

發明專利說明書 200526247

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：93/40584

※申請日期：93.12.24

ABIK 39/395
※IPC 分類：C07K 16/28

一、發明名稱：(中文/英文)

含有抗體之安定水性醫藥製劑

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

日商麒麟麥酒股份有限公司

KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

代表人：(中文/英文)

荒蒔 康一郎

ARAMAKI, KOICHIRO

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都中央區新川二丁目10番1號

10-1, SHINKAWA 2-CHOME, CHUO-KU, TOKYO 104-0033, JAPAN

國 籍：(中文/英文)

日本 JAPAN

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 石川 智世至
ISHIKAWA, TOMOYOSHI
2. 上野 哲寛
UENO, AKIHIRO
3. 木村 聰
KIMURA, SATORU
4. 植木 洋祐
UEKI, YOSUKE

國 籍：(中文/英文)

- 1.-4.均日本 JAPAN

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本；2003年12月25日；特願2004-431400
- 2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- 1.
- 2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☒ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

1. 食品工業發展研究所; 2002 年 12 月 19 日; CCRC 960180
2. 食品工業發展研究所; 2002 年 12 月 19 日; CCRC 960181
3. 食品工業發展研究所; 2002 年 12 月 19 日; CCRC 960182
4. 食品工業發展研究所; 2002 年 07 月 09 日; CCRC 960162
5. 食品工業發展研究所; 2002 年 07 月 09 日; CCRC 960161
6. 食品工業發展研究所; 2002 年 07 月 09 日; CCRC 960163

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

1. 日本; 獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心; 2001 年 10 月 11 日; FERM BP-7771
2. 日本; 獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心; 2001 年 10 月 11 日; FERM BP-7772
3. 日本; 獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心; 2001 年 10 月 11 日; FERM BP-7773
4. 日本; 獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心; 2001 年 09 月 27 日; FERM BP-7759

5. 日本；獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心；2001 年 09 月 27 日；FERM BP-7758
6. 日本；獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心；2002 年 04 月 17 日；FERM BP-8024

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於含有抗體的水性醫藥製劑。

【先前技術】

近年來伴隨生物工程的進展、DNA重組技術的驅使下，具有醫療用途的蛋白質可以被大量地、高純度地製造出來。然而，蛋白質與先前的化學合成分子不同，由於其分子量大且其三維構造複雜，為在保持其生物活性條件下安定保存該等蛋白質，需要考慮其物性的特別技術。安定保存蛋白質的製劑，必須保護蛋白質中所含的多個不同的官能基、並保持與活性相關的立體構造。於醫療上有用的蛋白質的一例為抗體。作為安定化抗體方法的一例，可例舉如日本特表2001/503781(WO98/22136)所述的進行冷凍乾燥使蛋白質安定化的方法。但是，臨床實務中冷凍乾燥製劑的投藥準備煩雜，給醫療從業者在作業過程帶來心理/時間上的負擔；另外技術上有混入細菌的危險性。相對於冷凍乾燥製劑，溶液製劑投藥前準備操作簡單，故細菌混入的危險性減少，因而認為醫療現場希望獲得溶液狀態的安定蛋白質製劑。

關於溶液狀態的安定蛋白質製劑有以下文獻。

Cleland等的"安定蛋白質製劑進展：詳細論述蛋白質凝聚、去氨化及氧化作用(The Development of Stable Protein Formulation: A close Look at Protein Aggregation, Deamination and Oxidation"(Therapeutic Drug Carrier

System, vol. 10, No. 4, 1993, pp307-377)一文提供關於蛋白質分解的一般性概述及對於減少蛋白質分解策略的見解。然而，該文獻未提及有關抗體的水性醫藥製劑不含鹽、及使用pH 5.0~6.0之麩胺酸緩衝液或檸檬酸緩衝液。

WO98/56418記述了含有未預先經冷凍乾燥的、治療上有效的抗體、醋酸緩衝液、界面活性劑及多元醇的水性醫藥製劑。然而，亦未提及麩胺酸或檸檬酸適宜作為維持pH的緩衝劑。

日本特許2547556號公報揭示了含有醋酸緩衝液與山梨糖醇的 γ -球蛋白製劑。然而，未提及包含麩胺酸或檸檬酸作為維持pH的緩衝劑。另外，亦未提及添加界面活性劑為佳。

WO97/04801揭示了適於重構後經皮下投藥的冷凍乾燥製劑。然而，即使其為未經冷凍乾燥的製劑，亦未提及使用pH 5.0~6.0的麩氨酸或檸檬酸作為維持pH的緩衝劑。

「安定的製劑」是指不含對投藥該製劑的患者有毒性的成分，另外藉由添加儘可能不破壞患者生體動態平衡性的活性成分以外的添加物，其中的活性成分在保存時保持化學的及/或物理的及/或生物學安定性的製劑。「儘可能不破壞患者生體動態平衡性的活性成分以外的添加物」是指經過去的治療實務結果確認具有足夠安全性的物質，或雖沒有過去的投藥實務結果但對細胞、動物的毒性評價或經其他方法預測具有足夠安全性的物質。再者，「保持患者生體動態平衡性」是指所含的活性成分以外的添加劑不具有患

者所不容許的生物活性，及/或若有可能為具有等張作用(與人類血液具有本質上相同滲透壓)等。

蛋白質的安定性藉由多種分析方法測定。例如RK Scopes著、Springer-Verlag東京出版的《新蛋白質精製法理論與實際》中有概述。「化學安定性」可藉由定量檢出蛋白質化學變化後的狀態而檢定。化學變化包括：可藉由尺寸排除層析法或SDS-PAGE評價的剪切等尺寸變化、可藉由離子交換層析法評價的電荷變化(例如產生去鹽胺結果)及可藉由疏水層析法評價的親水/疏水狀態的變化(例如產生氧化結果)等。「物理安定性」包括：可藉由顏色及/或透明性的目測檢查及/或尺寸排除層析法評價的不生成不溶性異物及/或混濁及/或凝聚體等。「生物安定性」可藉由檢定與抗原的結合活性而評價，其中「與抗原的結合活性」可藉由例如尺寸排除層析法或ELISA等而評價。

於治療用途上有用的蛋白質包含抗體。抗體與細胞表面表現的蛋白質結合，曾嘗試利用對細胞具有誘導致死或傷害性作用的抗體治療癌症等。現在，以細胞膜上存在的受體CD20為目標的人-鼠嵌合抗體(Rituximab)、以Her2/neu為目標的人化抗體等單株抗體被用於治療惡性腫瘤疾病，其治療效果得到公認。再者，單株抗體(抗HLA-DR抗體)被認為對於如WO2003/033538公開的第II類主要組織相容基因錯合體(MHC)分子的一種HLA-DR亦有用。若抗體具有血中半衰期長、對抗原特異性高的特徵，則特別適於作為抗腫瘤劑使用。例如，若為以腫瘤特異性抗原為目標的抗體，

推定被投藥的抗體聚集於腫瘤部位，故可望藉由補體依賴性細胞毒殺作用(CDC)或抗體依賴之細胞性細胞毒殺作用(ADCC)對於免疫系統的癌細胞進行攻擊。再者，藉由該抗體上結合有放射性核種或細胞毒性物質等的藥劑，可以將所結合的藥劑有效地送至腫瘤部位，同時，該藥劑到達非特異性其他組織上的量降低，故可估計副作用的減輕。藉由於腫瘤特異性抗原具有誘導細胞致死的活性時、投予具有拮抗活性的抗體，或於腫瘤特異性抗原與細胞增殖及生存相關時、投予保持中和活性的抗體，可望使腫瘤特異性抗體的聚集及由於抗體的活性造成腫瘤的增殖停止或退縮。從上述特徵看，抗體適宜作為抗腫瘤劑使用。

再者，第II類主要組織相容基因錯合體(MHC)分子結合於抗原肽片斷，該等抗原肽片斷呈現於輔助(CD4+)T細胞(「Th」細胞)(參照Babbitt B. et al., Nature (1985), 317, 359-361)。曾報導第II類MHC分子特異性單株抗體於生物於體外為Th細胞免疫應答性非常強的選擇性阻礙劑(參照Baxevanis CN, et al., Immunogenetics (1980), 11, 617-625)。該等單株抗體自發現以來，一直被認為是可用於慢性關節風濕病等自體免疫疾病的選擇性免疫抑制治療藥物。初期的生物體內研究顯示，該等單株抗體對於Th細胞性異種及自體免疫應答賦予有益的影響(參照Rosenbaum JT. et al., J. Exp. Med. (1981), 154, 1694-1702; Waldor MK. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983), 80, 2713-2717; Jonker M. et al. J. Autoimmun.(1988), 1, 399-414; Stevens

HP. et al., Transplant. Proc. (1990), 22, 1783-1784)。進而對靈長類研究顯示抑制了同種移植中移植物對宿主的反應(參照Billing R. & Chatterjee S. (1983), Transplant. Proc., 15, 649-650; Jonker M. et al., Transplant Proc. (1991), 23, 264-265)。現在臨床上為了抑制器官移植時的排斥反應，使用被稱為環孢靈A或FK506的免疫抑制劑，該等免疫抑制劑的問題點在於由於非特異性抑制免疫反應而造成強烈副作用。例如WO2003-033538公開的、對第II類主要組織相容基因錯合體(MHC)分子之一種之HLA-DR的單株抗體(抗HLA-DR抗體)可特異性抑制以HLA-DR為仲介的免疫活性，故被認為非常有效。綜上所述，認為抗體由於其特性而適宜作為副作用少的免疫抑制劑。

如上所述，適於治療用途的多種抗體的研究、開發、被實用化、醫療現場的頻繁使用現狀下，需要投藥準備簡便、細菌混入危險性低、安定的水性醫藥製劑。特別是，本領域需要含有如抗HLA-DR抗體等適於治療用途的抗體的安定水性醫藥製劑。

