的鏈長主要不同，但包含具有不飽和之剪切聚合物鏈與某低分子量二醇。泊洛沙姆188亦包含表示種類輪廓（species profile）（例如依GPC而定）者，所述種類輪廓包含表示低分子量（LMW）聚合物種類及高分子量（HMW）聚合物種類之主峰與兩側的「肩」峰。在本發明的一態樣中，泊洛沙姆亦可為去除主成分以外的種類或為了減少而將泊洛沙姆188進行精製所得之泊洛沙姆。

【0091】 泊洛沙姆188在日本藥典（The Japanese Pharmacopoeia）的規格中有時被稱為「聚氧乙烯（160）聚氧基丙烯（30）二醇」。

在本說明書中使用之情形，與泊洛沙姆188相關之「主成分」或「主峰」係

指具有小於約13,000Da且大於約4,500Da之分子量，並具有約7,680~9,510Da例如大概8,400~8,800Da例如約8,400Da或8,400Da的數量平均分子量之共聚物分子的種類。主峰種包含因應層析法條件並藉由凝膠滲透層析法（GPC）而溶出14~15分鐘者（參照美國專利第5,696,298號）。

在本發明的一態樣中，泊洛沙姆237（亦被稱為P-237、PX237或P237）係指具有以下的式Ia之聚環氧乙烷／聚環氧丙烷共聚物：

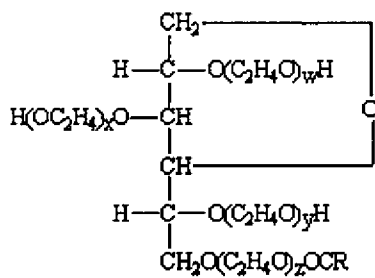


式中，a、b及c為平均的數，a及c能相同或不同且各自的藉由（C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O）所表示之親水性部分（亦即，共聚物的聚環氧乙烷部分）構成約60%~80%例如約70%，以及b係如藉由（C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O）所表示之疏水性物質具有約1,800~2,800Da例如2,000~2,600Da例如約2,300Da的分子量般的數。例如，a及c為約60~68之間的數，例如64，b為35~40之間的數或較佳為32~43之間的數，例如37。化合物的平均全分子量為約6,840~8,830Da，例如大概7,500~8,000Da，例如約7,800Da或7,800Da。泊洛沙姆237能包含非均質的聚合物種類的分布，所述非均質的聚合物種類雖聚合物的整體的鏈長主要不同，但包含具有不飽和之剪切聚合物鏈與某低分子量二醇。泊洛沙姆237亦包含表示種類輪廓（例如依GPC而定）者，所述種類輪廓包含表示低分子量（LMW）聚合物種類及高分子量（HMW）聚合物種類之主峰與兩側的「肩」峰。在本發明的一態樣中，泊洛沙姆亦可為去除主成分以外的種類或為了減少而將泊洛沙姆237進行精製所得之泊洛沙姆。

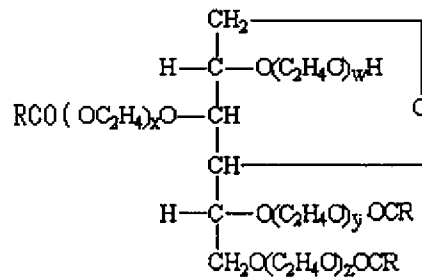
#### 【0092】 (2) 聚山梨醇酯

聚山梨醇酯係具有能用於作為非離子性界面活性劑及蛋白質穩定劑之以下的化學式II或式III之脂肪酸酯：

#### 【0093】 [化1]



(I I)、



(I I I)

【0094】 [式中， $w + x + y + z$ 為選自15~25之整數，

R為獨立且碳數為11以上的烷基或烯基]。

聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60及聚山梨醇酯80係在醫藥品、化妝品及食品業界被廣泛地使用作為穩定劑及乳化劑。聚山梨醇酯20主要包含聚氧乙烯（20）山梨醇酐的單月桂酸酯。聚山梨醇酯40主要包含聚氧乙烯（20）山梨醇酐的單棕櫚酸酯。聚山梨醇酯60主要包含聚氧乙烯（20）山梨醇酐的單硬脂酸酯。聚山梨醇酯80主要包含聚氧乙烯（20）山梨醇酐的單油酸酯。

【0095】 聚山梨醇酯在大多情形為各種的化學物質的混合物，大部分係由聚氧乙烯（20）山梨醇酐單酯所構成，視情形而包含異山梨醇酯混入物質。該等亦能包含例如聚乙二醇（PEG）、中間體結構及脂肪酸反應物質。頭部基（此情形為聚氧乙烯（20）山梨醇酐）包含其醇基之中的3個以形成3個聚環氧乙烷基與醚鍵之方式被取代之山梨醇酐（包含1,4-無水山梨醇、1,5-無水山梨醇及1,4,3,6-二無水山梨醇）。

### 【0096】 3.其他添加劑

在本發明的一態樣中，醫藥製劑可因應需要而與適當的藥學上可容許之載體、介質等進行混合並調製，而做成溶液製劑。溶液製劑的溶劑為水或藥學上可容許之有機溶劑。作為該種有機溶劑，可列舉例如丙二醇（1,2-丙烷二醇）、聚乙二醇300、聚乙二醇400、乙醇、甘油、乙酸等。作為適當的藥學上可容許之載體、介質，可列舉例如滅菌水、生理食鹽水、穩定化劑、抗氧化劑（抗壞血酸等）、緩衝劑（磷酸、檸檬酸、組胺酸、其他有機酸等）、防腐劑、螯合

劑（EDTA等）、結合劑等。又，亦可包含其他低分子量的多肽、血清白蛋白、明膠、免疫球蛋白等蛋白質、甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、麩胺酸、天冬胺酸、甲硫胺酸、精胺酸及離胺酸等胺基酸、多醣及單醣等醣類、碳水化合物、甘露醇、山梨醇等糖醇。在作為注射用的溶液之情形中，可列舉例如生理食鹽水、葡萄糖、包含其他補助藥之等張液例如D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化鈉，亦可併用適當的溶解佐劑例如醇（乙醇等）、多元醇（丙二醇、PEG等）等。

**【0097】** 在本發明的一態樣中，在溶液製劑中所使用之緩衝劑係使用用於維持溶液的pH之物質而調製。在本發明的一態樣中，在含有高濃度抗體的溶液製劑中，溶液的pH較佳為4.5~7.5，更佳為5.0~7.0，再佳為5.5~6.5。在本發明的一態樣中，能使用的緩衝劑係可調整此範圍的pH且醫藥上可容許者。此種緩衝劑在溶液製劑的領域中對於本發明所屬技術領域中具有通常知識者而言為習知，可使用例如磷酸鹽（鈉或鉀）、碳酸氫鈉等無機鹽；檸檬酸鹽（鈉或鉀）、乙酸鈉、丁二酸鈉等有機酸鹽；或磷酸、碳酸、檸檬酸、丁二酸、蘋果酸、葡萄糖酸等酸類。再者，亦可使用Tris類及如MES、MOPS、HEPES般的古德氏緩衝液（Good's Buffer）、組胺酸（例如組胺酸鹽酸鹽）、甘胺酸等。

**【0098】** 緩衝劑的濃度一般而言為1~500mmol/L，較佳為5~100mmol/L，再佳為10~20mmol/L。使用組胺酸緩衝劑之情形，緩衝劑較佳為含有5~25mmol/L的組胺酸，再佳為含有10~20mmol/L的組胺酸。

**【0099】** 在本發明的一態樣中，含有高濃度抗體的溶液製劑較佳為藉由添加對於有效成分亦即抗體而言為適當的穩定化劑而被穩定化。在本發明的一態樣中，「穩定的」含有高濃度抗體的溶液製劑係在冷藏溫度（2~8°C）至少12個月，較佳為2年，再佳為3年；或在室溫（22~28°C）至少3個月，較佳為6個月，再佳為1年，未觀察到有意義的變化。例如，在5°C保存2年後的二聚體量及

分解物量的合計為5.0%以下，較佳為2%以下，再佳為1.5%以下，或者在25°C保存6個月後的二聚體量及分解物量的合計為5.0%以下，較佳為2%以下，再佳為1.5%以下。

【0100】 又，在本發明的製劑中，因應需要，可適當添加冷凍保護劑、懸浮液、溶解佐劑、等張化劑、保存劑、吸附防止劑、稀釋劑、賦形劑、pH調整劑、止痛劑、含硫還原劑、抗氧化劑等。

【0101】 作為冷凍保護劑，可列舉例如海藻糖、蔗糖、山梨醇等糖類。

作為溶液佐劑，可列舉例如聚環氧乙烷氫化蓖麻油、聚山梨醇酯80、菸鹼醯胺、聚環氧乙烷山梨醇酐單月桂酸酯、聚乙二醇、蓖麻油脂肪酸乙酯等。

【0102】 作為等張化劑，可列舉例如氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣等。

作為保存劑，可列舉例如對位氧基苯甲酸甲酯、對位氧基苯甲酸乙酯、山梨酸、酚、甲酚、氯甲酚等。

【0103】 作為吸附防止劑，可列舉例如人類血清白蛋白、卵磷脂、葡聚醣、環氧乙烷—環氧丙烷共聚物、羥丙基纖維素、甲基纖維素、聚環氧乙烷氫化蓖麻油、聚乙二醇等。

【0104】 作為含硫還原劑，可列舉例如N—乙醯基半胱胺酸、N—乙醯基高半胱胺酸、硫辛酸、硫二甘醇、硫乙醇胺、硫代甘油、硫代山梨醇、硫代乙醇酸及其鹽、硫代硫酸鈉、麩胱甘肽（glutathione）、碳原子數1~7的硫代烷烴酸等具有巰基者等。

【0105】 作為抗氧化劑，可列舉例如異抗壞血酸、二丁基羥基甲苯、丁基羥基甲氧苯、 $\alpha$ -生育酚、乙酸生育酚、L-抗壞血酸及其鹽、L-抗壞血酸棕櫚酸酯、L-抗壞血酸硬脂酸酯、亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉、沒食子酸三戊酯、沒食子酸丙酯或乙烯二胺四乙酸二鈉（EDTA）、焦磷酸鈉、偏磷酸鈉等螯合劑。

【0106】 4.減少粒子產生之界面活性劑

### (1) 疏水度

在本發明的一態樣中，可藉由使用高疏水度的界面活性劑而減少含有抗體之醫藥製劑中的粒子產生。

**【0107】** 泊洛沙姆係由疏水性的聚環氧丙烷 (PPO) 鏈一嵌段及配置於兩側之親水性的聚環氧乙烷 (PEO) 鏈兩嵌段所構成之三嵌段兩親媒性共聚物，PPO鏈係由平均22~40之間的數的環氧丙烷，較佳為22~33、25~30或35~40之間的數，最佳為22~33之間的數的環氧丙烷所構成，PEO鏈係由分別平均75~85單元的環氧乙烷所構成。環氧丙烷為疏水性成分，環氧乙烷為親水性成分。泊洛沙姆之中，包含較多疏水性成分者的疏水度較高。

