



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I679019 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 11 日

(21)申請案號：103114922

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 04 月 25 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)**C07K16/24 (2006.01)**A61K9/08 (2006.01)**A61K9/19 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**A61P37/00 (2006.01)*

(30)優先權：2013/04/29 美國

61/816,899

2014/02/05 歐洲專利局

14305160.5

(71)申請人：法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72)發明人：卡瑞翁 蘇菲 CARAYON, SOPHIE (FR)；柏希夫 歐特曼 BOUSSIF, OTMANE

(FR)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希

(56)參考文獻：

US 2010/0226923A1

WO 2012/125775A1

審查人員：官速貞

申請專利範圍項數：29 項 圖式數：34 共 122 頁

(54)名稱

抗 I L - 4 / 抗 I L - 1 3 之雙特異性抗體調配物

(57)摘要

本發明係提供安定的醫藥抗體調配物(包括凍乾調配物)，其係包括一抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體和一緩衝系統，其中調配物的 pH 為約 pH 7，且其中該調配物具有低的鹽濃度以便於降低調配物的離子強度。此調配物可視需要進一步包括一非離子界面活性劑、糖及/或非離子安定劑。此等調配物可用於治療各種疾病。

The present invention provides stable pharmaceutical antibody formulations, including lyophilized formulations, comprising an anti-IL-4/anti-IL-13 bispecific antibody and a buffering system, wherein the pH of the formulation is about pH 7, and wherein the formulation has a low salt concentration in order to reduce the ionic strength of the formulation. The formulations may, optionally, further comprise a non-ionic surfactant, a sugar, and/or a non-ionic stabilizing agent. The formulations can be used in the treatment of various diseases.

I679019

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

抗 IL-4/抗 IL-13 之雙特異性抗體調配物

ANTI-IL-4/ANTI-IL-13 BISPECIFIC ANTIBODY FORMULATIONS

【中文】

本發明係提供安定的醫藥抗體調配物(包括凍乾調配物)，其係包括一抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體和一緩衝系統，其中調配物的 pH 為約 pH 7，且其中該調配物具有低的鹽濃度以便於降低調配物的離子強度。此調配物可視需要進一步包括一非離子界面活性劑、糖及/或非離子安定劑。此等調配物可用於治療各種疾病。

【英文】

The present invention provides stable pharmaceutical antibody formulations, including lyophilized formulations, comprising an anti-IL-4/anti-IL-13 bispecific antibody and a buffering system, wherein the pH of the formulation is about pH 7, and wherein the formulation has a low salt concentration in order to reduce the ionic strength of the formulation. The formulations may, optionally, further comprise a non-ionic surfactant, a sugar, and/or a non-ionic stabilizing agent. The formulations can be used in the treatment of various diseases.

【代表圖】

【本案指定代表圖】： 無

【本代表圖之符號簡單說明】： 無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

抗 IL-4/抗 IL-13 之雙特異性抗體調配物

ANTI-IL-4/ANTI-IL-13 BISPECIFIC ANTIBODY FORMULATIONS

【技術領域】

【0001】 本發明係提供安定的醫藥抗體調配物(包括凍乾調配物)，其係包括一抗-IL-4/抗-IL-13雙特異性抗體和一緩衝系統，其中調配物的pH為約pH 7，且其中該調配物具有低的鹽濃度以便於降低調配物的離子強度。此調配物可視需要進一步包括一非離子界面活性劑、糖及/或非離子安定劑。此等調配物可用於治療各種疾病。

【先前技術】

【0002】 根據 IL-4 和 IL-13 的生理功能，其為治療上重要的細胞激素且在許多疾病上(包括氣喘)扮演著重要角色(Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005, Vo. 5, 161-166)。IL-4 已顯示能抑制自體免疫疾病，而 IL-4 和 IL-13 二者已顯示促進抗-腫瘤免疫反應之潛在性。因為二種細胞激素係涉及過敏性疾病之發病機制，這些細胞激素的抑制劑應能提供治療利益。

【0003】 為了開發適合皮下給藥之含有抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體的醫藥調配物，此抗體必須濃縮至約 100 mg/mL 或更高。然而，在此等高濃度下可能引起許多併發難題，包括黏性增加、pH 移位、溶液顏色改變及形成可視性和次可視性(sub-visible)粒子。抗體之調配物進一步因其在高濃度下容易聚集之事實而複雜化。當典型的抗體正常係在 5°C 於 4 年的時間內形成低於 5%高分子量聚集體，而抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體係在 25°C 以每小時介於 0.5-1%間的速率及在 5°C 以每小時 0.1%速率形成 HMW。實際上，此抗體具有強力的聚集傾向，其無法以目標濃度範圍調配於液體中。最後，抗-IL4/抗-IL13 雙特異性抗體具有特別低的等電點，使其因溶解度問題而更難以調配。例如，抗-IL4/抗-IL13 雙特異性抗體具有介於 5.8 至 6.2 之等電點，而大部分的抗體係具有介於 8 至 10 之等電點。

【0004】 因此，對於可解決這些併發難題之改良和安定的醫藥調配物存有需求。

【發明內容】

【0005】 為了符合此等和其他需求，文中係提供高安定性抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體調配物。令人意外地已發現包括抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體和一緩衝系統之液體和凍乾粉末形式的高安定性抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體調配物，其中調配物的 pH 為約 pH 7，及其中調配物具有低的鹽濃度以便於降低調配物的離子強度。此調配物可視需要進一步包括一非離子界面活性劑、糖及/或非離子安定劑。這些調配物係就習用調配物加以改良，習用調配物其在調配物中抗體的濃度增加時常會導致抗體的分子聚集，及形成可視性和次-可視性粒子。特言之，本發明之調配物就有關可視性粒子、次-可視性粒子、低分子量蛋白及高分子量蛋白上展現良好的安定性。

【0006】 本發明之一實施例係提供一安定的抗體調配物，其包括：一雙特異性抗-IL-4/抗-IL-13 抗體或其抗原結合片段，而該抗體或其抗原結合片段係包括一化學式 VL1-連接子-VL2 之輕鏈和一化學式 VH1-連接子-VH2 之重鏈，其中 VL1 和 VH1 形成一 IL-13 抗原結合區而 VL2 和 VH2 形成一 IL-4 抗原結合區；及包括一適合將調配物的 pH 維持在約 pH 7 之緩衝系統；且其中該調配物具有低的鹽濃度以便於降低調配物的離子強度。

【0007】 在特定的實施例中，VL1 係包括 SEQ ID NO: 1 之 CDR 序列；VH1 係包括 SEQ ID NO: 2 之 CDR 序列；VL2 係包括 SEQ ID NO: 3 之 CDR 序列；及 VH2 係包括 SEQ ID NO: 4 或 5 之 CDR 序列。在替代的特定實施例中，VL1 係包括 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；VH1 係包括 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列；VL2 係包括 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列；及 VH2 係包括 SEQ ID NO: 4 或 5 之胺基酸序列。

【0008】 在特定的實施例中，輕鏈係包括化學式 N-VL1-連接子-VL2-CL，其中 CL 為一抗體的輕鏈恆定區，及其中重鏈係包括化學式 N-VH1-連接子-VH2-CH1-CH2-CH3，其中 CH2-CH3 係相當於抗體的 Fc 區。在特定的實施例中，此連接子係包括 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列。

【0009】 在特定的實施例中，此抗體或其抗原結合片段進一步係包括一恆定區。在特定的實施例中，此恆定區係由 CH1、CH2、CH3 和 CL 組成之群中選出。

【0010】 在特定的實施例中，此雙特異性抗體或其抗原結合片段為一人源化 IgG4 雙特異性抗體或其抗原結合片段。

【0011】 在特定的實施例中，抗體或其抗原結合片段的濃度為約 100 mg/mL。

【0012】 在本發明特定的實施例中，此緩衝系統係包括至少二種緩衝劑。在特定的實施例中，此緩衝系統濃度為約 10 mM。在特定的實施例中，此緩衝系統係包括 Tris 緩衝劑和磷酸鹽緩衝劑。在特定的實施例中，此 Tris 緩衝劑濃度為約 3.7 mM。在特定的實施例中，此磷酸鹽緩衝劑濃度為約 6.3 mM。在特定的實施例中，此 Tris 緩衝劑濃度為約 3.7 mM 及此磷酸鹽緩衝劑濃度為約 6.3 mM。

【0013】 在本發明特定的實施例中，此調配物進一步係包括一非離子界面活性劑。在特定的實施例中，非離子界面活性劑濃度為約 0.05%至約 0.2% (w/v)。在特定的實施例中，此非離子界面活性劑為聚山梨醇酯。在特定的實施例中，此聚山梨醇酯為聚山梨醇酯 80。在特定的實施例中，聚山梨醇酯 80 濃度為約 0.05%至約 0.2% (w/v)。在特定的實施例中，聚山梨醇酯 80 濃度為約 0.2% (w/v)。

【0014】 在本發明特定的實施例中，此調配物進一步係包括糖。在特定的實施例中，糖濃度為約 5% (w/v)。在特定的實施例中，此糖為一雙糖。在特定的實施例中，此雙糖為蔗糖。在特定的實施例中，蔗糖濃度為約 5% (w/v)。

【0015】 在本發明特定的實施例中，此調配物進一步係包括一非離子安定劑。在特定的實施例中，此非離子安定劑濃度為約 1%至約 3% (w/v)。在特定的實施例中，此非離子安定劑為胺基酸或糖。在特定的實施例中，此胺基酸為脯胺酸。在特定的實施例中，此糖為甘露醇。在特定的實施例中，脯胺酸濃度為約 1%至約 3% (w/v)。在特定的實施例中，脯胺酸濃度為約 3% (w/v)。在特定的實施例中，甘露醇濃度為約 3% (w/v)。

【0016】 在本發明特定的實施例中，此調配物為一凍乾調配物。

【0017】 在本發明特定的實施例中，此調配物就有關可視性粒子、次-可視性粒子、低分子量蛋白及高分子量蛋白上展現良好的安定性。

【0018】 本發明一實施例係提供安定的凍乾抗體調配物，其包括：約 100 mg/mL 的雙特異性抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段係包括一包含 SEQ ID NO: 2 和 4 之胺基酸序列的重鏈可變區及包括一包含 SEQ ID NO: 1 和 3 之胺基酸序列的輕鏈可變區；約 10 mM 的緩衝系統，其中此緩衝系統係包括約 3.7 mM 之 Tris 緩衝劑濃度及約 6.3 mM 之磷酸鹽緩衝劑濃度；約 0.2% (w/v) 聚山梨醇酯 80；約 5% (w/v) 蔗糖；及約 3% (w/v) 脯胺酸；其中此調配物的 pH 為約 pH 7。

【0019】 本發明一實施例係提供安定的凍乾抗體調配物，其包括：約 100 mg/mL 的雙特異性抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段係包括一包含 SEQ ID NO: 2 和 4 之胺基酸序列的重鏈可變區及包括一包含 SEQ ID NO: 1 和 3 之胺基酸序列的輕鏈可變區；約 10 mM 的緩衝系統，其中此緩衝系統係包括約 3.7 mM 之 Tris 緩衝劑濃度及約 6.3 mM 之磷酸鹽緩衝劑濃度；約 0.2% (w/v) 聚山梨醇酯 80；約 5% (w/v) 蔗糖；及約 3% (w/v) 甘露醇；其中此調配物的 pH 為約 pH 7。

【0020】 本發明一實施例係提供一套組，該套組係包括一包含本發明調配物之容器，以及供投予和使用此調配物之說明書。

【0021】 本發明一實施例係提供用於治療過敏性疾病、癌症、氣喘、與異常產生 IL-4 及/或 IL-13 有關的疾病，或與 TH-2 媒介的反應升高有關的疾病之方法，其係包括將本發明之調配物投予有此需要的患者。

詳細說明

【0022】 本發明不限於文中所述之特定的方法、方案、細胞株、載體或試劑，因為在不悖離本發明之精神和範圍下其可改變。再者，文中所用的術語僅為以特定實施例作為例證之目的且不希望限制本發明之範圍。任何類似或相當文中所述之方法和物質皆可用於施行本發明，而文中僅描述示例性方法、裝置和物質。

【0023】 文中所提及之所有的專利和公開案係以全文引用的方式併入本文中，作為描述和揭示可能與本發明一起使用或於本發明中使用之文中所提出的蛋白、酵素、載體、宿主細胞及方法之目的。然而，其在文中不應解釋為承認本發明無權藉由先前發明而先於此揭示。

定義

【0024】 除非另有說明，否則所有文中所用的技術和科學術語係具有如本項技術之一般技術者所正常理解之相同意義。

【0025】 請注意，除非內容中明確地指出，否則如本說明書和所附的申請專利範圍中所用，單數形式「一」、「此」亦包括複數參照物。

【0026】 術語「大約」係指特定值或範圍之 10%內，及更佳地 5%(或 1%或更低)之內。

【0027】 術語「投予」或「給藥」係指注射或另外物理上遞送一存在體外之物質(例如本發明之調配物)至一病患中，例如藉由黏膜、皮內、靜脈內、皮下、肌肉內遞送及/或任何其他文中所述或本項技術中已知的物理性遞送方法。當欲治療一疾病或其癥狀時，物質之投予典型地係在疾病或其癥狀發作之後。當欲預防一疾病或其癥狀時進行，物質之投予典型地係在疾病或其癥狀發作之前進行。

【0028】 就多肽的情況下，術語「類似物」係指一多肽，其具有與抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽之片段、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性表位或抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體相似或相同功能，但不一定包括相似或相同的抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽片段、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性表位或抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體之胺基酸序列，或具有相同或類似的抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽片段、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性表位或抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體之結構。具有相似胺基酸序列之多肽係指一多肽其滿足至少下列之一：(a)與文中所述的抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽(例如 SEQ ID NO: 1-5)、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽片段、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性表位或抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體之胺基酸序列具有至少 30%，至少 35%，至少 40%，至少 45%，至少 50%，至少 55%，至少 60%，至少 65%，至少 70%，至少 75%，至少 80%，至少 85%，及較

佳地至少 90%，更佳地至少 95%，或最佳地至少 99%一致性之多肽；(b)由在嚴格的條件下與編碼至少 5 個胺基酸殘基，至少 10 個胺基酸殘基，至少 15 個胺基酸殘基，至少 20 個胺基酸殘基，至少 25 個胺基酸殘基，至少 40 個胺基酸殘基，至少 50 個胺基酸殘基，至少 60 個胺基酸殘基，至少 70 個胺基酸殘基，至少 80 個胺基酸殘基，至少 90 個胺基酸殘基，至少 100 個胺基酸殘基，至少 125 個胺基酸殘基或至少 150 個胺基酸殘基之如文中所述的抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽片段、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性表位或抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體(或其 VH 或 VL 區)的核苷酸序列雜交的核苷酸所編碼的多肽(參見，例如 Sambrook 等人 (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.；Maniatis 等人 (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)；及(c)由與編碼文中所述的抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽片段、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性表位活抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體(或其 VH 或 VL 區)的核苷酸序列具至少 30%，至少 35%，至少 40%，至少 45%，至少 50%，至少 55%，至少 60%，至少 65%，至少 70%，至少 75%，至少 80%，至少 85%，及較佳地至少 90%，更佳地至少 95%或最佳地至少 99%一致性的核苷酸所編碼的多肽。具有與抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體多肽、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽片段、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性表位或抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體類似結構之多肽係指一多肽，其具有抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體多肽、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性多肽片段、抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性表位或抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體之類似的二級、三級或四級結構。多肽之結構可藉由熟習本項技術者已知的方法來測定，包括(但不限於)X-光結晶學、核磁共振和結晶學電子顯微技術。