專利文獻1：WO98/56418

專利文獻2：日本特許2547556號公報

專利文獻3：WO97/04801

非專利文獻1：Therapeutic Drug Carrier System vol. 10, No. 4, 1993, pp307-377

【發明內容】

本發明的目的在於提供一種含有抗體的安定水性醫藥製

劑。具體而言，目的在於提供一種於麩胺酸緩衝液及/或檸檬酸緩衝液中含有治療有效量的抗體、pH為4.0~6.0的安定水性醫藥製劑。

本發明者們致力於研究含有治療有效量抗體的安定水性醫藥製劑之結果，成功實現含抗體水性醫藥製劑中抗體的安定化，因而完成本發明。

本發明提供安定水性醫藥製劑，其含有治療有效量的抗體、維持pH 4.0至6.0的麩胺酸及/或檸檬酸。製劑於低溫(2°C至8°C)至少1年以上安定，即25°C下至少3個月及/或40°C下至少1個月安定、製劑經冷凍融解及振動仍安定。

再者，本發明係關於帶有容器的製造品，其中容器為容納有含治療有效量的抗體、維持pH 4.0至6.0的麩胺酸或檸檬酸緩衝液的安定水性醫藥製劑。

進一步本發明係關於水性醫藥製劑中使抗體安定化的方法，係藉由組合治療有效量的抗體、維持在pH 4.0至6.0的麩胺酸或檸檬酸緩衝液。

然而從另一方面看，本發明係關於藉由將治療有效量的本發明揭示之水性醫藥製劑對哺乳動物投藥之治療、預防或診斷方法。抗體為抗HLA-DR抗體時，提供對於疾患例如腫瘤(白血病(包含慢性淋巴性白血病、急性淋巴性白血病)、淋巴瘤(包含非何傑金氏淋巴瘤、何傑金氏淋巴瘤、T細胞淋巴瘤、B細胞淋巴瘤、巴奇托淋巴瘤、惡性淋巴瘤、彌漫性淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤)、骨髓瘤(包含多發性骨髓瘤)等)的預防、治療或診斷；器官移植時的免疫抑制(胰島或腎

臟、肝臟、心臟等的移植時排斥反應、GVHD的預防或治療)；或自體免疫疾病(例如風濕、動脈硬化治療藥、多發性硬化症、全身性紅斑狼瘡、特發性血小板減少症、克隆氏症等)的治療；哮喘等過敏症治療劑的預防或治療。

熟知本技藝者應明瞭本發明的該等方面。

如實施例所示，本發明含有抗體的製劑即使於25℃或40℃保存1個月，保存期間抗體的聚合物、分解物、去鹽胺體、及氧化體亦不增加且安定；另外確認抗體的生物學活性亦被保持。如實施例所示，藉由設定水性醫藥製劑的pH為4.0~6.0，通常的保存溫度為25℃以下時、可以安定保存該製劑中的抗體。

本說明書包含作為本申請優先權基礎的日本國專利申請2003-431400號說明書及/或圖式中記載的內容。

【實施方式】

以下詳細說明本發明。

本發明中所述之「水性醫藥製劑」是指具有醫藥效果的抗體作為活性成分溶解於水性溶液的形態、或溶液中活性成分維持明確效果的形態、或製劑中不含有可能破壞被投藥患者生體動態平衡性的成分。在此，「活性成分維持明確效果」是指所含活性成分維持其活性、沒有失去醫藥效果。

「儘可能不破壞患者生體動態平衡性的活性成分以外的添加劑」是指經過去的治療實務結果確認具有足夠安全性的物質，或雖沒有過去的投藥實物結果但對細胞、動物的毒性評價或經其他方法預測具有足夠安全性的物質。即，

本發明的水性醫藥製劑包含具有醫藥效果的抗體作為活性成分及醫藥上容許的其他添加劑。再者，「保持患者生體動態平衡性」是指活性成分以外的添加劑不具有患者所不容許的生物活性，及/或若可能具有等張作用(與人類血液具有本質上相同滲透壓)等。

「安定製劑」是指其中的活性成分保存時保持化學及/或物理及/或生物學安定性的物質。低溫(2℃至8℃)下至少1年以上安定為佳，即25℃下至少3個月及/或40℃下至少1個月安定為佳，製劑經冷凍融解、光照射及振動亦安定為佳。蛋白質的安定性藉由各種分析方法測定。「化學安定性」可藉由定量檢出蛋白質化學變化後的狀態而檢定。化學變化包括例如可藉由尺寸排除層析法或SDS-PAGE評價的剪切等尺寸修飾、可藉由離子交換層析法評價的電荷變化(例如產生去醯胺結果)及可藉由疏水層析法評價的親水/疏水狀態的變化(例如產生氧化結果)等。「物理安定性」包括：可藉由顏色及/或透明性的目測檢查及/或尺寸排除層析法評價的不生成不溶性異物及/或混濁及/或凝聚體等。「生物安定性」可藉由檢定與抗原的結合活性而評價，其中「與抗原的結合活性」可藉由例如尺寸排除層析法或ELISA等評價。抗體未經歷化學或物理變化時，該抗體保持生物安定性。因此，製劑中的抗體保持化學安定性及物理安定性的情形，可謂該製劑為安定。即，製劑是否安定，藉由測定所含抗體有無化學及物理特性變化即可知曉。安定的製劑係在保存期間抗體的聚合物、分解物、去醯胺體、氧化體

等不隨製劑的醫藥效果降低而增加、並且沒有出現不溶性異物或混濁者。本發明的安定製劑即使至少在低溫(2°C至8°C)下保存1年以上，或至少在25°C下保存3個月、或40°C下保存1個月，抗體的聚合物、分解物、去醯胺體、氧化體亦不隨醫藥效果的降低而增加。再者，製劑即使經冷凍融解或振動，抗體的聚合物、分解物、去醯胺體、氧化體亦不隨醫藥效果的降低而增加。本發明的安定製劑中抗體的聚合物在保存中不增加，例如於25°C或40°C下保存1個月後，以尺寸排除HPLC測定時，製劑中聚合物對抗體的比例小為佳。再者，本發明的安定製劑中抗體的分解物在保存中增加不多，例如25°C或40°C下保存1個月，製劑中分解物對抗體的比例小為佳。再者，本發明的安定製劑中抗體的去醯胺體的量在保存中增加不多，例如25°C或40°C下保存1個月，製劑中去醯胺體對抗體的比例小為佳。進一步，本發明的安定製劑中抗體的Fc部位氧化體在保存中增加不多，例如25°C或40°C下保存1個月，製劑中Fc部位氧化體對抗體的比例小為佳。

本發明中抗體的「治療有效量」是指治療抗體為有效的疾病時可有效預防或治療的用量。「疾病」是指以抗體治療有效益的任意徵狀。包含成為哺乳類疾病因素的病理狀態的慢性及急性疾患或疾病。製劑中存在的抗體的治療有效量，係考慮例如所需用量及投藥形態而決定。製劑中例示的抗體濃度為約1 mg/mL至約200 mg/mL，以為約5 mg/mL至約50 mg/mL為佳，最佳為約10 mg/mL及/或約20 mg/mL。

本發明中所述「抗體」具有最廣泛的意義，特別是單株抗體、多株抗體、多重特異性抗體、及保持所期望生物活性的抗體片斷。

本發明係關於含有抗體的水性醫藥製劑。製劑中的抗體係利用本技術領域用以產生抗體可利用的技術而調製。即，(1)作為免疫原使用的生物高分子的精製及/或抗原蛋白質於細胞表面過度表現的細胞的製作；(2)將抗原注射於動物獲得免疫後，採取血液、檢定其抗體價、決定脾臟的摘出時期而調製抗體產生細胞的步驟；(3)骨髓瘤細胞(骨髓瘤 myeloma)的調製；(4)抗體產生細胞與骨髓瘤的細胞融合；(5)產生目的抗體的融合瘤群的篩選；(6)向單一細胞選殖的分割(選殖 cloning)；(7)為大量製造單株抗體，因情況而定進行融合瘤的培養或移植有融合瘤的動物的飼養；(8)因情況而定，從融合瘤等抗體產生細胞選殖編碼人類單株抗體的基因、組合於合適的載體中，將其導入宿主(例如哺乳類細胞細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆蟲細胞、植物細胞等)、利用基因重組技術產生重組型抗體的調製；(9)如上所得抗體的精製；(10)如上所製造的單株抗體的生理活性及其識別特異性的檢測，或作為標示試劑的特性的檢定等。

單株抗體中亦包含因構成抗體的重鏈及/或輕鏈的各種胺基酸序列中1個或多個胺基酸經刪失、置換或附加之胺基酸序列的重鏈及/或輕鏈所組成的單株抗體。本發明的胺基酸序列中，如上所述胺基酸的部分改變(缺失、置換、插入、附加)可藉由部分改變編碼其胺基酸序列的鹼基序列而導

入。該鹼基序列的部分改變可利用已知部位特異性變異導入法(site specific mutagenesis)導入(Proc. Natl Acad Sci USA., 1984 Vol 81:5665)。在此，抗體是指，包含構成免疫球蛋白的重鏈可變領域及重鏈恆定領域、及輕鏈的可變領域及輕鏈的恆定領域等全部領域，係編碼免疫球蛋白基因來源的免疫球蛋白。本發明中所含的抗體亦包含任意免疫球蛋白及其等型之抗體。抗體亦包含亞類(subclass)經重組的改變抗體、或進而重鏈恆定域的EU編號系統(參照 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242)中第331號胺基酸置換為Ser的成為IgG1Ser或IgG2Ser的改變抗體。進一步亦包含碘、釷、鈾、鎔等放射性核種(J.W. Goding, Monoclonal Antibodies: principles and practice, 1993 Academic Press)、綠膿菌毒素、白喉毒素、蓖麻毒素等細菌毒素；及甲氨喋呤、絲裂霉素、卡奇霉素(calicheamicin)等化學療法試劑(D.J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T.J. International Ltd.; M.L. Grossbard., Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc)；進一步，藉由與Maytansinoid等之前驅藥物(Chari et al., Cancer Res., 1992 Vol. 52:127; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996 Vol. 93:8681)等結合進一步增強對癌症等疾病治療效果的物質。再者亦包含抗體的功能性片斷，「功能性片斷」是指抗體的一部分(部分片斷)，保持著1個以上抗體對抗原的作用，具體而言可列舉F(ab')₂、Fab'、