**【0108】** 在本發明的一態樣中，泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為3%、6%、20%或29% (w/w) 以上的比例包含含有PPO鏈之泊洛沙姆，所述PPO鏈係由34單元以上的環氧丙烷所構成。

**【0109】** 在本發明的一態樣中，泊洛沙姆的疏水度差異亦可藉由逆相層析法而確認。在逆相層析法中，藉由以PEO嵌段不會與固定相進行相互作用之方式進行設定，而可特定PPO嵌段的長度的分布。又，藉由此方法，可分析泊洛沙姆的疏水度差異 (非專利文獻2)。在本發明的一態樣中，參照非專利文獻2，如以下般設定泊洛沙姆的逆相層析法的條件。在逆相層析法中，已填充大孔型苯乙烯二乙烯基苯之HPLC管柱例如使用Agilent Technologies的PLRP-S管柱。

### **【0110】** [高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：PLRP-S管柱 (1000Å, 5 μm, 50×2.1mm; Agilent Technologies)

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出配程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

(6) 管柱溫度：65±5°C

(7) 泊洛沙姆濃度（超純水水中）：0.5mg/mL。

**【0111】** 在本發明的一態樣中，在利用上述條件的泊洛沙姆的層析法中，溶出時間為17分鐘以後的溶出物係對應於疏水度高的泊洛沙姆，溶出時間為17分鐘以後的峰面積相對於全峰面積為3%以上、6%以上、19%以上、33%以上或35%以上。

**【0112】** 又，在本發明的一態樣中，在利用上述條件的泊洛沙姆的層析法中，溶出時間為17分鐘以後的峰面積相對於1.5分鐘以後的全峰面積為3%以上、6%以上、20%以上、36%以上或46%以上。

**【0113】** (2) 表面張力

在本發明的一態樣中，藉由使用會降低含有界面活性劑之水溶液的表面張力之界面活性劑，而可減少在含有抗體之醫藥製劑的水溶液中之粒子產生。在本發明的一態樣中，作為可減少粒子產生之界面活性劑，有在本發明的實施例中經確認之泊洛沙姆188，還有泊洛沙姆237、聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯60、

聚山梨醇酯65及聚山梨醇酯80。界面活性能力越高的界面活性劑，越降低含有界面活性劑之水溶液的表面張力。泊洛沙姆的疏水度的指標與表面張力值有相關性。

【0114】 表面張力可利用Wilhelmy法（板法、垂直板法）、du Nouy法（環法、輪環法）、懸滴法（吊墜法）或最大泡壓法等一般所知之方法而進行測量，但不受限於此等。

【0115】 在本發明的一態樣中，含有0.5mg/mL的濃度的界面活性劑之水溶液具有52.3mN/m以下、52mN/m以下、51mN/m以下、50.7mN/m以下、50.5mN/m以下或39mN/m以下的表面張力。

【0116】 （3）不飽和度

在本發明的一態樣中，藉由使用不飽和度低的泊洛沙姆作為界面活性劑，而可減少含有特定的抗體之醫藥製劑中之粒子產生。

【0117】 不飽和度可藉由美國藥局方所規定之方法並使用乙酸水銀（II）溶液而得。

乙酸水銀（II）溶液的調製方法：

將50g的乙酸水銀（II）置入1000mL的量瓶，並使其溶解於已添加0.5mL的冰醋酸之約900mL的甲醇。利用甲醇稀釋至容量為止後，進行混合。若液體變成黃色則丟棄。混濁之情形則進行過濾。即使如此還是混濁之情形則廢棄。需要重複調製溶液之情形，則使用新的試劑。將此液體在暗處保存於褐色瓶中以避光。

【0118】 泊洛沙姆的不飽和度計算的流程：

將約15.0g的泊洛沙姆移至250mL的三角燒瓶。將50mL的乙酸水銀（II）溶液以移液管秤入燒瓶，以磁性攪拌器進行混合直至完全溶解為止。一邊偶爾旋轉一邊放置30分鐘。

添加溴化鈉的結晶10g，以磁性攪拌器攪拌約2分鐘。不拖延地添加約1mL的酚酞試驗液，將已遊離之乙酸以0.1N甲醇性氫氧化鉀滴定液進行滴定。利用同樣的方法進行對照試驗。測量初期的酸性度。使15.0g的泊洛沙姆溶解於已以甲醇性氫氧化鉀進行中和至酚酞的最終點為止之75mL的甲醇。接著，添加約1mL的酚酞試驗液，在氮氣輸送下，以0.1N甲醇性氫氧化鉀滴定液進行滴定。

**【0119】** 依循下述公式，計算不飽和度 (mEq/g)：

$$(V_U - V_B - V_A) N / 15$$

於此， $V_U$ 、 $V_B$ 及 $V_A$ 分別為使用於試驗試料、空白試料 (blank) 及初期酸性度的滴定之0.1N甲醇性氫氧化鉀的容量 (mL)， $N$ 為滴定液的當量濃度 (normality)。

**【0120】** 在本發明的一態樣中，使用作為界面活性劑之泊洛沙姆的不飽和度係小於0.018mEq/g。

## 5.減少粒子產生

### (1) 減少粒子產生

在本發明的一態樣中，所謂「減少粒子產生」，係指在指定的條件下會產生能藉由目視檢測的粒子之醫藥製劑的水溶液中，不產生能藉由目視檢測的粒子，或使產生之粒子數減少。已減少產生能藉由目視檢測的粒子一事，可藉由計數粒子數而確認。粒子的尺寸或數量能利用光遮蔽粒子計數法、顯微鏡粒子計數法、流式細胞粒子影像解析法、目視檢查、在已分離粒子後進行顯微紅外線分光 (infrared spectroscopy, IR) 測量或顯微拉曼分光測量而進行測量，較佳為利用目視檢查與顯微紅外線分光或顯微拉曼分光測量的組合而進行測量。

### **【0121】** (2) 能藉由目視檢測的粒子

在本說明書中，所謂能藉由目視檢測的粒子，係在高照度下能藉由目視檢測的粒子，並具有40  $\mu$ m以上的粒徑。其中，將在藥典所規定之標準照度 (2,000

~3,000lx左右)下能藉由目視檢測的粒子稱為「可見粒子」或「不溶性可見性粒子」。可見粒子一般而言具有大於100  $\mu\text{m}$ 的粒徑(非專利文獻1)。尺寸小於可見粒子且在藥典所規定之標準照度(2,000~3,000lx左右)下肉眼不可見但藉由提高照度、拉長觀察時間而能藉由目視檢測的粒子係「僅在高照度下能藉由目視檢測的粒子」,並具有40  $\mu\text{m}$ ~100  $\mu\text{m}$ 的粒徑。可見粒子係在照明下、標準照度(2,000~3,000lx左右)下,在黑色背景或白色背景前緩緩地使容器旋轉或顛倒5秒鐘以上,以肉眼進行目視檢查,藉此確認。僅在高照度下能藉由目視檢測的粒子係在照明下、高照度(6,000lx以上)下,在黑色背景前緩緩地使容器旋轉或顛倒30秒鐘以上,以肉眼進行目視檢查,藉此確認。在高照度之檢查中,亦能確認可見粒子。

**【0122】** 在本說明書中,所謂「源自蛋白質粒子」,係指包含僅由蛋白質所構成之粒子以及由蛋白質與聚二甲基矽氧烷(PDMS)的複合體所構成之粒子並由蛋白質所生成之能藉由目視檢測的粒子。粒子係由蛋白質分子所導致一事,可藉由顯微拉曼分光測量而確認。在溶液中作為蛋白質所包含的僅為醫藥有效成分(API),能藉由目視檢測的粒子係由API所產生。能藉由目視檢測的粒子的數量能利用光遮蔽粒子計數法、顯微鏡粒子計數法、流式細胞粒子影像解析法、目視檢查、在已分離粒子後進行顯微紅外線分光(infrared spectroscopy, IR)測量或顯微拉曼分光測量而測量,較佳為藉由目視檢查與顯微紅外線分光或顯微拉曼分光測量的組合而測量。

**【0123】** 在本說明書中,所謂「凝聚體」,係指藉由聚集多個已改質之蛋白質所產生之較高分子量的蛋白質種類,且與「高分子種」及「HMWS」的用語互換地使用。蛋白質凝聚體大致能在以下幾點不同:尺寸(小型(2量體)~大型(能以顯微鏡確認的粒子或甚至可見粒子)的集合體、直徑為奈米~微米的範圍)、形態(大概球狀~纖維狀)、蛋白質結構(天然對非天然/改質)、

分子間結合的類型（共價對非共價）、可逆性及可溶性。可溶性的凝聚體包含大約1~100nm的尺寸範圍，蛋白質粒子包含能以顯微鏡確認的(約0.1~100  $\mu\text{m}$ )範圍及可見 (>100  $\mu\text{m}$ ) 範圍。前述類型的蛋白質凝聚體全部大致被包含於該用語。因此，所謂「(蛋白質)凝聚體」的用語，係指2個以上的蛋白質單體物理性匯集或化學性結合而成之所有種類的非天然種類。

**【0124】** 在本發明的一態樣中，醫藥製劑係不使容器內的溶液冷凍地被保存於-30°C~25°C，較佳為溶液的冷凍點~25°C，更佳為1°C~10°C，更佳為2°C~8°C，再佳為5°C。保存進行1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、13小時、14小時、15小時、16小時、17小時、18小時、19小時、20小時、21小時、22小時、23小時、24小時、25小時、26小時、27小時、28小時、29小時、30小時、31小時、32小時、33小時、34小時、35小時、36小時、48小時、60小時、72小時、84小時、96小時。保存進行至少24小時、至少2日、至少3日、至少4日、至少10日、至少20日、至少30日、至少40日、至少50日、至少60日、至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月、至少7個月、至少8個月、至少9個月、至少10個月、至少11個月、至少12個月。

#### **【0125】 5.容器**

在本發明的一態樣中，醫藥製劑被填充於容器。容器為塑膠製或玻璃製的注射器、卡式瓶 (cartridges) 或小瓶。

**【0126】** 在本發明的一態樣中，用於投予至患者之醫藥製劑被填充於注射器、卡式瓶或小瓶內。在一態樣中，醫藥製劑係在製造用填充施設中被置入注射器、卡式瓶或小瓶內。在一態樣中，注射器、卡式瓶或小瓶在置入組合物前會被滅菌。在一態樣中，已填充醫藥製劑之注射器、卡式瓶或小瓶係在對患者投予醫藥製劑之前具有1日、至少7日、至少14日、至少1個月、至少6個月、至

少1年或至少2年的保存期限。在一態樣中，注射器、卡式瓶或小瓶被暴露於儲存及／或輸送的條件。

**【0127】** 在本發明的一態樣中，注射器、卡式瓶或小瓶被暴露於機械應力。作為機械應力，可列舉掉落應力及振動應力，但不受限於此。在本發明的一態樣中，注射器、卡式瓶或小瓶被暴露於1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次、21次、22次、23次、24次、25次、25次以上、30次以上或40次以上的掉落應力。掉落時，施加於注射器、卡式瓶或小瓶之應力除了依據掉落次數以外亦依據高度、方向等而變化。掉落高度例如為American Society for Testing and Materials (ASTM) D4169所記載之38.1cm，但不受限於此。