【0029】 就測定二個胺基酸序列或二個核苷酸序列之一致性百分比，係將序列以最佳化比較目的對齊(例如，可將缺位導入第一胺基酸序列或核苷酸序列用於與第二胺基酸或核苷酸序列最佳化聯配)。然後比較在對應胺基酸位置或核苷酸位置的胺基酸殘基或核苷酸。當在第一序列中的一個位置和第二序列中對應位置被相同的胺基酸殘基或核苷酸佔據時，則此分子

在該位置為一致的。二個序列間之一致性百分比為此等序列所共享的相同位置之數目(亦即，一致性% = 相同的重疊位置/位置的總數目 X 100%)。在一實施例中，此二種序列具有相同的長度。

【0030】 測定二個序列間的一致性百分比(例如胺基酸序列或核酸序列)亦可使用數學運算來進行。用於比較二個序列之數學運算的較佳非限定實例為 Karlin 和 Altschul 之運算 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264 2268, 於 Karlin 和 Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873 5877 修改。此一運算係併入 NBLAST 和 XBLAST 程式中, Altschul 等人, 1990, J. Mol. Biol. 215:403。BLAST 核苷酸搜尋可用 NBLAST 核苷酸程式參數組來進行，例如得分=100，字長=12 得到類似所指核酸分子之核苷酸序列。BLAST 蛋白搜尋可用 XBLAST 程式參數組來進行，例如得分=50，字長=3 得到類似所指蛋白分子之胺基酸序列。為了得到就比較目的之缺位比對，可如 Altschul 等人., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389 3402 中所描述，使用 Gapped BLAST。另一種選擇，PSI BLAST 可用於進行刪除分子間距離關係之迭代搜尋(Id.)。當利用 BLAST 時，Gapped BLAST 和 PSI Blast 程式，可使用個別程式的內鍵參數(例如 XBLAST 和 NBLAST)(參見，例如 National Center for Biotechnology Information (NCBI)於 www.ncbi.nlm.nih.gov 上)。另外較佳的，用於序列比較之數學運算的非限定實例為 Myers 和 Miller 之運算法, 1988, CABIOS 4:11 17。此一運算係併入 ALIGN 程式中(version 2.0)，其為 GCG 序列比對套裝軟體之部分。當利用 ALIGN 程式比較胺基酸序列時，PAM120 重量殘基表，可使用 12 之缺位長度罰值和 4 之缺位罰值。

【0031】 二個序列間的一致性百分比可使用類似上述之技術，以有或無允許缺位下來測定。在計算一致性百分比上，典型地僅計算確切的配對數。

【0032】 「拮抗劑」或「抑制劑」係指能抑制一或多種目標分子之生物活性的分子，例如 IL-4 及/或 IL-13 之訊號傳遞。藉由讓被配體活化的細胞失能或將其殺死，及/或藉由干擾受體或配體活化(例如酪胺酸激酶活化)或配體與受體結合後之訊號傳導，拮抗劑可干擾受體與配體之結合且反之亦然。拮抗劑可完全阻斷受體-配體相互作用或實質上可降低此相互作用。在本發明特定的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體為人源化、拮

抗性抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體，較佳地人源化、單株、拮抗性抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體。

【0033】 術語「抗體」、「免疫球蛋白」或「Ig」在文中可交換使用。術語抗體包括(但不限於)合成抗體、單株抗體、重組產生的抗體、多特異性抗體(包括雙特異性抗體)、人類抗體、人源化抗體、嵌合抗體、內抗體、單鏈 Fvs (scFv)(例如包括單特異性、雙特異性等)、駱駝化抗體、Fab 片段、F(ab')、二硫化物-連接 Fvs (sdFv)、抗-個體基因型(抗-Id)抗體及任何上述之表位結合片段。特言之，抗體係包括免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子之免疫學上活性部分，亦即特異與 IL-4 或 IL-13 抗原結合之含有抗原-結合位置之抗原結合區或分子(例如抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體之一或多個互補決定區(CDR))。抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體可為任何型式(例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)，任何種類(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)，或任何亞類(例如 IgG2a 和 IgG2b)之免疫球蛋白分子。在較佳的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體為人源化，例如人源化單株抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體。在特定的實施例中，此抗-T 抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體為 IgG 抗體，人類 IgG4 抗體。

【0034】 術語「抗原」係指能與本發明抗體結合之分子或分子的一部分。一抗原可具有一或一個以上的表位。被本發明抗體所辨識之抗原的實例包括(但不限於)血清蛋白，例如細胞激素，如 IL-4、IL5、IL9 和 IL-13、生物活性多肽、細胞表面分子例如受體、轉運子、離子通道、病毒和細菌蛋白。

【0035】 術語「抗原結合位置」係指包括特異與部份或所有抗原結合或互補的區域之抗體部分。當抗原較大時，抗體可能僅與抗原的特定部分結合，此部分稱為表位。抗原結合區可藉由一或多個抗體可變區來提供。較佳地，抗原結合區係由抗體輕鏈可變區(VL)和抗體重鏈可變區(VH)結合所構成。

【0036】 術語「結合劑」係指與 IL-4 及/或 IL-13 結合或特異結合之任何分子，例如抗體、siRNA、核酸、適體或小分子有機化合物，或其變體或片段。

【0037】 術語「雙特異性抗體」或 BsAbs 係指組合單一分子內二個抗體之抗原結合位置的分子。因此，雙特異性抗體能同時與二個不同的抗原結合。除了診斷目的之應用外，BsAbs 藉由將有效的效應子系統重新導向疾病區域或藉由增加中和或刺激抗體活性，為新的治療應用鋪路。雙特異性抗體可為單株的，但較佳地為人類或人源化。製造雙特異性抗體之方法已為本項技術所熟知。

【0038】 術語「副產物」包括有損或減少治療性/預防性結合劑之比例的不欲的產物，例如在一給予的調配物中之抗體。例如，典型的副產物包括抗體之聚集物、抗體片段例如由去醯胺化或水解之蛋白降解所產生，或其混合物。典型地，聚集物為具有大於單體抗體之分子量的複合物。抗體降解產物可包括，例如抗體片段，例如由去醯胺化或水解所產生的。典型地，降解產物為具有大於單體抗體之分子量的複合物。在 IgG 抗體的情況下，此等降解產物係低於約 150 kD。

【0039】 術語「組成物」和「調配物」希望係涵蓋含有特定成份(例如抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體)，視需要特定量之產品，以及任何直接或間接由特定成份，視需要特定量組合所產生的產品。

【0040】 術語「恆定區」係指輕鏈和重鏈之羧基端部分，其不會直接涉及抗體與抗原之結合，但具有各種效應子功能，例如與 Fc 受體相互作用。此術語係指，相對於其他疫球蛋白分子之部分(含有抗原結合位置之可變區)，具有更保守胺基酸序列之免疫球蛋白分子的部分。恆定區係含有重鏈之 CH1、CH2 和 CH3 區及輕鏈之 CHL 區。

【0041】 術語「病症」係指受益於本發明調配物之治療的任何症狀。此項係包括慢性和急性病症，其包括該等使哺乳動物及特別是人類，易罹患該所指病症之病理症狀。文中所欲治療之病症的非限定實例包括癌症、發炎、自體免疫疾病、感染、心血管疾病、呼吸疾病、神經疾病和代謝疾病。

【0042】 術語「表位」係指抗原表面上之局部區域，例如 IL-4 或 IL-13 多肽或 IL-4 或 IL-13 多肽片段，其能與抗體之一或多個抗原結合區結合，且在動物，較佳地哺乳動物，及最佳地人類中具有抗原性或致免疫活性，而能引發免疫反應。具有致免疫活性之表位為在動物中引起抗體反應之一

部份的多肽。具有致免疫活性之表位為與抗體特異結合之一部份多肽，如藉由本項技術中熟知的方法，例如免疫分析所測定。抗原表位不一定需要具有致免疫性。表位通常係由化學活性表面聚合之分子所組成，例如胺基酸或糖側鏈，且具有特定的三維結構特性，以及特定的帶電性特性。形成表位之多肽區可為多肽之鄰近的胺基酸，或此表位可共同來自抗體之二或多個非鄰近的胺基酸區。此表位可為或不可為三-維表面特徵之抗原。在特定的實施例中，IL-4 或 IL-13 表位為三-維表面特徵之 IL-4 或 IL-13 多肽。在其他的實施例中，IL-4 或 IL-13 表位為一線性特徵之 IL-4 或 IL-13 多肽。抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體可特異與變性形式之 IL-4 或 IL-13 的表位、天然形式之 IL-4 或 IL-13 表位，或變性和天然形式之 IL-4 或 IL-13 二者的表位相結合。

【0043】 術語「賦形劑」係指通常用於藥物作為稀釋劑、媒劑、防腐劑、結著劑、安定劑等之惰性物質，並包括(但不限於)蛋白(例如，血清白蛋白等)，胺基酸(例如，天門冬胺酸、麩胺酸、離胺酸、精胺酸、甘胺酸、組胺酸等)、脂肪酸和磷脂質(例如，烷基磺酸酯、辛酸酯等)、界面活性劑(例如，SDS、聚三梨醇酯、非離子界面活性劑等)、糖類(例如，蔗糖、麥芽糖、海藻糖等)及多醇類(例如，甘露醇、山梨醇等)。亦參見 Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa.，其係以全文引用的方式併入。

【0044】 在胜肽或多肽之情況，術語「片段」係指包括少於全長胺基酸序列之胜肽或多肽。此一片段可能係由，例如截去胺基端、截去羧基端，及/或刪除胺基酸序列中間的殘基所產生。片段可，例如由替代的 RNA 剪接或由活體內蛋白酶活性所產生。在特定的實施例中，IL-4 或 IL-13 片段係包括包含與 IL-4 或 IL-13 多肽特異結合之 IL-4 或 IL-13 多肽或抗體之至少 5 個鄰近的胺基酸殘基、至少 10 個鄰近的胺基酸殘基、至少 15 個鄰近的胺基酸殘基、至少 20 個鄰近的胺基酸殘基、至少 25 個鄰近的胺基酸殘基、至少 40 個鄰近的胺基酸殘基、至少 50 個鄰近的胺基酸殘基、至少 60 個鄰近的胺基酸殘、至少 70 個鄰近的胺基酸殘、至少 80 個鄰近的胺基酸殘、至少 90 個鄰近的胺基酸殘、至少 100 個鄰近的胺基酸殘基及，至少 125 個鄰近的相鄰胺基酸殘基，至少 150 個鄰近的相鄰的胺基酸殘基，至少 175 個

鄰近的相鄰胺基酸殘基，至少 200 個鄰近的胺基酸殘基，或至少 250 個鄰近的胺基酸殘基之胺基酸序列的多肽。

【0045】 詞語和術語抗體或抗原之「功能性片段、變體、衍生物或類似物」等等，以及其形式，為具有與所指之全長抗體或抗原共通的質性上生物活性之化合物或分子。例如，抗-IL-4 抗體之功能性片段或類似物為一可與 IL-4 分子結合或可防止或實質上降低配體能力者，或與 IL-4 結合之促效性或拮抗性抗體。

【0046】 術語「重鏈」當用於有關抗體時係指五種不同的類型，以重鏈恆定區的胺基酸為基準，稱為阿爾法(α)、德爾塔(Δ)、艾蒲賽龍(ϵ)、伽瑪(γ)和繆(μ)。這些不同類型的重鏈已為本項技術所熟知並分別產生五種抗體 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，包括 IgG 的四種亞類，亦即 IgG1、IgG1、IgG3 和 IgG4。較佳地，此重鏈為人類重鏈。

【0047】 術語「絞鏈」或「絞鏈區」係指包括抗體之第一和第二恆定區間的胺基酸之柔韌多肽。

【0048】 非人類抗體之「人源化」形式為嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其部份(例如 F_v 、 F_{ab} 、 $F_{ab'}$ 、 $F_{(ab)2}$ 或其他抗體之靶-結合的子序列)，相較於人類抗體，其含有衍生自非人類免疫球蛋白之序列。一般而言，人源化抗體將包括實質上全部一個，及典型地二個可變區，其中全部或實質上全部 CDR 區係相當該等非人類免疫球蛋白，及全部或實質上全部 FR 區為該等人類免疫球蛋白模板序列。人源化抗體亦可包括至少一部份的免疫球蛋白恆定區(F_c)，典型地所選的人類免疫球蛋白模板之恆定區。一般而言，目的係使抗體分子在人類中為輕微致免疫性。因此，在無實質上減少一或多個 CDR 與 IL-4 及/或 IL-13 之特異結合功能下，可將一或多個 CDR 中的一或多個胺基酸改變成對人類宿主較低致免疫性的胺基酸，為可能的。另一種選擇，FR 可為非人類的，但該等大部份致免疫性的胺基酸係以較低致免疫性的胺基酸置換。然而，CDR 嫁接，如上所論述，並非唯一得到人源化抗體之方法。例如，只修改 CDR 區可能不夠，因為對於框架殘基參與決定 CDR 環之三-維結構和抗體對其配體之整體親和力為常見的。因此，可施用任何方法，以便於將非人類親代抗體分子修改成對人類致免性較低，而與人類抗體全局序列一致性並非一定必要。所以，人源化亦可，例如僅藉

由一些殘基之取代來進行，特別是該等暴露在抗體分子上而非隱藏在分子內，且因此不易影響宿主免疫系統的殘基。參見，例如 Studnicka 等人, Prot Eng 7(6):805-814, 1994；Mol Imm 44:1986-1988, 2007；Sims 等人, J Immunol 151:2296 (1993)；Chothia 等人, J Mol Biol 196:901 (1987)；Carter 等人, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285 (1992)；Presta 等人, J Immunol 151:2623 (1993), WO 2006/042333 和美國專利第 5,869,619 號。另一種選擇，抗體亦可藉由其他技術加以人源化，包括 CDR 嫁接(EPO 0 239 400；WO 91/09967；和美國專利第 5,530,101 和 5,585,089 號)，鑲飾或表面重修(EPO 0 592 106；EPO 0 519 596；Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498；Studnicka 等人, 1994, Prot Eng 7(6):805-814；和 Roguska 等人, 1994, PNAS 91:969-973)和鏈改組(美國專利第 5,565,332 號)。人類抗體可藉由各種本項技術中已知的方法來製造，包括(但不限於)噬菌體表現法，參見美國專利第 4,444,887、4,716,111、5,545,806 和 5,814,318 號；及 WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735 和 WO 91/10741，使用基因轉植動物，例如噬齒類，使用嵌合細胞等等。

【0049】 「介白素-4」(IL-4)係關於天然生成或內源性哺乳動物 IL-4 蛋白及具有與天然生成或內源性對應哺乳動物 IL-4 蛋白相同胺基酸序列之蛋白{例如，重組蛋白、合成蛋白(亦即使用合成有機化學法所製造)}。因此，如文中所定義，此術語包括成熟的 IL-4 蛋白、多形態或等位基因變體，及其他 IL-4 同型和前述之修飾或非修飾型(例如脂質化，糖基化)。天然生成的或內源性 IL-4 包括野生型蛋白例如成熟的 IL-4、多形態或等位基因變體，及其他同型和哺乳動物中天然生成的突變型(例如，人類、非人類靈長類)。此等蛋白，例如可從天然產生的 IL-4 來源中回收或分離。這些蛋白和具有與天然生成或內源性對等 IL-4 相同基酸序列的蛋白，係以對應的哺乳動物之名稱來命名。例如，當對應的哺乳動物為人類時，此蛋白係稱為人類 IL-4。數種突變的 IL-4 蛋白已為本項技術所知，例如該等揭示於 WO 03/038041 中之蛋白。

【0050】 「介白素-13」(IL-13)係指天然生成或內源性哺乳動物 IL-13 蛋白及具有與天然生成或內源性對應哺乳動物 IL-13 蛋白相同胺基酸序列之蛋白(例如，重組蛋白、合成蛋白(亦即使用合成有機化學法所製造))。因

