



(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 201414496 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：102131326

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 30 日

(51)Int. Cl.：

A61K47/14 (2006.01)

A61K47/22 (2006.01)

A61K47/26 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P7/04 (2006.01)

(30)優先權：2012/08/31 美國

13/601,598

2013/03/15 美國

13/843,780

(71)申請人：拜耳保健責任有限公司 (美國) BAYER HEALTHCARE LLC (US)
美國

(72)發明人：馬欣翰 MA, XINGHANG (US)；香君 XIANG, JUN (US)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：2 共 57 頁

(54)名稱

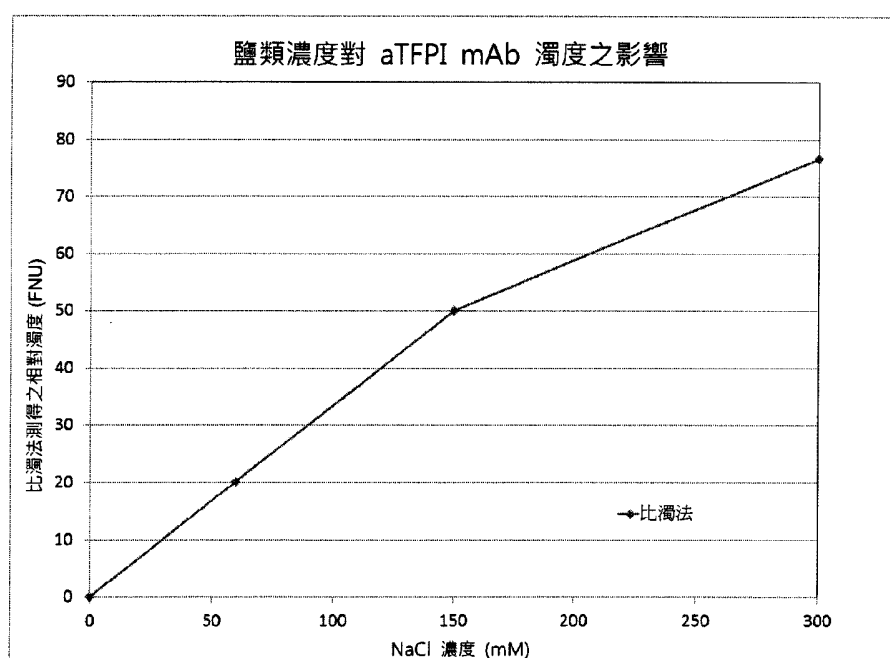
抗體及蛋白質配方

ANTIBODY AND PROTEIN FORMULATIONS

(57)摘要

本發明提供實質上等滲透壓且低黏度的無鹽抗體及其他蛋白質配方。本發明亦提供使用所揭露之配方治療疾病的方法。

第 1 圖





(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 201414496 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：102131326

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 30 日

(51)Int. Cl.：

A61K47/14 (2006.01)

A61K47/22 (2006.01)

A61K47/26 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P7/04 (2006.01)

(30)優先權：2012/08/31 美國

13/601,598

2013/03/15 美國

13/843,780

(71)申請人：拜耳保健責任有限公司 (美國) BAYER HEALTHCARE LLC (US)
美國

(72)發明人：馬欣翰 MA, XINGHANG (US)；香君 XIANG, JUN (US)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：2 共 57 頁

(54)名稱

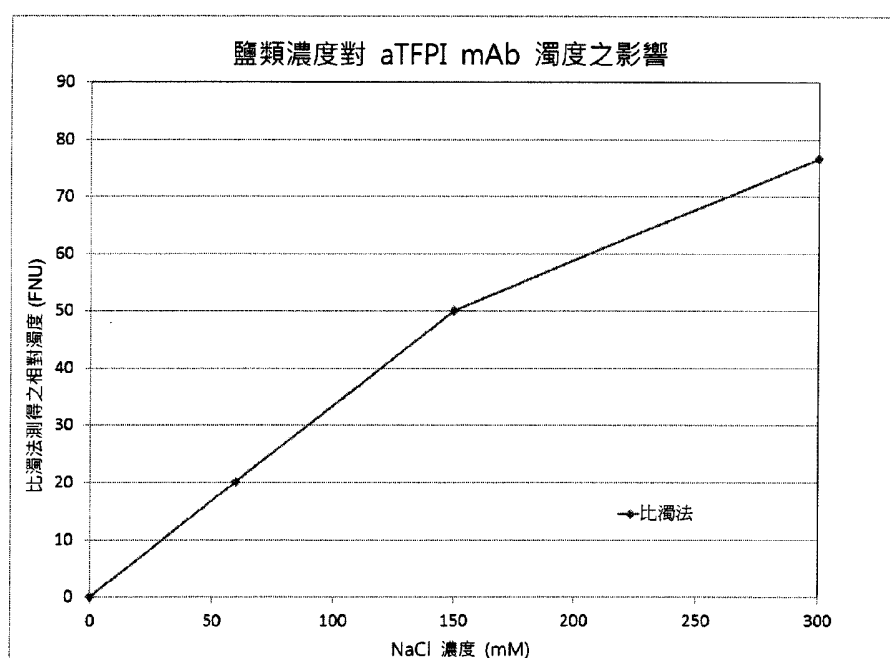
抗體及蛋白質配方

ANTIBODY AND PROTEIN FORMULATIONS

(57)摘要

本發明提供實質上等滲透壓且低黏度的無鹽抗體及其他蛋白質配方。本發明亦提供使用所揭露之配方治療疾病的方法。

第 1 圖



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)

抗體及蛋白質配方

ANTIBODY AND PROTEIN FORMULATIONS

【技術領域】

【0001】 本發明之揭露大體而言與等滲透壓且低黏度的抗體及其他蛋白質配方有關，包括有利於注射及一般性給藥之配方。

【先前技術】

【0002】 血友病患者因出血失調導致在外傷或開刀後會造成延遲性凝血。延長時間的出血是由一個或多個凝血因子的基因缺陷所引起。已知的兩種常見血友病類型為血友病 A 型及血友病 B 型。血友病 A 型由因子 VIII 之缺陷所引起，而血友病 B 型由因子 IX 之缺陷所引起。血友病患者總計約 75~80% 為血友病 A 型。

【0003】 組織因子路徑抑制子 (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) 為血液凝集外部路徑的人類抑制子，並且運作於抗凝血作用。目前正致力於發展對抗 TFPI 的抗體，包括抗-TFPI 單株抗體 (aTFPI mAb)，以阻斷 TFPI 的功能。如此的 aTFPI mAb 之一為人類 IgG2 抗-TFPI mAb，目前正發展使用於血友病 A 型及 B 型患者的治療。

【0004】 抗體及其他蛋白質可經由靜脈注射、肌肉注射及/或皮下注射給藥予病患。為確保病患順從度，皮下注射之劑型最好為等滲透壓，並且包括小的注射體積(每注射部位<2.0 ml)。為減少注射體積，蛋白質的給藥經常在 1 mg/ml 至 150 mg/ml 之範圍內。

【0005】 現今市售之抗體及其他蛋白質為主之藥物產品是使用液態及冷凍乾燥兩種劑型，而具有高蛋白質濃度的蛋白質及抗體藥物產品更常使用冷凍乾燥劑型。

【0006】 蛋白質及抗體劑型在配方發展上存在許多挑戰，特別是液態配方。配方中的蛋白質濃度接近其表觀溶度極限時，會透過沉澱、成膠及/或結晶發生相分離。在高蛋白質濃度時，由於可溶及不可溶之蛋白質-蛋白質的聚集體形成，抗體或其他蛋白質的穩定度會成為問題。高度濃縮的蛋白質配方經常為高黏度，而高黏度在處理上，例如在超微過濾及無菌過濾上以及在劑量溶液的注射上會出現困難度。對於打算用於肌肉注射或皮下給藥的配方所需之蛋白質濃度下，需要高濃度之穩定劑，例如蔗糖及氯化鈉，以達到長期的蛋白質穩定度。最終的高張溶液常因組織損害引起注射疼痛。因此，平衡穩定用之穩定劑的量及高蛋白質濃度配方的滲透壓是重要的。

【0007】 基於這些理由，在本技術領域中，對於液體型態之抗體及其他蛋白質為主之治療配方有需求，而該液體型態呈現高蛋白質濃度而無蛋白質聚集、滲透壓或黏度顯著增加之困擾，及/或蛋白質穩定度降低之困擾。因此，抗體及其他蛋

白質爲主之配方以含有限量賦形劑及易於治療性給藥或輸送的小體積爲佳。經得起冷凍乾燥的抗體及其他蛋白質爲主之治療配方爲更佳，以在長時間的儲存情況下增進蛋白質穩的定度。