Fab、Fv、二硫化物結合Fv、單鏈Fv(scFv)、微型雙功能抗體(Diabody)及其聚合物等(D.J. King., Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T.J. International Ltd)。或「功能性片斷」是指抗體的片斷中可與抗原結合的片斷。製劑化的抗體以本質上純淨為佳、期望本質上均質(即，不含污染蛋白質等)。「本質上純淨」的抗體是指相對於組合物的總重量至少含有約90重量%的抗體、至少含有約95重量%抗體的組合物為佳。「本質上均質」的抗體是指相對於組合物的總重量，至少含有約99重量%抗體的組合物。

本發明中所含的抗體，較好為人類抗體、人型化抗體或人—鼠嵌合抗體、較好為IgG、較好的IgG的亞類為IgG1、IgG2、IgG4中的任一種。再者IgG較好為經恆定領域的胺基酸序列的一部分基因改變而實現胺基酸的缺失及/或置換及/或插入的IgG。再者，更佳為對於HLA-DR的人單株抗體、又更佳為WO2003-033538中記載的抗HLA-DR人單株抗體、HD3、HD4、HD6、HD7、HD8、HD10、HD4G1、HD4G2Ser、HD4G4、HD8G1、HD8G1Ser、HD8G2、HD8G2Ser、HD8G4。其中，產生HD4、HD6、HD8及HD10的融合瘤分別以FERM BP-7771、FERM BP-7772、FERM BP-7773、FERM BP-7774，於2001年10月11日國際寄存於獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心(日本國茨城縣築波市東1丁目1番地1 中央第6)。再者，產生HD3及HD7的融合瘤分別以FERM BP-08534及FERM BP-08536，於2003年10月31日國

際存放於同一中心。進一步，本專利亦包含針對CD40的人單株抗體、較好為WO2002-088186記載的抗CD40拮抗抗體、KM281-1-10、KM281-2-10-1-2、KM283-5、KM225-2-56、KM292-1-24、KM341-6-9、4D11、5H10、11E1、5G3、3811、3411、3417、F4-465、抗CD40激動劑抗體、KM302-1、KM341-1-19、KM643-4-11、2053、2105、3821、3822、285、110、115、F1-102、F2-103、F5-77、F5-157。其中，融合瘤選殖株KM 302-1、KM 281-1-10及KM 281-2-10-1-2於2001年5月9日分別以FERM BP-7578、FERM BP-7579、FERM BP-7580；選殖株KM341-1-19及4D11於2001年9月27日分別以FERM BP-7759、FERM BP-7758；選殖株2105於2002年4月17日以FERM BP-8024基於布達佩斯條約國際寄存於獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心(日本國茨城縣築波市東1丁目1番地1中央第6)。進一步，含有F2-103、F5-77及F5-157的重鏈及輕鏈可變領域的質體於2001年4月19日分別以ATCC PTA-3302(F2-103重鏈)、ATCC PTA-3303(F2-103輕鏈)、ATCC PTA-3304(F5-77重鏈)、ATCC PTA-3305(F5-77輕鏈)、ATCC PTA-3306(F5-157重鏈)及ATCC PTA-3307(F5-157輕鏈)；融合瘤選殖株F1-102及F4-465於2001年4月24日分別以ATCC PTA-3337及ATCC PTA-3338(美國國立菌培養收集所，美國維吉尼亞州20110-2209馬那薩斯10801大學大街)基於布達佩斯條約國際寄存。

本發明中所含之「添加劑」包含活性成分以外的水性醫藥製劑中所含的全部成分，例如包含緩衝劑、pH調節劑、等張劑、安定化劑、界面活性劑、防腐劑、懸濁劑、乳化劑等。再者，亦包含一種添加劑展現二種以上效果的物質。

「緩衝劑」是指借助酸鹼共軛成分的作用穩定pH變化的添加劑。本發明的緩衝液適宜為約4.0至約6.0的pH範圍，較佳為約4.5至約6.0、更佳為約4.0至約5.0、又較佳為約4.5至約5.0、或約5.0至約6.0、pH 5.2至pH 5.8、約pH 5.5。使用具有該pH範圍的緩衝液時，任何抗體在通常醫藥製劑的保存溫度25℃以下皆安定。然而，因抗體的種類不同，亦有較高溫度例如40℃下安定的pH範圍有所改變的情形。例如，抗體使用抗HLA-DR抗體時，緩衝溶液的pH為約5.0至6.0、較佳為pH 5.2至pH 5.8、更佳約為5.5為宜；抗體使用抗CD40拮抗抗體時，緩衝溶液的pH為約4.0至6.0、較佳為pH 4.5至pH 6.0、更佳為約4.0至5.0為宜。調節pH至該範圍的緩衝劑的示例包含麩胺酸鹽(例如麩胺酸鈉)、乙酸鹽(如乙酸鈉)、琥珀酸鹽(如琥珀酸鈉)、葡萄糖酸鹽、檸檬酸、檸檬酸鹽、抗壞血酸鹽(例如抗壞血酸鈉)及其它有機酸緩衝劑。希望獲得冷凍融解上安定製劑時，緩衝劑不使用磷酸鹽為佳。本發明中麩胺酸鹽或檸檬酸為佳、麩胺酸鹽為最佳。對應於其緩衝能力及/或所希望的滲透壓，緩衝劑濃度為約1 mM至約50 mM、為5 mM至約20 mM為佳、最佳為約10 mM。

「等張劑」是指調製對象製劑具有與人類血液本質上相

同滲透壓的物質。等張製劑具有約250至350 mOsm的滲透壓、以生理鹽水的滲透壓為1的滲透壓比約為1為佳。等張劑一般使用鹽類或/及多元醇。本發明的等張劑本質上不含鹽為佳，本發明的等張劑含有多元醇為佳。

「多元醇」為含有多個羥基的物質，包含糖(還原及非還原糖)、糖醇及糖酸。在此，多元醇具有未達約600 kD(例如約120 kD至約400 kD範圍)的分子量為佳。「還原糖」為可減少金屬離子或含有可與蛋白質中的離胺酸及其它胺基酸發生相同反應的半縮醛基的物質；「非還原糖」不具有還原糖的該等性質。還原糖的例示為果糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖及葡萄糖。非還原糖包含蔗糖、海藻糖、山梨糖、松糖(Melezitose)及棉子糖。甘露糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、蘇糖醇(threitol)、山梨糖醇及甘油是糖醇的示例。糖酸中包含L-葡萄糖及其金屬鹽。溶液中對抗體無化學影響的非還原糖為較佳之多元醇，希望製劑在冷凍融解上安定時，使製劑中的抗體不安定化的冷凍溫度(例如-20℃)下不結晶的物質為佳。山梨糖醇具有優異的溶液安定性，故適宜。

「界面活性劑」中包含聚山梨糖醇酯(例如聚山梨糖醇酯20、80等)或Poloxamer(例如Poloxamer-188)等非離子性界面活性劑。所添加的界面活性劑的量為減少被製劑化抗體的凝聚、及/或抑制製劑中粒子的形成至最小化、及/或減少吸附的量。本發明中以包含聚山梨糖醇酯作為界面活性劑為佳、以包含聚山梨糖醇酯80更佳。界面活性劑在製劑中較

好以 0.02 mg/mL 至 0.10 mg/mL、最佳以約 0.05 mg/mL 的量存在。

「安定化劑」是指藉由少量的添加、較佳為添加 10 mM 以下而可提高保存時活性成分的化學及/或物理及/或生物安定性的添加劑。本發明製劑中所含之安定化劑亦可選自甘胺酸、甲硫胺酸、鹽酸半胱胺酸、白胺酸、鹽酸離胺酸、鹽酸精胺酸、天門冬胺酸、抗壞血酸、EDTA 及該等的鹽等所組成的組群。

使用於體內投藥之製劑必須為無菌。因此，製劑調製前或調製後，藉由通過無菌過濾膜而過濾而易於製成無菌。

製劑藉由已知的方法例如丸劑注射或花費一定時間連續注入而經靜脈內投藥、肌肉內、腹腔內、大腦內、皮下、關節內、滑液囊內、蛛網膜下腔內、經口、局部、或由吸入途徑投藥於有必要以抗體治療的哺乳動物、以人類為佳。適宜的實施狀態為將製劑經靜脈內投藥於哺乳動物。為此，介由使用注射器或點滴靜注器注入製劑。

本發明的其他實施狀態中，提供具備有容納本發明水性製劑的容器的製造品，提供於依據情形使用之指示。適宜的容器包含例如瓶、小瓶、安瓿及注射器。容器可以由玻璃或塑膠等各種材料形成。例示的容器為 3~20 mL 的玻璃製安瓿。以容器容納製劑、容器上或伴隨容器的標籤上標明使用指示。製造品亦可包含其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針、注射器、及使用指示書作為包裝附件，亦可進一步包含從市售及使用者觀點考慮的其他材料。

實施例

參照以下實施例，可更充分理解本發明。但是，該等實施例並不限制發明的範圍。引用的全部文獻與專利併於本文供參考。

實施例1 含有抗HLA-DR的水性製劑(緩衝劑的研究)

此實施例是記述含有 WO2003/033538 中公開的對 HLA-DR之抗體(抗HLA-DR抗體)的水性製劑。

本實施例中調製如表1所示的製劑、評價緩衝劑的種類對抗體安定性的影響。

[表1]

供於本研究的製劑一覽表

	原體濃度	緩衝劑	等張劑	界面活性劑	pH
1	抗HLA-DR抗體 10 mg/mL	10 mM 麩胺酸	D-山梨糖醇 262 mM	聚山梨糖醇酯80 0.05 mg/mL	5.5
2		10 mM 抗壞血酸			
3		10 mM 檸檬酸			

(1)製劑檢體的調製

本研究中使用的試劑為：抗HLA-DR抗體(約18 mg/mL，按照 WO2003-0033538中所記載的方法於麒麟啤酒公司醫藥生產本部生產技術中心調製)、L-麩胺酸鈉單水合物(日本藥典外醫藥品規格)、L-組胺酸(日本藥典)、檸檬酸鈉單水合物(日本藥典)、抗壞血酸(日本藥典)、D-山梨糖醇(日本藥典)、D-甘露醇(日本藥典)、鹽酸(日本藥典)、聚山梨糖醇酯80(日本藥典)、注射用水(日本藥典)。