此，如文中所定義，此術語包括成熟的 IL-13 蛋白、多形態或等位基因變體，及其他 IL-13 同型(例如藉由替代的剪接或其他細胞處理所製造)和前述之修飾或非修飾型(例如脂質化，糖基化)。天然生成的或內源性 IL-13 包括野生型蛋白例如成熟的 IL-13、多形態或等位基因變體，及其他同型和哺乳動物中天然生成的突變型(例如，人類、非人類靈長類)。例如，如文中所用 IL-13 係涵蓋人類 IL-13 變體，其中成熟的人類 IL-13 之 110 位置的 Arg 係被 Gin 取代(成熟的 IL-13 之 110 位置相當於前驅蛋白的 130 位置)，其係與氣喘有關(異位性和非異味性氣喘)，以及其他 IL-13 之變體(Heinzmann 等人, Hum Mol Genet. 9:549-559 (2000))。此等蛋白，例如可從天然產生的 IL-13 來源中回收或分離。這些蛋白和具有與天然生成或內源性對等 IL-13 相同氨基酸序列的蛋白，係以對應的哺乳動物之名稱來命名。例如，當對應的哺乳動物為人類時，此蛋白係稱為人類 IL-13。數種突變的 IL-13 蛋白已為本項技術所知，例如該等揭示於 WO 03/035847 中之蛋白。

【0051】 「分離的」或「純化的」結合劑，例如抗體為實質上無細胞物質或其他來自細胞或來自結合劑所衍生之組織來源的汙染蛋白，或當由化學合成時，其實質上無化學前驅物或其他化學物質。例如，「實質上無細胞物質」一詞包括抗體之製備物，其中該抗體係由從其分離或重組製造之細胞的細胞組份所分離。因此，實質上無細胞物質之抗體係包括具有低於約 30%、20%、10%或 5%(重量比)之異源蛋白(文中亦稱為「汙染蛋白」)的抗體製備物。當此抗體係重組產生時，其亦較佳地係實質上無培養基，亦即培養基係低於約 20%、10%或 5%之蛋白製備物的容量。當此抗體係由化學合成所製造時，其較佳地係實質上無化學前驅物或其他化學物，亦即其與涉及此蛋白合成的化學前驅物或其他化學物分開。因此，此等抗體製備物係具有低於約 30%、20%、10%、5%(乾重比)之化學前驅物或相關抗體以外的化合物。在一較佳的實施例中，抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體係經分離或純化。

【0052】 術語「Kabat 編號」及類似術語已被本項技術所承認並係指比抗體或其抗原結合蛋白之重鏈和氫鏈可變區的其他胺基酸殘基更可變(亦即高可變)的胺基酸殘基之編號系統(Kabat 等人(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 及 Kabat 等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological

Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。就重鏈可變區, 此高變區典型地範圍係從 CDR1 之 31 至 35 的胺基酸位置, CDR2 之 50 至 65 的胺基酸位置, CDR3 之 95 至 102 的胺基酸位置。就輕鏈可變區, 此高變區典型地範圍係從 CDR1 之 24 至 34 的胺基酸位置, CDR2 之 50 至 56 的胺基酸位置, CDR3 之 89 至 97 的胺基酸位置。

【0053】 術語「輕鏈」當用於有關抗體時係指二種不同的類型, 以輕鏈恆定區的胺基酸為基準, 稱為(κ)和(λ)。輕鏈胺基酸序列已為本項技術所熟知。在較佳的實施例中, 此輕鏈為人類輕鏈。

【0054】 術語「連接子」係指連接抗體之抗原結合區的分子。此連接子可為任何種類的連接子分子。較佳地, 此連接子為一多肽。在重鏈多肽和輕鏈多肽之間和之內的連接子彼此可相同或不同。再者, 此連接子可具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 個胺基酸之長度。如用於輕鏈區, 用於重鏈之較佳的胜肽連接子單位為(G4S)₂, 亦即 GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6)。重鏈和輕鏈之連接子單位的數目可相同(兩邊對稱的順序)或彼此不同(不對稱順序)。胜肽連接子較佳地係具足夠的長度以提供適當的柔韌度使抗原結合基團免於彼此活性的干擾, 例如藉由位阻現象, 以允許適當的蛋白摺疊, 且若需要, 讓抗體分子, 可能地寬距, 與一或多個在相同細胞上的受體相互作用; 又其較佳地係夠短而得以讓抗體基團在細胞中仍為穩定的。因此, 胜肽連接子之長度、組成及/或構形可由熟習本項技術者容易地選擇, 以使多價抗體之所欲的性質最適化。

【0055】 術語「低鹽」和「低鹽濃度」係指 15 mM 或更低之相對低的鹽濃度, 包括 0 之鹽濃度或無鹽。鹽濃度係以調配物中鹽類和緩衝劑之量來決定。較佳的, 此緩衝系統係以低濃度, 亦即約 15 mM 或更低之低濃度存在於調配物中, 以便於減低調配物之離子強度。另一種選擇, 某些較佳的實施例不含有鹽和緩衝劑。亦較佳的, 無添加另外的鹽類, 例如 NaCl 至調配物中, 以保持調配物盡可能低的離子強度。

【0056】 術語「管理(manage)」係指患者由治療(例如, 預防或治療劑)所衍生的有利效用, 其不會使得罹病痊癒。在特定的實施例中, 係將一

或多種治療(例如，預防或治療劑，例如本發明調配物)投予一患者，用以「管理」IL-4 或 IL-13-媒介的疾病(例如癌症、發炎、自體免疫疾病、感染、心血管疾病、呼吸疾病、神經疾病和代謝疾病)，或其一或多種癥狀，而得以阻止此疾病的進展或惡化。

【0057】 術語「單株抗體」係指得自同源或實質上同源抗體之族群的抗體，且各單株抗體典型地將被認為是此抗原上的單一表位。在較佳的實施例中，「單株抗體」為由單一雜交瘤或其他細胞所產生的抗體。術語「單株」不限於任何特定的製造此抗體之方法。例如，單株抗體可藉由如 Kohler 等人；Nature, 256:495 (1975)中所述之雜交瘤方法來製造，或可從噬菌體庫分離。其他製備選殖細胞株和藉此表現的單株抗體之方法已為本項技術所熟知(參見，例如第 11 章中：Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed.；Ausube 等人, eds., John Wiley and Sons, New York)。

【0058】 術語「醫藥組成物」如本發明中所用係指各種製備物之調配物。含有治療上有效量之抗體的調配物為無菌液體溶液、液體懸浮液或凍乾物及視需要含有安定劑或賦形劑。

【0059】 術語「醫藥上可接受」係指經聯邦或州政府管理當局核准，或列於美國藥典、歐洲藥典或其他一般所知道之藥典中供用於動物，更特言之用於人類。

【0060】 術語「醫藥上可接受賦形劑」係指與活性分子例如單株抗體組合，供製備一適合或方便劑型之任何惰性物質。「醫藥上可接受賦形劑」為一在所用的劑量和濃度時對接受者無毒性，且係與包括單株抗體之調配物的其他成份相容。

【0061】 術語「防止」係指因給予文中所提供的治療或治療組合(例如，預防或治療劑之組合，例如本發明調配物)所導致之完全或部份抑制 IL-4 或 IL-13-媒介的疾病及/或其相關癥狀的發展、再發生、發作或擴散。

【0062】 術語「預防藥劑」係指可於一患者中完全或部份抑制 IL-4 或 IL-13-媒介的疾病及/或其相關癥狀的發展、再發生、發作或擴散之任何藥劑。在特定的實施例中，術語「預防藥劑」係指本發明調配物。在特定的其他實施例中，術語「預防藥劑」係指本發明調配物以外的藥劑。較佳地，預防藥劑為已知用於或已用於或目前正用於防止 IL-4 或 IL-13-媒介的

疾病及/或其相關癥狀，或阻止 IL-4 或 IL-13-媒介的疾病及/或其相關癥狀之發作、發展、進程及/或嚴重度。在特定的實施例中，此預防藥劑為人源化抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體。

【0063】 「重組抗體」一詞包括藉由重組方法所製備、表現、創造或分離之人類抗體，例如使用重組表現載體轉染至宿主細胞所表現的抗體，或由重組的、組合的人類抗體庫所分離的抗體，由人類免疫球蛋白基因之基因轉殖及/或轉染色體的動物(例如小鼠或牛)所分離的抗體(參見，例如，Taylor, L. D.等人(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295)或藉由任何涉及人類免疫球蛋白基因與其他 DNA 序列剪接之其他方法所製備、表現、創造或分離之抗體。此等重組的人類抗體可具有衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列的可變區和恆定區(參見 Kabat, E. A.等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。在特定的實施例中，然而，此等重組的人類抗體係於活體外進行突變(或當使用人類 Ig 序列之動物基因轉殖時，為活體內體細胞突變)且因此當係由人類生殖系 VH 和 VL 序列所衍生或與其相關時，重組抗體之 VH 和 VL 區的胺基酸序列可能為非天然存在於活體內人類生殖系儲庫之序列。

【0064】 術語「糖類」係指一種分子其為多元醇之衍生物。糖類通常係稱為碳水化合物且可含有不同量的糖單元，例如單糖、雙糖和多糖。

【0065】 術語「特異結合」係指與抗原或其片段特異結合且不會與其他抗原特異結合。例如，特異與抗原結合之抗體可以較低的親和力與其他多肽結合，如以例如，放射免疫分析(RIA)、酵素連結免疫吸附分析(ELISA)、BIACORE 或其他本項技術中已知的分析所測定。特異與抗原結合之抗體或其變體或片段可與相關的抗原交叉反應。較佳地，特異與抗原結合之抗體或其變體或片段不會與其他抗原交叉反應。特異與 IL-4 及/或 IL-13 抗原結合之抗體或其變體或片段可藉由，例如免疫分析、BIAcore 或其他熟習本項技術者已知的技術來鑑別。典型地，特異或選擇性反應將為至少二倍背景訊號或雜音，且更典型地為大於 10 倍背景。參見，例如，Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York 於第 332-336 頁就有關抗體特異性之論述。

【0066】 「安定」或「安定化」調配物為其中結合劑，例如抗體，於儲存時在其中必須保留其物理安定性、特性、完整性及/或化學安定性、特性、完整性，及/或生物活性。各種用於測量蛋白安定性之分析技術在本項技術中為可取得的並例如審閱 Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993)。安定性可在選擇的溫度及其他儲存條件下歷經一段選擇的時間來測量。安定性可藉由至少一種由下列組成之群中選出的方法來測定：目測檢查、SDS-PAGE、IEF、HPSEC、RFFIT 及 κ/λ ELISA。例如，若在目測檢查顏色及/或澄清度，或以 UV 光分散、SDS-PAGE 或以(高壓)粒徑篩析層析(HPSEC)測量時，其顯示無聚集、沉澱及/或變性之現象，則抗體在醫藥調配物中係「保留其物理安定性」。較佳地，當使用本發明調配物時，如由 HPSEC 或任何用於測量聚集形成之適合的方法所測量，係有 5%或更低，典型地 4%或更低，較佳地 3%或更低，更佳地 2%或更低，及特別式 1%或更低的抗體形成聚集物。例如，在特定調配物中於特定的儲存條件下經過一段特定的預定時間後，若抗體單體具有約 90%，較佳地約 95%，特別是約 98%之純度，則抗體在一特定的調配物中係視為安定的。化學安定性可藉由偵測和定量化學上改變的蛋白形式來評估。化學改變可能涉及大小修改(例如剪裁)，其可使用，例如(HP)SEC、SDS-PAGE 及/或介質輔助雷射脫附離子化/飛行時間質譜(MALDI/TOF MS)來評估。其他類型的化學改變包括電荷改變(例如，因去醯胺化所產生)，其例如可藉由離子交換層析來評估。若在一給予的時間抗體之生物活性，例如如抗原分析或病毒中和分析中所測定，為至少約 90% (在分析的誤差內)之醫藥調配物在製備時所展現的生物活性，則抗體在一給予的時間於醫藥調配物中係「保留其生物活性」。

【0067】 術語「患者(subject)」和「病患(patient)」係交換使用。如中所述，一患者較佳地為一哺乳動物，例如非靈長類(例如，牛、豬、馬、貓、狗、大鼠等)或靈長類(例如，猴子和人類)，最佳地為人類。在一實施例中，此患者為患有 IL-4 及/或 IL-13-媒介疾病之哺乳動物，較佳地人類。在另外的實施例中，此患者為處於發生 IL-4 及/或 IL-13-媒介疾病風險之哺乳動物，較佳地人類。

【0068】 「實質上一致」一詞有關抗體鏈多肽序列可解釋為與參照抗體序列具有至少 70%、80%、90%、95%或更高序列一致性之抗體鏈。有關核酸序列之術語可解釋為與參照核酸序列具有至少 85%、90%、95%或 97%或更高序列一致性之核苷酸序列。

【0069】 「替代的」變體為該等在天然的序列中具有至少一胺基酸殘基移除或被不同的胺基酸置換，插入其相同的位置。取代可為單一的，其中在分子中僅有一個胺基酸被取代，或可為多重的，其中在相同分子中之二或多個胺基酸係經取代。多數個取代可在連續的位置。又，一個胺基酸可經多數個殘基取代，在該情況下此一變體係包括取代和插入二者。「插入的」變體為該等一或多個胺基酸係緊鄰一胺基酸插入至天然序列中的特定位置。緊鄰一胺基酸係指以胺基酸之 α -羧基或 α -胺基功能基相連接。「刪除的」變體為該等在天然胺基酸序列中移除一或多個胺基酸。一般，刪除的變體將在分子的特定區域具有一或多個胺基酸刪除。

【0070】 術語「治療上有效量」係指治療(例如本發明調配物)之量其係足以降低及/或改善一特定疾病之嚴重性及/或時間及/或其相關癥狀。此術語亦涵蓋用於降低或改善特定疾病之進展或進程，降低或改善特定疾病之發生、進展和發作，及/或改善或增進另外的治療(例如本發明調配以外的治療)之預防性或治療性效用所需的量。在某些實施例中，本發明抗體之治療上有效量係提供介於約 5 至 20 ng/ml，較佳地介於約 10 至 20 ng/ml 之局部濃度。在某些實施例中，「治療上有效量」如文中所用係指用於達到特定結果(例如抑制 IL-4 及/或 IL-13 細胞激素)之本發明抗體的量。

【0071】 術語「治療劑」係指可用於治療、管理或改善 IL-4 及/或 IL-13-媒介疾病及/或其相關癥狀之任何藥劑。在特定的實施例中，術語「治療劑」係指本發明調配物。在特定的其他實施例中，術語「治療劑」係指本發明調配物以外的藥劑。較佳地，治療劑為一已知可用於，或已用於或目前正用於治療管理或改善 IL-4 及/或 IL-13-媒介疾病或一或多種其相關癥狀之藥劑。

【0072】 術語「治療(therapy)」係指任何可用預防、管理、治療及/或改善 IL-4 及/或 IL-13-媒介疾病(例如癌症、發炎、自體免疫疾病、感染、心血管疾病、呼吸疾病、神經疾病和代謝疾病)之方案、方法及/或藥劑。在

特定的實施例中，術語「治療」係指可用預防、管理、治療及/或改善熟習本項技術者(例如醫療人員)已知的 IL-4 及/或 IL-13-媒介疾病之生物性治療、支持性治療及/或其他治療。

【0073】 術語「治療(treat)」係指由給予一或多種治療(包括，但不限於給予一或多種預防性或治療性藥劑，例如本發明調配物)所產生之減低或改善 IL-4 及/或 IL-13-媒介疾病(例如癌症、發炎、自體免疫疾病、感染、心血管疾病、呼吸疾病、神經疾病和代謝疾病)的進程、嚴重性及/或期間。