【發明內容】

【0008】 本發明之揭露提供液態及冷凍乾燥的抗體及蛋白質爲主之配方，該配方爲實質上等張以及低黏度，並且該配方實質上不含無基鹽類。本文所示之抗體及其他蛋白質配方在自約 pH 4.0 至約 pH 6.0 之 pH 時，含有：自約 0 mM 至約 30 mM 的組胺酸；自約 50 ppm 至約 200 ppm 的非離子介面活性劑，例如聚山梨醇酯(Tween®)80 或聚山梨醇酯(Tween®)20；自約 88 mM 至約 292 mM 的糖或糖醇，例如甘露醇、右旋糖、葡萄糖、海藻糖及/或蔗糖；自約 0 mM 至約 50 mM 的精胺酸；自約 0 mM 至約 50 mM 的離胺酸；自約 0 mM 至約 133 mM 的甘胺酸或丙胺酸；自約 0 mM 至約 10 mM 的甲硫胺酸；以及自約 1 mg/ml 至約 150 mg/ml 的蛋白質。本文所揭露之配方的黏度範圍爲在 22°C 時呈現自約 1 mPa-S 至約 20 mPa-S，或在 22°C 時呈現自約 1 mPa-S 至約 15 mPa-S，或在 22°C 時呈現範圍自約 1 mPa-S 至約 10 mPa-S，或在 22°C 時呈現自約 1 mPa-S 至約 8 mPa-S，或在 22°C 時呈現自約 1 mPa-S 至約 6 mPa-S，以及滲透壓範圍爲自約 240 至約 380 mmol/kg。

【0009】 在進一步之態樣中，本發明之揭露提供用於治療病患病症的方法，包含將治療有效量之本文所述之一種或更多

種配方給藥予病患。例如，提供用於治療病患病症的方法，包含將治療有效量之本文中更詳細描述之抗體或其他蛋白質配方給藥予病患。

【0010】 本文列舉出本發明所教示之這些及其他特徵。

【圖式簡單說明】

【0011】 熟悉此項技術者將了解以下描述之圖式僅為舉例說明之用途。這些圖式並不以任何方式限制本發明所教示之範圍。

【0012】 第 1 圖顯示在 pH 5.5 時，氯化鈉(NaCl)濃度對 20 mg/ml 抗-TFPI mAb 配方之濁度的影響。

【0013】 第 2 圖顯示 pH 對於抗-TFPI mAb 藥物實體之濁度的影響。

【實施方式】

【0014】 如上述，本發明之揭露提供抗體及其他蛋白質配方，該配方穩定在所欲之儲存條件下的液體型態或冷凍乾燥型態的抗體或其他蛋白質。本文所述之配方包括一種或更多種醫藥可接受之賦形劑或穩定劑，並且容納在合適 pH 的緩衝介質中，且與生理流體實質上等滲透壓。就全身性給藥而言，注射為給藥的一種途徑，包括肌肉注射、靜脈注射、腹膜內注射以及皮下注射。

【0015】 本發明所揭露之蛋白質配方，由於其低黏度，故可經由例如超微過濾及無菌過濾便利地處理，並且可經由注

射，包括皮下注射，給藥予病患。再者，因為本發明所揭露之抗體及蛋白質配方實質上等滲透壓，其減少組織損害或其他有害的生理影響，以及因而達到良好的病患耐受性且增加病患順從度。

【0016】 本文所述之配方具有實質上不含添加的鹽類之特徵，其提供增加其他穩定劑，例如蔗糖，之濃度的變通性，同時維持經改善之體內(*in vivo*)耐受性之配方的滲透壓，並因此增加病患的順從度。再者，本發明所述配方之低黏度容許便利的處理，包括但不限定於超微過濾及無菌過濾，以及透過針頭注射藥物產品溶液。

【0017】 本文中所用之術語「黏度」意指液體配方流動的阻力，例如當給藥予病患期間透過注射器針頭的注射。黏度測量可藉由使用 Peltier 元件組的錐與板技術在界定的溫度下，例如本文所述之 22°C 完成。通常，將界定明確的剪切應力梯度應用至液體配方，並量測最終的剪切速率。黏度為剪切應力對剪切速率的比率。本文中所用之黏度以在 22°C 時之 mPa-S 為單位表示，其中 1 mPa-S = 1 cP。本文中所揭露之低黏度、實質上等滲透壓的配方通常具有下列特徵：黏度範圍在 22°C 時自約 1 mPa-S 至約 20 mPa-S、在 22°C 時自約 1 mPa-S 至約 15 mPa-S、在 22°C 時自約 1 mPa-S 至約 10 mPa-S、在 22°C 時自約 1 mPa-S 至約 8 mPa-S 或在 22°C 時自約 1 mPa-S 至約 6 mPa-S。

【0018】 本文中所用之術語「滲透壓」意指溶質濃度的量測，定義為每公斤(kg)溶液中溶質的毫莫耳數。所欲之滲透壓程度

可藉由添加一種或更多種穩定劑，例如糖或糖醇來達成，該糖或糖醇包含但不限定於甘露醇、右旋糖、葡萄糖、海藻糖及/或蔗糖。適於提供滲透壓之額外的穩定劑描述於參考文獻中，例如 Handbook of Pharmaceutical Excipients (第四版，Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, Science & Practice Publishers)或 Remingtons: The Science and Practice of Pharmacy (第十九版，Mack Publishing Company)。

【0019】 本文中所用之術語「約」意指所提供單位值的 $\pm 10\%$ 。本文中所用之術語「實質上」意指所關注的特性或性質呈現出全體或近似程度的定性狀態。在生物領域中具有通常知識者將了解生物及化學現象確實極少達成或避免絕對的結果。故本文中使用實質上之術語以指出眾多生物及化學現象中固有完整性的可能缺失。本文中所用之術語「等滲透壓」以及「等張」可與術語「實質上等滲透壓」以及「實質上等張」互換使用，並且意指配方之特徵為具有與另一溶液的滲透壓力相同或至少實質上相等的滲透壓力，其藉由配方中包括可滲透與不可滲透的溶質兩者之總濃度與另一溶液中溶質的總數相同或至少實質上相等的配方來達成。故本技術領域中具有通常知識者知悉使用「等滲透壓」以及「等張」配方於體內給藥時，該「等滲透壓」以及「等張」配方一般具有滲透壓範圍自約 270 mmol/kg 至約 310 mmol/kg，在本發明所揭露之低黏度配方的情況下，可互換地使用術語「等滲透壓」、「等張」、「實質上等滲透壓」以及「實質上等張」，以意指配方具有之滲透壓範圍為自約 240 mmol/kg 至約 380

mmol/kg，或自約 270 mmol/kg 至約 370 mmol/kg，或自約 300 mmol/kg 至約 330 mmol/kg。

【0020】 本發明所揭露之低黏度、實質上等滲透壓之抗體及其他蛋白質配方在自約 pH 4 至約 pH 6 之 pH 時，含有：自約 0 mM 至約 30 mM 的組胺酸；自約 50 ppm 至約 200 ppm 的非離子界面活性劑，例如聚山梨醇酯(Tween®)80 或聚山梨醇酯(Tween®)20；自約 88 mM 至約 292 mM 的糖或糖醇，例如甘露醇、右旋糖、葡萄糖、海藻糖及/或蔗糖；自約 0 mM 至約 50 mM 的精胺酸；自約 0 mM 至約 50 mM 的離胺酸；自約 0 mM 至約 133 mM 的甘胺酸或丙胺酸；自約 0 mM 至約 10 mM 的甲硫胺酸以及自約 1 mg/ml 至約 150 mg/ml 的蛋白質。本文所揭露之配方的黏度範圍在 22°C 時呈現出自約 1 mPa-S 至約 20 mPa-S，或在 22°C 時呈現出自約 1 mPa-S 至約 15 mPa-S，或在 22°C 時呈現出自約 1 mPa-S 至約 10 mPa-S，或在 22°C 時呈現出自約 1 mPa-S 至約 8 mPa-S，或在 22°C 時呈現出自約 1 mPa-S 至約 6 mPa-S，以及滲透壓範圍為自約 240 mmol/kg 至約 380 mmol/kg。