**【0128】** 注射器可為PP（聚丙烯）或玻璃。注射器的內周面可塗布作為潤滑劑的聚矽氧油。

在本發明的一態樣中，聚矽氧油為聚二甲基矽氧烷。一些例示的聚二甲基矽氧烷中，非限定地包含例如黏度為350厘司之Dow Corning（註冊商標）360 Medical Fluid、黏度為1000厘司之Dow Corning（註冊商標）360 Medical Fluid、黏度為12,500厘司之Dow Corning（註冊商標）360 Medical Fluid、及非限定地包含Dow Corning（註冊商標）MDX4-4159 fluid之Dow Corning（註冊商標）360 Medical Fluid。

**【0129】** 在本發明的一態樣中，注射器的容量的尺寸（規格）未被特別限定。具體而言，容量為0.5mL～5.0mL，較佳為1mL或2.25mL。

**【0130】** 在本發明的一態樣中，卡式瓶容量的尺寸（規格）未被特別限定。具體而言，容量可為0.5mL～20.0mL，例如可為1.0mL、1.5mL、1.8mL、2.0mL、2.2mL、3.0mL、5.0mL、10.0mL、15.0mL、20.0mL，但不受限於此等的量。

**【0131】** 在本發明的一態樣中，小瓶的容量的尺寸（規格）未被特別限定。

具體而言，可為3mL~100mL，亦可為3mL、5mL、10mL、15mL、20mL、30mL、50mL或100mL，但不受限於此等的量。

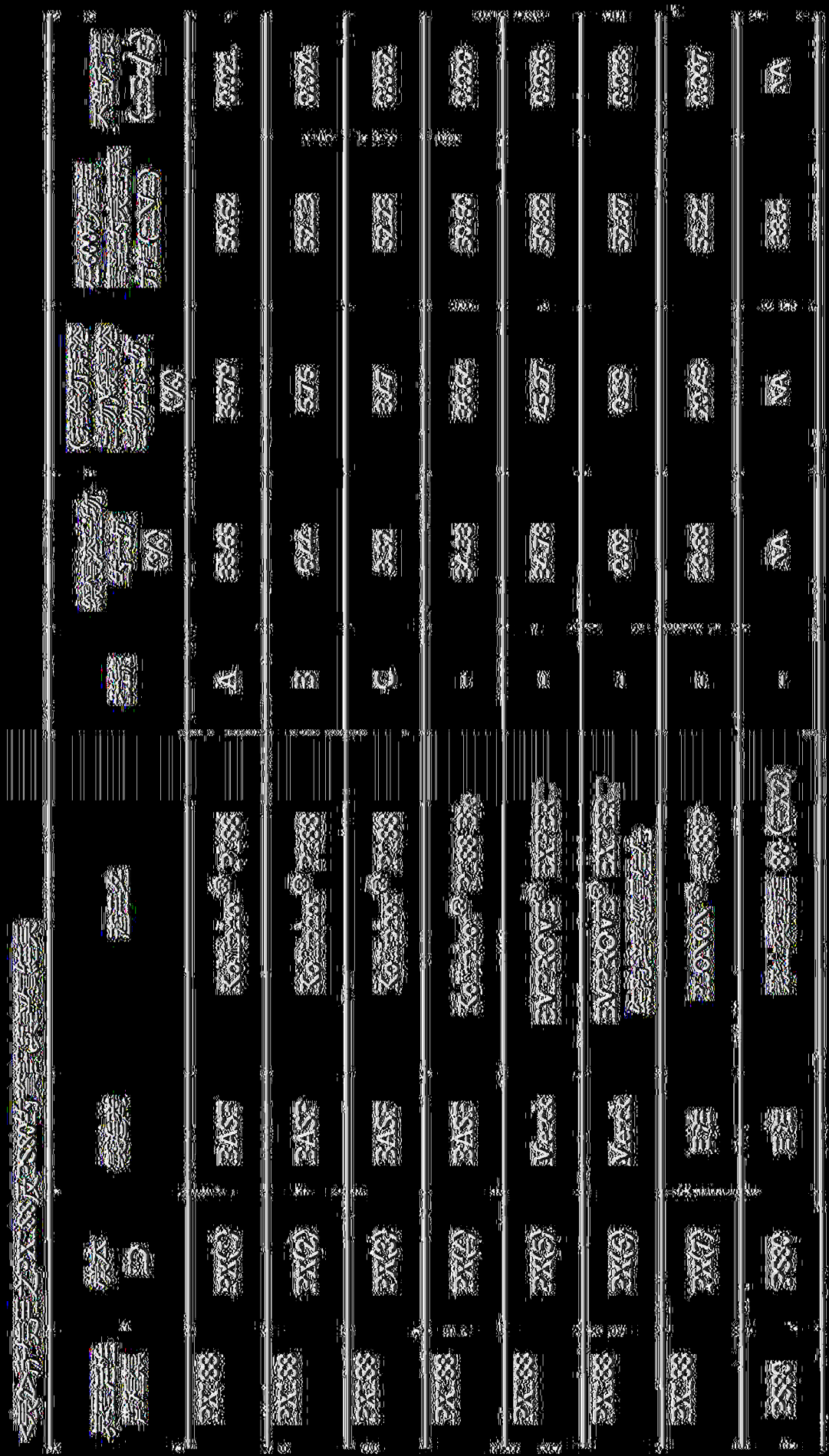
**【0132】** 本發明雖藉由以下的實施例而進一步例示，但不受限於下述的實施例。

[實施例]

**【0133】** [實施例1] 泊洛沙姆188 (PX188) 的經由逆相層析法所進行之成分分析

針對表2所表示之包含不同的製造商、等級、批次之7種類的PX188，為了評價聚環氧丙烷 (PPO) 嵌段的長度而實施經由逆相層析法所進行之分析。經由逆相層析法所進行之PPO嵌段長的分析方法係參考先前論文 (非專利文獻1)。

**【0134】** [表2]



【0135】 HPLC系統係使用在Alliance e2695 liquid chromatograph (Waters) 安裝2424蒸發光散射偵測器 (ELSD) (Waters) 而成者，數據取得與分析係使用Empower 3 software (Waters)。分離所使用之管柱係使用PLRP-S column (1000Å, 5 μm, 50×2.1mm, Agilent Technologies)，並設定成65±5°C的管柱溫度。流速固定在0.2mL/分鐘，作為移動相，將超純水 (Milli-Q水) 設為移動相A且將乙腈設為移動相B而繪製線形的梯度。作為梯度的詳細內容，係58%B至64%B (0~16.0分鐘)、64%B至90%B (16.0~18.5分鐘)、固定於90%B (18.5~21.5分鐘)、90%B至100%B (21.5~23.5分鐘)、固定於100%B (23.5~30.0分鐘)、100%B至58%B (30.0~30.1分鐘)、固定於58%B (30.1~40.0分鐘)。ELSD的漂移管的溫度為50±25°C、霧化器的加熱功率等級為75%，增益值為250，氣壓為20psi。將各PX188以成為0.5mg/mL之方式溶解於超純水，將該PX188溶液20 μL注入HPLC系統。將開始後17分鐘以後的溶出物定義為「緩慢溶出物」，在將緩慢溶出物的比例設為相對於全峰面積之17分鐘以後的峰面積的比例 (%) 的前提下，從各PX188的層析圖 (圖1) 計算緩慢溶出物的比例。再者，將相對於已排除開始後1.5分鐘為止的峰面積的全峰面積之17分鐘以後的峰面積的比例定義為「(排除初期溶出物) 緩慢溶出物」，並從各PX188的層析圖 (圖1) 進行計算。

【0136】 再者，針對5種類的PX188，計算相當於緩慢溶出物之具有34個以上的PPO嵌段長之分子種類的質量%。將在17分鐘以後最初溶出之峰的PPO嵌段長設為34個，計算各溶出峰的PPO嵌段長。又，針對兩端的PEO嵌段長，分別設為80個而計算相當於各溶出峰之分子種類的分子量。接下來，算出此等分子量與溶出峰面積值的乘積值，將PPO嵌段長為34個以上者之和作為分子，將全部峰之和作為分母，乘以100，藉此針對各PX188計算具有34個以上的PPO嵌段長之分子種類的質量%。將具有34個以上的PPO嵌段長之分子種類相對於全部泊洛

沙姆之比例（質量%）的計算結果揭示於表3。

(0137) [表3]

**【0138】 [實施例2] PX188及PS80的表面張力值的測量**

針對表2所表示之7種類的PX188及1種類的PS80，測量將各界面活性劑以成為0.5mg/mL之方式溶解於超純水而成之水溶液的表面張力值。使用表面張力計（Force Tensiometer K100C，Kruss），在20~25度實施經由使用鉑板的Wilhelmy法所進行之測量。作為K100C的測量參數，將檢測速度設為6mm/分鐘，將檢測感度設為0.005g，並將浸漬深度設為2mm，以60秒鐘間隔取得從測量開始起至600秒鐘為止的表面張力值（圖2）。此外，針對已置入浸漬鉑板的界面活性劑溶液之玻璃容器，在每次測量實施以異丙醇接著以超純水的多次清洗。針對鉑板，亦在每次測量以異丙醇接著以超純水進行清洗後以酒精燈進行熾熱清洗（red hot wash）。

**【0139】** 各種PX188水溶液的表面張力值係在鉑板浸漬後緩緩逐漸降低並在從測量開始起經過600秒鐘的時間點達到平衡。因此，作為各種界面活性劑溶液的表面張力值，係採用在經過600秒鐘的時間點的值。PS80水溶液的表面張力值雖即使經過600秒鐘後亦持續減少，但為了與PX188水溶液進行比較，而設為採用在經過600秒鐘的時間點的表面張力值。

**【0140】 [實施例3] 緩慢溶出物的比例與表面張力值的相關性**

分析表2所表之7種類的PX188的緩慢溶出物的比例與利用上述方法所測量之表面張力值之間的相關性。其結果，該等2個值顯示有高相關性（圖3）。亦即，在PX188中顯示PPO嵌段長的成分的比例係與成為界面活性能力的指標之表面張力值相關，再者，顯示在包含多量的PPO嵌段長的成分之情形中表面張力值會減少。

**【0141】 [實施例4] 能藉由目視檢測的粒子評價用的樣品調製**

為了調查各種界面活性劑對能藉由目視檢測的粒子的產生造成之影響，使用表2所表示之7種類的PX188及1種類的PS80，調查二種類的mAb製劑中的粒子

產生。mAb係使用中外製藥所製造及精製之mAb1（艾美賽珠單抗，IgG4，抗凝血IXa/X因子人源化雙重特異性單株抗體）與mAb2（薩特利珠單抗，IgG2，pH依賴性結合性人源化抗IL-6受體單株抗體）。mAb1的樣品係將含有158mg/mL的mAb1、20mM的組胺酸、150mM的精胺酸、天冬胺酸（適量）、0.5mg/mL的PX188或PS80之水溶液調製成pH6.0，並在小瓶（3mL 經硫處理的玻璃小瓶，MURASE GLASS）中填充1mL。mAb2的樣品將含有123mg/mL的mAb1、20mM的組胺酸、150mM的精胺酸、天冬胺酸（適量）、0.5mg/mL的PX188或PS80之水溶液調製成pH6.0，並在注射器（1mL ClearJect，大成化工）填充1mL。針對各mAb，使用表2所示之8種類的界面活性劑，分別製作8種類的樣品。針對所製作之樣品實施目視檢查，並在樣品製造步驟中排除包含可見性異物之樣品。