各製劑檢體係藉由製作預先不含原藥的安慰劑溶液、以

抗HLA-DR抗體溶液使用NAP管柱(Farumashia biotech公司製)與製劑安慰劑溶液置換而調製。再者蛋白質濃度調製至OD280 nm吸光度係數 $\epsilon=1.4$ 換算的濃度。

各製劑檢體在淨化臺內使用0.22 μm 濾膜(Millipore公司製)進行無菌過濾，淨化臺內保證無菌條件下每1 mL填充於5 mL玻璃小瓶(符合日本藥典要求)中。進而用以稀釋分析檢體及分析的空白組之不含抗HLA-DR抗體的溶液(安慰劑)，在淨化臺內使用0.22 μm 瓶頂濾膜(Nalgene公司製)進行無菌過濾。

(2)試驗條件

本實施例中為進行安定性評價，依照以下條件對各製劑試樣施予應力。

熱安定性試驗：控制為40℃或25℃的培養箱(TABAI ESPEC公司製)中保存1個月。

另外，各試樣於各應力負荷後分析開始前保存於控制為4℃的低溫庫中。

(3)分析方法

尺寸排除HPLC檢測(SEC)：聚合物含量及分解物含量藉由尺寸排除高速液相層析法算出。因應需要，檢體稀釋至1 mg/mL、於環境溫度下注入15 μL 。分離係使用TSKgel G3000 SWXL 30 cm $\times$ 7.8 mm(TOSOH公司製)層析管柱，使用20 mM磷酸鈉、500 mM氯化鈉pH 7.0作為移動相，以0.5 mL/分鐘的流量、分析時間為30分鐘，在215 nm進行檢出。定義主峰前溶出物為聚合物、主峰後溶出物為分解物。

陽離子交換HPLC檢測(IEC)：去醯胺體含量藉由陽離子交換高速液相層析法算出。注入60 μ L經適當稀釋至5 mg/mL的檢體。使用TSKgel BIOAssist S(TOSOH公司製)作為分離管柱、於280 nm進行檢出。對於A使用20 mM酒石酸pH 4.5、對於B使用20 mM酒石酸、1 M氯化鈉pH 4.5作為移動相，使用最適的梯度條件進行分析。定義主峰前溶出的劣化物為去醯胺體。

疏水HPLC檢測(HIC)：Fc部位氧化體的含量藉由疏水層析法而算出。相對於250 μ L適當稀釋至1 mg/mL的檢體，加入250 mM磷酸鈉、12.5 mM L-半胱胺酸、pH 7.0水溶液20 μ L與2.5 mg/mL木瓜酵素溶液2.5 μ L，在37°C進行酵素處理2小時、調製Fc片段檢體。注入15 μ L所調製之Fc碎片檢體，使用TSKgel Butyl-NPR 3.5 cm $\times$ 4.6 mm(TOSOH公司製)作為分離管柱於215 nm進行分析及檢出。使用20 mM三(羥甲基)胺基甲烷pH 7.0作為移動相A；20 mM三(羥甲基)胺基甲烷、2 M硫酸銨，pH 7.0作為移動相B，使用最適的梯度條件進行分析。定義主峰前溶出的劣化物為氧化體。

SDS-PAGE檢測：因應必要，檢體溶液稀釋至200 μ g/mL。於檢體溶液中加入二分之一容積的Tris SDS樣品處理液(第一化學藥品公司製)，作為非還原檢體溶液。再者，因應必要稀釋本品的溶液中加入二分之一容積的Tris SDS β ME樣品處理液(第一化學藥品公司製)，於60°C加熱15分鐘，作為還原檢體溶液。電泳槽中充滿電泳用tris/甘胺酸/SDS緩衝液(BioRad公司製)。5 μ L試樣溶液施加於4~20%聚丙稀醯胺

凝膠(第一化學藥品公司製)、以20 mA恆定電流進行電泳至試樣溶液中所含溴酚藍的藍色移動至凝膠的下端附近為止。電泳結束後的凝膠經銀染色檢出。其中為了判斷檢體及劣化體的大致分子量而同時電泳分子量標識(包含200 kDa、116.2 kDa、66.3 kDa、42.4 kDa、30.0 kDa、17.2 kDa的蛋白質)。

不溶性異物及混濁：白色光源直接照射約5000路克斯的明處，以肉眼檢查有無不溶性異物及混濁。

滲透壓比：使用自動滲透壓測定裝置(Arclay公司製OSMO STATION OM-6050)進行滲透壓測定、計算相對於同時測定的生理鹽水的滲透壓之比。

pH：使用自動pH測定裝置(Mettler Toledo公司製MP-230等)進行pH測定。測定開始時使用pH 4、pH 7及pH 9的標準溶液進行校正後進行測定。

(4)結果

圖1表示各水性醫藥製劑在25℃或40℃下保存時聚合物量的變化。聚合物量藉由尺寸排除HPLC測定。顯示麩胺酸緩衝液製劑及檸檬酸緩衝液製劑為安定。再者，其他分析項目(分解物、去醯胺體、Fc部位氧化體)中，抗壞血酸緩衝液為不安定，而麩胺酸緩衝液製劑及檸檬酸緩衝液製劑則安定。

以肉眼目視檢查，含抗壞血酸緩衝液製劑保存後呈黃色或褐色。麩胺酸、檸檬酸緩衝液製劑保存前後未發現變化而為安定。任一檢體中不溶性粒子皆為微量，另外保存前

後未發現變化而為安定。再者，發現在25℃或40℃下保存時的pH在抗壞血酸緩衝液製劑中有向低pH側移動的傾向。麩胺酸、檸檬酸緩衝液製劑在保存前後未發現變化而為安定。全部檢體的滲透壓比約為1，應力負荷前後未發現變化。

使用抗壞血酸緩衝液的製劑所測定的大多數劣化指標顯示較大數值，顯示非常不安定。

藉由本實施例判明麩胺酸、檸檬酸適宜作為抗體安定化的緩衝劑。最佳為使用麩胺酸作為緩衝劑。

實施例2 含有抗HLA-DR抗體的水性製劑(pH的研究)

本實施例記述含有WO2003/033538中公開的對HLA-DR之抗體(抗HLA-DR抗體)的水性製劑。

本實施例中調製如表2所示的製劑，進行適宜的製劑pH的詳細評價。

[表2]

供於本研究的製劑一覽表

	原體濃度	緩衝劑	等張劑	界面活性劑	pH
1	抗HLA-DR抗體 10 mg/mL	10 mM 麩胺酸	D-山梨糖醇 262 mM	聚山梨糖醇酯80 0.05 mg/mL	4.0
2					5.0
3					5.2
4					5.5
5					5.8
6					6.0
7					7.0

(1)材料與方法

本實施例中所用材料與分析方法同實施例1。

(2) 試驗條件

本實施例中為進行安定性評價，依照以下條件對各製劑施加應力。

熱安定性試驗：控制於40℃或25℃的培養箱(TABAI ESPEC公司製)中保存1個月。

冷凍融解試驗：藉由-20℃冷凍庫及4℃低溫庫中交替保存，冷凍融解重複3次，做為檢體。其中每次循環以目視確認試樣完全凍結或融解。

強制振動試驗：使用振動試樣機(大洋科學工業公司製 RECIPRO SHAKER SR-II)以300 rpm、40 mm振動條件進行20分鐘，調製檢體。

光安定性試驗：控制在約4000路克斯的白色螢光燈下，以使經受120萬路克斯之方式以光照射檢體。

(3) 結果

圖2表示各水性醫藥製劑在25℃或40℃下保存時聚合物量的變化。聚合物量藉由尺寸排除HPLC測定。顯示麩胺酸緩衝液製劑在pH 4.0至pH 6.0為安定。再者，圖3表示各水性醫藥製劑在25℃或40℃下保存時分解物量的變化。分解物量藉由尺寸排除HPLC測定。顯示麩胺酸緩衝液製劑在25℃下保存時在pH 4.0至pH 7.0為安定。進而SDS-PAGE分析中尺寸排除HPLC所得結果得到同樣傾向的電泳圖。圖4表示各水性醫藥製劑在25℃或40℃下保存時去醯胺體量的變化。去醯胺體量係藉由陽離子交換HPLC測定。顯示麩胺酸緩衝液製劑在25℃下保存時在pH 4.0至pH 7.0為安定。圖5

表示各水性醫藥製劑在25℃或40℃下保存時Fc部位氧化體量的變化。Fc部位氧化體的量係藉由疏水HPLC測定。顯示麩胺酸緩衝液製劑在pH 4.0至pH 6.0為安定。經目視發現異物及混濁、不溶性異物、滲透壓比及pH在應力負荷前後幾乎沒有變化而為安定。

光安定性試驗的結果，發現光照射後任一檢體中聚合物、分解物、去醯胺體、Fc部位氧化體的量皆有增加，該等變化可藉由紙箱遮光而被抑制。因此，保存時實行任何遮光處理即可安定地保存。其中，冷凍融解及振動應力負荷前後的變化在任一分析項目中都未發現變化而為安定。

實施例3 含有抗HLA-DR抗體的製劑(等張的研究)

該實施例記述含有WO2003/033538中公開的對HLA-DR之抗體(抗HLA-DR抗體)的水性製劑。

本實施例中調製如表3所示的製劑，評價製劑的等張劑對製劑安定性的影響。

[表3]

供於本研究的製劑一覽表

	原體濃度	緩衝劑	等張劑	界面活性劑	pH
1	抗HLA-DR抗體10 mg/mL	10 mM 麩胺酸	D-山梨糖醇 262 mM	聚山梨糖醇 酯80 0.05 mg/mL	5.5
2			甘露糖醇 262mM		