【0074】 術語「可變區」係指輕鏈和重鏈之一部份，典型地在重鏈中約胺基端 120 至 130 個胺基酸及在輕鏈中約 100 至 110 個胺基酸，其在抗體中的序列大不相同且係用於結合及各特定抗體對其特定抗原之特異性。序列的可變性係集中在該等稱為互補決定區(CDR)之區域，而可變區中更高度保守區域係稱為架構區(FR)。輕鏈和重鏈的 CDR 主要係負責抗體與抗原之相互作用。胺基酸位置的編號係根據 EU 索引，如 Kabat 等人(1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington D.C.) 5th ed. ("Kabat et al.")。在較佳的實施例中，此可變區為一人類可變區。

B.調配物和調配物組份

【0075】 如前面所述，本發明調配物係包括一抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體和一緩衝系統，其中此調配物之 pH 為約 pH 7，及其中此調配物具有低的鹽濃度以便於降低調配物之離子強度。調配物可視需要進一步包括一非離子界面活性劑、糖及/或一非離子安定劑。已發現本發明調配物係提供優於先前抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體調配物之顯著改良，其中先前的調配物其在調配物中抗體濃度增加時常導致抗體之分子聚集，及形成可視性和次可視性粒子。特言之，本發明之調配物就有關可視性粒子、次-可視性粒子、低分子量蛋白及高分子量蛋白上展現良好的安定性。

i.抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體及其變體和片段

【0076】 在特定的實施例中，本發明調配物係包括一抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體。此雙特異性抗體係與 IL-4 及/或 IL-13 或其變體或片段結合

或特異結合。此 IL-4 及/或 IL-13 分子可來自任何物種。較佳地，此 IL-4 及/或 IL-13 分子係來自人類。IL-4 和 IL-13 之胺基酸序列和蛋白結構已為本項技術所熟知。

【0077】 在特定的示例性實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體為人源化抗體、全人類抗體或其變體或其抗原結合片段。較佳的抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體係防止 IL-4 和 IL-13 與其受體結合，及抑制 IL-4 和 IL-13 生物活性。

【0078】 在一特定的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段係包括一與 IL-13 相結合之輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 1 胺基酸序列(加底線係表示胺基酸作改變，粗體字係表示 CDR)。

抗-IL13 hB-B-13 VH3(SEQ ID NO:1)：

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD **SYGQSYMHWY** QQKAGQPPKL
LIYLASNLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YCQQNAEDSR
TFGGGTKLEI K

【0079】 在一特定的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段係包括一與 IL-13 相結合之重鏈可變區(VH)，該重鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 2 胺基酸序列(加底線係表示胺基酸作改變，粗體字係表示 CDR)。

抗-IL13 hB-B-13 VH2(SEQ ID NO:2)：

EVQLKESGPG LVAPGGSLSI TCTVSGFSLT **DSSINWVRQP** PGKGLEWLGM
IWGDGRIDYA DALKSRLSIS KDSSKSQVFL EMTSLRTDDT ATYYCARDGY
FPYAMDFWGQ GTSVTVSS

【0080】 在一特定的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段係包括一與 IL-4 相結合之輕鏈可變區(VL)，該輕鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 3 胺基酸序列(加底線係表示胺基酸作改變，粗體字係表示 CDR)。

抗-IL4 h8D4-8 VL1(SEQ ID NO:3)：

DIQMTQSPAS LSVSVGDTIT LTCHASQNI **DVWLSWFQQKP** GNIPKLLIYK
ASNLHTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISLQ EDIATYYCQQ **AHSYPFTFGG**
GTKLEIKR

【0081】 在一特定的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段係包括一與 IL-4 相結合之重鏈可變區(VH)，其係包括 SEQ ID NO: 4 胺基酸序列(加底線係表示胺基酸作改變，粗體字係表示 CDR)。

抗-IL4 h8D4-8 VH1(SEQ ID NO:4)：

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT** **SYWIHWIKQR** PGQGLEWIGM
IDPSDGETRL NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTRLK
EYGNYSFYF DVWGAGTLVT VSSA

【0082】 在另外特定的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段係包括一與 IL-4 相結合之重鏈可變區(VH)，該重鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 5 胺基酸序列(加底線係表示胺基酸作改變，粗體字係表示 CDR)。

抗-IL4 h8D4-8 VH2(SEQ ID NO:5)：

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT** **SYWIHWIKQR** PGQGLEWIGM
IDASDGETRL NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTRLK
EYGNYSFYF DVWGAGTLVT VSSA

【0083】 在某些特定的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段係包括一與 IL-13 相結合之重鏈可變區，該重鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 2 胺基酸序列；及一與 IL-13 相結合之輕鏈可變區，該輕鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 1 胺基酸序列。

【0084】 在其他特定的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段係包括一與 IL-4 相結合之重鏈可變區，該重鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 4 胺基酸序列；及一與 IL-4 相結合之輕鏈可變區，該輕鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 3 胺基酸序列。

【0085】 又在其他特定的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段係包括一與 IL-4 相結合之重鏈可變區，該重鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 5 胺基酸序列；及一與 IL-4 相結合之輕鏈可變區，該輕鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 3 胺基酸序列。

【0086】 在更特定的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段係包括一與 IL-13 和 IL-4 相結合之重鏈可變區，該重鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 2 和 4，或 2 和 5 胺基酸序列；及一與 IL-13 和 IL-4

相結合之輕鏈可變區，該輕鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 1 和 3 胺基酸序列。

【0087】 在最特定的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體係包括一與 IL-13 和 IL-4 結合之重鏈可變區，該重鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 2 和 4 胺基酸序列；及一與 IL-13 和 IL-4 相結合之輕鏈可變區，該輕鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 1 和 3 胺基酸序列(前導抗體(Lead Antibody))。此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體之實施例的示意圖係如圖 1 中所示，而示例性重鏈和輕鏈可變區係如圖 2 所示。前導抗體之分子量如質譜所測定為 198 kDa。前導抗體之等電點，如等電點聚焦所測，範圍係介於 5.8 至 6.2。

【0088】 在替代最特定的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段係包括化學式 VL1-連接子-VL2 之輕鏈和化學式 VH1-連接子-VH2 之重鏈，其中 VL1 和 VH1 係形成 IL-4 抗原結合區而 VL2 和 VH2 係形成 IL-13 抗原結合區。在某些實施例中，VL1 包括 SEQ ID NO: 1 之 CDR 序列；VH1 包括 SEQ ID NO: 2 之 CDRV 序列；VL2 包括 SEQ ID NO: 3 之 CDR 序列；及 VH2 包括 SEQ ID NO: 4 或 5 之 CDR 序列。在替代的實施例中，VL2 包括 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；VH2 包括 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列；VL1 包括 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列；及 VH1 包括 SEQ ID NO: 4 或 5 之胺基酸序列。

【0089】 在某些實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段係在抗體之抗原結合區之間包括一連接子。此連接子可為任何種類的連接子分子。較佳地，此連接子為一多肽。在重鏈多肽和輕鏈多肽之間和之內的連接子彼此可相同或不同。再者，此連接子可具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 個胺基酸之長度。如用於輕鏈區，用於重鏈之較佳的胜肽連接子單元為(G4S)₂，亦即 GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6)。最佳地，SEQ ID NO: 2 和 4 係藉由一第一胜肽連接子連結一起，其中該第一和第二胜肽連接子各自包括 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列。重鏈和輕鏈之連接子單元的數目可相同(兩邊對稱的順序)或彼此不同(不對稱順序)。胜肽連接子較佳地係具足夠的長度以提供適當的柔韌度來使抗原結合基團免於彼此活性的干擾，例如藉由位阻現象，以允許適當的蛋白摺疊，且若需要，讓抗體分子，可能地寬距，與一

或多個在相同細胞上的受體相互作用；又其較佳地係夠短而得以讓抗體基團在細胞中仍為穩定的。因此，胜肽連接子之長度、組成及/或構形可由熟習本項技術者容易地選擇，以使多價抗體之所欲的性質最適化。

【0090】 在本發明一較佳的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段為一人源化抗體。人源化抗體同型之實例包括 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。較佳地，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體為一 IgG 抗體。有四種形式的 IgG。較佳地，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體為一 IgG4 抗體。在本發明一更佳的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體為人源化 IgG4 抗體。

【0091】 在某些實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段進一步係包括一恆定區，例如 CH1、CH2、CH3 和 CL。

【0092】 本發明調配物之特定的實施例亦包括抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其抗原結合片段之變體。抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體之變體基於其高度相似性可具有類似的生理化學性質，且因此亦包括在本發明範圍內。變體係定義為帶有與抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體至少 95%，較佳地至少 97%，例如至少 98%或 99%之同源胺基酸序列，且能競爭與 IL-4 及/或 IL-13 多肽、IL-4 及/或 IL-13 多肽片段或 IL-4 及/或 IL-13 表位結合之抗體。較佳地，此等變體將改善、中和或另外抑制 IL-4 及/或 IL-13 生物活性。測定與目標結合之競爭可藉由熟習本項技術者已知的例行方法來進行。較佳地，此等變體為人類或人源化抗體，及較佳地為 IgG4 分子。在較佳的實施例中，變體在胺基酸序列上係至少 90%、95%、96%、97%、98%或 99% 與結合 IL-13 和 IL-4 包含 SEQ ID NO:2、4 和 5 之胺基酸序列的重鏈可變區；及結合 IL-13 和 IL-4 包含 SEQ ID NO:1 和 3 之胺基酸序列的輕鏈可變區一致。術語「變體」係指包括一胺基酸序列之抗體，其中此胺基酸序列，相較於抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體之胺基酸序列，係具有一或多個胺基酸改變。此變體可具有保守性序列修飾，包括胺基酸取代、修飾、添加和刪除。

【0093】 修飾之實例包括(但不限於)糖基化、乙醯基化、聚乙二醇化、磷酸化、醯胺化、以已知的保護/阻斷基團衍生化、蛋白分解性裂解以及連結細胞配體或其他蛋白。胺基酸修飾可藉由本項技術中已知的標準技術來

進行，例如定點突變、分子選殖、寡核苷酸定向突變以及編碼抗體之核酸中隨機 PCR-媒介的突變。保守性胺基酸取代包括其中胺基酸殘基係經具有類似結構或化學性質之胺基酸殘基所置換。具有類似側鏈之胺基酸殘基家族在本項技術中已有定義。這些家族包括帶有鹼性側鏈之胺基酸(例如，離胺酸、精胺酸、組胺酸)，酸性側鏈(例如，天門冬胺酸、麩胺酸)、不帶電的極性側鏈(例如，天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)，非極性側鏈(例如，甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)， β -支鏈側鏈(例如，蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳香側鏈(例如，酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸)。熟習技術者應明瞭，亦可使用上述所用以外的胺基酸殘基家族種類。再者，一變體可能具有非保守性胺基酸取代，例如，以具有不同結構或化學性質之胺基酸殘基取代一胺基酸。類似的小變異亦可包括胺基酸刪除或插入或二者。測定哪一個胺基酸殘基可能被取代、修飾、插入或刪除而不會消除免疫活性之指南，可使用本項技術中熟知的電腦程式來尋找。電腦運算法例如，其中包括，Gap 或 Bestfit，其已為熟習本項技術者所知，可用於最佳化對齊胺基酸序列進行比較並定義類似或相同的胺基酸殘基。相較於抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體，變體可具有相同或不同，更高或更低的結合親和力，但仍能特異與 IL-4 及/或 IL-13 結合，且可具有與抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體相同、更高或更低的生物活性。

【0094】 本發明之實施例亦包括抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體之抗原結合片段。術語「抗原結合區」、「抗原結合片段」及類似術語係指包括與抗原相互作用及授予結合劑其對抗原的特異性和親和力之胺基酸殘基的抗體部份(例如，互補決定區(CDR))。抗原結合區可衍生自任何動物物種，例如啮齒類(例如，兔、大鼠或倉鼠)和人類。較佳地，此抗原結合區應為人類來源。抗原結合片段之非限定實例包括：Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fd 片段、Fv 片段、單鏈 Fv (scFv) 分子、dAb 片段及由模擬抗體之高可變區之胺基酸殘基所組成的最小識別單位。

【0095】 在本發明較佳的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體(或其變體或其抗原結合片段)將能改善、中和或其他抑制活體內 IL-4 及/或 IL-13 生物活性。

【0096】 在本發明較佳的實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體(或其變體或其抗原結合片段)為改善、中和或其他抑制活體內 IL-4 及/或 IL-13 生物活性之結抗劑抗體。

【0097】 鑑別、分離、製備和定性與 IL-13 和 IL-4 結合之抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體或其變體或片段，包括包含一重鏈可變區和一輕鏈可變區之抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體，其中該重鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 2 和 4 之胺基酸序列，而該輕鏈可變區係包括 SEQ ID NO: 1 和 3 之胺基酸序列，已詳述描述於 PCT 公開案 WO 2009/052081 中，其係以引用的方式併入本文中。

【0098】 較佳地，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體(或其變體或其抗原結合片段)係以從約 5 mg/mL 至約 200 mg/mL，例如約 50 mg/mL 至約 150 mg/mL，約 75 mg/mL 至約 125 mg/mL 和約 100 mg/mL 之量存在調配物中。另一種選擇，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體(或其變體或其抗原結合片段)係以從約 5 mg/mL 至約 65 mg/mL，約 66 mg/mL 至約 130 mg/mL，約 131 mg/mL 至約 200 mg/mL 之量存在調配物中。例如，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體可以從約 5 mg/mL，約 10 mg/mL，約 15 mg/mL，約 20 mg/mL，約 25 mg/mL，約 30 mg/mL，約 35 mg/mL，約 40 mg/mL，約 45 mg/mL，約 50 mg/mL，約 55 mg/mL，約 60 mg/mL，約 65 mg/mL，約 70 mg/mL，約 75 mg/mL，約 80 mg/mL，約 85 mg/mL，約 90 mg/mL，約 95 mg/mL，約 100 mg/mL，約 105 mg/mL，約 110 mg/mL，約 115 mg/mL，約 120 mg/mL，約 125 mg/mL，約 130 mg/mL，約 135 mg/mL，約 140 mg/mL，約 145 mg/mL，約 150 mg/mL，約 155 mg/mL，約 160 mg/mL，約 165 mg/mL，約 170 mg/mL，約 175 mg/mL，約 180 mg/mL，約 185 mg/mL，約 190 mg/mL，約 195 mg/mL 或約 200 mg/mL 之量存在調配物中。。