**【0142】** 目視檢查後，將判定為不包含可見性異物之樣品靜置於25°C或靜置於40°C後，對實施目視檢查之群組各提供10支mAb1及10支mAb2。又，在5°C靜置，在施加定期的機械應力後，對實施目視檢查之群組提供20支mAb1及40支mAb2。

**【0143】** 定期的機械應力的賦予方法

除了在室溫賦予機械應力時，賦予定期的機械應力之樣品組係在5°C靜置保管。為了防止容器的損壞，在適當地捆包的狀態下，參照ASTM D4169，施加組合以下的掉落試驗與振動試驗之應力（掉落試驗→振動試驗→掉落試驗）。掉落應力係使用掉落試驗裝置（PDT-56ED，Lansmont），以從38.1cm的高度對各樣品賦予之應力成為均一之方式，在各面朝下的狀態針對4個面各進行2次掉落，並將此設為1組的掉落試驗。在振動試驗的前後各實施1組此掉落試驗。針對振動應力，使用振動試驗裝置（D-5900，振研），賦予4種強度的振動應力（Truck Low Level 40分鐘、Truck Medium Level 15分鐘、Truck High Level 5分鐘、Air Level I 120分鐘），將此設為1組的振動試驗。如同圖4，有僅賦予1組振動試驗之情形

與連續賦予4組振動試驗之情形，將該等賦予時間點揭示於圖6。

**【0144】** [實施例5] 在25°C靜置之情形的粒子產生

對於在25°C靜置保管6個月後的樣品，依目視檢查法1及2實施目視檢查。針對由目視檢查所檢測之粒子，如同經由拉曼光譜法所進行之能藉由目視檢測的粒子的組成辨識方法，使用成像顯微拉曼裝置（DXR2xi，Thermo scientific），實施由拉曼光譜法所進行之組成的辨識。

**【0145】** 目視檢查法1（小瓶；mAb1）

小瓶的目視檢查係使用目視檢查台（EM-M102-06，Hitachi Industry & Control Solutions）。將小瓶的外部清洗乾淨，在黑色的背景及約20,000lx的照度下，以肉眼計數在所填充之藥液中包含能藉由目視檢測的粒子之小瓶的數量。

**【0146】** 目視檢查法2（注射器；mAb2）

注射器的目視檢查係使用螢光燈。將注射器的外部清洗乾淨，在黑色的背景及約10,000lx的照度下，以肉眼計數在所填充之藥液中包含能藉由目視檢測的粒子之小瓶的數量。

**【0147】** 由拉曼光譜法所進行之粒子的組成辨識方法

以鎳性的孔徑3mm的過濾器（TOKYO PROCESS SERVICE）捕集粒子，使用成像顯微拉曼裝置（DXR2xi，Thermo scientific）而獲得照射532nm的雷射時的拉曼光譜，藉此實施為內因性的蛋白性的粒子的確認。使用倍率為10倍或50倍的透鏡，以能獲得如變得能判定組成般的適當的光譜之方式，將雷射強度（5.0～10.0mW）、曝光時間（0.05～1.0秒鐘）、積算次數（15～35次）的值設為在記載的範圍內而取得光譜。作為具代表性的蛋白性的粒子，因存在由蛋白質單體所構成之粒子以及由蛋白質與聚二甲基矽氧烷（PDMS）的複合體所構成之粒子，故將該等的拉曼光譜例揭示於圖6。

**【0148】** 對於在25°C靜置保管6個月後的樣品，計數包含蛋白性粒子之容

第 55 頁，共 68 頁(發明說明書)

器數量，並揭示於表4。mAb1與mAb2皆顯示粒子的產生率係依據在製劑中所包含之界面活性劑的種類而異。

【0149】 [表4]



**【0150】** [實施例6] 在40°C靜置後的粒子產生

對於在40°C靜置保管6個月後的樣品，依目視檢查法1及2，實施目視檢查。針對以目視檢查所檢測之粒子，如同由拉曼光譜法所進行之粒子的組成辨識方法，使用成像顯微拉曼裝置（DXR2xi，Thermo scientific），實施由拉曼光譜法所進行之組成的辨識。

**【0151】** 對於在40°C靜置保管6個月後的樣品，計數包含蛋白性粒子之容器數量，並揭示於表5。mAb1與mAb2皆顯示粒子的產生率係依據在製劑中所包含之界面活性劑的種類而大不相同

**【0152】** [表5]



**【0153】** [實施例7] 在5°C靜置及定期的機械應力條件下之粒子產生

對於5°C靜置保管及已賦予定期的掉落及振動應力之樣品（mAb1為6個月後的樣品，mAb2為3個月後的樣品），依目視檢查法1及2實施目視檢查。針對以目視檢查所檢測之粒子，如同由拉曼光譜法所進行之粒子的組成辨識方法，使用成像顯微拉曼裝置（DXR2xi，Thermo scientific），實施由拉曼光譜法所進行之組成的辨識。

**【0154】** 對於5°C靜置保管及已賦予定期的機械應力之樣品，計數包含蛋白性粒子之容器數量，並揭示於表6。

**【0155】** [表6]



【0156】 在mAb2中，顯示粒子的產生率係依據製劑中所含之界面活性劑的種類而大不相同。在mAb1中，因粒子的產生率並不夠高，故之後的分析中並不使用。

【0157】 [實施例8] PX188的緩慢溶出物的比例及界面活性劑水溶液的表面張力值與粒子產生率之相關性分析

為了明確表2所表示之7種類的PX188的緩慢溶出物的比例與粒子的產生率之相關性而實施相關性分析。針對粒子產生率(%)，係藉由在各樣品中將已產生粒子之容器數量除以供試驗之總容器數並乘以100而計算。又，針對在25°C的靜置保管條件與在40°C的靜置保管條件，皆因由升溫所導致之壓力、所生成之蛋白性粒子的組成中由蛋白質與聚二甲基矽氧烷的複合體所構成者亦佔了大部分，故認為是依循同等的粒子的形成路徑所生成者，作為熱應力條件進行合算而算出粒子產生率(%)。針對5°C靜置保管及已賦予定期的機械應力者，因由蛋白質單體所構成之不溶性異物佔了大部分，被認為是依循與熱應力條件不同之粒子形成路徑所生成者，故作為機械應力條件而個別地實施分析。

【0158】 其結果，在mAb1中，在熱應力條件下，在緩慢溶出物的比例與粒子的產生率發現相關性(圖7)。又，在mAb2中，亦在熱應力條件及機械應力條件下，亦在緩慢溶出物的比例與粒子的產生率發現相關性(圖8、圖10中的左圖)。在mAb1的機械應力條件下，發現弱相關性(圖9中的左圖)。

【0159】 由此相關圖，顯示緩慢溶出物的比例的值高，亦即使用PPO嵌段越長的PX188種類，則越能減少在mAb1、mAb2製劑中之粒子產生。又，如同實施例3所示，緩慢溶出物的比例的值因與表面張力的值相當地相關，故可換言之，藉由使用能更減低表面張力值的界面活性劑，而能減少在mAb1、mAb2製劑中之粒子產生。此事被即使在為與PX188不同的界面活性劑種類之PS80中，由於減低PS80水溶液的表面張力值且粒子的生成率低，所以也不依賴於界面活性

劑種類之事所證實。又，在表面張力值50~53mN/m的範圍中獲得明顯的粒子的產生率不同的結果，因此被認為在此範圍中，存在mAb1、mAb2製劑中之粒子產生增減的閾值。

**【0160】** [實施例9] PX188的不飽和度與粒子產生率之相關性分析

在機械應力條件下，不僅分析緩慢溶出物的比例，亦分析不飽和度（Unsaturation）與粒子的產生率之相關性。其結果，發現一定程度的下述相關性：不飽和度越低，亦即產品中的二嵌段體（PEO-PPO體）越少，則粒子的產生率越低（圖9中的中央圖、圖10中的中央圖）。尤其，針對表示低於關於PX188的不飽和度之現行USP規格的下限值（0.018mEq/g）之不飽和度之PX（7），對於mAb1、mAb2任一者皆完全地抑制蛋白性異物產生。