(1)材料與方法

本實施例中所用材料與分析方法同實施例1。

(2)試驗條件

同實施例2中所示方法於對檢體施加負荷應力。

(3)結果

圖6表示各水性醫藥製劑經重複冷凍及融解後聚合物量的變化。聚合物量藉由尺寸排除HPLC測定。顯示使用山梨糖醇作為等張劑的製劑為安定。相對於山梨糖醇在冷凍時不結晶，而甘露糖醇冷凍時會結晶，故認為冷凍時有可能物理性破壞抗體分子。證明作為等張劑所用的多元醇以山梨糖醇等之在凍結時不結晶的化合物較佳。其他試驗條件下未發現安定性的差異。再者，發明者經預研究對鹽(氯化鈉)或糖(山梨糖醇)作為等張劑進行比較試驗，於熱安定性試驗中有關聚合物、分解物、去醯胺體生產量，得出使用糖類時比較安定的結論。

因此，本發明的等張劑較好本質上不含鹽；較好以在溶液中對抗體沒有化學影響的非還原糖作為適宜的多元醇；希望製劑在冷凍融解上安定時，為在使製劑中的抗體不安定化的凍結溫度(例如-20℃)下不結晶的物質為佳。山梨糖醇具有優異的溶液安定性，故適宜。

再者，本發明者使用聚山梨糖醇酯80作為界面活性劑、還研究了其濃度對抗體安定性的影響。由於界面活性劑的添加，製劑化抗體的凝聚減少。但是，發現藉由0.20 mg/mL以上的過量添加，抗體的Fc部位氧化體量有增加傾向。因此，界面活性劑在製劑中較好為0.02 mg/mL至0.10 mg/mL、最佳為約0.05 mg/mL的量存在為宜。

再者發明者藉由預研究，除了上述實施例中以外又對安

定化劑(甘胺酸、甲硫胺酸、鹽酸半胱胺酸、白胺酸、鹽酸離胺酸、鹽酸精胺酸、天門冬胺酸、抗壞血酸、EDTA)的添加進行研究。發現例如藉由添加甘胺酸，增強不溶性微粒子的抑制效果，另外發現甲硫胺酸抑制氧化體生成的效果。因此，本發明亦可包含該等安定化劑。

進而，使用對HAS重組的完全人類IgG1抗體(抗HAS抗體)進行同樣的研究，確認本發明不論抗體種類都成立。再者，使用抗HAS抗體的水性醫藥製劑的研究中進行抗體濃度1 mg/mL至100 mg/mL的研究，顯示本發明所示的方法無論抗體的濃度皆成立。

實施例4 含有抗體之醫藥製劑的調製

含有抗體的安定水性醫藥製劑的調製例如下所述。

從以編碼本發明所用抗體(HD3、HD4、HD6、HD7、HD8、HD10、HD4G1、HD4G2Ser、HD4G4、HD8G1、HD8G1Ser、HD8G2、HD8G2Ser、HD8G4)的基因轉型的該抗體予以表現所得的CHO細胞的培養上清液中，藉由WO2003-033538所示的方法精製該抗體。該精製抗體濃縮至約10 mg/mL後，使用超濾膜置換為10 mM麩胺酸緩衝液、262 mM D-山梨糖醇、pH=5.5緩衝液。緩衝液置換後的回收液中所含的抗體濃度經濃縮及調製至20 mg/mL後，添加聚山梨糖醇酯80至0.05 mg/mL、得到含20 mg/mL抗體的水性醫藥製劑。再者，上述20 mg/mL抗體製劑以不含抗體的水性醫藥製劑(10 mM麩胺酸緩衝液、262 mM D-山梨糖醇、0.05 mg/mL聚山梨糖醇酯80溶液)稀釋、調製任意抗體濃度的水

性醫藥製劑。以下表4之A至N表示相當於1 mL含有10 mg/mL抗體的水性醫藥製劑的組成比例。

[表4]

A 含有HD3之水性醫藥製劑的組成

HD3	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg
D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

B 含有HD4之水性醫藥製劑的組成

HD4	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg
D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

C 含有HD6之水性醫藥製劑的組成

HD6	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg
D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

D 含有HD7之水性醫藥製劑的組成

HD7	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg
D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1mL)

E 含有HD8之水性醫藥製劑的組成

HD8	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg
D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

F 含有HD10之水性醫藥製劑的組成

HD10	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg
D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

G 含有HD4G1之水性醫藥製劑的組成

HD4G1	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg

H 含有HD4G2ser之水性醫藥製劑的組成

HD4G2ser	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg

D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

I 含有HD4G4之水性醫藥製劑的組成

HD4G4	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg
D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

J 含有HD8G1之水性醫藥製劑的組成

HD8G1	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg
D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

K 含有HD8G1ser之水性醫藥製劑的組成 L 含有HD8G2之水性醫藥製劑的組成

HD8G1ser	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg
D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

HD8G2	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg
D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

M 含有HD8G2ser之水性醫藥製劑的組成 N 含有HD8G4之水性醫藥製劑的組成

HD8G2ser	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg
D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

HD8G4	10 mg
麩胺酸鈉單水合物	1.87 mg
鹽酸	0.057 mg
D-山梨糖醇	47.73 mg
山梨糖醇酯80	0.05 mg
注射用蒸餾水	(1 mL)

如上所述得到的水性醫藥製劑利用無菌濾膜成為無菌、利用經無菌管理的自動填充機等填充於預先滅菌的小瓶中，以橡膠栓封口、鋁蓋卷封，得到無菌的含有抗體的水性醫藥製劑。

實施例5 含有抗CD40抗體的水性製劑

該實施例記述含有WO02-088186中公開的對CD40的抗體(抗CD40拮抗抗體)的水性製劑。

本實施例中調製如表5所示的製劑、評價pH對抗體安定性的影響。

[表5]

供於本研究的製劑一覽表

	原體濃度	緩衝劑	等張劑	界面活性劑	pH
1	抗CD40拮抗抗體 10 mg/mL	10 mM 麩胺酸	D-山梨糖醇 262 mM	聚山梨糖醇 酯80 0.05 mg/mL	4.0
2					4.5
3					5.0
4					5.5
5					6.0
6					7.0

製劑檢體的調製

本研究使用的試劑有：抗CD40拮抗抗體(約15 mg/mL，按照WO02-088186中所記載的方法於麒麟啤酒公司醫藥生產本部生產技術中心調製)、L-麩胺酸鈉單水合物(日本藥典外醫藥品規格)、D-山梨糖醇(日本藥典)、氫氧化鈉(日本藥典)、鹽酸(日本藥典)、聚山梨糖醇酯80(日本藥典)、注射用水(日本藥典)。

各製劑試樣藉由製作不預先含原藥的安慰劑溶液、再以帶有抗HLA-DR拮抗抗體的NAP管柱(Pharmacia biotech公司製)與製劑安慰劑溶液置換而調製。蛋白質濃度調製至以OD280 nm吸光度係數 $\varepsilon=1.65$ 換算的濃度。

各製劑檢體在淨化臺內使用 0.22 μm 濾膜 (Millipore 公司製) 進行無菌過濾，淨化臺內保證無菌條件下每 1 mL 填充於 5 mL 玻璃小瓶 (不二硝子 (股份有限公司) 白 U-KB2CS (無塗膜)) 中。進而用以分析檢體的稀釋及分析空白組之不含抗 HLA-DR 拮抗抗體的溶液 (安慰劑) 在淨化臺內使用 0.22 μm 瓶頂濾膜 (Nalgene 公司製) 進行無菌過濾。

試驗條件

本實施例中為進行安定性評價，依照以下條件對各製劑試樣施予應力。

熱安定性試驗：控制於 40 $^{\circ}\text{C}$ 或 25 $^{\circ}\text{C}$ 的培養箱 (TABAI ESPEC 公司製) 中保存 1 個月。

再者，各試樣於各應力負荷後分析開始前保存於控制在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的低溫庫中。

分析方法

尺寸排除 HPLC 檢測 (SEC)：聚合物含量及分解物含量藉由尺寸排除高速液相層析法算出。因應需要，於環境溫度下使檢體稀釋至 1 mg/mL 並注入 15 μL 。分離係使用 TSK gel G3000 SWXL 30 cm $\times$ 7.8 mm (TOSOH 公司製) 管柱、使用 20 mM 磷酸鈉、500 mM 氯化鈉 pH 7.0 作為移動相、以 0.5 mL/分鐘的流量、分析時間為 30 分鐘、在 215 nm 進行檢出。定義主峰前溶出物為聚合物、主峰後溶出物為分解物。

SDS-PAGE 檢測：因應必要，檢體稀釋至 200 $\mu\text{g/mL}$ 。檢體溶液中加入二分之一容積的 Tris SDS 樣品處理液 (第一化學藥品公司製)，作為非還原檢體溶液。再者，因應必要稀

釋本品的溶液中加入二分之一容積的Tris SDSβME樣品處理液(第一化學藥品公司製)，在60℃加熱15分鐘，作為還原檢體溶液。電泳槽中充滿電泳用tris/甘胺酸/SDS緩衝液(BioRad公司製)。5 μL試樣溶液施加於4~20%聚丙烯醯胺凝膠(第一化學藥品公司製)、以20 mA恆定電流進行電泳至試樣溶液中所含的溴酚藍的藍色移動至凝膠的下端附近。電泳結束後的凝膠經銀染色檢出。其中為了判斷試樣及劣化體的大致分子量而同時電泳分子量標識(包含200 kDa、116.2 kDa、66.3 kDa、42.4 kDa、30.0 kDa、17.2 kDa的蛋白質)。

滲透壓比：使用自動滲透壓測定裝置(Arclay公司製OSMO STATION OM-6050)進行滲透壓測定、計算相對於同時測定的生理鹽水的滲透壓之比。

pH：使用自動pH測定裝置(Mettler Toledo公司製MP-230等)進行pH測定。測定開始時使用pH 4、pH 7及pH 9的標準溶液進行校正後再進行測定。

結果及考察

圖7所示為各水性醫藥製劑在25℃或40℃下保存時聚合物量。聚合物量係藉由尺寸排除HPLC測定。顯示在pH 4.0至pH 6.0為安定。圖8所示為各水性醫藥製劑保存於40℃時的分解物量。分解物量係藉由尺寸排除HPLC測定。分解物量與pH無關而為微量。再者，在25℃或40℃下保存時的pH於全部檢體保存前後都未發現變化而為安定。全部檢體的滲透壓比約為1，應力負荷前後未發現變化。