【0099】 在特定的示例實施例中，此抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體係以約 100 mg/mL 之量存在調配物中。在另外的示例實施例中，人源化 IgG4 抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體，其包括包含 SEQ ID NO: 2 和 4，或 2 和 5 之胺基酸序列之與 IL-13 和 IL-4 結合的重鏈可變區；包含 SEQ ID NO: 1 和 3 之胺基酸序列之與 IL-13 和 IL-4 結合的輕鏈可變區，係以約 100 mg/mL 之量存在調配物中。

ii. 緩衝劑、緩衝系統、離子強度和pH

【0100】 緩衝劑係幫助將調配物之pH維持在大約生理條件的範圍內。緩衝劑較佳地係以範圍從約1 mM至約50 mM之濃度存在調配物中。適合用於本發明之緩衝劑包括有機和無機酸及其鹽類，例如檸檬酸鹽緩衝劑(例如，檸檬酸二氫鈉-檸檬酸二鈉混合物，檸檬酸-檸檬酸三鈉混合物，檸檬酸-檸檬酸二氫鈉混合物等)，琥珀酸鹽緩衝劑(例如，琥珀酸-琥珀酸二氫鈉混合物，琥珀酸-氫氧化鈉混合物，琥珀酸-琥珀酸二鈉混合物等)，酒石酸鹽緩衝劑(例如，酒石酸-酒石酸鈉混合物，酒石酸-酒石酸鉀混合物，酒石酸-氫氧化鈉混合物等)，延胡索酸鹽緩衝劑(例如，延胡索酸-延胡索酸一鈉混合物，延胡索酸-延胡索酸二鈉混合物，延胡索酸一鈉-延胡索酸二鈉混合物等)，葡萄糖酸鹽緩衝劑(例如，葡萄糖酸-葡萄糖酸鈉混合物，葡萄糖酸-氫氧化鈉混合物，葡萄糖酸-葡萄糖酸鉀混合物等)，草酸鹽緩衝劑(例如，草酸-草酸鈉混合物，草酸-氫氧化鈉混合物，草酸-草酸鉀混合物等)，乳酸鹽緩衝劑(例如，乳酸-乳酸鈉混合物，乳酸-氫氧化鈉混合物，乳酸-乳酸鉀混合物)及乙酸鹽緩衝劑(例如，乙酸-乙酸鈉混合物，乙酸-氫氧化鈉混合物等)。磷酸鹽緩衝劑、組胺酸緩衝劑、三甲胺鹽例如 Tris、HEPES 和其他此等已知的緩衝劑亦適合並可使用。較佳地，緩衝劑之組合物，亦即於本發明調配物中使用二或多種緩衝劑。二或多種緩衝劑之組合物在文中係指一緩衝系統。

【0101】 本發明調配物係包括一緩衝系統。緩衝系統係維持生理上適合的pH。此外，緩衝系統參予達到調配物之等張性和化學安定性。由於開發雙特異性抗體之適合的抗體調配物困難，較佳的係使用組合的緩衝系統以利用二或多種緩衝劑之優勢。藉由組合二或多種緩衝劑，能開發出更安定的抗體調配物。

【0102】 較佳地，此緩衝系統係以從約1 mM至約50 mM，例如約5 mM至約25 mM，約5 mM至約15 mM或約10 mM之濃度存在調配物中。另一種選擇，此緩衝系統係以從約1 mM至約15 mM，約16至約30 mM，約31至約45 mM或約46 mM至約50 mM之濃度存在調配物中。例如，此緩衝系統可以從約1 mM，約2 mM，約3 mM，約4 mM，約5 mM，約6 mM，

約 7 mM, 約 8 mM, 約 9 mM, 約 10 mM, 約 11 mM, 約 12 mM, 約 13 mM, 約 14 mM, 約 15 mM, 約 16 mM, 約 17 mM, 約 18 mM, 約 19 mM, 約 20 mM, 約 21 mM, 約 22 mM, 約 23 mM, 約 24 mM, 約 25 mM, 約 26 mM, 約 27 mM, 約 28 mM, 約 29 mM, 約 30 mM, 約 31 mM, 約 32 mM, 約 33 mM, 約 34 mM, 約 35 mM, 約 36 mM, 約 37 mM, 約 38 mM, 約 39 mM, 約 40 mM, 約 41 mM, 約 42 mM, 約 43 mM, 約 44 mM, 約 45 mM, 約 46 mM, 約 47 mM, 約 48 mM, 約 49 mM 及約 50 mM 之濃度存在調配物中。更佳地, 此緩衝系統係以從約 5 mM 至約 15 mM 之濃度存在調配物中, 及甚佳地從約 8 mM 至約 12 mM。在一最佳的實施例中, 此緩衝系統係以約 10 mM 之濃度存在。

【0103】 較佳地, 此緩衝系統係包括一 Tris 緩衝劑和一磷酸鹽緩衝劑。較佳地, 此 Tris 緩衝劑係以從約 1 至約 5 mM 之濃度存在調配物中。例如, 此 Tris 緩衝劑可以從約 1 mM, 約 2 mM, 約 3 mM, 約 4 mM 或約 5 mM 之濃度存在調配物中。更佳地, 此 Tris 緩衝劑係以從約 2 mM 至約 4 mM 之濃度存在調配物中, 及甚佳地從約 3 mM 至約 4 mM。在一最佳的實施例中, 此 Tris 緩衝系統係以約 3.7 mM 之濃度存在。

【0104】 較佳地, 磷酸鹽緩衝液係以從約 1 至約 10 mM 之濃度存在調配物中。例如, 磷酸鹽緩衝劑係以約 1 mM, 約 2 mM, 約 3 mM, 約 4 mM, 約 5 mM, 約 6 mM, 約 7 mM, 約 8 mM, 約 9 mM 或約 10 mM 之濃度存在調配物中。更佳地, 磷酸鹽緩衝劑係以從約 3 mM 至約 8 mM 之濃度存在調配物中, 及甚佳地從約 5 mM 至約 7 mM。在一最佳的實施例中, 此緩衝系統係以約 6.3 mM 之濃度存在。

【0105】 在本發明一最佳的實施例中, 此緩衝系統係包括濃度約 3.7 mM 之 Tris 緩衝劑和濃度約 6.3 mM 之磷酸鹽緩衝劑。此緩衝系統中 Tris 緩衝劑和磷酸鹽緩衝劑之組合為非比尋常的且不為本項技術所知。

【0106】 亦較佳的, 此緩衝系統係以低濃度, 亦即約 15 mM 或更低存在調配物中, 以便於降低調配物中的離子強度。此項係基於當調配物的離子強度增加, 抗體之聚集的動能增加之事實。為了改善調配物的安定性, 降低抗體的聚集或抗體聚集的速度為必需的。

【0107】 在特定的實施例中，本發明調配物具有約 pH 7 之 pH。較佳地，調配物的 pH 範圍係從約 5.0 至約 8.0。例如，調配物的 pH 可為約 5.0，約 5.1，約 5.2，約 5.3，約 5.4，約 5.5，約 5.6，約 5.7，約 5.8，約 5.9，約 6.0，約 6.1，約 6.2，約 6.3，約 6.4，約 6.5，約 6.6，約 6.7，約 6.8，約 6.9，約 7.0，約 7.1，約 7.2，約 7.3，約 7.4，約 7.5，約 7.6，約 7.7，約 7.8，約 7.9 及約 8.0。更佳地，調配物的 pH 範圍可從約 6.5 至約 7.5。在一最佳的施例中，pH 為約 7.0。當調配物的 pH 為約 pH 7 時，此調配物展現有關可視性粒子、次-可視性粒子、低分子量蛋白及高分子量蛋白之良好的安定性。調配物的 pH 可藉由任何熟習本項技術者已知的方法來測量。一測量 pH 之較佳的方法係使用帶有微電極之 pH 測量計。調配物的 pH 可使用任何本項技術中已知的方法來調整。用於改變調配物 pH 之較佳的化學物質為鹽酸(HCl)和氫氧化鈉(NaOH)。

【0108】 在特定的實施例中，本發明調配物具有抗體等電點(pI)以上的 pH。等電點為特定分子或表面載體無淨電荷時之 pH。雙特異性抗體之 pI 可藉由任何熟習本項技術者已知的方法來測定。較佳地，雙特異性抗體之 PI 係以變性等電聚焦來測量。抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體之 PI，其中該抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體係包括一包含 SEQ ID NO: 2 和 4 之胺基酸序列的重鏈和一包含 SEQ ID NO: 1 和 3 之胺基酸序列的輕鏈，為 5.8-6.2。

iii. 非離子界面活性劑

【0109】 本發明調配物可視需要進一步包括一非離子界面活性劑。界面活性劑為安定生物分子之化學化合物及/或調配物中之一般的醫藥賦形劑。界面活性劑一般係保護分子和賦形劑免於空氣/溶液介面引發的應力及溶液/表面引發的應力，其另外可能造成分子聚集。界面活性劑亦防止可視性和次可視性粒子形成。

【0110】 較佳地，此非離子界面活性劑係以從約 0.01%至約 1% (w/v)，例如約 0.01%至約 0.5%，約 0.01%至約 0.3%或約 0.01%至約 0.2%之濃度存在調配物中。另一種選擇，此非離子界面活性劑係以從約 0.01%至約 0.05% (w/v)，約 0.06%至約 0.10% (w/v)，約 0.11%至約 0.15% (w/v)，約 0.16%至約 0.20% (w/v)，約 0.20%至約 0.30% (w/v)，約 0.30%至約 0.40% (w/v)，約

0.40%至約0.50% (w/v), 約0.50%至約0.60% (w/v), 約0.60%至約0.70% (w/v), 約0.70%至約0.80% (w/v), 約0.80%至約0.90% (w/v)或約0.90%至約1.0% (w/v) 之濃度存在調配物中。例如, 此非離子界面活性劑可以約0.01% (w/v), 約0.02% (w/v), 約0.03% (w/v), 約0.04% (w/v), 約0.05% (w/v), 約0.06% (w/v), 約0.07% (w/v), 約0.08% (w/v), 約0.09% (w/v), 約0.1% (w/v), 約0.2% (w/v), 約0.3% (w/v), 約0.4% (w/v), 約0.5% (w/v), 約0.6% (w/v), 約0.7% (w/v), 約0.8% (w/v), 約0.9% (w/v)和約1% (w/v)之量存在調配物中。在特定的實施例中, 此非離子界面活性劑係以從約0.05%至約0.2% (w/v) 存在調配物中。

【0111】 界面活性劑之實例包括(但不限於)聚山梨醇酯、甘油、二羧酸、草酸、琥珀酸、延胡索酸、酞酸及其組合物。熟習本項技術者已了解可使用其他非離子界面活性劑, 只要其為醫藥上可接受的, 亦即適合投予患者。此非離子界面活性劑較佳地為聚山梨醇酯。聚山梨醇酯之實例包括聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、聚山梨醇酯 60、聚山梨醇酯 65 和聚山梨醇酯 80。最佳地, 此非離子界面活性劑為聚山梨醇酯 80。

【0112】 在示例的實施例中, 聚山梨醇酯 80 係以從約0.01%至約1% (w/v)之量存在調配物中。例如, 聚山梨醇酯 80 可以從約0.01% (w/v), 約0.02% (w/v), 約0.03% (w/v), 約0.04% (w/v), 約0.05% (w/v), 約0.06% (w/v), 約0.07% (w/v), 約0.08% (w/v), 約0.09% (w/v), 約0.1% (w/v), 約0.2% (w/v), 約0.3% (w/v), 約0.4% (w/v), 約0.5% (w/v), 約0.6% (w/v), 約0.7% (w/v), 約0.8% (w/v), 約0.9% (w/v)及約1% (w/v)之量存在調配物中。在特定的實施例中, 聚山梨醇酯 80 係以從約0.03%至約0.2% (w/v)存在調配物中。例如, 聚山梨醇酯 80 可以從約0.01%至約1% (w/v), 約0.02%至約0.5% (w/v) 及約0.03%至約0.2% (w/v)之量存在調配物中。在本發明一最佳的實施例中, 聚山梨醇酯 80 係以0.2% (w/v)之量存在調配物中。

iv. 糖

【0113】 本發明調配物可視需要進一步包括糖。典型地, 糖可用作高分子量蛋白之安定劑或作為低溫保護劑或作為凍乾保護劑。

【0114】 較佳地，糖係以從約 1%至約 10% (w/v)，例如約 2%至約 8% (w/v)，約 3%至約 7% (w/v)，約 4%至約 6% (w/v)或約 5% (w/v)之濃度存在調配物中。另一種選擇，糖係以從約 1%至約 3% (w/v)，約 3%至約 6% (w/v)或約 6%至約 10 % (w/v)之濃度存在調配物中。例如，糖可以約 1% (w/v)，約 2% (w/v)，約 3% (w/v)，約 4% (w/v)，約 5% (w/v)，約 6% (w/v)，約 7% (w/v)，約 8% (w/v)，約 9% (w/v)或約 10% (w/v)之量存在調配物中。在特定的實施例中，糖係以從約 3%至約 7% (w/v)，及更佳地約 5%存在調配物中。

【0115】 糖之實例包括(但不限於)單糖、雙糖和多糖。糖類的實例包括葡萄糖、蔗糖、麥芽糖、海藻糖、右旋糖、木糖醇、果糖和甘露醇。熟習本項技術者已了解可使用其他糖類，只要其為醫藥上可接受，亦即適合投予患者。較佳地，此糖為雙糖。更佳地，此糖為蔗糖。

【0116】 在特定的實施例中，蔗糖係以從約 1%至 10% (w/v)之量存在調配物中。例如，蔗糖可以約 1% (w/v)，約 2% (w/v)，約 3% (w/v)，約 4% (w/v)，約 5% (w/v)，約 6% (w/v)，約 7% (w/v)，約 8% (w/v)，約 9% (w/v)或約 10% (w/v)之量存在調配物中。較佳地，蔗糖係以約 3%至約 7% (w/v)或約 4%至約 6% (w/v)之量存在。最佳地，蔗糖係以約 5% (w/v)之量存在調配物中。

v. 非離子安定劑

【0117】 本發明調配物可視需要進一步包括一非離子安定劑。安定劑係指廣泛類別之賦形劑，其功能範圍可從膨脹劑至使治療劑安定或幫助防止變性或黏附於容器壁之添加劑。安定劑亦使高分子量蛋白形成降至最小。

【0118】 較佳地，此非離子安定劑係以從約 1%至約 10% (w/v)，例如約 2%至約 8% (w/v)，約 2%至約 5% (w/v)，約 2%至約 4% (w/v)或約 3% (w/v)之濃度存在調配物中。另一種選擇，此非離子安定劑係以從約 1%至約 2% (w/v)，約 2%至約 4% (w/v)，約 4%至約 6% (w/v)，約 6%至約 8% (w/v)或約 8%至約 10 % (w/v)之濃度存在調配物中。例如，此非離子安定劑可以從約 1% (w/v)，約 2% (w/v)，約 3% (w/v)，約 4% (w/v)，約 5% (w/v)，約 6% (w/v)，約 7% (w/v)，約 8% (w/v)，約 9% (w/v)或約 10% (w/v)之量存在

調配物中。在特定的實施例中，此非離子安定劑係以從約 1% 至約 5% (w/v)，更佳地從約 1% 至約 3% (w/v)，及最佳地約 3% (w/v) 存在調配物中。

【0119】 安定劑之實例包括(但不限於)多元醇；胺基酸，例如脯胺酸、精胺酸、離胺酸、甘胺酸、麩醯胺酸、天門冬醯胺酸、組胺酸、丙胺酸、鳥胺酸、L-白胺酸、2-苯丙胺酸、麩胺酸、蘇胺酸等；有機糖類或糖醇，例如乳糖、海藻糖、木蘇糖、阿拉伯糖醇、赤藻糖醇、甘露醇、山梨醇、木糖醇、核糖醇、肌糖醇、半乳糖醇、甘油及其類似物，包括環醇，例如肌醇；聚乙二醇；胺基酸聚合物；含硫還原劑，例如尿素、麩胱甘肽、硫辛酸、硫乙醇酸鈉、硫代甘油、 α -單硫代甘油和硫代硫酸鈉；低分子量多肽(亦即 <10 個殘基)；蛋白，例如人類血清白蛋白、牛血清白蛋白、明膠、免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烯吡咯酮、糖類、單糖類，例如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖；雙糖類，例如乳糖、麥芽糖和蔗糖；三糖類例如棉子糖；多糖類例如葡聚糖等等。熟習本項技術者已了解可使用其他非離子安定劑，只要其為醫藥上可接受，亦即適合投予患者。較佳地，此非離子安定劑為胺基酸。更佳地，此非離子安定劑為脯胺酸或甘胺酸。最佳地，此非離子安定劑為脯胺酸。另一種選擇，此非離子安定劑為甘露醇。