**【0161】** 又，實施使用緩慢溶出物的比例與不飽和度這兩個參數之多元回歸分析，結果發現相關係數的增加，其程度在mAb2特別明顯。（圖9中的右圖、圖10中的右圖）

[實施例10] 在各製劑中所產生之HMWS的評價

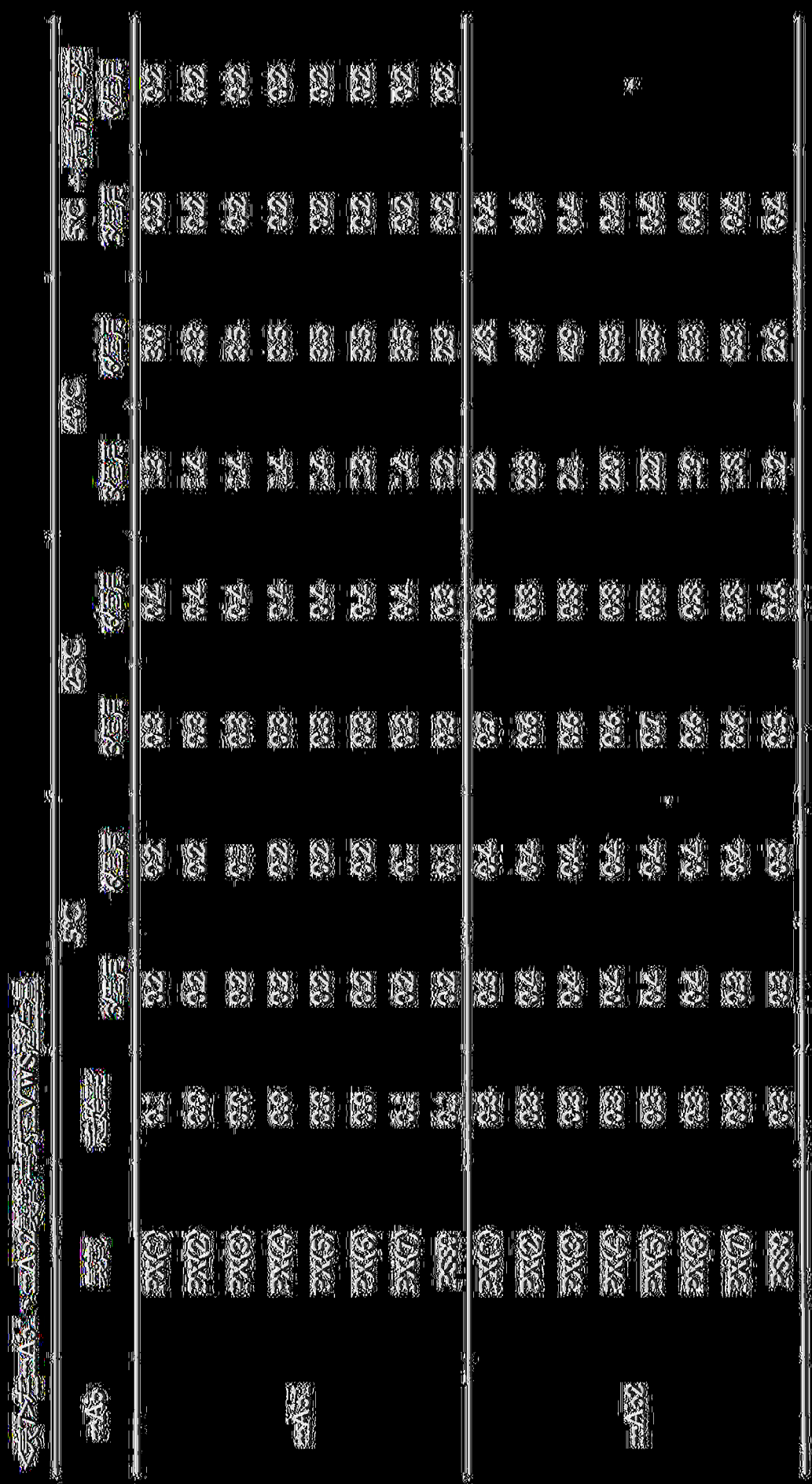
為了評價界面活性種類對在製劑中產生源自抗體之凝聚體（高分子量種類，High Molecular Weight Species，HMWS）所造成之影響，藉由尺寸排除層析法而評價在使用表2所表示之7種類的PX188及1種類的PS80之製劑中的HMWS產生量。針對5°C靜置、25°C靜置、40°C靜置及5°C靜置保管及已施加定期的機械應力之條件，分別在開始保管前、3個月後及6個月後實施評價。但是，因未實施針對mAb2的5°C靜置保管及已賦予定期的掉落振動之條件在6個月時間點的目視評價，故亦未實施HMWS評價。

**【0162】** HPLC系統係使用在Alliance 2695 liquid chromatograph（Waters）安裝2489 UV/Visible detector（Waters）而成者，數據取得與分析係使用Empower 3 software（Waters）。分離所使用之管柱係使用TSKgel G3000SWXL column

(250Å, 5 μm, 300×7.8mm, Tosoh), 並設定成25±5°C的管柱溫度。流速固定為0.2mL/分鐘, 作為移動相係使用50mM的NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、300mM的NaCl及0.5mg/mL的NaN<sub>3</sub> (pH7.0), 流速固定為0.5mL/分鐘。各抗體溶液係以成為1mg/mL的抗體濃度之方式利用移動相用溶液進行稀釋, 並將60 μL注入HPLC系統。HMWS%的值係作為相對於峰面積積分對象範圍(10-24分鐘)的總峰面積之出現在14.5分鐘附近之HMWS的峰面積的比例而定義, 並由各樣品的層析圖算出。

【0163】 將所算出之HMWS的值揭示於表7。

【0164】 [表7]



【0165】 針對5°C靜置條件及5°C靜置保管及已賦予定期的機械應力之條件，表現幾乎同等的HMWS量，未確認到HMWS的明顯增加及樣品之間的差異。又，在25°C靜置條件及40°C靜置條件下，相較於5°C靜置條件，發現HMWS量的增加，但未確認到樣品之間的明顯差異。在熱應力條件下，在PS80中顯示稍低於PX188樣品組的值，但在粒子的產生率中，相較於表面張力值較低的PX188（例如，PX（1）或PX（4）），未發現明顯的差異，因此在mAb1、mAb2製劑中之粒子產生的減少被認為與HMWS的產生量無關，且來自氣液界面或容器表面、聚矽氧油（PDMS）表面壓力的各種界面活性劑的保護能力會對粒子產生率造成影響（圖11）。圖11的左側表示經由界面活性劑之界面的保護充分之情形的形象圖，圖9的右側表示保護不充分之情形的形象圖。

【0166】 [實施例11] 低濃度PX188的表面張力值的測量

針對表2所表示之7種類的PX188之中的PX（3）、PX（6）、PX（7），測量使各界面活性劑以成為0.01mg/mL之方式溶解於超純水而成之水溶液的表面張力值。使用表面張力計（Force Tensiometer K100C，Kruss），在20-25°C實施由使用鉑板之Wilhelmy法所進行測量。作為K100C的測量參數，將檢測速度設為6mm/分鐘，將檢測感度設為0.005g，並將浸漬深度設為2mm，以10秒鐘間隔取得從測量開始起至600秒鐘為止的表面張力值（圖12）。此外，針對已置入使鉑板浸漬的界面活性劑溶液之玻璃容器，在每次測量實施多次以異丙醇接著以超純水進行的清洗。針對鉑板，亦在每次測量以異丙醇接著以超純水進行清洗後以酒精燈進行熾熱清洗。

【0167】 各種PX188水溶液的表面張力值因表現與測量使PX188以成為0.5mg/mL之方式溶解於超純水而成之水溶液的表面張力值時同樣的行為，故作為各種界面活性劑溶液的表面張力值，採用在經過600秒鐘的時間點的值（PX（3）為55.7mN/m，PX（6）為56.4mN/m，PX（7）為55.3mN/m）。於此，進行

測量之在PX188的經過600秒鐘的時間點的表面張力值的大小係與實施例2同樣，即使為PX188濃度低於0.5mg/mL之情形，亦可評價各PX188的表面活性能的差異。

**【0168】** [實施例12] 泊洛沙姆237 (PX237) 的經由逆相層析法所進行之成分分析

將以與實施例1同樣的流程實施泊洛沙姆237 (PX237) 的經由逆相層析法所進行之成分分析的結果揭示於以下的圖13。在PX237中，顯示若排除開始後1.5分鐘為止的峰面積，則全峰在17分鐘以後出現。

**【0169】** [實施例13] PX237的表面張力值的測量

測量使PX237以成為0.05mg/mL之方式溶解於超純水 (Milli-Q水) 而成之水溶液的表面張力值。使用表面張力計 (Force Tensiometer K100C, Kruss)，在20-25°C 實施由使用鉑板之Wilhelmy法所進行測量。作為K100C的測量參數，將檢測速度設為6mm/分鐘，將檢測感度設為0.005g，並將浸漬深度設為2mm，以60秒鐘間隔取得從測量開始起至600秒鐘為止的表面張力值 (圖14)。此外，針對已置入使鉑板浸漬的界面活性劑溶液之玻璃容器，在每次測量實施多次以異丙醇接著以超純水進行的清洗。針對鉑板，亦在每次測量以異丙醇接著以超純水進行清洗後，以酒精燈進行熾熱清洗。

**【0170】** 0.5mg/mL的PX237水溶液的表面張力值因表現與測量使PX188以成為0.5mg/mL之方式溶解於超純水而成之水溶液的表面張力值時同樣的行為，故作為PX237水溶液的表面張力值，採用在經過600秒鐘的時間點的值 (45.9mN/m)。採用0.5mg/mL的PX188水溶液的表面張力值與在經過600秒鐘的時間點的值。PX237水溶液的表面張力值低於表2所記載之任一PX188水溶液的表面張力值，可評價PX237的表面活性能高於PX188。

**【0171】** [實施例14] 能藉由目視檢測的粒子評價用的樣品調製

為了調查PX237對能藉由目視檢測的粒子的產生所造成之影響，作為PX237及控制組，使用表2所表示之PX188的內PX（3），調查在一種類的mAb製劑中的粒子產生。mAb係使用由中外製藥所製造及精製之mAb1（艾美賽珠單抗，IgG4，抗凝血IXa/X因子人源化雙重特異性單株抗體）。mAb1的樣品係將含有150mg/mL的mAb1、20mM的組胺酸、150mM的精胺酸、天冬胺酸（適量）、0.5mg/mL的PX188或PX237之水溶液調製成pH6.0，並將1mL填充至小瓶（3mL經疏處理的玻璃小瓶，MURASE GLASS）。針對所製作之樣品，實施目視檢查，在樣品製造步驟中排除包含可見性異物之樣品。

【0172】 目視檢查後，將判定為不包含可見性異物之樣品在25°C靜置後，在實施目視檢查之群組中，對各樣品分別提供60支mAb1。

【0173】 [實施例15] 在25°C靜置之情形的粒子產生

對於在25°C靜置保管6個月後的樣品，如同目視檢查法1，實施目視檢查。針對由目視檢查所檢測之粒子，如同由拉曼光譜法所進行之能藉由目視檢測的粒子的組成辨識方法，使用成像顯微拉曼裝置（DXR2xi，Thermo scientific），實施由拉曼光譜法所進行之組成的辨識。

【0174】 對於在25°C靜置保管6個月後的樣品，計算包含蛋白性粒子之容器數，並揭示於表8。製劑中所含之界面活性劑為PX237之情形，顯示粒子的產生率低於PX（3）。

[表8]

	初期	25°C且6個月後
由PX（3）所調製之mAb1	0/60	5/60（蛋白質－PDMS VP）
由PX237所調製之mAb1	0/60	0/60

【符號說明】

無。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="zh"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="2003-P220181300-
TW 序列表.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.2.0"
productionDate="2023-03-17">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>111146149</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-12-01</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>FA0001-22299</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>JP</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>JP2021-195788</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2021-12-01</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">日商中外製藥股份有限公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="ja">抗体含有製劑の調製方法</InventionTitle>
  <InventionTitle languageCode="zh">含抗體製劑的調製方法</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>5</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>artificial sequence</INSDQualifier_value>
              <NonEnglishQualifier_value>人工序列</NonEnglishQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```

</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q2">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYDIQWVRQAPGKGLEWVSSI SPSSGQSTYYRR
EVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRTGREYGGGWYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVKDRVE
SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSP</INSDSeq_sequ
ence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>444</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..444</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q3">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>artificial sequence</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    <NonEnglishQualifier_value>人工序列</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..444</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q4">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDNNMDWVRQAPGQGLEWMGDINTRSGGS IYNE
EFQDRVIMTVDKSTDTAYMELSSLRSEDATYHCARRKSYGYLDEWEGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQYTCNVDHKPSNTKVKDRVESKYG
PPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSP</INSDSeq_sequence
>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>

```

```

<INSDQualifier id="q5">
  <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>artificial sequence</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>人工序列</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q6">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASRNIERQLAWYQQKPGQAPELLIYQASRKESGVPDRF
SGSRYGTDFTLTISLQPEDIATYYCQQYSDPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>443</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..443</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>

```

```

    <INSDQualifier id="q7">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>An artificially synthesized peptide
sequence</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>一人工合成胜肽序列</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..443</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q8">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGHSISHDHAWSWVRQPPGEGLEWIGFISYSGITNYNP
SLQGRVTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARSLARTTAMDYWGEGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC
VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHAHYTQKLSLSLSP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>