本說明書中引用的全部期刊、專利及專利申請案就此引用本文作為參考。

【圖式簡單說明】

圖1為含有抗HLA-DR抗體的各水性醫藥製劑於25℃或40℃下保存時聚合物量的變化示意圖。聚合物量藉由尺寸排除HPLC測定。顯示麩胺酸緩衝液製劑及檸檬酸緩衝液製劑安定。

圖2為含有抗HLA-DR抗體的各水性醫藥製劑於25℃或40℃下保存時聚合物量的變化示意圖。聚合物量藉由尺寸排除HPLC測定。顯示麩胺酸緩衝液製劑在pH 4.0至pH 6.0安定。

圖3為含有抗HLA-DR抗體的各水性醫藥製劑於25℃或40℃下保存時分解物量的變化示意圖。分解物量藉由尺寸排除HPLC測定。

圖4為含有抗HLA-DR抗體的各水性醫藥製劑於25℃或40℃下保存時去醯胺體之量的變化示意圖。去醯胺體之量係藉由陽離子交換HPLC測定。

圖5為含有抗HLA-DR抗體的各水性醫藥製劑於25℃或40℃下保存時Fc部位氧化體之量的變化示意圖。Fc部位氧化體之量係藉由疏水HPLC測定。顯示麩胺酸緩衝液製劑在pH 4.0至pH 6.0安定。

圖6為含有抗HLA-DR抗體的各水性醫藥製劑重複進行冷凍及融解後聚合物量變化示意圖。聚合物量係藉由尺寸排除HPLC測定。顯示使用山梨糖醇作為等張劑的製劑安定。

圖7為含有抗CD40拮抗抗體的各水性醫藥製劑於25℃保

存時聚合物量變化示意圖。聚合物量係藉由尺寸排除HPLC測定。顯示麩胺酸緩衝液製劑在pH 4.0至pH 6.0安定。

圖8為含有抗CD40拮抗抗體的各水性醫藥製劑保存時分解物量變化示意圖。分解物量係藉由尺寸排除HPLC測定。顯示麩胺酸緩衝液製劑在pH 4.0至pH 7.0安定。

五、中文發明摘要：

本發明提供一種含有抗體的安定水性醫藥製劑。具體為一種於麩胺酸緩衝液及/或檸檬酸緩衝液中含有治療有效量的抗體、pH為4.0~6.0的安定水性醫藥製劑。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

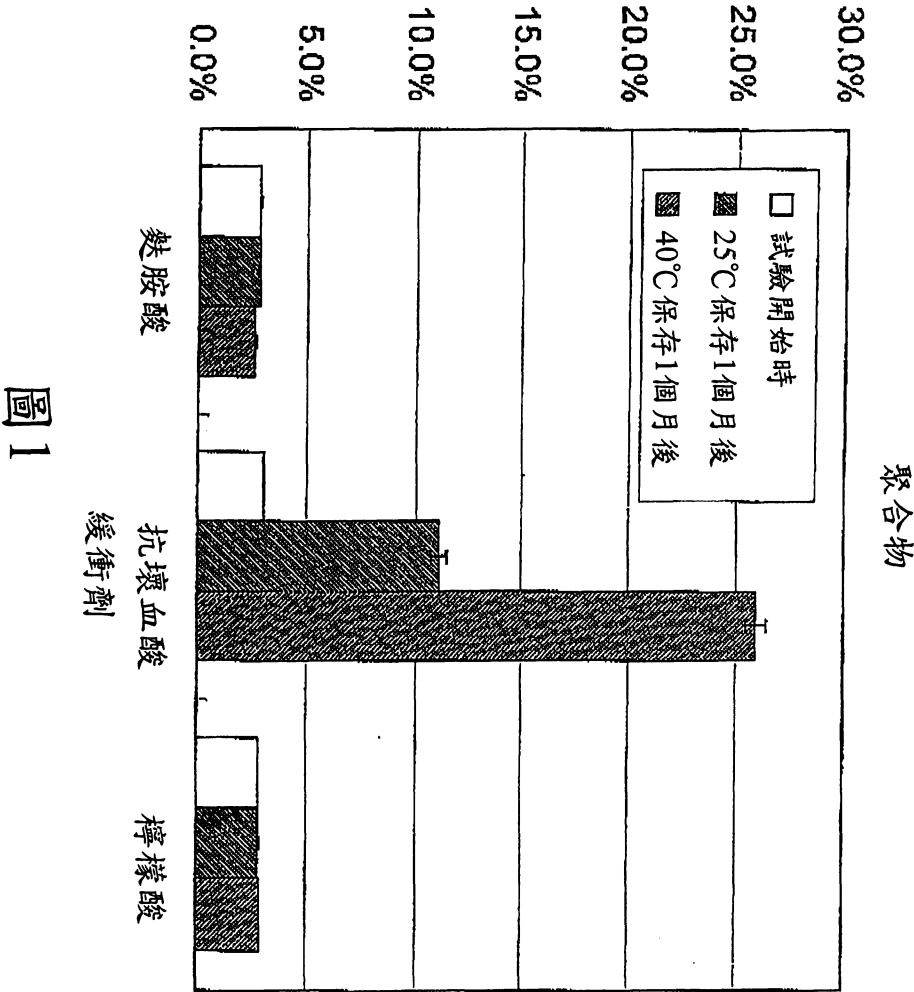
1. 一種安定的水性醫藥製劑，其係於麩胺酸緩衝液及/或檸檬酸緩衝液中，含有治療上有效量的抗體，其pH為4.0~6.0。
2. 如請求項1之水性醫藥製劑，其中緩衝液濃度為1 mM~50 mM。
3. 如請求項1或2之水性醫藥製劑，其中含有等張劑。
4. 如請求項3之水性醫藥製劑，其中等張劑中不含鹽。
5. 如請求項3之水性醫藥製劑，其中等張劑為多元醇。
6. 如請求項5之水性醫藥製劑，其中多元醇為山梨糖醇。
7. 如請求項3之水性醫藥製劑，其中滲透壓為250 mOsm~350 mOsm。
8. 如請求項1之水性醫藥製劑，其中含有界面活性劑。
9. 如請求項8之水性醫藥製劑，其中界面活性劑為聚山梨糖醇酯(Polysorbate) 80。
10. 如請求項8之水性醫藥製劑，其中界面活性劑濃度為0.02mg/mL~0.10mg/mL。
11. 如請求項1之水性醫藥製劑，其中抗體為人類抗體、人型化抗體或嵌合抗體。
12. 如請求項1之水性醫藥製劑，其中抗體為單株抗體。
13. 如請求項1之水性醫藥製劑，其中抗體為IgG。
14. 如請求項13之水性醫藥製劑，其中IgG的亞類為IgG1、IgG2、IgG4之任一者。
15. 如請求項13之水性醫藥製劑，其中IgG為藉由於恆定區域

之胺基酸序列的一部分基因改變，實行胺基酸的刪失、置換及/或插入的IgG。

16. 如請求項1之水性醫藥製劑，其中抗體為針對HLA-DR之抗體。
17. 如請求項1之水性醫藥製劑，其中抗體為針對CD40之抗體。
18. 如請求項1之水性醫藥製劑，其中抗體濃度為約1至200 mg/mL。
19. 一種安定的水性醫藥製劑，其係於麩胺酸緩衝液中含有治療上有效量之抗體、等張劑、界面活性劑，其pH為4.0~6.0。
20. 一種安定的水性醫藥製劑，其係於麩胺酸緩衝液中含有治療上有效量之抗體、等張劑、界面活性劑，其pH為4.5~6.0。
21. 一種安定的水性醫藥製劑，其特徵在於麩胺酸緩衝液中含有治療上有效量的抗體同時含有山梨糖醇作為等張劑、聚山梨糖醇酯80作為界面活性劑且其pH為4.0~6.0者。
22. 一種安定的水性醫藥製劑，其係於麩胺酸緩衝液中含有治療上有效量的抗體同時含有山梨糖醇作為等張劑、聚山梨糖醇酯80作為界面活性劑且其pH為4.5~6.0。
23. 如請求項1之水性醫藥製劑，其中包含由甘胺酸、甲硫胺酸、鹽酸半胱胺酸、白胺酸、鹽酸離胺酸、鹽酸精胺酸、天門冬胺酸、抗壞血酸、EDTA及其鹽所組成的群中選出的至少1種安定化劑。

24. 一種請求項1至23中任一項之水性醫藥製劑的製造方法。
25. 一種使抗體安定化的方法，其特徵在於按照請求項1至24中任一項之組成，藉由組合治療上有效量的抗體與麩胺酸緩衝液及/或檸檬酸緩衝液、等張劑及界面活性劑使抗體安定化。