【0021】 在這些配方中，組胺酸為緩衝劑，可用來維持配方之 pH 自約 pH 4 至約 pH 6.0、或約 pH 5 至約 pH 6，例如約 pH 5、約 pH 5.5 或約 pH 6。分別或組合使用糖或糖醇，例如甘露醇、右旋糖、葡萄糖、海藻糖及/或蔗糖，作為在液體配方中以及冷凍乾燥期間或之後的抗體的低溫保護劑及穩定劑。非離子界面活性劑，例如聚山梨醇酯(包括聚山梨醇酯 20 及聚山梨醇酯 80)、泊洛沙姆(polyoxamers，包括泊洛沙姆 184

及泊洛沙姆 188)、Pluronic®多元醇以及其他乙烯/聚丙烯嵌段聚合物，在處理及儲存期間藉由減少介面的交互作用來穩定抗體，並預防蛋白質吸附。精胺酸為蛋白質助溶劑，且亦為減少抗體及其他蛋白質聚集(例如 aTFPI mAb 聚集)以及醮化之穩定劑。甲硫胺酸為在處理及儲存期間預防抗體氧化之抗氧化劑。

【0022】 糖及無機鹽常被使用作為蛋白質穩定劑；然而，糖及無機鹽二者也是有效的張力試劑。如果配方需要高濃度之一種或更多種糖以穩定蛋白質，無機鹽之濃度則應為零或維持在相當低濃度，以維持配方之滲透壓，使給藥後之注射疼痛降低。相當令人驚訝的發現為氯化鈉增加抗體配方的濁度。因此實質排除將無機鹽添加至本文所述之配方中。這些無鹽配方以提升穩定度以及減少相變，例如沉澱或聚集，來維持抗體及其他蛋白質配方的滲透壓。

【0023】 本文中所用之術語「鹽類」意指無機鹽，包含但不限於氯化鈉(NaCl)、硫酸鈉(Na_2SO_4)、硫氰酸鈉(NaSCN)、氯化鎂(MgCl_2)、硫酸鎂(MgSO_4)、硫氰酸銨(NH_4SCN)、硫酸銨($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)、氯化銨(NH_4Cl)、氯化鈣(CaCl_2)、硫酸鈣(CaSO_4)、氯化鋅(ZnCl_2)等等，或前述無機鹽之組合。本文所揭露之抗體及其他蛋白質配方以實質上不存在添加的鹽類為特徵，故於本文中是指無鹽抗體及/或蛋白質配方。本技術領域中具有通常知識者將了解，因 pH 調整而引入本發明所揭露之配方內而存在之無機鹽，不被視為添加的無機鹽，且依據本發明所揭露之配方中如果存在無機鹽，應當不會超過約 2

mM 之濃度。

【0024】 本文中所用之術語「界面活性劑」包括非離子界面活性劑，非離子界面活性劑包括但不限於聚山梨醇酯，例如聚山梨醇酯 20 或 80，以及泊洛沙姆，例如泊洛沙姆 184 或 188，Pluronic®多元醇以及其他乙烯/聚丙烯嵌段聚合物。有效提供穩定的抗體及其他蛋白質配方的界面活性劑含量常在 50 ppm 至 200 ppm 之範圍內。使用非離子界面活性劑可容許配方暴露在剪切應力及表面張應力下，而不引起抗體或其他蛋白質變性，且亦減少處理及儲存期間於表面上的吸附。本文所揭露之配方包括但不限於具有一種或更多種非離子界面活性劑之配方，包括例如一種或更多種聚山梨醇酯，例如聚山梨醇酯 20 或 80，一種或更多種泊洛沙姆，例如泊洛沙姆 184 或 188，一種或更多種 Pluronic®多元醇，及/或一種或更多種乙烯/聚丙烯嵌段聚合物。本文之範例為具有聚山梨醇酯之配方，例如聚山梨醇酯 20 (Tween® 20)或聚山梨醇酯 80 (Tween® 80)。

【0025】 本文中所用之術語「蛋白質」意指含有至少五個構成胺基酸(constituent amino acids)的胺基酸聚合物，該構成胺基酸藉由胜肽鍵共價連結。構成胺基酸可選自由遺傳碼所編碼的胺基酸群組，包括：丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸、絲胺酸、酥胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、半胱胺酸、甘胺酸、脯胺酸、精胺酸、組胺酸、離胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸。本文中所用之術語「蛋白質」與相關之術語「胜肽」及「多胜肽」同

義。

【0026】 本文中所用之術語「抗體」意指一般已知為免疫球蛋白的蛋白質類型。抗體包括全長單株抗體(mAb)，例如 IgG2 單株抗體，包括免疫球蛋白可結晶片段(Fc)區域。術語抗體亦包括雙專一性抗體(bispecific antibody)、雙體(diabodies)、單鏈分子以及抗體片段，例如抗原結合片段(Fab)、抗原結合片段雙體(F(ab')₂)以及可變異片段(Fv)。

【0027】 本文中所用之術語「抗-TFPI 抗體 (anti-TFPI antibody)」意指具有對抗人類 TFPI 蛋白質以及人類 TFPI 蛋白質片段與變異體之結合專一性的抗體。本文所示之抗-TFPI 抗體可為 IgG2 抗體，且包括抗-TFPI IgG2 單株抗體，例如嵌合性的、人源化的、完全人類的抗-TFPI IgG2 單株抗體。本發明之揭露的範例抗-TFPI 抗體為人類抗-TFPI IgG2 單株抗體，具有包含本文中以 SEQ ID NO: 1 表示序列的輕鏈及/或本文中以 SEQ ID NO: 2 表示的重鏈。亦適用於本文所揭露之配方中的其他抗-TFPI 單株抗體，包括其全長抗體、其抗原結合片段及其變異體，描述於 PCT 專利公開案第 WO 2011/109452 號及第 WO 2010/017196 號中，這兩案之全文皆加入本文中做為參考。

【0028】 「單株抗體」的特徵為具有單一抗原決定部位的專一性。例如，單株抗體可以 Kohler 以及 Milstein 於 *Nature* 256:495 (1975)中所描述的融合瘤方法製造，或以重組 DNA 方法，例如以美國專利案第 4,816,567 號中描述的方法製造。單株抗體亦可使用例如 Clackson 等人於 *Nature* 352:624-628

(1991)中以及 Marks 等人於 *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) 中所描述的技術，由噬菌體展示庫(phage display libraries)分離出。

【0029】 單株抗體包括「嵌合性單株抗體」，其中一部分的重鏈及/或輕鏈包括來自衍生自一個物種之抗體的序列，而抗體的剩餘部分，包括 Fc 區域，包括來自衍生自第二物種之抗體的序列，通常該第二物種為人類。詳見例如美國專利案第 4,816,567 號以及 Morrison 等人於 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984) 之發表。

【0030】 單株抗體亦包括「人源化單株抗體」，其中衍生自一個物種之抗體的重鏈及/或輕鏈序列之一或多個互補決定區(CDR)取代衍生自第二物種之抗體的重鏈及/或輕鏈序列之一或多個 CDR，通常該第二物種為人類。「人源化」的處理通常應用於為給藥予人類所發展的單株抗體。詳見例如 Riechmann 等人於 *Nature* 332(6162):323-27 (1988) 之發表以及 Queen 等人於 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(24):10029-33 (1989) 之發表。

【0031】 單株抗體亦包括「完全人類單株抗體」，其中完整的重鏈及輕鏈序列是衍生自人類抗體序列。完全人類單株抗體可以噬菌體展示技術產生，且可從經基因工程處理而表現人類抗體全部功能的小鼠分離出。詳見例如 McCafferty 等人於 *Nature* 348(6301):552-554 (1990) 之發表、Marks 等人於 *J. Mol. Biol.* 222(3):581-597 (1991) 之發表以及 Carmen 與 Jermutus 於 *Brief Funct. Genomic Proteomic* 1(2):189-203

(2002) 之發表。

【0032】 本文中所用之抗體或其他蛋白質配方的術語「醫藥上有效量」意指於投藥方案中提供治療效果之配方的量。本文所揭露的抗體及蛋白質配方通常包括抗體及其他蛋白質的濃度範圍自約 1 mg/ml 至約 150 mg/ml、或自約 1 mg/ml 至約 100 mg/ml、或自約 1 mg/ml 至約 50 mg/ml、或自約 1 mg/ml 至約 20 mg/ml、或自約 1 mg/ml 至約 10 mg/ml、或自約 10 mg/ml 至約 20 mg/ml、或自約 20 mg/ml 至約 150 mg/ml、或自約 50 mg/ml 至約 150 mg/ml、或自約 60 mg/ml 至約 150 mg/ml、或自約 70 mg/ml 至約 150 mg/ml、或自約 80 mg/ml 至約 150 mg/ml、或自約 90 mg/ml 至約 150 mg/ml、或自約 100 mg/ml 至約 150 mg/ml、或自約 120 mg/ml 至約 150 mg/ml、或自約 140 mg/ml 至約 150 mg/ml。在一些態樣中，這些配方內的蛋白質或抗體的濃度為約 150 mg/ml。當皮下給藥時，如此配方通常的給藥體積以每一注射部位小於約 2.0 ml、或約 1.5 ml、或約 1 ml、或約 0.5 ml。