【0120】 在特定的實施例中，脯胺酸係以從約 1% 至 10% (w/v) 之量存在調配物中。例如，脯胺酸可以從約 1% (w/v)，約 2% (w/v)，約 3% (w/v)，約 4% (w/v)，約 5% (w/v)，約 6% (w/v)，約 7% (w/v)，約 8% (w/v)，約 9% (w/v) 或約 10% (w/v) 之量存在調配物中。較佳地，脯胺酸可以約 1% 至約 5% (w/v) 或約 1% 至約 3% (w/v) 之量存在。最佳地，脯胺酸係以約 3% (w/v) 之量存在調配物中。

【0121】 在特定替代的實施例中，甘露醇係以從約 1% 至 10% (w/v) 之量存在調配物中。例如，甘露醇可以約 1% (w/v)，約 2% (w/v)，約 3% (w/v)，約 4% (w/v)，約 5% (w/v)，約 6% (w/v)，約 7% (w/v)，約 8% (w/v)，約 9% (w/v) 或約 10% (w/v) 之量存在調配物中。較佳地，甘露醇可以約 1% 至約 5% (w/v) 或約 1% 至約 3% (w/v) 之量存在。最佳地，甘露醇係以約 3% (w/v) 之量存在調配物中。

vi. 其他賦形劑

【0122】 再者，本發明調配物可視需要進一步包括其他的賦形劑，包括(但不限於)注射用水、稀釋劑、增溶劑、安撫劑、另外的緩衝劑、無機或有機鹽類、抗氧化劑、防腐劑、膨脹劑、螯合劑、張度劑及其類似物。較佳地，然而，本發明調配物除了上述之外，並無包括其他賦形劑。其他的醫藥上可接受載劑、賦形劑或安定劑，例如 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)中所述，可包括在調配物中，其限制條件為不能對本發明之特性有不利的影響。在一特別的實施例中，此調配物實質上無防腐劑，雖然，在替代的實施例中，添加防腐劑可能為需要的。例如，低溫保護劑或凍乾保護劑可包括在凍乾調配物中。

vii. 液體或凍乾調配物

【0123】 本發明調配物可為液體調配物或凍乾調配物。較佳地，此調配物為液體調配物。更佳地，此液體調配物係供注射用。另一種選擇，此調配物可為凍乾粉末。較佳地，此凍乾粉末係就在投予之前與溶劑組合。

viii. 示例的調配物

【0124】 在本發明一示例的實施例中，本發明係提供一適合皮下給藥之液體抗體調配物，此調配物包括：

約 100 mg/mL 的雙特異性抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段係包括一包含 SEQ ID NO: 2 和 4 之胺基酸序列的重鏈可變區和一包含 SEQ ID NO: 1 和 3 之胺基酸序列的輕鏈可變區；

約 10 mM 的緩衝系統，其中此緩衝系統係包括約 3.7 mM 之 Tris 緩衝劑濃度和約 6.3 mM 之磷酸鹽緩衝劑濃度；

約 0.2% (w/v) 聚山梨醇酯 80；

約 5% (w/v) 蔗糖；及

約 3% (w/v) 脯胺酸；

其中此調配物之 pH 為約 pH 7。

【0125】 在本發明之另外的示例實施例中，本發明係提供一適合皮下給藥之液體抗體調配物，此調配物包括：

約 100 mg/mL 的雙特異性抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段係包括一包含 SEQ ID NO: 2 和 4 之胺基酸序列的重鏈可變區和一包含 SEQ ID NO: 1 和 3 之胺基酸序列的輕鏈可變區；

約 10 mM 的緩衝系統，其中此緩衝系統係包括約 3.7 mM 之 Tris 緩衝劑濃度和約 6.3 mM 之磷酸鹽緩衝劑濃度；

約 0.2% (w/v) 聚山梨醇酯 80；

約 5% (w/v) 蔗糖；及

約 3% (w/v) 甘露醇；

其中此調配物之 pH 為約 pH 7。

【0126】 在本發明之替代的示例實施例中，本發明係提供一適合皮下給藥之安定的凍乾抗體調配物，此調配物包括：

約 100 mg/mL 的雙特異性抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段係包括一包含 SEQ ID NO: 2 和 4 之胺基酸序列的重鏈可變區和一包含 SEQ ID NO: 1 和 3 之胺基酸序列的輕鏈可變區；

約 10 mM 的緩衝系統，其中此緩衝系統係包括約 3.7 mM 之 Tris 緩衝劑濃度和約 6.3 mM 之磷酸鹽緩衝劑濃度；

約 0.2% (w/v) 聚山梨醇酯 80；

約 5% (w/v) 蔗糖；及

約 3% (w/v) 脯胺酸；

其中此調配物之 pH 為約 pH 7。

【0127】 在本發明之另外替代的示例實施例中，本發明係提供一適合皮下給藥之安定的凍乾抗體調配物，此調配物包括：

約 100 mg/mL 的雙特異性抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段係包括一包含 SEQ ID NO: 2 和 4 之胺基酸序列的重鏈可變區和一包含 SEQ ID NO: 1 和 3 之胺基酸序列的輕鏈可變區；

約 10 mM 的緩衝系統，其中此緩衝系統係包括約 3.7 mM 之 Tris 緩衝劑濃度和約 6.3 mM 之磷酸鹽緩衝劑濃度；

約 0.2% (w/v) 聚山梨醇酯 80；

約 5% (w/v) 蔗糖；及

約 3% (w/v) 甘露醇；

其中此調配物之 pH 為約 pH 7。

ix. 安定性

【0128】 本發明調配物在 2-8°C 係持續安定至少約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36 個月或更久。在示例的實施例中，其在 2-8°C 係持續安定至少約 6 個月或更久。在其他示例的實施例中，其在 2-8°C 係持續安定至少約 9 個月。在另外示例的實施例中，其在 2-8°C 係持續安定至少約 1 年或更久，更佳地約 2 年，及甚佳地約 3 年。

C. 給藥模式

【0129】 在本發明特定的實施例中，此調配物係適合非經腸、靜脈內、肌肉內、皮下給藥或其組合。本發明調配物適合藉由各種技術來遞送。在本發明較佳的實施例中，此調配物係以皮下給藥。例如，其較佳的，含有 100 mg/mL 之抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體的調配物係以皮下給藥。因此，此調配物較佳地為無菌的。製造無菌調配物之方法已為本項技術所熟知並包括，例如，經由無菌過濾膜過濾或調配物成份(抗體除外)之高壓蒸氣滅菌於約 120°C 進行約 30 分鐘。

D. 劑量和劑型

【0130】 本發明調配物之有效劑量係依照許多不同的因素而變，包括給藥方法、目標位置、患者的生理狀態、患者是否為人類或動物、給予的其他藥物，及治療是否為預防性或治療性。通常，患者為人類，但亦可治療非人類哺乳動物，包括基因轉殖哺乳動物。治療劑量可能需要定出效價以使安全性和效力最佳化。較佳地，劑量範圍係從 100-200 mg/瓶。

【0131】 本發明調配物可以多重時機給藥。單一劑量間的時間可為每天、每週、每二週、每月或每年。間隔亦可為非規律性的。在幾個月內，調整劑量以達到特定的血漿結合劑(例如抗體)濃度。劑量和頻率將依照抗

-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體在患者中的半衰期而變。一般而言，人類抗體顯現最長的半衰期，接著人源化抗體、嵌合抗體和非人類抗。

【0132】 在另外的實施例中，本發明係提供包括一治療上有效量之本發明調配物的醫藥單位劑型，經由將此劑型投予患者用於治療患者中一或多種疾病。在一較佳的實施例中，此患者為人類。此人類可為成人或可為嬰兒。術語「醫藥單位劑型」係指適用於所欲治療之患者作為單一的劑量之物理上離散單位，各單位含有一經計算產生所欲治療/預防效用之預定量的活性化合物結合所需的檸檬酸鹽緩衝劑和 pH。

【0133】 單位劑型可為包括此調配物之容器。適合的容器包括(但不限於)密封的安瓶、小瓶、瓶、注射器和試管。此等容器可由各種材料來製成，例如玻璃或塑膠，且可具有無菌的出入口(例如，此容器可為一小瓶，其具有一可被皮下注射針穿透的塞子)。在一較佳的實施例中，此容器為一小瓶。一般，此容器應保持調配物之無菌及安定性。

【0134】 在特定的實施例中，此調配物係包裝在 7、10、1 或 20 mL 小瓶中，其係由透明、無色第 I 型玻璃所製作，並以塞子關閉(塗覆氟聚合物-溴丁基)以凸緣(聚乙烯)之彈壓蓋密封。

【0135】 在特定的實施例中，此調配物係二次包裝於一容器中，例如使小瓶避開光線之紙板盒。

【0136】 用於活體內給藥之調配物必須為無菌的。此項可藉由，例如經由無菌過濾膜過濾來進行。例如，本發明之液體調配物可使用 0.2 μm 或 0.22 μm 過濾器藉由過濾來殺菌。

E. 治療方法

【0137】 文中進一步係提供治療 IL-4 及/或 IL-13-媒介的疾病或病症之方法，該方法包括將本發明調配物投予一病患。在特定的實施例中，該 IL-4 及/或 IL-13-媒介的疾病為癌症、發炎、自體免疫疾病、感染、心血管疾病、呼吸疾病、神經疾病和代謝疾病。

【0138】 本發明之調配物可用於治療、抑制或預防疾病，例如過敏疾病、Th2-媒介的疾病、IL-13-媒介的疾病、IL-4-媒介的疾病及/或 IL-4/IL-13-媒介的疾病。此等疾病之實例包括何傑金氏症、氣喘、過敏性氣喘、異位

性皮膚炎、異位性過敏、潰瘍性結腸炎、硬皮症、過敏性鼻炎、COPD3 特發性肺纖維化、慢性移植排斥、博來黴素引發的肺纖維化、放射線引發的肺纖維化、肺肉芽腫、進行性全身性硬化症、血吸蟲病、肝纖維化、腎癌、勃奇氏淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、何傑金氏症、非何傑金氏症、塞扎里症候群(Sezary syndrome)、氣喘、敗血性關節炎、疱疹樣皮膚炎、慢性自體性蕁麻疹、潰瘍性結腸炎、硬皮症、肥厚性疤痕、惠普爾病(Whipple's Disease)、良性攝護腺肥大、其中涉及 IL-4 受體參與之肺病症、其中涉及 IL-4 受體-媒介的上皮障礙破壞之症狀、其中涉及 IL-4 受體之消化系統病症、對藥物之過敏性反應、川崎氏症、鐮刀型紅血球疾病、過敏性肉芽腫(Churg-Strauss syndrome)、葛瑞夫茲病(Grave's disease)、妊娠毒血症、修格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、自體免疫淋巴細胞增生症候群、自體免疫溶血性貧血、巴瑞特氏食道症(Barrett's esophagus)、自體免疫葡萄膜炎、結核病、囊狀纖維化、過敏性支氣管肺黴菌病、慢性阻塞性肺疾病、博來黴素引發的肺病變和纖維化、肺泡蛋白質沉積症、成人呼吸窘迫症候群、類肉瘤病、高 IgE 症候群、特發性嗜酸性粒細胞增多症、自身免疫性胞病、尋常型天皰瘡、大皰性類天皰瘡、重症肌無力、慢性疲勞症候群、腎病。.

【0139】 術語「過敏性疾病」係指一種病理症狀，其中病患係對一正常無致免疫性之物質高度敏感或增大對其之免疫反應。過敏疾病一般其特徵為肥大細胞被 IgE 活化，導致一發炎反應(例如，局部反應、全身性反應)，其可能導致良性如打噴嚏至威脅生命之過敏性休克和死亡。過敏性疾病之實例包括(但不限於)過敏性鼻炎(例如花粉熱)、氣喘(例如，過敏性氣喘)、過敏性皮膚炎(例如濕疹)、接觸性皮膚炎、食物過敏和蕁麻疹。

【0140】 術語「Th2-媒介的疾病」係指其中病變係(全部或部份)由免疫反應(Th2-型免疫反應)所產生之疾病，其中該免疫反應係由特徵為產生 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 之 CD4⁺ Th2 T 淋巴細胞所調節。Th2-型免疫反應係與特定細胞激素(例如，IL-4, IL-13)和特定種類的抗體(例如 IgE)之產生有關，且與體液免疫相關。Th2-媒介的疾病其特徵為出現升高量的 Th2 細胞激素(例如，IL-4, IL-13)及/或特定種類的抗體(例如 IgE)並包括，例如過敏性疾病(例如，過敏性鼻炎、異位性皮膚炎、氣喘(例如，異位性氣喘)、過敏性氣管疾病(AAD)、過敏性休克、結膜炎)，與升高量之 IL-4 及/或 IL-13 有

關的自體免疫病症(例如，類風濕性關節炎、宿主-抗-移植物疾病、腎疾病(例如，腎炎症候群、狼瘡腎炎))，及與升高量之 IL-4 及/或 IL-13 有關的感染(例如，病毒、寄生蟲、真菌(例如，白色念珠菌(*C. albicans*))感染)。特定癌症係與升高量之 IL-4 及/或 IL-13 有關或與 IL-4-引發及/或 IL-13-引發的癌細胞增生有關(例如，B 細胞淋巴瘤、T 細胞淋巴瘤、多發性骨髓瘤、頭和頸癌、乳癌和卵巢癌)。這些癌症可使用本發明調配物來治療、抑制或預防。

【0141】 術語「癌症」係指或描述哺乳動物，特別是人類的生理狀況，其典型地特徵為細胞生長失調。癌症的實例包括(但不限於)惡性腫瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤和白血病。

【0142】 術語「自體免疫疾病」係指由個體自身組織所產生或針對個體自身組織之非惡性疾病或病症。自體免疫疾病或病症之實例包括(但不限於)發炎反應，例如發炎性皮膚疾病，包括乾癬和皮膚炎；過敏性症狀例如濕疹和氣喘；其他涉及 T 細胞浸潤和慢性發炎反應之症狀；動脈硬化；糖尿病(例如，第 I 型糖尿病或胰島素依賴糖尿病)；多發性硬化症和中樞神經系統(CNS)發炎性病症。

【0143】 在特定的實施例中，本發明調配物係與一或多種治療(例如，非本發明調配物之治療，其目前正投予供預防、治療、管理及/或改善 IL-4 及/或 IL-13-媒介的疾病)組合投予。使用的術語「組合」並非限制其中治療投予患者之順序。第一治療可在投予第二治療之前(例如，1 分鐘，45 分鐘，30 分鐘，45 分鐘，1 小時，2 小時，4 小時，6 小時，12 小時，24 小時，48 小時，72 小時，96 小時，1 週，2 週，3 週，4 週，5 週，6 週，8 週，或 12 週)，同時或之後(例如，1 分鐘，45 分鐘，30 分鐘，45 分鐘，1 小時，2 小時，4 小時，6 小時，12 小時，24 小時，48 小時，72 小時，96 小時，1 週，2 週，3 週，4 週，5 週，6 週，8 週或 12 週)，投予一曾經患有、已患有或易罹患 IL-4 及/或 IL-13-媒介疾病之患者。任何另外的治療可以任何順序與其他另外的治療一起投予。可與本發明抗體組合投予之治療的非限定實例包括列於美國藥典(U.S. Pharmacopoeia)及/或醫師參考手冊(Physician's Desk Reference)中之核准的抗-發炎劑。

F.套組

【0144】 本發明之特定的實施例係包括一包含本發明調配物之套組。此套組可進一步包括一或多個容器，該容器係包括醫藥上可接受賦形劑，及包括其他商業和使用者的立場所希望的物質，其包括過濾器、針和注射器。與套組結合的可為包括在治療、預防或診斷產品之商業包裝中的習用說明書，其包含有關，例如適應症、使用、劑量、製造商、給藥、禁忌症及/或關於使用此治療、預防或診斷產品之警告的資訊。