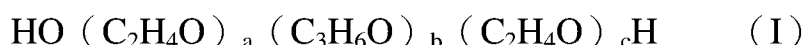
```

```
<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q9">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>An artificially synthesized peptide
sequence</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>一人工合成胜肽序列</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q10">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDSTITCQASTDISSHLNWTQKPKGKAPPELLIYYGSHLLSGVPSRF
SGSGSGTDFFTISSLEAEDAATYYCGQGNRLPYTFGGTKVEIERTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq
sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，該水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（polyoxyethylene polyoxypropylene glycol）（泊洛沙姆（Poloxamer）），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

其係在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中，相對於全峰面積，溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙烯基苯（styrene divinylbenzene）之HPLC管柱（1000Å，5 μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出配程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

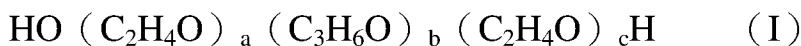
(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

(6) 管柱溫度：65±5°C

(7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

**【請求項2】** 一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，該水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

其係在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中，相對於1.5分鐘以後的全峰面積，溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙基苯之HPLC管柱（1000Å，5 μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

## (3) 溶出配程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

## (4) 流速：0.2mL/分鐘

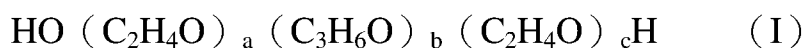
(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

## (6) 管柱溫度：65±5°C

## (7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

【請求項3】一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，該水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為3%（w/w）以上的比例包含在分子內含有34以上的（C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O）之泊洛沙姆分子。

【請求項4】一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，該水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及界面活性劑，

界面活性劑係含有0.5mg/mL的濃度的該界面活性劑之水溶液具有52.3mN/m以下的表面張力之界面活性劑。

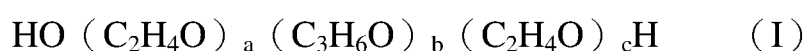
【請求項5】如請求項4之醫藥製劑，其中，界面活性劑選自泊洛沙姆或脂肪酸聚氧乙烯山梨醇酐（聚山梨醇酯(polysorbate)）。

【請求項6】如請求項4或5中任一項之醫藥製劑，其中，界面活性劑為如請求項1之式I所表示之泊洛沙姆。

【請求項7】如請求項4至6中任一項之醫藥製劑，其中，界面活性劑為聚山梨醇酯80。

【請求項8】一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，該水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

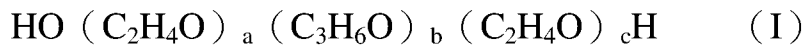
a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

泊洛沙姆的不飽和度係小於0.018mEq/g。

【請求項9】一種方法，其係在水溶液中包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，該單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

該方法包含在水溶液中添加聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

並且，包含在水溶液中添加在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中相對於全峰面積而溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上之泊洛沙姆：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙基苯之HPLC管柱（1000Å，5 μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出梯度程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25℃，霧化器加熱功

率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi)

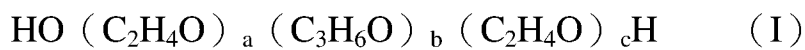
(6) 管柱溫度：65±5°C

(7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

【請求項10】一種方法，其係在水溶液中包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，該單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

該方法包含在水溶液中添加聚氧乙烯聚氧丙稀二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

並且，包含在水溶液中添加在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中相對於1.5分鐘以後的全峰面積而溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上之泊洛沙姆：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙稀基苯之HPLC管柱（1000Å，5μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出梯度程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

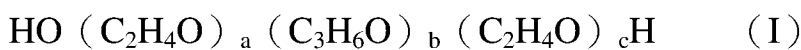
(6) 管柱溫度：65±5°C

(7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

**【請求項11】** 一種方法，其係在包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，該單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

該方法包含在水溶液中添加聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為3%（w/w）的比例包含在分子內含有34以上的（C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O）之泊洛沙姆分子。

**【請求項12】** 一種方法，其係在水溶液中包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，該單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

該方法包含在水溶液中添加在 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 的濃度的界面活性劑水溶液中具有 $52.3\text{mN}/\text{m}$ 以下的表面張力之界面活性劑作為界面活性劑。