【0033】 在某些態樣中，抗體或其他蛋白質配方在 pH 範圍自約 pH 5.0 至約 pH 6.0 時，含有約 30 mM 的組胺酸、約 100 ppm 的 Tween 80、約 292 mM 的蔗糖、約 20 mg/ml 的抗體或其他蛋白質。在相關之態樣中，抗體及其他蛋白質配方亦含有自約 30 mM 至約 50 mM 的精胺酸。

【0034】 在其他態樣中，抗體或其他蛋白質配方在 pH 範圍自約 pH 5.0 至約 pH 6.0 時，含有約 10 mM 的組胺酸、約 75 ppm 的 Tween 80、約 234 mM 的蔗糖、約 50 mg/ml 的抗體或其他

蛋白質。在相關之態樣中，抗體及其他蛋白質配方亦含有自約 30 mM 至約 50 mM 的精胺酸。

【0035】 在其他態樣中，抗體或其他蛋白質配方在 pH 範圍自約 pH 5.0 至約 pH 6.0 時，含有約 10 mM 的組胺酸、約 75 ppm 的 Tween 80、約 234 mM 的蔗糖、約 100 mg/ml 的抗體或其他蛋白質。在相關之態樣中，抗體及其他蛋白質配方亦含有自約 30 mM 至約 50 mM 的精胺酸。

【0036】 在其他態樣中，抗體或其他蛋白質配方在 pH 範圍自約 pH 5.0 至約 pH 6.0 時，含有約 10 mM 的組胺酸、約 75 ppm 的 Tween 80、約 88 mM 的蔗糖、約 133 mM 的甘胺酸、約 100 mg/ml 的抗體或其他蛋白質。在相關之態樣中，抗體及其他蛋白質配方亦含有自約 30 mM 至約 50 mM 的精胺酸。

【0037】 在其他態樣中，抗體或其他蛋白質配方在 pH 範圍自約 pH 5.0 至約 pH 6.0 時，含有約 10 mM 的組胺酸、約 75 ppm 的 Tween 20、約 88 mM 的蔗糖、約 133 mM 的甘胺酸、約 100 mg/ml 的抗體或其他蛋白質。在相關之態樣中，抗體及其他蛋白質配方亦含有自約 30 mM 至約 50 mM 的精胺酸。

【0038】 在其他態樣中，抗體或其他蛋白質配方在 pH 範圍自約 pH 5.0 至約 pH 6.0 時，含有約 10 mM 的組胺酸、約 200 ppm 的 Tween 20、約 88 mM 的蔗糖、約 133 mM 的甘胺酸、約 100 mg/ml 的抗體或其他蛋白質。在相關之態樣中，抗體及其他蛋白質配方亦含有自約 30 mM 至約 50 mM 的精胺酸。

【0039】 在其他態樣中，抗體或其他蛋白質配方在 pH 範圍自約 pH 5.0 至約 pH 6.0 時，含有約 10 mM 的組胺酸、約 75 ppm

的 Tween 80、約 88 mM 的蔗糖、約 100 mg/ml 的抗體或其他蛋白質。在相關之態樣中，抗體及其他蛋白質配方亦含有自約 10 mM 至約 50 mM 的精胺酸。

【0040】 在其他態樣中，抗體或其他蛋白質配方在 pH 範圍自約 pH 5.0 至約 pH 6.0 時，含有約 10 mM 的組胺酸、約 75 ppm 的 Tween 80、約 88 mM 的蔗糖、約 133 mM 的甘胺酸、約 10 mM 的精胺酸、約 100 mg/ml 的抗體或其他蛋白質。在相關之態樣中，抗體及其他蛋白質配方亦含有自約 0 mM 至約 10 mM 的甲硫胺酸。

【0041】 在其他態樣中，抗體或其他蛋白質配方在 pH 範圍自約 pH 5.0 至約 pH 6.0 時，含有約 10 mM 的組胺酸、約 75 ppm 的 Tween 80、約 88 mM 的蔗糖、約 133 mM 的甘胺酸、約 30 mM 的離胺酸、約 100 mg/ml 的抗體或其他蛋白質。

【0042】 在其他態樣中，抗體或其他蛋白質配方在 pH 範圍自約 pH 5.0 至約 pH 6.0 時，含有約 10 mM 的組胺酸、約 75 ppm 的 Tween 80、約 234 mM 的蔗糖、約 30 mM 的精胺酸、約 100 mg/ml 的抗體或其他蛋白質。在相關之態樣中，抗體及其他蛋白質配方亦含有自約 0 mM 至約 10 mM 的甲硫胺酸。

【0043】 本文中範例的抗體配方，其中抗體包含 IgG2 抗體，例如抗組織因子路徑抑制子抗體(aTFPI Abs)，包括具有輕鏈及重鏈的人類 IgG2 單株抗體，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 1 序列，該重鏈包含 SEQ ID NO: 2 序列。

【0044】 因此，本發明之揭露提供抗-TFPI mAb 配方，包括抗-TFPI IgG2 mAb 配方，其中抗-TFPI mAb 在高蛋白質濃度

時為可溶。通常在本文所揭露之配方中抗-TFPI mAb 濃度在約 1 mg/ml 至約 150 mg/ml 之間時仍然可溶，並於等滲透壓儲存條件下仍然穩定，以及與目前可獲得之抗體配方相較呈現出降低的黏度。

【0045】 具有包含 SEQ ID NO: 1 序列之輕鏈及包含 SEQ ID NO: 2 序列之重鏈的抗-TFPI 抗體為阻斷組織因子路徑抑制子 (TFPI) 之 IgG2 抗體。由於 TFPI 抑低調控 (down-regulate) 外部凝集，抗-TFPI 抗體可藉由阻斷 TFPI 來促進驅動外部路徑的凝集，因而繞過血友病治療之內部路徑中的 FVIII 或 FIX 缺陷。本文所示之無鹽抗-TFPI 抗體配方可經由皮下注射或其他注射途徑給藥予病患。

【0046】 如部分本發明之揭露，已發現抗-TFPI 抗體的溶解度與穩定度被賦形劑所影響。抗-TFPI 抗體的溶解度隨著 NaCl 濃度減少而增加。當 NaCl 不存在時，抗-TFPI 抗體的溶解度高於包括 NaCl 的配方。此外，已發現正電荷胺基酸，例如精胺酸及離胺酸可改善抗-TFPI 抗體的穩定度，而且 pH 大幅影響抗-TFPI 抗體的溶解度。抗體溶液的濁度隨著 pH 增加而增加；然而，當 pH 降低時，沉澱為可逆的。用於穩定本文所示之抗-TFPI 抗體的最佳 pH 範圍自約 pH 4 至約 pH 6 或自約 pH 5 至約 pH 6，例如約 pH 5、約 pH 5.5 或約 pH 6。

【0047】 如上詳載的本文範例之配方，其中抗體為抗-TFPI 抗體 (aTFPI Ab)。在至少一個態樣中，抗-TFPI 抗體為人類 IgG2 單株抗體。例如，人類抗-TFPI IgG2 單株抗體包括含有輕鏈以及重鏈之抗體，該輕鏈具有以 SEQ ID NO: 1 表示之胺基酸

序列，該重鏈具有以 SEQ ID NO: 2 表示之胺基酸序列。

範例的人類抗-TFPI IgG2 單株抗體之輕鏈及重鏈序列

序列識別符號	胺基酸序列 (NH ₃ -COOH)
SEQ ID NO: 1	SYELTQPPSV SVSPGQTARI TCSGDNLPKY YAHWYQQKPG QAPVVVIFYD VNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCQAW WSSTPVFGGG TKLTVLGQPK AAPSVTLFPP SSEELQANKA TLVCLISDFY PGAVTVAWKA DSSPVKAGVE TTTPSKQSNN KYAASSYLSL TPEQWKSHRS YSCQVTHEGS TVEKTVAPTE CS
SEQ ID NO: 2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMDWVRQA PGKGLEWVSS IRGSRGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARLY RYWFDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTGPS SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPMLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG

【0048】 本發明之揭露亦提供用於治療病患病症之方法，包含將治療有效量之本文所述之一種或更多種配方給藥予病患。例如，提供用於治療病患病症之方法，包含將治療有效量的抗體或其他蛋白質配方給藥予病患，該抗體或其他蛋白質配方在 pH 範圍自約 pH 4.0 至約 pH 6.0 之時，含有自約 0 mM 至約 30 mM 的組胺酸、自約 50 ppm 至約 200 ppm 的聚山梨醇酯(Tween®) 80 或聚山梨醇酯(Tween®) 20、自約 88 mM 至約 292 mM 的蔗糖、自約 0 mM 至約 50 mM 的精胺酸、自約 0 mM 至約 50 mM 的離胺酸、自約 0 mM 至約 133 mM 的甘胺酸或丙胺酸、自約 0 mM 至約 10 mM 的甲硫胺酸以及自約 1 mg/ml 至約 150 mg/ml 的蛋白質。在這些方法的至少一個態樣中，抗體或其他蛋白質配方可以靜脈注射給藥。在這些方法的其他態樣中，抗體或其他蛋白質配方可以皮下注射給藥。在這些方法的其他態樣中，抗體或其他蛋白質配方可以肌肉注射給藥。

【0049】 在相關之態樣中，本發明之揭露提供病患中血友病 A 型或血友病 B 型的治療方法，包含將治療有效量的抗-TFPI 抗體配方給藥予病患，該抗-TFPI 抗體配方在 pH 範圍自約 pH 4.0 至約 pH 6.0 時，含有自約 0 mM 至約 30 mM 的組胺酸、自約 50 ppm 至約 200 ppm 的聚山梨醇酯(Tween®) 80 或聚山梨醇酯(Tween®) 20、自約 88 mM 至約 292 mM 的蔗糖、自約 0 mM 至約 50 mM 的精胺酸、自約 0 mM 至約 50 mM 的離胺酸、自約 0% (0 mM) 至約 1% (133 mM) 的甘胺酸、自約 0 mM

至約 10 mM 的甲硫胺酸以及自約 1 mg/ml 至約 150 mg/ml 的蛋白質。在這些方法的至少一個態樣中，抗-TFPI 抗體配方可以靜脈注射給藥。在這些方法的其他態樣中，抗-TFPI 抗體配方可以皮下注射給藥。在這些方法的其他態樣中，抗-TFPI 抗體配方可以肌肉注射給藥。

【0050】 依據病患中血友病 A 型或血友病 B 型的這些治療方法的某些態樣，抗-TFPI 抗體為人類抗-TFPI IgG2 單株抗體，例如含有輕鏈以及重鏈之人類抗-TFPI IgG2 單株抗體，該輕鏈具有以 SEQ ID NO: 1 表示之胺基酸序列，該重鏈具有以 SEQ ID NO: 2 表示之胺基酸序列。

【0051】 為達解釋本說明書之目的，將適時應用下列定義，以單數型態使用的術語亦將包括複數型態，反之亦然。一旦下列任何定義與包括加入本文中作為參考的其他文件中之用字抵觸，下列任何定義應隨時以解釋本說明書以及其相關之申請專利範圍為目的來使用，除非已明白地意指相反的含義（例如在原使用此術語之文件中）。「或」的使用意謂「及/或」，除非另有說明。本文中「一」的使用意謂「一或更多」，除非另有說明，或使用「一或更多」明顯不適當。「包含」及「包括」的使用為可互換且不受限制。再者，本技術領域中具有通常知識者應了解，在一個或更多個實施例的描述使用術語「包含」時，於一些特定的例子中，可使用「基本上由...組成」及/或「由...組成」的表達方式擇一地描述實施例。

【0052】 本發明揭露之態樣可參照下列實施例進一步了解，但不應以任何方式將下列實施例解讀作為本發明所教示範圍

的限制。

實施例

實施例 1

NaCl 濃度以及 pH 對於抗體溶液濁度之影響

【0053】 本實施例揭露鹽類(NaCl)濃度以及 pH 對於含有抗-TFPI 人類單株抗體溶液的濁度之影響，抗-TFPI 人類單株抗體具有以 SEQ ID NO: 1 表示之胺基酸序列的輕鏈以及具有以 SEQ ID NO: 2 表示之胺基酸序列的重鏈。

【0054】 以比濁法測量溶液之濁度，以快速評估鹽類濃度以及 pH 對 aTFPI Ab 溶液之影響。本實施例中使用之抗-TFPI 抗體配方含有 10 mM 醋酸緩衝液、88 mM 蔗糖以及 200 ppm Tween 80。NaCl 濃度於 0 mM 至 300 mM 間變動。在 pH 5.5 的抗-TFPI 配方之 NaCl-依賴性之濁度測量結果示於第 1 圖中。這些數據證實了抗-TFPI mAb 配方之濁度隨著 NaCl 濃度的增加而顯著增加。鹽類濃度自 0 增加至 300 mM 造成比濁法測量的濁度值增加了 72 FNU，其可歸因於溶液中 aTFPI Ab 的沉澱、聚集或不溶解化。由於此發現，對於本發明所揭露之抗-TFPI 抗體配方因而建議使用不含氯化鈉之溶液。

【0055】 不被理論所限制，咸信伴隨 NaCl 濃度增加之抗-TFPI mAb 配方所增加之濁度起因於抗-TFPI mAb 的精胺酸側鏈上正電荷之中和作用。在不同 pH 時伴隨單價鹽類(NaCl)衝擊之 aTFPI mAb 的相行為，解釋了為何可達成穩定的、可溶的、無鹽的以及實質上等滲透壓的 aTFPI mAb 配方。

【0056】 本發明所揭露之 aTFPI mAb 分子在 pH 低於等電點 (PI)時具有 116 個帶有正電荷的側鏈的胺基酸(42 個精胺酸以及 74 個離胺酸)。此抗-TFPI 抗體具有 ~ 7.9 之 PI。pH 低於 PI 時，例如 pH 4 $\sim$ 6 時，此抗-TFPI 抗體具有淨正電荷。抗-TFPI 抗體表面上的正電荷互斥於個別分子間適當地預防蛋白質-蛋白質的結合，因而顯著增加溶解度。假設鹽類的陰離子(Cl^-)連接至抗-TFPI 抗體表面上精胺酸側鏈上的胍基(guanidinium group)以中和正電荷，此可促進蛋白質-蛋白質之交互作用，並因此造成較低溶解度，以及溶液濁度。藉由將 pH 偏移到 4 $\sim$ 6，發展本文所述的無鹽配方以達成增加抗體的溶解度與穩定度(詳見第 1 圖)。在鹽類不存在的情況中，其他穩定劑，例如蔗糖，濃度可增加至 $> 150 \text{ mM}$ 以及 $< 300 \text{ mM}$ 而不損及滲透壓。

【0057】 亦研究 pH 對於抗-TFPI 抗體濁度之影響。如第 2 圖所示，pH 亦可大幅影響 aTFPI Ab 溶液的濁度。當 pH 從 4 增加到 6.5 時，aTFPI Ab 溶液的濁度增加了 81 FNU。進一步將 pH 增加到 7，溶液的濁度則超出可精確測量的範圍。然而，當 pH 降低時，溶液中形成的沉澱為可逆的。此結果可歸因於當 pH 增加至接近 aTFPI Ab 之 PI 值時的表面電荷中和，因為 aTFPI Ab 之 PI 值近似於 7.9。依據此研究，aTFPI Ab 配方最好為較低 pH。然而，較低之 pH 在注射期間會引起組織刺激性。因此，就病患順從度的觀點而言較佳為中性 pH。平衡這兩個因子，aTFPI Ab 配方之最佳 pH 在 pH 5 到 pH 6 之間。

實施例 2

抗-TFPI 抗體配方

【0058】 依據實施例 1 中所示之非預期發現，實質上等滲透壓之抗-TFPI Ab 配方的製備不含 NaCl。這些配方通常使用高蔗糖濃度來幫助穩定抗-TFPI Ab。

【0059】 依據表 1 中所示之配方以透析法解凍並重新配製冷凍之抗-TFPI 抗體。製備配方並以 0.22 μm 濾器過濾配方，以及填裝至玻璃管藥瓶中並以橡膠瓶塞塞住藥瓶。

【0060】 亦發現不存在 NaCl 以及存在 88 mM 至 292 mM 蔗糖與聚山梨醇酯 80 或聚山梨醇酯 20 (50~200 ppm)時，正電荷胺基酸，例如精胺酸(10~50 mM)，可有效抑制 aTFPI Ab 醣化。

表 1

抗-TFPI 抗體配方

配方名稱	配方組成分
PH5.0	20 mg/ml aTFPI mAb 30 mM 組胺酸 292 mM 蔗糖 100 ppm Tween 80 pH 5.0
PH5.5	20 mg/ml aTFPI mAb 30 mM 組胺酸 292 mM 蔗糖 100 ppm Tween 80 pH 5.5