【圖式簡單說明】

【0145】

圖 1 為顯示包括二條輕鏈和二條重鏈之示例雙特異性抗-IL-4/抗-IL-13 抗體分子的示意圖。此二條輕鏈係包括 N-VL_{hB-B13}-連接子-VL_{h8D4-8}-CL-C 基團，及此二條重鏈係包括 N-VH_{hB-B13}-連接子-VH_{h8D4-8}-CH1-CH2-CH3-C 基團。此連接子序列係包括(G4S)₂ 或 GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6)。

圖 2 係說明示例抗體的胺基酸序列，亦即 B-B13 抗-IL-13 抗體之人源化可變區(SEQ ID NOS: 1 和 2)和 8D4-8 抗-IL-4 抗體之人源化可變區(SEQ ID NOS: 3、4 和 5)。加底線係表示胺基酸已作改變。粗體係表示 CDR 序列。

圖 3 為一組顯示震盪應力後分析#P5 (pH-緩衝劑篩選)之粒子污染的照片。

圖 4 係顯示數種應力之後對#P6 分析(pH-緩衝劑篩選)之次-可視性粒子 >1.5μm 污染的圖形。

圖 5 係顯示數種應力之後分析#P6 (pH-緩衝劑篩選)之次-可視性粒子 >10μm 污染的圖形。

圖 6 係顯示熱應力之後分析#P6 (pH-緩衝劑篩選)之 HMW 圖形。

圖 7 係顯示在 45°C 2 週後分析#P5 (pH-緩衝劑篩選)之 SEC 層析圖。

圖 8 為在 45°C 2 週後分析#P5 (pH-緩衝劑篩選)之 SDS-PAGE 凝膠照片。

圖 9 為在 45°C 2 週後分析#P5 和 6 (pH-緩衝劑篩選)之 IEF 凝膠照片。

圖 10 為顯示應力程序後於分析#P13 上(鹽效應)之 HMW 量的圖式。

圖 11 係顯示機械應力後分析#P12 (界面活性劑)之雙目成像照片。

圖 12 為顯示在 5°C 儲存 6 週時分析#P12(界面活性劑)之 HMW 監測圖式。

圖 13 為顯示在 5°C 儲存 6 週時分析#P12(添加劑)之 HMW 監測圖式。

圖 14 為顯示在 5°C 儲存 4 週時分析#P20-FDS(添加劑)之 HMW 監測圖式。

圖 15 為顯示在 5°C 儲存 2 週時分析#P12 (添加劑)之 HMW 監測圖式。

圖 16 為比較前導調配物中 1%脯胺酸與 3%脯胺酸，單體含量倒數之時間函數的圖式。

圖 17 為調配物#P16-1 之冷凍乾燥程序期間追隨溫度之圖式。

圖 18 係顯示#P18-1 餅在 15 mL 模製玻璃小瓶中之照片。

圖 19 為顯示凍乾程序後分析#P14 (添加物)之 HMW 量的圖式。

圖 20 為顯示凍乾後分析#P20 (添加物)之 HMW 量的圖式。

圖 21 為顯示一冷凍/解凍週期後於非調配 DS(分析#9)上 HMW 量之圖式(a)和照片(b)。

圖 22 為顯示重建後分析#P14 (添加物)之 HMW 量的圖式。

圖 23 為顯示重建後分析#P20 (添加物)之 HMW 量的圖式。

圖 24 為顯示餅儲存和重建後分析#P17 (添加物)之 HMW 量的圖式。

圖 25 為顯示餅儲存和重建後分析#P20 (添加物)之 HMW 量的圖式。

圖 26 為顯示第一次篩選(分析#H04-150 至 172 – pH –緩衝劑篩選)之 DSC 結果的圖式。

圖 27 係顯示組胺酸和琥珀酸調配物之視覺外觀的照片(分析#P-H04-144 和 148，#H04-150 A1 至 A6)。

圖 28 為顯示於 5°C(分析#H04-150 B1)和 RT 時(分析#H04-163 A1、B1、B2 和 H04-172 A1、A2)以 SEC 對緩衝劑篩選之 HMW 演變。

圖 29 為磷酸/Tris 緩衝劑(分析#H04-187)上 pH 篩選之 DSC 結果的圖式。

圖 30 為以 SEC 於磷酸/Tris 緩衝劑(分析#H04-187)上對 pH 篩選之 HMW 演變的圖式。

圖 31 為顯示緩衝劑濃度篩選(分析#H04-185)之 DSC 結果的圖式。

圖 32 為於 RT 以 SEC 隨緩衝劑濃度之 HMW 演變的圖式(分析 #H04-185)。

圖 33 為顯示於 RT 以 SEC 對 NaCl 之 HMW 演變的圖式(分析 #H04-185)。

圖 34 為顯示於 RT 以 SEC 對甘胺酸與蔗糖之 HMW 演變的圖表(分析 #H04-185)。

【實施方式】

實例

【0146】 提供下列實例，用以幫助說明本發明。並不希望此等實例在任何方面限制本發明之範圍。一般而言，除非另有指出，否則本發明之施行係應用醫藥調配物之習用技術、化學、分子生物、重組 DNA 技術、免疫學例如抗體技術和多肽製備之標準技術，如，例如 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)；Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), volume 51, Ed.: Paul S., Humana Press (1996)；Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), Eds.: McCafferty J.等人, Humana Press (1996)；Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)；及 Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel 等人, John Wiley & Sons (1992)中所描述。

【0147】 用於實例 2-6 之縮寫為：

BD：	生物技術開發
BsAb：	雙特異性抗體
DLS：	動態光散射
DoE：	實驗設計
DP：	藥物產品
DS：	藥物基質
DSC：	示差掃描熱分析儀
FCM：	流式細胞顯微技術
FDS：	調配的藥物基質

FT-IR：	傅立葉轉換(Fourier Transformed) - 紅外線
HAP：	羥磷灰石層析
HDPE：	高密度聚乙烯
HMW：	高分子量
HPLC：	高效液相層析
IEF：	等電聚焦
IgG：	免疫球蛋白 G
IL：	介白素
kDa：	千道爾頓
LMW：	低分子量
Nd：	未測定
PEG：	聚乙二醇
PES：	聚醚砜
PS80：	聚山梨醇酯 80
PVDF：	聚偏氟乙烯
rpm：	每分鐘轉數
SC：	皮下
SDS-PAGE：	十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳
SEC：	粒徑篩析層析
SLS：	靜態光散射
Sq：	適量
TGA：	熱重分析
UF/DF：	超濾/滲濾
USP：	美國藥典
UV-Vis：	紫外線-可見
w/v：	重量/體積
WFI：	注射用水
XRPD：	X-光粉末繞射

【0148】 在下列實例中係使用人源化 IgG4 抗-IL-4/抗-IL-13 雙特異性抗體，其包括一包含 SEQ ID NO：2 和 4 之胺基酸序列、與 IL-13 和 IL-4

結合之重鏈可變區，及一包含 SEQ ID NO：1 和 3 之胺基酸序列、與 IL-13 和 IL-4 結合之輕鏈可變區(前導抗體)，用以測定最佳調配物條件。

【0149】 下列調配物研究(實例 2-6)之目的係了解前導抗體在溶液和在冷凍-乾燥狀態之行為(亦即，鑑定主要的降解路徑)和測定適合的緩衝劑-pH 系統及為約 100 mg/mL 之前導抗體提供良好安定性之添加劑，供進一步的調配物開發。

【0150】 下列係顯示用於實例 2-6 中之藥物基質：

【0151】 前導抗體後 HAP 純化步驟(下游處理之最後步驟)：

批件#RSN0169(研究#P5 至 P6)

調配物緩衝劑：磷酸鈉緩衝液 75 mM, pH 6.7

濃度：10.4 mg/mL；

批件 #RSN0169-SZW 320、326 和 327(研究#P7 至 P13)

調配物緩衝劑：磷酸鈉緩衝液 59 mM, pH 6.9

濃度：4.5 mg/mL；

批件#RSN0169-SZW 330 (研究#P14)

調配物緩衝劑：磷酸鈉緩衝液 55 mM, NaCl 20 mM, pH 6.8

濃度：4.4 mg/mL；及

批件# RSN0152 (研究#P15 至 P21)

調配物緩衝劑：磷酸鈉緩衝液 55 mM, NaCl 20 mM, pH 6.8

濃度：3.9 mg/mL。

【0152】 就各調配物之方析，係於水中 UF/DF 終了或最終緩衝時，調整前導抗體濃度及然後進一步以適量的濃縮緩衝劑和添加劑溶液稀釋至所欲的最終調配物(詳情請參見表 1)。

表 1 -調配物調整之詳情

分析#	最初濃度 ⁰	最初緩衝劑 ⁰	最終濃度 ⁰
P5-7	2 mg/mL	水	1 mg/mL
P12	95 mg/mL	水	85 mg/mL
P13	112 mg/mL	水	100 mg/mL
P14-16	27 mg/mL	水	20 mg/mL
P15	125 mg/mL	水	100 mg/mL

分析#	最初濃度 ⁰	最初緩衝劑 ⁰	最終濃度 ⁰
17	46 mg/mL	水	38 mg/mL
P18	46 mg/mL	磷酸鹽 Tris 3.5 mM	38 mg/mL
P20	42 mg/mL	磷酸鹽 Tris 3.5 mM	35 mg/mL
P21	42 mg/mL	磷酸鹽 Tris 3.5 mM	35 mg/mL

a UF/DF 和調整後之濃度和緩衝液

b 以濃緩衝劑和添加物溶液稀釋後之濃度

【0153】 將各調配物於層流下無菌過濾(Millex® GV, Millipore, 0.22 µm, PVDF)並在適當的各安定性時間點將溶離份分散於 1 型玻璃小瓶中，但是冷凍/解凍研究係使聚乙烯管。

【0154】 就實例 2-6 中的調配物測定機械應力和熱應力條件。

【0155】 為了評估震盪應力對調配物分析#P5-7 之影響，係將小瓶於室溫使用 Test 74401 以 350 rpm 震盪 2 至 15 h，及然後分析。

【0156】 為了評估灌注應力對調配物分析#P12、13、16-18 和 20 之影響，當可取得小量樣本時係以 HPLC 注射器(Unimetrics Corporation 100 µL)，及當可取得較大量的樣本，係以 Terumo 26G x ½ - 0.45x12 mm 注射器評估灌注性能之潛在影響(亦即，針內的剪應力)。

【0157】 為了評估熱應力對調配物分析#P5-7 和 13 之影響，係將小瓶存放在 45°C 歷時 1 和 2 週，及然後分析。以 DSC 測定升高溫度之熱應力。亦將分析#P5-7 和 13 存放於 5°C 歷時 2 週，及然後分析。

【0158】 為了評估熱應力對調配物分析#P12、15 和 21 之影響，係將小瓶存放在 5°C 歷時 3 至 6 週，並每週分析。將凍乾之前的溶液，稱為調配藥基質(FDS)，就分析#P16-18 和 20 係存放於 5°C 歷時 4 至 5 週並每週分析。就分析#P14、16-18 和 20 凍乾後之重建的溶液，係存放於 5°C 歷時 24 h 及然後分析。

實例 1 – PH 最適化

【0159】 在此調配物開發之第 1 步驟係測定前導抗體調配物之最佳 pH。為了測定最佳 pH，係使用低濃度的前導抗體(1 mg/ml，對照 100 mg/ml)，

因為此低濃度的前導抗體係足以測定此最佳 pH。表 2 係顯示此研究中所試驗的調配物。

表 2 - 分析#P5- pH 篩選

調配物#P5-x	緩衝系統	pH	濃度
1	檸檬酸鹽 100 mM	4.5	1 mg/ml
2	檸檬酸鹽 100 mM	5.0	1 mg/ml
3	檸檬酸鹽 100 mM	5.5	1 mg/ml
4	檸檬酸鹽 100 mM	6.0	1 mg/ml
5	磷酸鹽 100 mM	6.5	1 mg/ml
6	磷酸鹽 100 mM	7.0	1 mg/ml
7	磷酸鹽 100 mM	7.5	1 mg/ml
8	Tris 100 mM	8.0	1 mg/ml
9	Tris 100 mM	8.5	1 mg/ml

【0160】 在此研究中，調配物不穩定，因為其導致前導抗體之構形上不安定性。特言之，前導抗體傾向未摺疊。又，調配物 9 產生了去醯胺化。因此，經測定前導抗體調配物之最佳 pH 應在約 pH 7.0 之狹隘的範圍內。

【0161】 其他調配物參數，例如緩衝劑、界面活性劑和安定劑之後續研究，係包括較高濃度的前導抗體。當使用較高濃度的前導抗體時，這些後續的研究確認了上述有關前導抗體調配物之最佳 pH 的結論。

實例 2 – 緩衝系統/離子強度(鹽)
緩衝劑

【0162】 調配物開發程序之下個步驟係測定前導抗體調配物之最佳緩衝劑。以數個不同的分析試驗數種不同的緩衝劑，例如組胺酸、磷酸鹽、Tris 及其組合物。

表 3 - 分析#P6- 1 mg/ml 之緩衝系統篩選

調配物#P6-x	緩衝系統	pH	濃度
1	組胺酸 10 mM	6.5	1 mg/ml
2	磷酸鹽 10 mM	6.5	1 mg/ml
3	磷酸鹽 10 mM	7.0	1 mg/ml



調配物#P6-x	緩衝系統	pH	濃度
4	磷酸鹽 10 mM	7.5	1 mg/ml
5	Tris 10 mM	7.0	1 mg/ml
6	Tris 10 mM	7.5	1 mg/ml
7	磷酸鹽 60 mM	7.0	1 mg/ml

表 4 - 分析#P7-1 mg/ml 之鹽篩選

調配物#P7-x	緩衝系統	pH	濃度	添加劑
1	磷酸鹽 10 mM	7.0	1 mg/ml	NaCl 70 mM
2	磷酸鹽 10 mM	7.0	1 mg/ml	NaCl 140 mM
3	Tris 10 mM	7.0	1 mg/ml	NaCl 70 mM
4	Tris 10 mM	7.0	1 mg/ml	NaCl 140 mM

表 5 - 分析#P13- 100 mg/ml 之緩衝劑/鹽篩選

調配物#P13-x	緩衝系統	pH	濃度	添加劑
1	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	-
2	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	NaCl 70 mM
3	Tris 10 mM	7.0	100 mg/ml	-
4	Tris 10 mM	7.0	100 mg/ml	NaCl 70 mM

表 6 - 緩衝劑系統配方

緩衝劑系統(酸/鹼)	pH	酸濃度	鹼濃度
檸檬酸/NaOH	4.5	100 mM	Sq pH 5.0
檸檬酸/NaOH	5.0	100 mM	Sq pH 5.0
檸檬酸/NaOH	5.5	100 mM	Sq pH 5.5
檸檬酸/NaOH	6.0	100 mM	Sq pH 6.0
磷酸二氫鈉/NaOH	6.5	100 mM	Sq pH 6.5
磷酸二氫鈉/NaOH	6.5	10 mM	Sq pH 6.5
磷酸二氫鈉/NaOH	7.0	100 mM	Sq pH 7.0
磷酸二氫鈉/NaOH	7.0	60 mM	Sq pH 7.0
磷酸二氫鈉/NaOH	7.0	10 mM	Sq pH 7.0

緩衝劑系統(酸/鹼)	pH	酸濃度	鹼濃度
磷酸二氫鈉/NaOH	7.5	100 mM	Sq pH 7.5
磷酸二氫鈉/NaOH	7.5	10 mM	Sq pH 7.5
磷酸/Tris 胺甲烷	8.0	Sq pH 8.0	100 mM
磷酸/Tris 胺甲烷	8.5	Sq pH 8.5	100 mM
磷酸/Tris 胺甲烷	7.0	Sq pH 7.0	10 mM
磷酸/Tris 胺甲烷	7.5	Sq pH 7.5	10 mM
HCl /L-組胺酸	6.5	Sq pH 6.5	10 mM
磷酸二氫鈉/Tris 胺甲烷	7.0	6.3 mM	3.7 mM
磷酸二氫鈉/Tris 胺甲烷	7.0	2.22 mM	1,28 mM