十一、圖式：



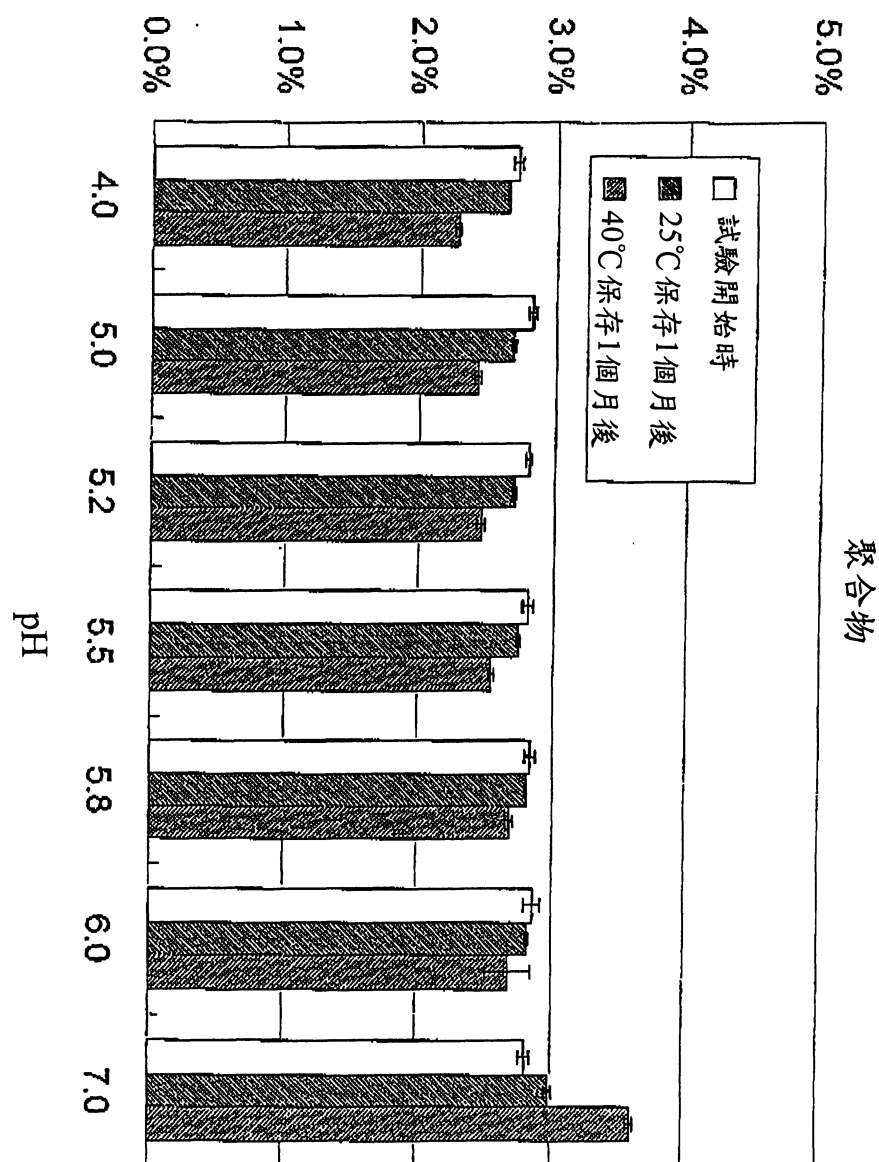


圖2

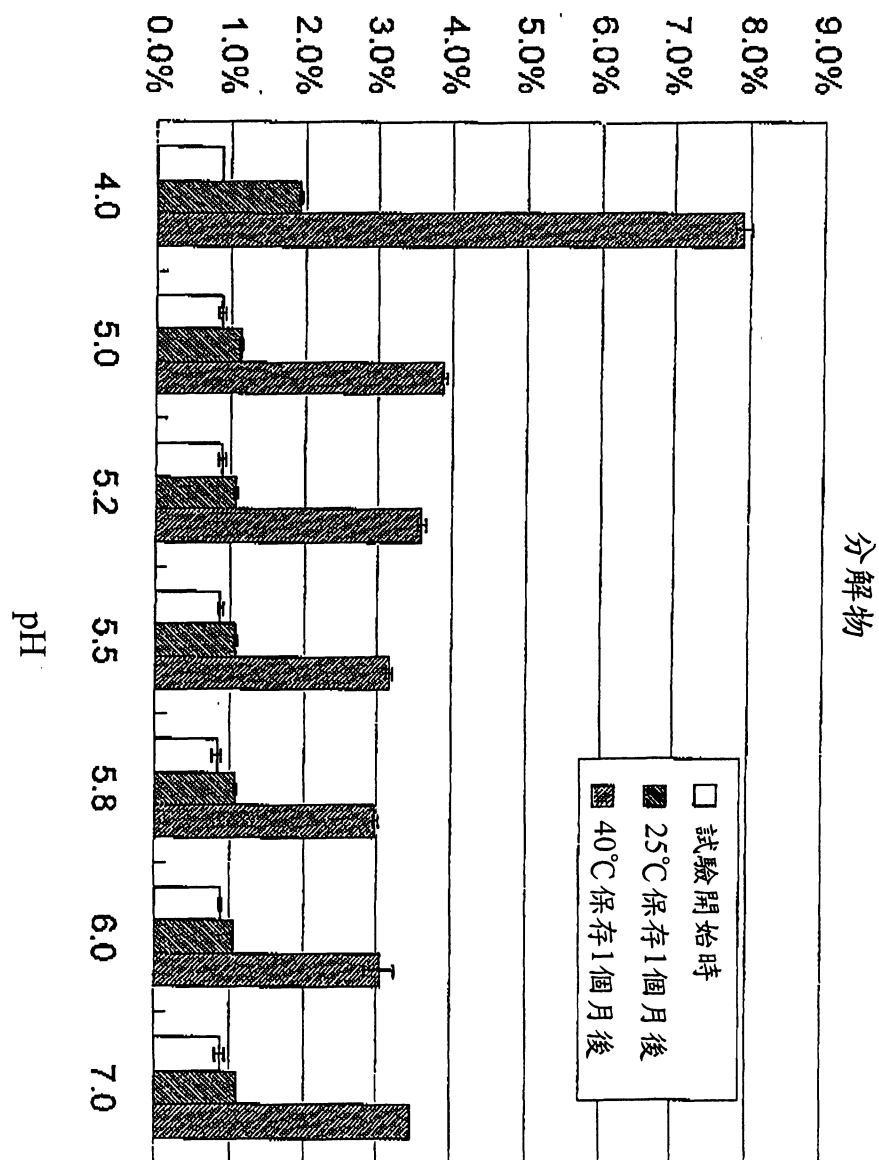


圖 3

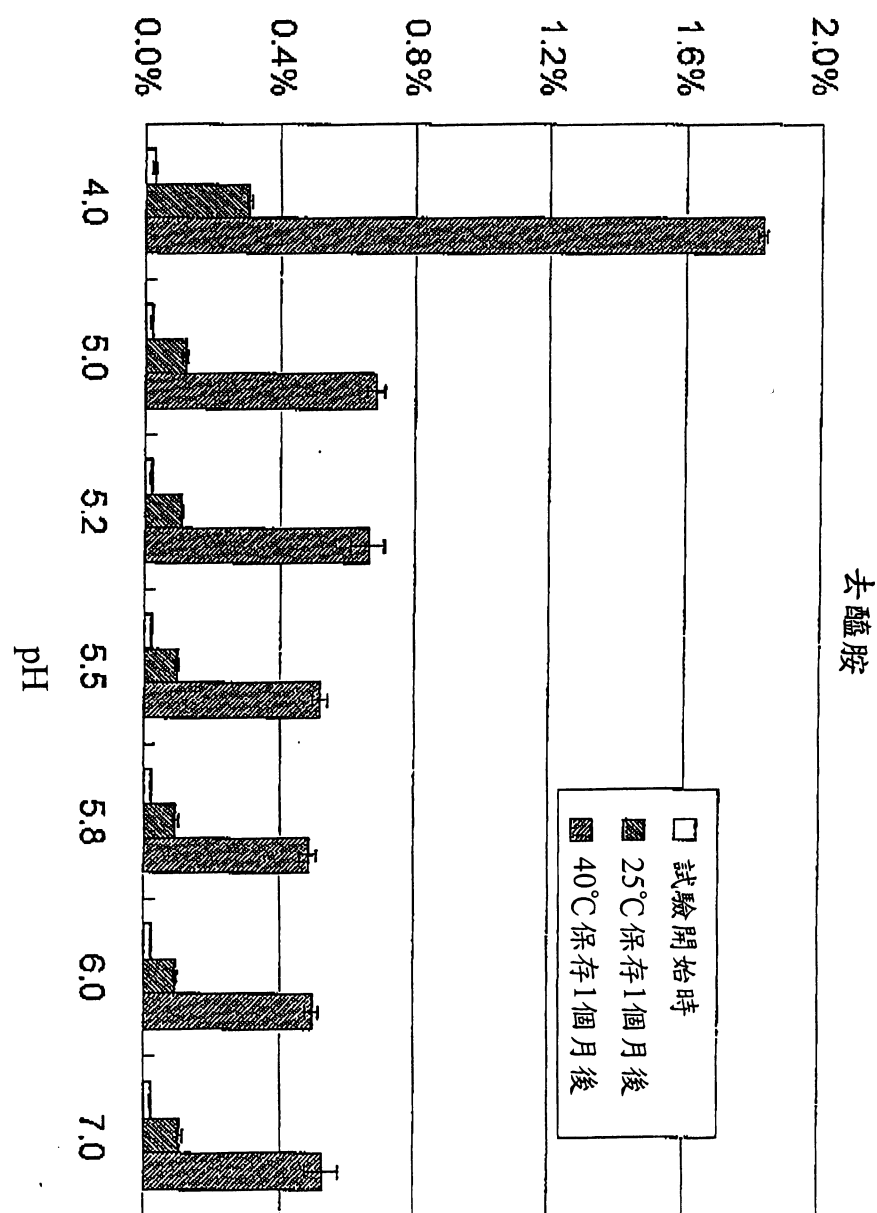


圖4

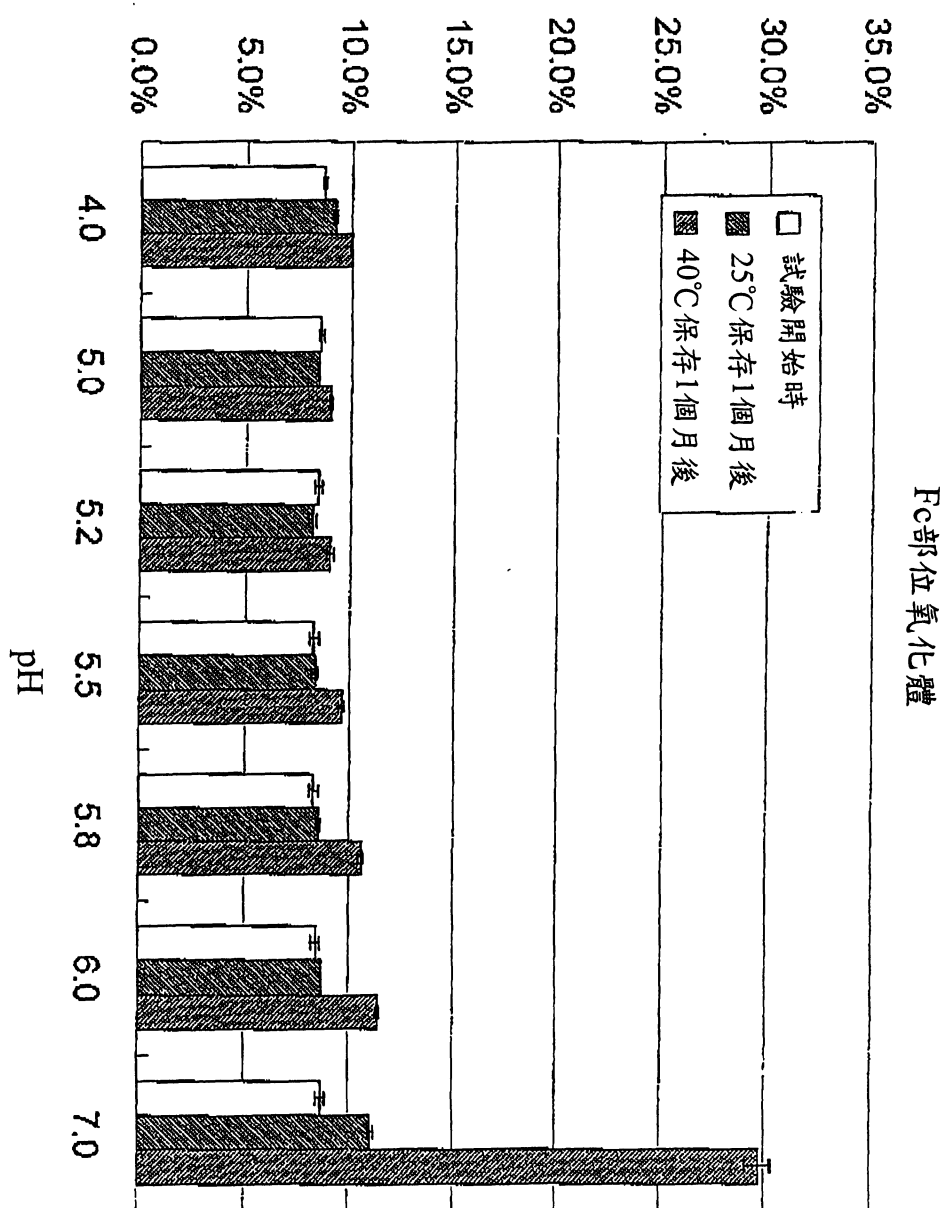