PH6.0	20 mg/ml aTFPI mAb 30 mM 組胺酸 292 mM 蔗糖 100 ppm Tween 80 pH 6.0
6ARG	20 mg/ml aTFPI mAb 30 mM 組胺酸 292 mM 蔗糖 100 ppm Tween 80 50 mM 精胺酸 pH 6.0
PH5.5LC	50 mg/ml aTFPI Ab 10 mM 組胺酸 234 mM 蔗糖 75 ppm Tween 80 pH 5.5
PH5.5LCARG	50 mg/ml aTFPI Ab 10 mM 組胺酸 234 mM 蔗糖 75 ppm Tween 80 30 mM 精胺酸 pH 5.5
PH5.5HCARG	100 mg/ml aTFPI Ab 10 mM 組胺酸 234 mM 蔗糖 75 ppm Tween 80 30 mM 精胺酸 pH 5.5

PH6LCARG	50 mg/ml aTFPI Ab 10 mM 組胺酸 234 mM 蔗糖 75 ppm Tween 80 50 mM 精胺酸 pH at 6
PH6LCARG_L	100 mg/ml aTFPI Ab 10 mM 組胺酸 234 mM 蔗糖 75 ppm Tween 80 30 mM 精胺酸 pH 6
3%STWN80	100 mg/ml aTFPI Ab 10 mM 組胺酸 88 mM 蔗糖 75 ppm Tween 80 30 mM 精胺酸 133 mM 甘胺酸 pH 5.5
3%STWN20_L	100 mg/ml aTFPI Ab 10 mM 組胺酸 88 mM 蔗糖 75 ppm Tween 20 30 mM 精胺酸 133 mM 甘胺酸 pH 5.5

3%STWN20_H	100 mg/ml aTFPI Ab 10 mM 組胺酸 88 mM 蔗糖 200 ppm Tween 20 30 mM 精胺酸 133 mM 甘胺酸 pH at 5.5
5.5ARG10	100 mg/ml aTFPI Ab 10 mM 組胺酸 88 mM 蔗糖 75 ppm Tween 80 10 mM 精胺酸 133 mM 甘胺酸 pH 5.5
5.5ARG10MET	100 mg/ml aTFPI Ab 10 mM 組胺酸 88 mM 蔗糖 75 ppm Tween 80 10 mM 精胺酸 10 mM 甲硫胺酸 133 mM 甘胺酸 pH 5.5
5.5LYS30	100 mg/ml aTFPI Ab 10 mM 組胺酸 88 mM 蔗糖 75 ppm Tween 80 30 mM 離胺酸 133 mM 甘胺酸 pH 5.5

PH5.5HCARGMET	100 mg/ml aTFPI Ab
	10 mM 組胺酸
	234 mM 蔗糖
	75 ppm Tween 80
	30 mM 精胺酸
	10 mM 甲硫胺酸
	pH 5.5

【0061】 以下列方法分析這些抗-TFPI mAb 配方的每一個：以 HPLC-SEC 分析蛋白質聚集以及降解；以 LC-MS 分析 aTFPI 結構變化(醣化及氧化)；以比濁法分析濁度的評估；以黏度計分析黏度的測量；以滲透壓儀器分析滲透壓的測量。這些分析的結果表示於表 2 中。

表 2

抗-TFPI 抗體配方之滲透壓及黏度

配方組成分	在 22 °C 之黏度 (mPa-S)	滲透壓 (mmol/kg)
aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5	1.8	272

aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM	1.6	339
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM	2.9	335
aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 6.0 精胺酸 50mM	2.3-	373
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 6.0 精胺酸 30mM	4.6	353*

aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	4.1	282*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 20 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	4.5	282
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 20 200ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	4.5	278
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 10mM 甘胺酸 133 mM	--	263*

aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 10mM 甲硫胺酸 10mM 甘胺酸 133 mM	--	268*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 離胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	--	288*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甲硫胺酸 10mM	3.0	341

* 根據計算結果估計的滲透壓

實施例 3

精胺酸對於抗-TFPI Ab 醣化之影響

【0062】 該實施例證明了相較於未添加精胺酸的抗-TFPI Ab 配方，包含精胺酸的抗-TFPI Ab 配方呈現出抗體醣化減少。

【0063】 包含及不包含精胺酸之 pH 6 的抗-TFPI Ab 配方，儲存於 40°C、歷時 14 天，並以 LC-MS 測試。表 3 中所示之結果證明了可能由於 aTFPI Ab 獨特的結構，正電荷胺基酸精胺酸減少抗-TFPI Ab 的醣化至在參考標準品所見的水平。

表 3

精胺酸減少抗-TFPI mAb 醣化

配方名稱	配方組成分	LC-MS 量變曲線
PH6.0	20 mg/ml aTFPI mAb 30 mM 組胺酸 292 mM 蔗糖 100 ppm Tween 80 pH 6.0	醣化
6ARG	20 mg/ml aTFPI mAb 30 mM 組胺酸 292 mM 蔗糖 100 ppm Tween 80 50 mM 精胺酸 pH 6.0	可與參考標準品比較

【0064】 根據此研究結果可定論 aTFPI Ab 的穩定度受配方 pH 有較高之衝擊，以及考慮靜脈注射(IV)、肌肉注射(IM)與皮下注射時，配方穩定度之最佳 pH 在 pH 5 至 pH 6 之間。精胺酸似乎可預防 aTFPI Ab 醣化。基於這些發現設計實施例 4 及實施例 5 中所示之配方發展及穩定度研究。

實施例 4

抗-TFPI Ab 配方之穩定度

【0065】 抗-TFPI Ab 配方之 HPLC-SEC 的結果與 LC-MS 的結果總結於表 4～7 中。

表 4

於 5℃ 歷時 3 個月後抗-TFPI Ab 冷凍乾燥配方之穩定度

配方組成分	HPLC-SEC 聚集形成的平均速率 (%/day) ²	LC-MS (3 個月)
aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5	0	Y
aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM	0	Y
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM	0	Y

aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 6.0 精胺酸 50mM	0	Y
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 6.0 精胺酸 30mM	0	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	0	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 20 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	0'	Y'

aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 20 200ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	0 ¹	Y ¹
--	----------------	----------------

¹ 根據 2 個月的值來計算

² 如果速率為負值，則輸入零

Y：可與參考標準品比較

Y*：可與參考標準品比較，有微量調整

表 5

於 40 °C 歷時 3 個月後抗-TFPI Ab 冷凍乾燥配方之穩定度

配方組成分	HPLC-SEC 聚集形成的平均速率 (%/day) ²	LC-MS (3 個月)
aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5	0.01	醣化
aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM	0	Y
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM	0.01	Y
aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 6.0 精胺酸 50mM	0	Y

aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 6.0 精胺酸 30mM	0.01	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	0.01	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 20 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	0.04 ¹	Y ¹
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 20 200ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	0.04 ¹	Y ¹

¹ 根據 2 個月的值來計算

² 如果速率為負值，則輸入零

Y：可與參考標準品比較

Y*：可與參考標準品比較，有微量調整

表 6

於 5 °C 歷時 3 個月之液態配方

配方組成分	HPLC-SEC 聚集形成的平均速率 (%/day) ²	LC-MS (3 個月)
aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5	0	Y
aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5.5 精胺酸 30mM	0	Y
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM	0	Y

aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 6.0 精胺酸 50mM	0	Y
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 6.0 精胺酸 30mM	0.01	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	0.01	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 20 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	0 ¹	Y ¹

aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 20 200ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	0 ¹	Y ¹
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 10mM	0	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 10mM 甲硫胺酸 10mM	0	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 離胺酸 30mM	0.01	Y*

¹ 根據 2 個月的值來計算

² 如果速率為負值，則輸入零

Y：可與參考標準品比較

Y*：可與參考標準品比較，有微量調整

表 7

於 40 °C 歷時 3 個月之液態配方

配方組成分	HPLC-SEC 聚集形成的平均速率 (%/day) ²	LC-MS (3 個月)
aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5	0.17	醱化
aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM	0.02	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM	0.04	Y*

aTFPI 50 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 6.0 精胺酸 50mM	0.03	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 234 mM Tween 80 75ppm pH 6.0 精胺酸 30mM	0.04	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	0.04	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 20 75ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	0.04 ¹	Y* ¹

aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 20 200ppm pH 5.5 精胺酸 30mM 甘胺酸 133 mM	0.040 ¹	Y* ¹
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 10mM	0.07	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 精胺酸 10mM 甲硫胺酸 10mM	0.06	Y*
aTFPI 100 mg/ml 組胺酸 10mM 蔗糖 88 mM Tween 80 75ppm pH 5.5 離胺酸 30mM	0.06	Y*