【請求項13】如請求項12之方法，其中，界面活性劑係選自泊洛沙姆或脂肪酸聚氧乙烯山梨醇酐（聚山梨醇酯）。

【請求項14】如請求項12或13之方法，其中，界面活性劑為如請求項1之式I所表示之泊洛沙姆。

【請求項15】如請求項12至14中任一項之方法，其中，界面活性劑為聚山梨醇酯80。

【請求項16】如請求項9至15中任一項之方法，其中，前述粒子係源自蛋白質。

【請求項17】如請求項9至16中任一項之方法，其中，前述粒子具有 $40\ \mu\text{m}$ 以上的粒徑。

【發明圖式】

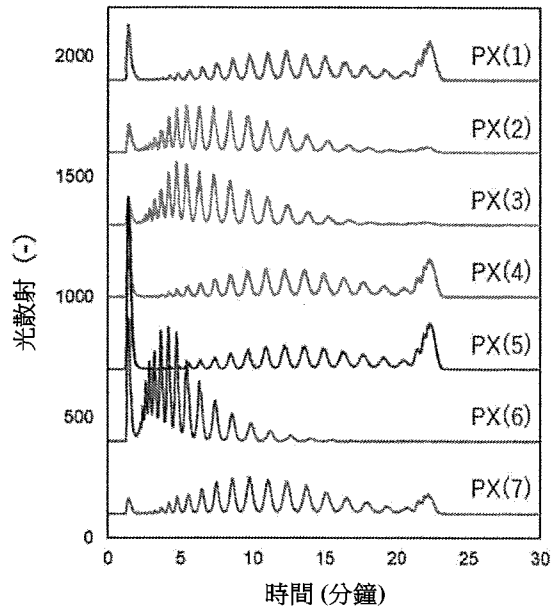


圖1

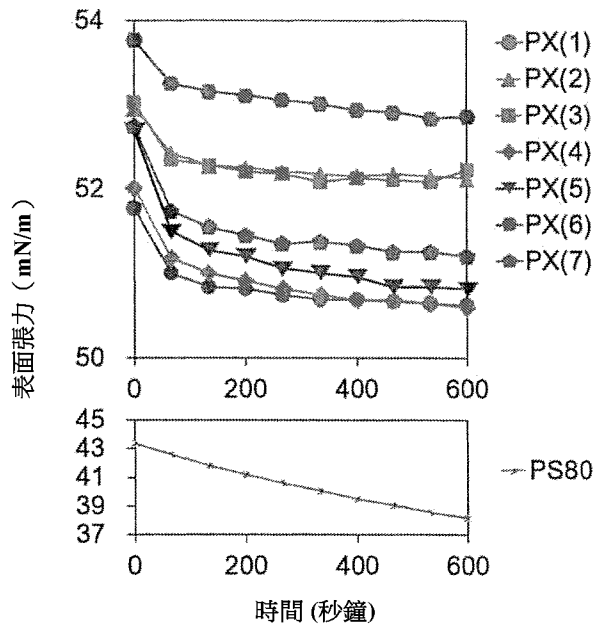


圖2

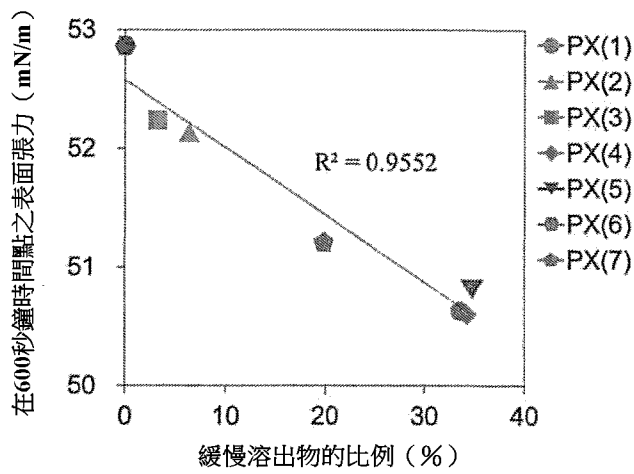


圖3

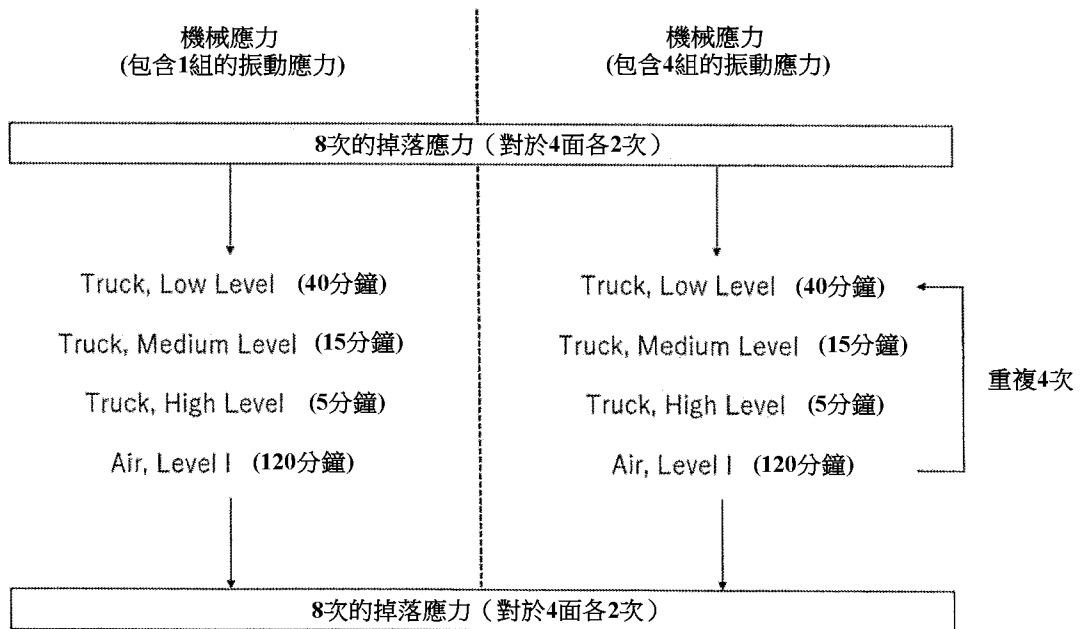


圖4

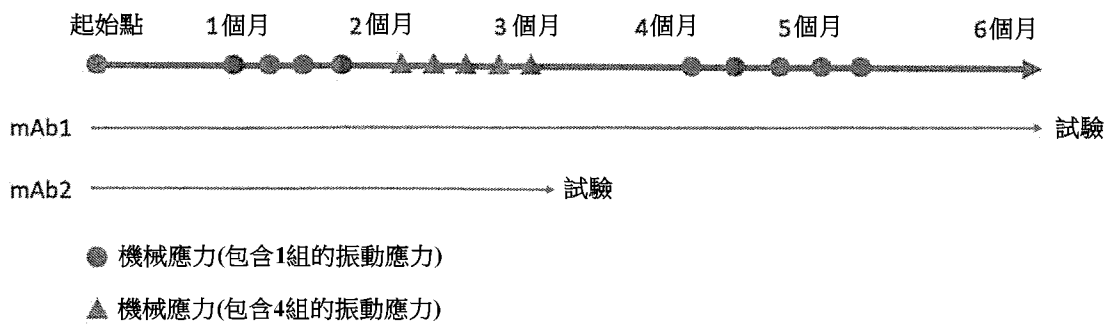


圖5

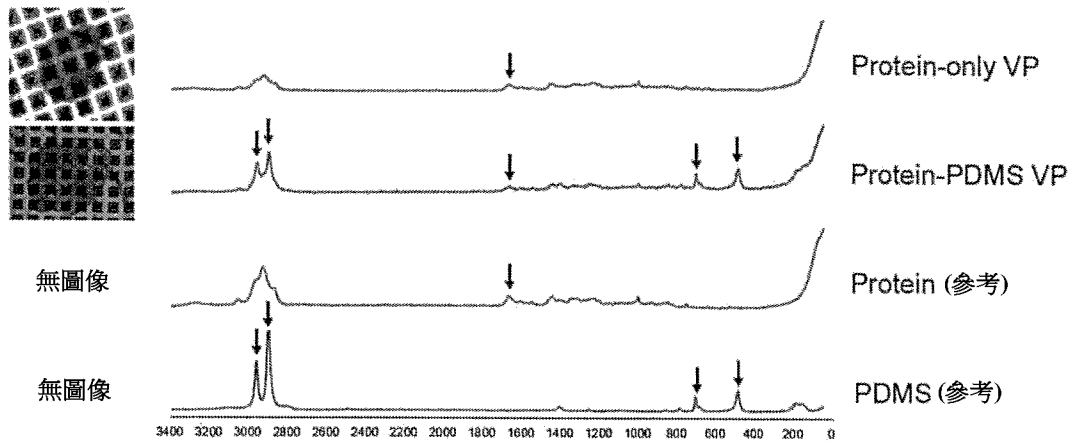


圖6

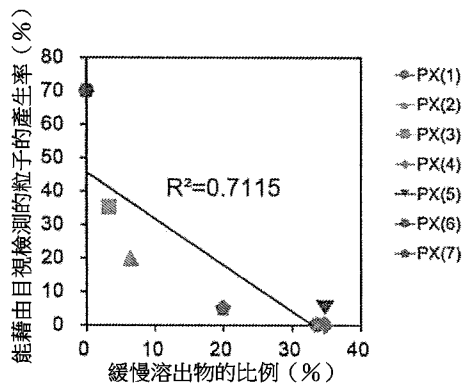


圖7

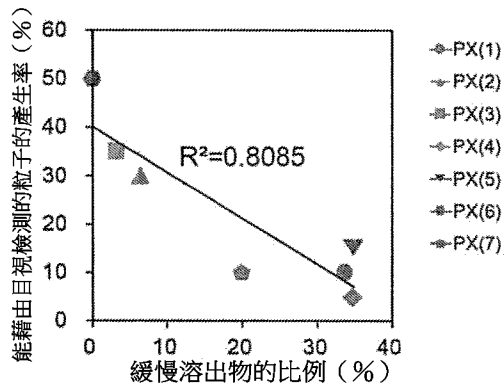


圖8

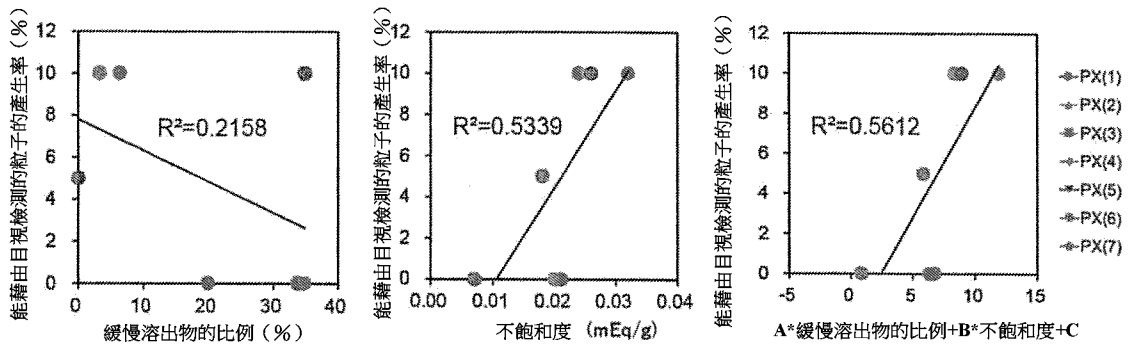


圖9

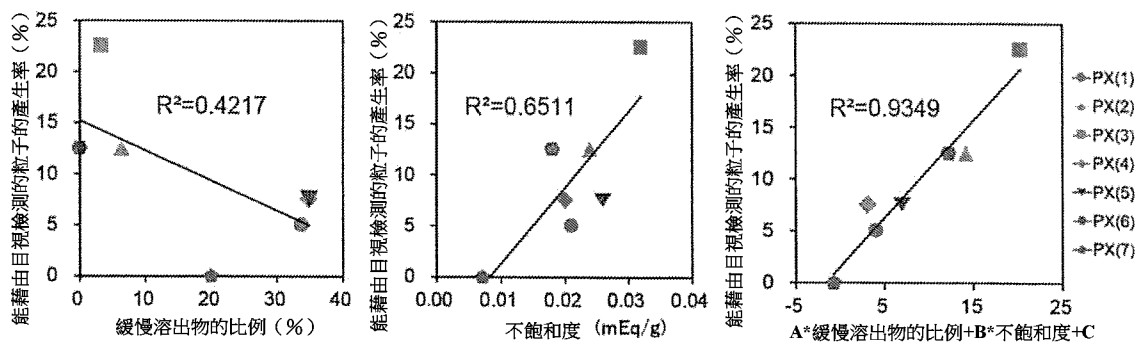


圖10

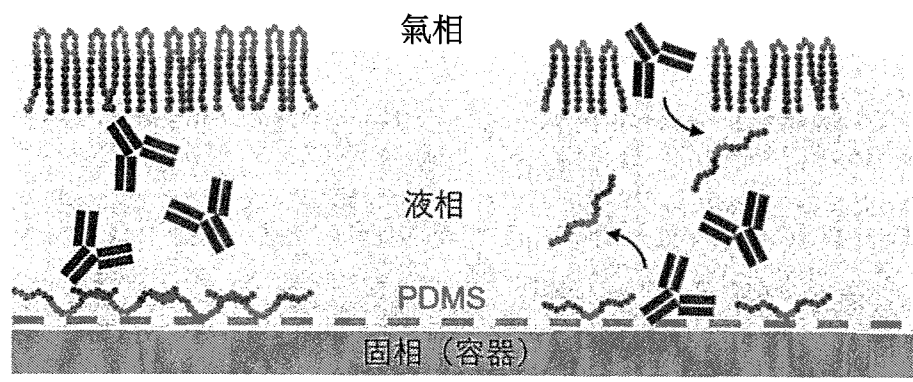


圖 11

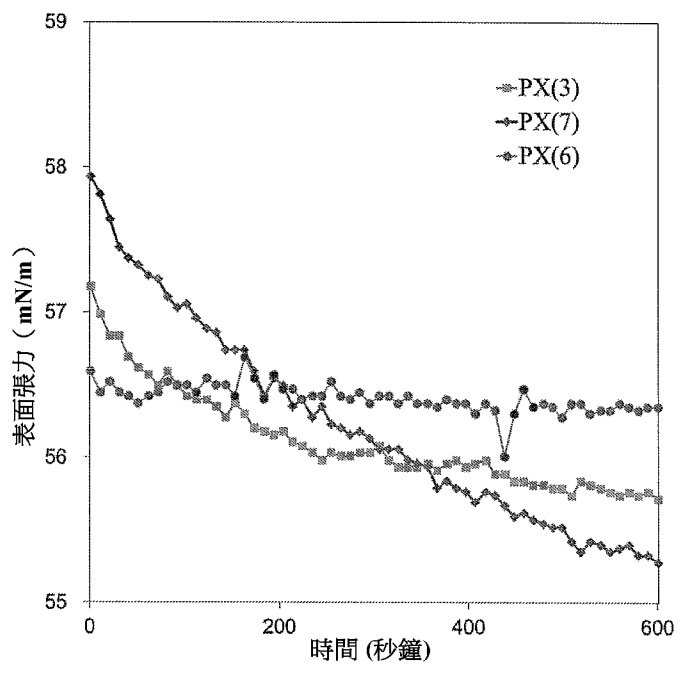


圖 12

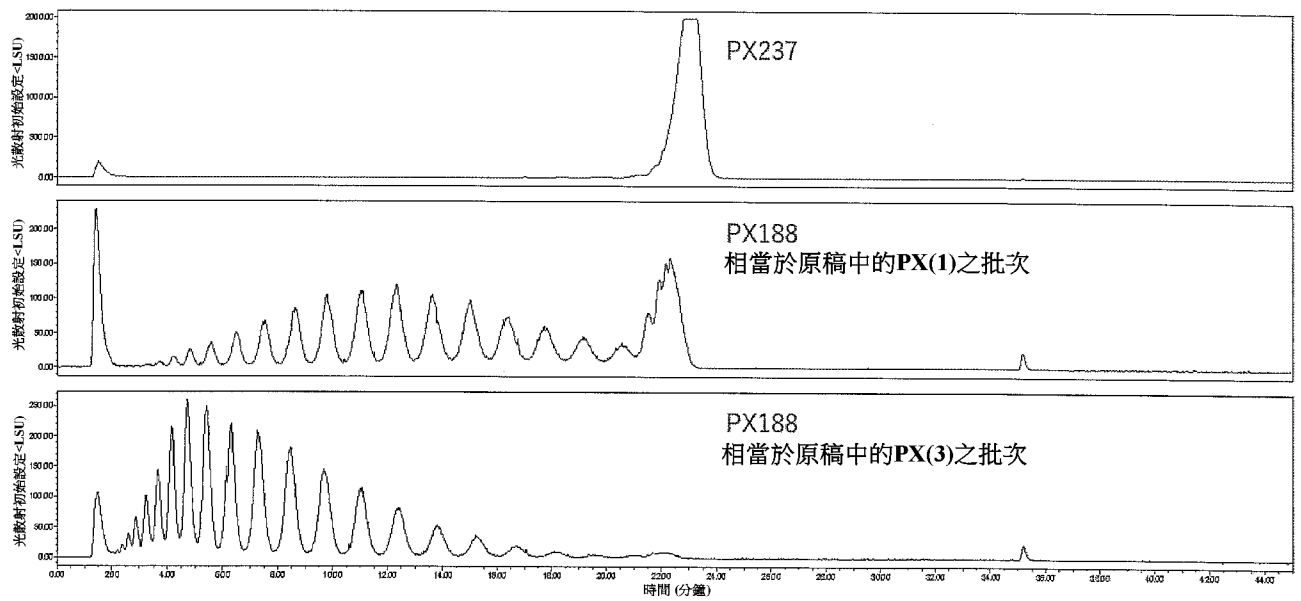


圖13

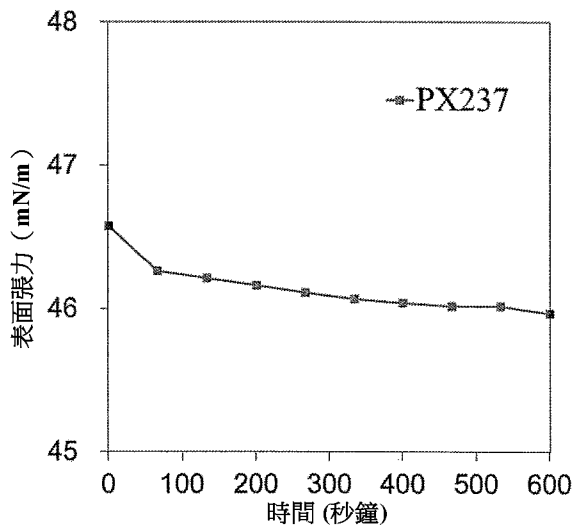


圖14

移動相B：乙腈

(3) 溶出梯度程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25℃，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