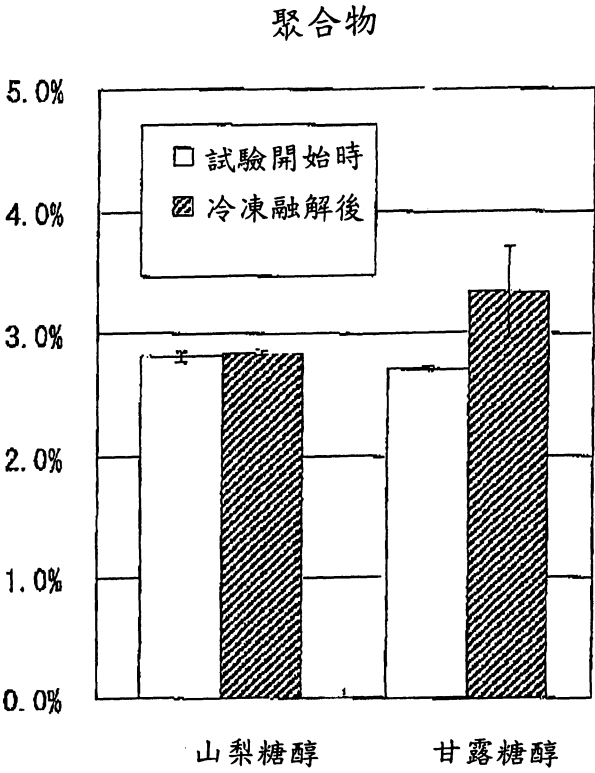


圖 5



等張劑

圖6

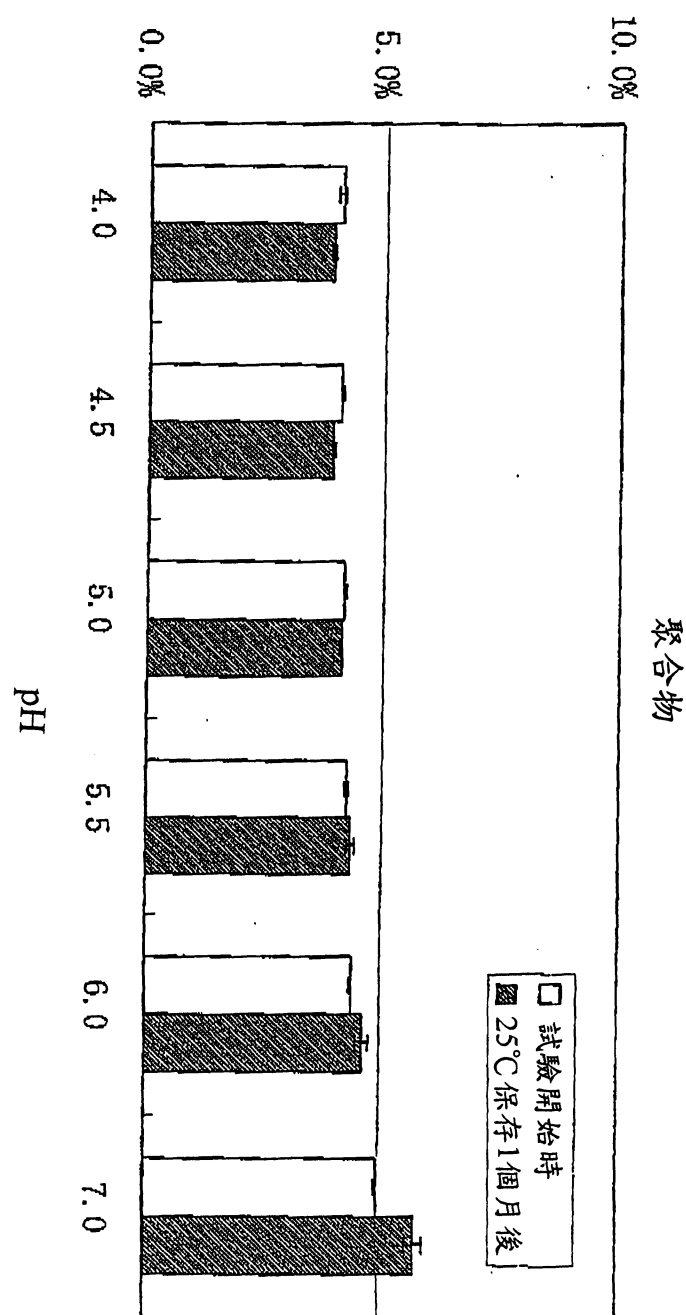


圖 7

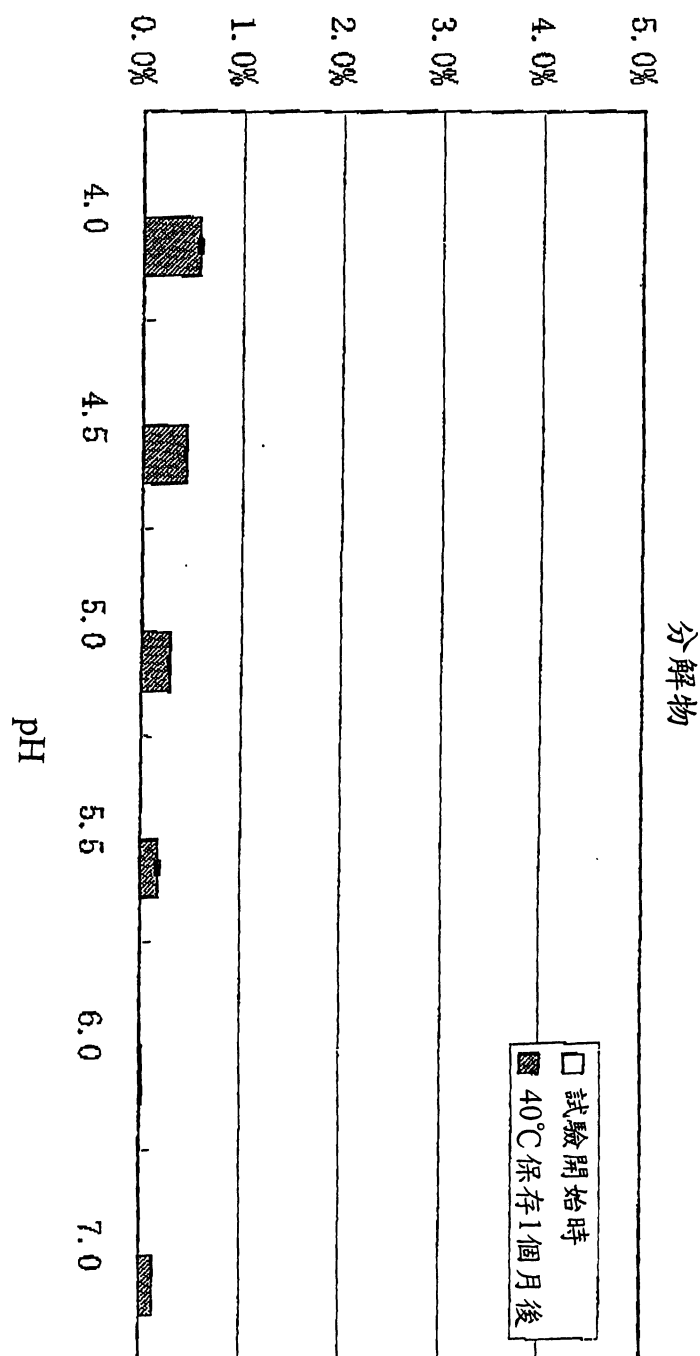


圖 8

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)