¹ 根據 2 個月的值來計算

Y：可與參考標準品比較

Y*：可與參考標準品比較，有微量調整

【符號說明】

【0066】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

請參換頁單獨記載之序列表文件

序列表

<110> (美商·拜耳保健責任有限公司)
(馬欣翰)
(香君)

<120> 抗體及蛋白質配方

<130> 17207.0002US11

<140> 102131326

<141> 2013-08-30

<150> US13/601598

<151> 2012-08-31

<160> 2

<170> PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 212

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Pro Lys Tyr Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Ile Phe
35 40 45

Tyr Asp Val Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Trp Ser Ser Thr Pro Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
115 120 125

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
130 135 140

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180 185 190

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro

195

200

205

Thr Glu Cys Ser
210

<210> 2
<211> 442
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Arg Gly Ser Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Arg Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn
180 185 190

Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

	245		250		255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn	260	265	270		
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg	275	280	285		
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val	290	295	300		
Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser	305	310	315	320	
Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys	325	330	335		
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu	340	345	350		
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	355	360	365		
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu	370	375	380		
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe	385	390	395	400	
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly	405	410	415		
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr	420	425	430		
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	435	440			

發明摘要

※ 申請案號：102131326

※ 申請日：2013 年 08 月 30 日

※IPC 分類：

A61K47/14 (2006.01)
A61K47/32 (2006.01)
A61K47/36 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01)
A61P7/04 (2006.01)

【發明名稱】（中文/英文）

抗體及蛋白質配方

ANTIBODY AND PROTEIN FORMULATIONS

【中文】

本發明提供實質上等滲透壓且低黏度的無鹽抗體及其他蛋白質配方。本發明亦提供使用所揭露之配方治療疾病的方法。

【英文】

Provided are salt-free antibody and other protein formulations that are substantially isosmotic and of low viscosity. Also provided are methods for the treatment of diseases using the disclosed formulations.

【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

申請專利範圍

1. 一種無鹽的蛋白質或抗體配方，包括：
 - a. 10 mM 至 30 mM 的組胺酸；
 - b. 50 ppm 至 200 ppm 的非離子界面活性劑；
 - c. 88 mM 至 292 mM 的糖或糖醇，該糖或糖醇係選自甘露醇、右旋糖、葡萄糖、海藻糖以及蔗糖；
 - d. 0 mM 至 50 mM 的精胺酸；
 - e. 0 mM 至 50 mM 的離胺酸；
 - f. 0 mM 至 133 mM 的甘胺酸或丙胺酸；
 - g. 0 mM 至 10 mM 的甲硫胺酸；以及
 - h. 1 mg/ml 至 150 mg/ml 的蛋白質或抗體；其中該蛋白質或抗體配方之 pH 範圍為 pH 4.0 至 pH 6.0，以及其中該蛋白質配方實質上不含無機鹽。
2. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，其中該配方之黏度範圍在 22°C 下為 1 至 8 mPa-S。
3. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，其中該配方之滲透壓範圍為 240 至 380 mmol/kg。
4. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，其中該非離子界面活性劑為選自聚山梨醇酯 20 及聚山梨醇酯 80 之聚山梨醇酯。

5. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，其中該糖為蔗糖。

6. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，其包含 10 mM 至 50 mM 之間的精胺酸。

7. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，包含：

- a. 30 mM 的組胺酸，
- b. 100 ppm 的聚山梨醇酯 80，
- c. 292 mM 的蔗糖，以及
- d. 20 mg/ml 的蛋白質或抗體；

其中該蛋白質或抗體配方之 pH 範圍為自 pH 5.0 至 pH 6.0。

8. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，包含：

- a. 10 mM 的組胺酸，
- b. 75 ppm 的聚山梨醇酯 80，
- c. 234 mM 的蔗糖，以及
- d. 50 mg/ml 的蛋白質或抗體；

其中該蛋白質或抗體配方之 pH 範圍為自 pH 5.0 至 pH 6.0。

9. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，包含：

- a. 10 mM 的組胺酸，
- b. 75 ppm 的聚山梨醇酯 80，
- c. 234 mM 的蔗糖，以及

d. 100 mg/ml 的蛋白質或抗體；

其中該蛋白質或抗體配方之 pH 範圍為自 pH 5.0 至 pH 6.0。

10. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，包含：

a. 10 mM 的組胺酸，

b. 75 ppm 的聚山梨醇酯 80，

c. 88 mM 的蔗糖，

d. 133 mM 的甘胺酸，以及

e. 100 mg/ml 的蛋白質或抗體；

其中該蛋白質或抗體配方之 pH 範圍為自 pH 5.0 至 pH 6.0。

11. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，包含：

a. 10 mM 的組胺酸，

b. 75 ppm 的聚山梨醇酯 20，

c. 88 mM 的蔗糖，

d. 133 mM 的甘胺酸，以及

e. 100 mg/ml 的蛋白質或抗體；

其中該蛋白質或抗體配方之 pH 範圍為自 pH 5.0 至 pH 6.0。

12. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，包含：

a. 10 mM 的組胺酸，

b. 200 ppm 的聚山梨醇酯 20，

c. 88 mM 的蔗糖，

d. 133 mM 的甘胺酸，以及

e. 100 mg/ml 的蛋白質或抗體；

其中該蛋白質或抗體配方之 pH 範圍為自 pH 5.0 至 pH 6.0。

13. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，包含：

a. 10 mM 的組胺酸，

b. 75 ppm 的聚山梨醇酯 80，

c. 88 mM 的蔗糖，以及

d. 100 mg/ml 的蛋白質或抗體；

其中該蛋白質或抗體配方之 pH 範圍為自 pH 5.0 至 pH 6.0。

14. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，包含：

a. 10 mM 的組胺酸，

b. 75 ppm 的聚山梨醇酯 80，

c. 88 mM 的蔗糖，

d. 10 mM 的精胺酸，以及

e. 100 mg/ml 的蛋白質或抗體；

其中該蛋白質或抗體配方之 pH 範圍為自 pH 5.0 至 pH 6.0。

15. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，其包含 5 mM 至 10 mM 的甲硫胺酸。

16. 如請求項 1 所述之無鹽的蛋白質或抗體配方，包含：

a. 10 mM 的組胺酸，

b. 75 ppm 的聚山梨醇酯 80，

- c. 88 mM 的蔗糖，
- d. 30 mM 的離胺酸，以及
- e. 100 mg/ml 的蛋白質或抗體；

其中該蛋白質或抗體配方之 pH 範圍為自 pH 5.0 至 pH 6.0。

17. 一種無鹽的抗-TFPI 抗體配方，包括：

- a. 10 mM 至 30 mM 的組胺酸；
- b. 50 ppm 至 200 ppm 的非離子界面活性劑；
- c. 88 mM 至 292 mM 的糖或糖醇，該糖或糖醇係選自甘露醇、右旋糖、葡萄糖、海藻糖以及蔗糖；
- d. 0 mM 至 50 mM 的精胺酸；
- e. 0 mM 至 50 mM 的離胺酸；
- f. 0 mM 至 133 mM 的甘胺酸或丙胺酸；
- g. 0 mM 至 10 mM 的甲硫胺酸；及
- h. 1 mg/ml 至 150 mg/ml 的抗-TFPI 抗體；

其中該抗-TFPI 抗體配方之 pH 為 pH 4.0 至 pH 6.0，以及其中該抗-TFPI 抗體配方實質上不含無機鹽。

18. 如請求項 17 所述之無鹽的抗-TFPI 抗體配方，其中該配方之黏度範圍在 22°C 下為 1 至 8 mPa-S。

19. 如請求項 17 所述之無鹽的抗-TFPI 抗體配方，其中該配方之滲透壓範圍為 240 至 380 mmol/kg。

20. 如請求項 17 所述之無鹽的抗-TFPI 抗體配方，其中該非離子界面活性劑為選自聚山梨醇酯 20 及聚山梨醇酯 80 之聚山梨醇酯。

21. 如請求項 17 所述之無鹽的抗-TFPI 抗體配方，其中該糖為蔗糖。

22. 如請求項 17 所述之無鹽的抗-TFPI 抗體配方，包含：

- a. 10 mM 的組胺酸，
- b. 75 ppm 的聚山梨醇酯 80，
- c. 234 mM 的蔗糖，
- d. 30 mM 的精胺酸，以及
- e. 10 mM 的甲硫胺酸，以及
- f. 100 mg/ml 的抗-TFPI 抗體；