(6) 管柱溫度：65±5℃

(7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

【0009】 [1-2]如[1-1]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自22~33之數。

[1-3]如[1-1]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自25~30之數。

[1-4]如[1-1]所記載之醫藥製劑，其中，b係選自35~40之數。

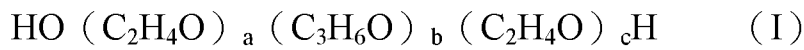
【0010】 [1-5]如[1-1]~[1-4]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，17分鐘以後的峰面積為6%以上、19%以上、33%以上或35%以上。

[1-6]一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，所述水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：

第 4 頁，共 68 頁(發明說明書)

P220181300TWF1



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~40之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

其係在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中，相對於1.5分鐘以後的全峰面積，溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙基苯之HPLC管柱（1000Å，5 μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出梯度程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

(6) 管柱溫度：65±5°C

移動相B：乙腈

(3) 溶出梯度程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測醫藥製劑：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

(6) 管柱溫度：65±5°C

(7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

[5-14]如[5-13]所記載之醫藥製劑，其中，在高速液體層析法中，相對於全峰面積，溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上。

[5-15]如[5-13]或[5-14]所記載之醫藥製劑，其中，17分鐘以後的峰面積為6%以上、19%以上、20%以上、33%以上、35%以上、36%以上或46%以上。

[5-16]如[5-13]~[5-15]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，已填充大孔型苯乙烯二乙基苯之HPLC管柱為PLRP-S管柱。

[5-17]如[5-1]~[5-16]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為3%（w/w）以上的比例包含在分子內含有34以上的（C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O）之泊洛沙姆分子。

[5-18]如[5-1]~[5-17]中任一者所記載之醫藥製劑，其中，泊洛沙姆以

第 16 頁，共 68 頁(發明說明書)

### (1) 疏水度

在本發明的一態樣中，可藉由使用高疏水度的界面活性劑而減少含有抗體之醫藥製劑中的粒子產生。

**【0107】** 泊洛沙姆係由疏水性的聚環氧丙烷 (PPO) 鏈一嵌段及配置於兩側之親水性的聚環氧乙烷 (PEO) 鏈兩嵌段所構成之三嵌段兩親媒性共聚物，PPO 鏈係由平均 22~40 之間的數的環氧丙烷，較佳為 22~33、25~30 或 35~40 之間的數，最佳為 22~33 之間的數的環氧丙烷所構成，PEO 鏈係由分別平均 75~85 單元的環氧乙烷所構成。環氧丙烷為疏水性成分，環氧乙烷為親水性成分。泊洛沙姆之中，包含較多疏水性成分者的疏水度較高。

**【0108】** 在本發明的一態樣中，泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為 3%、6%、20% 或 29% (w/w) 以上的比例包含含有 PPO 鏈之泊洛沙姆，所述 PPO 鏈係由 34 單元以上的環氧丙烷所構成。

**【0109】** 在本發明的一態樣中，泊洛沙姆的疏水度差異亦可藉由逆相層析法而確認。在逆相層析法中，藉由以 PEO 嵌段不會與固定相進行相互作用之方式進行設定，而可特定 PPO 嵌段的長度的分布。又，藉由此方法，可分析泊洛沙姆的疏水度差異 (非專利文獻 2)。在本發明的一態樣中，參照非專利文獻 2，如以下般設定泊洛沙姆的逆相層析法的條件。在逆相層析法中，已填充大孔型苯乙烯二乙烯基苯之 HPLC 管柱例如使用 Agilent Technologies 的 PLRP-S 管柱。

#### **【0110】** [高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：PLRP-S 管柱 (1000Å, 5 μm, 50×2.1mm; Agilent Technologies)

(2) 移動相：

移動相 A：超純水

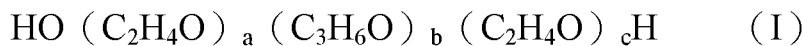
移動相 B：乙腈

(3) 溶出梯度程序

**【發明申請專利範圍】**

【請求項1】一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，該水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（polyoxyethylene polyoxypropylene glycol）（泊洛沙姆（Poloxamer）），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

其係在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中，相對於全峰面積，溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙烯基苯（styrene divinylbenzene）之 HPLC管柱（1000Å，5 μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出梯度程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

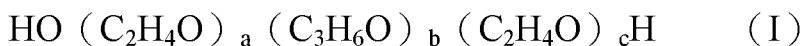
(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

(6) 管柱溫度：65±5°C

(7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

【請求項2】一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，該水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

其係在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中，相對於1.5分鐘以後的全峰面積，溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙基苯之HPLC管柱（1000Å，5 μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

## (3) 溶出梯度程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

## (4) 流速：0.2mL/分鐘

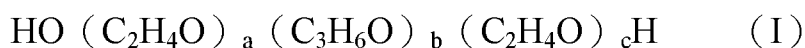
(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

## (6) 管柱溫度：65±5°C

## (7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

【請求項3】一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，該水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為3%（w/w）以上的比例包含在分子內含有34以上的（C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O）之泊洛沙姆分子。

【請求項4】一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，該水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及界面活性劑，

界面活性劑係含有0.5mg/mL的濃度的該界面活性劑之水溶液具有52.3mN/m以下的表面張力之界面活性劑。

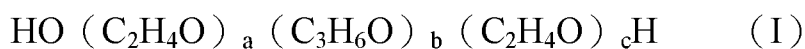
【請求項5】如請求項4之醫藥製劑，其中，界面活性劑選自泊洛沙姆或脂肪酸聚氧乙烯山梨醇酐（聚山梨醇酯(polysorbate)）。

【請求項6】如請求項4或5中任一項之醫藥製劑，其中，界面活性劑為如請求項1之式I所表示之泊洛沙姆。

【請求項7】如請求項4至6中任一項之醫藥製劑，其中，界面活性劑為聚山梨醇酯80。

【請求項8】一種醫藥製劑，其係包含水溶液而成之醫藥製劑，該水溶液包含：單株抗體，其選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體；以及聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

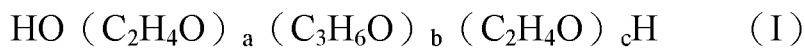
a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

泊洛沙姆的不飽和度係小於0.018mEq/g。

【請求項9】一種方法，其係在水溶液中包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，該單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

該方法包含在水溶液中添加聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

並且，包含在水溶液中添加在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中相對於全峰面積而溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上之泊洛沙姆：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙基苯之HPLC管柱（1000Å，5 μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出梯度程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25℃，霧化器加熱功

率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi)

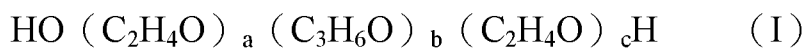
(6) 管柱溫度：65±5°C

(7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

【請求項10】一種方法，其係在水溶液中包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，該單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

該方法包含在水溶液中添加聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

並且，包含在水溶液中添加在利用由下述所定義之條件的高速液體層析法中相對於1.5分鐘以後的全峰面積而溶出時間為17分鐘以後的峰面積為3%以上之泊洛沙姆：

[高速液體層析法的條件]

(1) 管柱：已填充大孔型苯乙烯二乙基苯之HPLC管柱（1000Å，5 μm，50×2.1mm）

(2) 移動相：

移動相A：超純水

移動相B：乙腈

(3) 溶出梯度程序

0分鐘起至16.0分鐘為止：移動相B 從58%往64%

16.0分鐘起至18.5分鐘為止：移動相B 從64%往90%

18.5分鐘起至21.5分鐘為止：移動相B 於90%固定

21.5分鐘起至23.5分鐘為止：移動相B 從90%往100%

23.5分鐘起至30.0分鐘為止：移動相B 於100%固定

30.0分鐘起至30.1分鐘為止：移動相B 從100%往58%

30.1分鐘起至40.0分鐘為止：移動相B 於58%固定

(4) 流速：0.2mL/分鐘

(5) 檢測方法：蒸發光散射檢測（漂移管溫度：50±25°C，霧化器加熱功率位準：75%，增益值：250，氣壓：20psi）

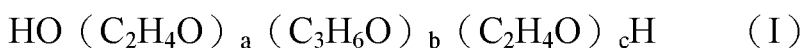
(6) 管柱溫度：65±5°C

(7) 泊洛沙姆濃度（超純水中）：0.5mg/mL。

【請求項11】一種方法，其係在包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，該單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

該方法包含在水溶液中添加聚氧乙烯聚氧丙烯二醇（泊洛沙姆），

泊洛沙姆係以式I所表示：



[式中，a及c係獨立地選自75~85之數，

b係選自22~33之數，

a、b及c係在泊洛沙姆整體中之平均值]，

泊洛沙姆以相對於泊洛沙姆整體為3%（w/w）的比例包含在分子內含有34以上的（C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O）之泊洛沙姆分子。

【請求項12】一種方法，其係在水溶液中包含單株抗體之醫藥製劑中減少水溶液中的粒子產生之方法，該單株抗體選自具有序列識別號1及2的H鏈與序列識別號3的L鏈之抗體或具有序列識別號4的H鏈與序列識別號5的L鏈之抗體，

該方法包含在水溶液中添加在 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 的濃度的界面活性劑水溶液中具有 $52.3\text{mN}/\text{m}$ 以下的表面張力之界面活性劑作為界面活性劑。

【請求項13】如請求項12之方法，其中，界面活性劑係選自泊洛沙姆或脂肪酸聚氧乙烯山梨醇酐（聚山梨醇酯）。

【請求項14】如請求項12或13之方法，其中，界面活性劑為如請求項1之式I所表示之泊洛沙姆。

【請求項15】如請求項12至14中任一項之方法，其中，界面活性劑為聚山梨醇酯80。

【請求項16】如請求項9至15中任一項之方法，其中，前述粒子係源自蛋白質。

【請求項17】如請求項9至16中任一項之方法，其中，前述粒子具有 $40\ \mu\text{m}$ 以上的粒徑。