其中該抗-TFPI 抗體配方之 pH 為 5.5。

23. 如請求項 17 所述之無鹽的抗-TFPI 抗體配方，其中該抗-TFPI 抗體為人類 IgG2 單株抗體。

24. 如請求項 17 所述之無鹽的抗-TFPI 抗體配方，其中該人類 IgG2 單株抗體包含一輕鏈及一重鏈，該輕鏈包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列，該重鏈包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列。

25. 一種蛋白質或抗體配方之用途，其係用於製造治療病患

之病症的藥物，其中該蛋白質或抗體配方的 pH 在 pH 4.0 至 pH 6.0 之間時包含 10 mM 至 30 mM 之間的組胺酸、50 ppm 至 200 ppm 之間的聚山梨醇酯 80 或聚山梨醇酯 20、88 mM 至 292 mM 之間的蔗糖、0 mM 至 50 mM 之間的精胺酸、0 mM 至 50 mM 之間的離胺酸、0 mM 至 133 mM 之間的甘胺酸、0 mM 至 10 mM 之間的甲硫胺酸以及 1 mg/ml 至 150 mg/ml 之間的蛋白質或抗體，以及其中該蛋白質或抗體配方實質上不含無機鹽。

26. 如請求項 25 所述之用途，其中該蛋白質或抗體配方以靜脈注射、皮下注射或肌肉注射給藥。

27. 一種抗-TFPI 抗體配方之用途，其係用於製造治療病患之血友病 A 型或血友病 B 型的藥物，其中該抗-TFPI 抗體配方的 pH 在 pH 4.0 至 pH 6.0 之間時包含 10 mM 至 30 mM 之間的組胺酸、50 ppm 至 200 ppm 之間的聚山梨醇酯 80 或聚山梨醇酯 20、88 mM 至 292 mM 之間的蔗糖、0 mM 至 50 mM 之間的精胺酸、0 mM 至 50 mM 之間的離胺酸、0 mM 至 133 mM 之間的甘胺酸、0 mM 至 10 mM 之間的甲硫胺酸以及 1 mg/ml 至 150 mg/ml 之間的蛋白質，以及其中該抗-TFPI 抗體配方實質上不含無機鹽。

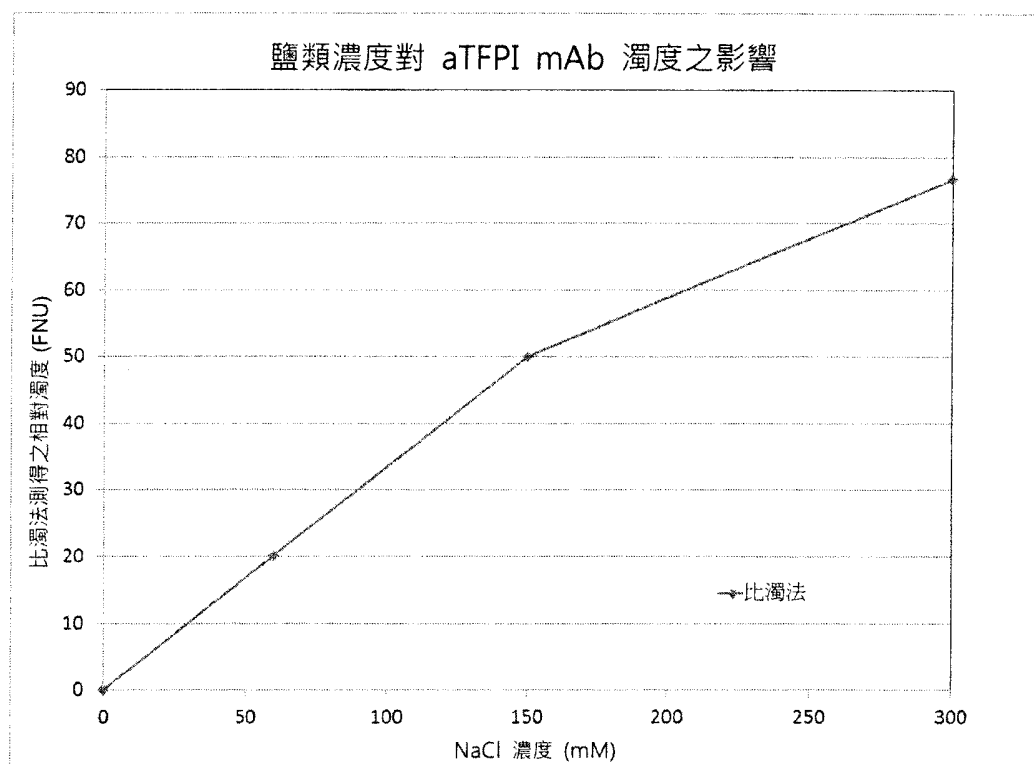
28. 如請求項 27 所述之用途，其中該抗-TFPI 抗體為人類 IgG2 單株抗體。

29. 如請求項 28 所述之用途，其中該人類 IgG2 單株抗體包含一輕鏈及一重鏈，該輕鏈包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列，該重鏈包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列。

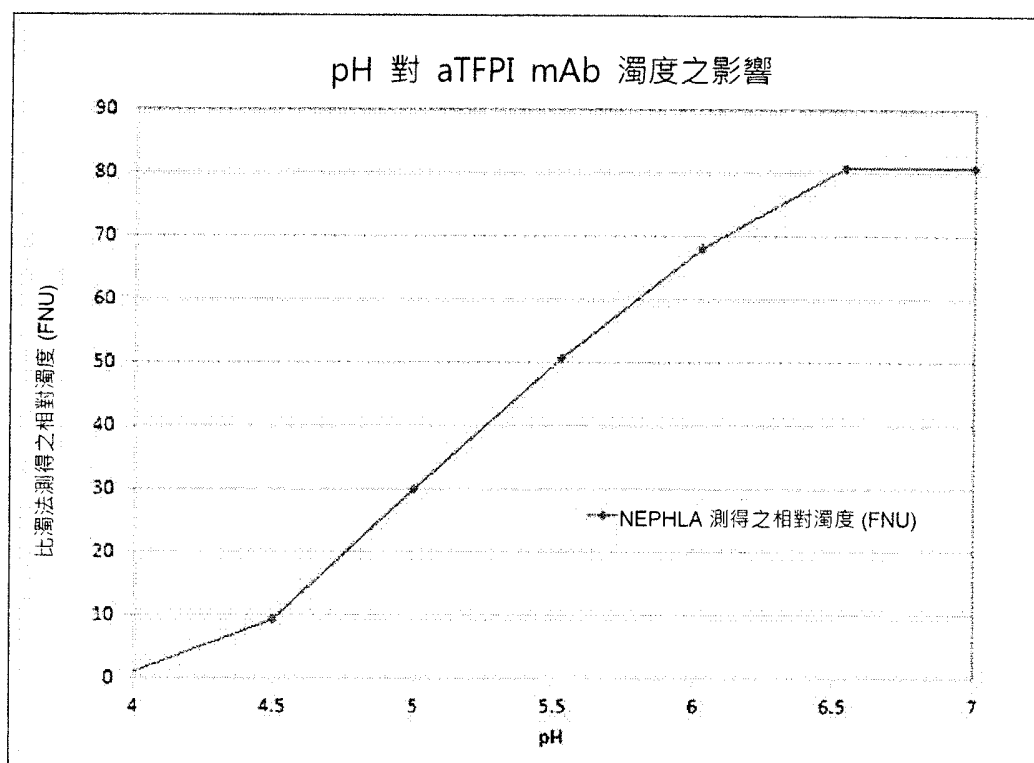
30. 如請求項 27 所述之用途，其中該抗-TFPI 抗體配方以靜脈注射、皮下注射或肌肉注射給藥。

圖式

第 1 圖



第 2 圖



發明摘要

※ 申請案號：102131326

※ 申請日：2013 年 08 月 30 日

※IPC 分類：

A61K47/14 (2006.01)
A61K47/32 (2006.01)
A61K47/36 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01)
A61P7/04 (2006.01)

【發明名稱】（中文/英文）

抗體及蛋白質配方

ANTIBODY AND PROTEIN FORMULATIONS

【中文】

本發明提供實質上等滲透壓且低黏度的無鹽抗體及其他蛋白質配方。本發明亦提供使用所揭露之配方治療疾病的方法。

【英文】

Provided are salt-free antibody and other protein formulations that are substantially isosmotic and of low viscosity. Also provided are methods for the treatment of diseases using the disclosed formulations.

【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