【0163】 因處理和調配物調合，過濾的調配物分析和對照組無可視性和次可視性粒子，及由於起始的 DS 含有 5.5% 的 HMW，SEC 分析顯示純度 $\leq 92.0\%$ 。

【0164】 由 DSC 得到的開始和變性溫度顯示下列緩衝劑-pH 系統有較佳的熱安定性：

- 磷酸鹽 pH 6.5 和 7.0：#P5-5、P5-6、6-2、P6-3
- Tris pH 7.0 和 7.5：#P6-5、P6-6

例如，相較於 pH 4.5 之 48°C，及組胺酸緩衝劑之 59°C，其開始的溫度為約 61°C。

【0165】 由 SLS 所得到的膠體安定性顯示下列緩衝劑-pH 系統有較佳的安定性：

- 磷酸鹽 pH 7.5：#P6-4
- Tris pH 7.0 和 7.5：#P6-5、P6-6

例如，相較於組胺酸緩衝劑之 0.4×10^{-4} mL.mol/g² 和磷酸鹽 pH 7.0 緩衝劑之 1.5×10^{-4} mL.mol/g²，其第二均功係數係接近 3.0×10^{-4} mL.mol/g²。

【0166】 在震盪應力 1 小時 30 分鐘後，觀察到不同程度的粒子汙染(參見圖 3)。

【0167】 有關可視性粒子，就分析#P5，顯示良好安定性之候選緩衝劑-pH 系統係如下：

- 磷酸鹽 pH 6.5, 7.0 和 7.5 : #P5-5, P5-6 和 P5-7
- Tris pH 8.0 和 8.5 : #P5-8 和 P5-9

【0168】 就這二個緩衝系統以介於 6.5 至 7.5 之 pH 進行分析#6。顯現最佳安定性之候選物係如下：

- 磷酸鹽 pH 7.0 和 7.5 : #P6-3 和 P6-4
- Tris pH 7.0 和 7.5 : #P6-5 和 P6-6

【0169】 鹼性 pH 對於降低粒子形成似乎為較佳。

【0170】 震盪應力和熱應力(於 45°C 2 週)為用於區別有關次-可視性粒子之緩衝-pH 系統的相關方法。

【0171】 提供良好安定性之候選緩衝劑-pH 系統有：

分析#5：調配物#P5-6 至 P5-9，亦即 pH ≥ 7.0

分析#6 (參見圖 4 和圖 5)：

-磷酸鹽 7.5 : # P6-4

-Tris 7.5 : # P6-6

接著：

-磷酸鹽 pH 7.0 : #P6-3

-Tris pH 7.0 : #P6-5

【0172】 注意，對所有的應力條件，組胺酸緩衝劑(#P6-1)顯示，重大的不穩定效應。

【0173】 HIAC 測量確認此目測檢驗：鹼性 pH 對於降低粒子形成為較佳的。再者，在相同的 pH，磷酸鹽-為基底的調配物比 Tris 緩衝系統提供略少的次-可視性粒子。

【0174】 有關分析#5 和 6，對於 HMW 和 LMW 二者，熱應力顯示有趣的結果。注意，調配物#P5-1 (pH 4.5)在 45°C 1 週後完全降解；及調配物#P5-2 在 45°C 2 週後亦同樣完全降解。將這二個樣本從下列分析中移出。

【0175】 有關 HMW，在 45°C 2 週後之結果，就調配物#P5-6 至 P5-9 (pH ≥ 7.0)為相類似，而#P5-5 至 P5-3 為較佳，因 pH 從 6.5 降至 5.5。就分析#6，確認此趨勢及提供良好安定性之候選緩衝劑-pH 系統有(參見圖 6)：

磷酸鹽 pH 6.5 : #P6-2

Tris pH 7.0：#P6-5

組胺酸 pH 6.5：#P6-1

【0176】 因此，pH 6.5 對降低 HMW 形成比 pH 7.0 提供較佳的安定性，其本身比 pH 7.5 更好。再者，在相同的 pH (7.0 和 7.5)，Tris-為基底的調配物比磷酸鹽緩衝-系統提供略低的 HMW。

【0177】 有關 LMW，調配物#P5-3 至 P5-5 ($\text{pH} \leq 6.5$)在 45°C 2 週後顯現良好的安定性。就調配物#P5-6 至 P5-9 ($7.0 \leq \text{pH} \leq 8.5$)，形成實質的 LMW 及在 SDS-PAGE 凝膠上產生額外色帶。調配物#P5-9 (Tris pH 8.5)之 LMW 降解更明顯(參見圖 7)及#P5-7(磷酸鹽 pH 7.5)之 SDS-PAGE 凝膠上的額外色帶為顯見的(參見圖 8)。注意，就磷酸鹽和 Tris 緩衝系統之降解產物似乎不相同。

【0178】 分析#6 確認了這些結論並顯示，對於相同的 pH，磷酸鹽-為基底的調配物比-Tris 緩衝系統提供略高的 LMW。

【0179】 有關 HMW 和 LMW，酸性 pH 似乎比鹼性 pH 展現較佳的安定性，其中 Tris 略優於磷酸鹽緩衝系統。

【0180】 由 IEF 證明，熱應力在 45°C 歷時 4 週對前導抗體之力值化學降解為一重大意義(亦即酸模式改變)，並因此選擇提供前導抗體良好安定性之緩衝-pH 系統(參見圖 9)。最低安定性調配物為 Tris pH 8.5 (#P5-9)和磷酸鹽 pH 7.5 (#P6-4)，為同型模式，二者出現 2 種額外的酸形式及主要的形式變成次要的。顯現良好安定性之候選的緩衝-pH 系統為 Tris pH 7.0 (#P6-5)。

【0181】 總之，以最初的狀態分析和分析#P5 和 6(1 mg/mL 溶液)之應力程序結果為基礎，pH 已設定在 7.0。此選擇為有關可視性和次可式性粒子(鹼性 pH)之良好安定性及有關 HMW 和 LMW (酸 pH)之安定性間的折衷。有關緩衝系統，磷酸鹽和 Tris 二者對於所選的 pH 顯現優勢：就可視性和次可式性粒子而言為磷酸鹽，就 HMW 和 LMW 而言為 Tris。

【0182】 注意，對於第一添加劑評估，係使用緩衝系統磷酸鹽 10 mM 或 Tris 10 mM：

- 在 100 mg/mL 前導抗體溶液上確認上述結果，
- 及於二個緩衝系統上分開試驗冷凍-乾燥過程。

【0183】 確認上述結果且二個緩衝系統(#P14-3 和 P14-8)在冷凍乾燥過程期間顯現良好的結果(參見圖 19)。

【0184】 於 pH 7.0，磷酸鹽比 Tris 具有較強的緩衝能力；然而，與 Tris 不同，其鹼在冷凍步驟期間具有沉澱的傾向。結合 Tris 和磷酸鹽二者之優點，選擇這二種緩衝系統的混合物：磷酸鹽 6.3 mM 和 Tris 3.7 mM。即便使用 Tris 緩衝劑或磷酸鹽緩衝劑已為本項技術所知(各自分開使用)，但結合 Tris 緩衝劑和磷酸鹽緩衝劑於一緩衝系統中為非比尋常且不為本項技術所知。

導電率(pH 和緩衝劑選擇)

【0185】 在凍乾之前，溶液具有約 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 之導電率，其在重建後就 DP 得到 850 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 之理論的導電率。

【0186】 吾等首次嘗試常用於 mAb 之緩衝劑：組胺酸，以其在 pH 6.2 和 6.6 之緩衝區及 10 mM 之濃度。在 pH 6.2，在室溫遭遇到前導抗體沉澱之不溶解的問題(參見圖 29)。在 pH 6.6，溶液在室溫略為乳白色，第二均功係數為低的 $0.4 \times 10^{-4} \text{ mL}\cdot\text{mol}/\text{g}^2$ 。與大部份的 mAb 不同，組胺酸並非前導抗體之良好的緩衝劑。

【0187】 然後，吾等嘗試另一種常用的緩衝劑：磷酸鹽，以其在 pH 6.5、7.0 和 6.5 之緩衝區及 10 mM 之濃度。就 pH 6.5 和 7.0，第二均功係數係低於 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mL}\cdot\text{mol}/\text{g}^2$ ，其係代表膠體安定性低。就 pH 7.5，第二均功係數接近 $3.0 \times 10^{-4} \text{ mL}\cdot\text{mol}/\text{g}^2$ ，其係代表良好的膠體安定性，然而熱應力(在 45°C 2 週)顯示純度降低(HMW 和 LMW 增加)比 pH 6.5 和 7.0 更明顯。磷酸鹽為一良好的緩衝劑，然而在酸性 pH 時膠體穩定性低，而在鹼性 pH 時前導抗體對熱應力具敏感性。

【0188】 為了擴大緩衝劑篩選，係將 Tris 以其在 pH 7.0 和 7.5 之緩衝區及 10 mM 之濃度作測試。二個 pH 皆顯現良好的膠體穩定性，其中第二均功係數接近 $3.0 \times 10^{-4} \text{ mL}\cdot\text{mol}/\text{g}^2$ 。熱應力(在 45°C 2 週)顯示純度降低(HMW 和 LMW 增加) pH 7.5 比 pH 7.0 更明顯。Tris 在 pH 7.0 時比相同 pH 的磷酸鹽，就 HMW 而言提供更佳的安定性及就 LMW 而言略佳的安定性。Tris pH 7.0 為比 Tris pH 7.5 和磷酸鹽 pH 7.0 更優良的緩衝系統。雖然，為

了得到 Tris 於此 pH ($pK_a = 8.1$)時良好的緩衝能力，所需之量應比用於商業化產品中的最大量更多。

【0189】 為了將用於前導抗體之緩衝劑最適化，係選擇磷酸鹽 6.5mM/Tris 3.7mM 之組合物，以便在 pH 7.0 由於磷酸鹽($pK_a = 7.2$)而得到良好的緩衝能力，及由於 Tris 而得到良好安定性之前導抗體。

【0190】 如上所述，即便使用 Tris 緩衝劑或磷酸鹽緩衝劑已為本項技術所知(各自分開使用)，但結合 Tris 緩衝劑和磷酸鹽緩衝劑於一緩衝系統中為非比尋常且不為本項技術所知。

離子強度/鹽濃度

【0191】 以二種濃度 70 mM 之選擇的候選緩衝劑-pH 對 100 mg/mL 前導抗體溶液測試氯化鈉(NaCl)。

【0192】 由 DSC 所得到的開始和變性溫度以及由 SLS 所得到的膠體安定性並未顯示 NaCl 對溶液的安定性有任何實質效應。

【0193】 在調配物分析#P13 之機械應力及相同的調配物於 5°C 儲存 2 週後，候選物#P13-1 和 P13-3，亦即無 NaCl，對 HMW 形成顯示較佳的安定性(參見圖 10)。相同 c/c 於圖 33 中。

【0194】 鹽濃度增加使得離子強度增加，其造成前導抗體之聚集動能增加。因此，決定此調配物不應含有鹽或滲透劑。此外，決定最佳的調配物應包括低濃度的緩衝劑以便具有低的離子強度。

實例 3 – 界面活性劑

【0195】 在調配物開發程序的下一步係決定用於前導抗體調配物之最佳賦形劑。賦形劑必須足以安定此前導抗體，且與凍乾作用相容。試驗數種不同的界面活性劑，例如各種濃度的聚山梨醇酯和泊洛沙姆(poloxamers)。

表 7-85 mg/ml 之分析#P12-添加劑篩選

調配物 #P12-x	緩衝系統	pH	濃度	添加劑 1	添加劑 2
1	磷酸鹽 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	甘胺酸 1% (w/v) (130 mM)
3	磷酸鹽 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)
4	磷酸鹽 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	海藻糖 5% (w/v)
5	磷酸鹽 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	-
6	磷酸鹽 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS80 0.1% (w/v)	-
7	磷酸鹽 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS20 0.01% (w/v)	-
8	磷酸鹽 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS20 0.1% (w/v)	-
9	磷酸鹽 10 mM	7.0	85 mg/ml	泊洛沙姆 0.05% (w/v)	-
10	磷酸鹽 10 mM	7.0	85 mg/ml	泊洛沙姆 0.1% (w/v)	-
11	磷酸鹽 10 mM	7.0	85 mg/ml	-	-

表 8 - 100 mg/ml 之分析#P23-添加劑篩選

調配物#P23-x	緩衝系統	pH	濃度	添加劑
1	Tris /磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.1% (w/v)
2	Tris /磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.2% (w/v)
3	Tris /磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.3% (w/v)

【0196】 就在 0.22 μm 過濾後，調配物分析和對照組無可視性和次-可視性粒子。由於前導抗體之濃度從 4.5 mg/mL 至 100 mg/mL(起始 DS 含有 3.0% HMW)，SEC 分析顯示純度 $\leq$ 92.0%。

【0197】 機械應力為區別候選調配物間之相關方法。由於可取得的起始物之量有限，標準目測觀察並不可能，且因此係使用於放大鏡下毛細管中之觀察。有關可視性/次可視性粒子，就分析#12 顯現良好安定性之候選物係如下(參見圖 11)：

PS80 0.1 %：#P12-6

PS20 0.1 %：#P12-8

【0198】 在所測試的界面活性劑中，相較於無界面活性劑之調配物，對於 HMW 形成皆無任何影響，但#P12-8 (PS20 0.1 %)除外，其在 5°C 儲存 6 週期間具有些微負面效應(參見圖 12)。

【0199】 總之，界面活性劑間並無強烈的不同。選擇下列界面活性劑：PS80，用以防止可視性/次可視性粒子形成。

【0200】 接著，於前導抗體調配物中測試各種濃度的 PS80 (參見表 23)。將 0.05-0.2%之 PS80 濃度就震盪應力以 350 rpm (室溫)測試 15 小時。然後以流式細胞顯微技術分析樣本，且結果係如表 9 中所示。表 9 係顯示介於 0.05 至 0.2%之 PS80 濃度，就所有的濃度對於震盪應力具有同等的安定效應。因此，0.05 至 0.2%之 PS80 濃度可用於調配物中。

表 9 – PS80 濃度

15h 以 350 rpm 於室溫

	$\geq 2 \mu\text{m}$ $\geq 10 \mu\text{m}$ $\geq 25 \mu\text{m}$		
F2 (0.05%PS80)	2589	148	21
F3 (0.07%PS80)	975	32	2
F4 (0.1%PS80)	698	58	3
F5 (0.2%PS80)	1969	98	16

FCM：每毫升粒子數目

實例 4 – 蔗糖

【0201】 如上所述，在調配物開發程序的下一步係決定用於前導抗體調配物之最佳賦形劑。此賦形劑必須足以安定此前導抗體，且與凍乾作用相容。試驗數種不同的糖，例如各種濃度的蔗糖、海藻糖和甘露醇。

表 10 - 分析#P14-凍乾物之添加劑篩選

調配物 #P14-x	緩衝 系統	pH	強度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3
1	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	-	-
2	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 10% (w/v)	-
3	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)
4	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	NaCl 70 mM	甘露醇 3% (w/v)
5	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	NaCl 70 mM	甘露醇 3% (w/v)
6	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	Glycine 1% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)
7	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/小瓶	PS80 0.3% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)
8	Tris 10 mM	7.0	100 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)

表 11 - 分析#P15-添加劑篩選 100 mg/ml - DoE

調配物 #P15-x	緩衝 系統	pH	濃度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3	添加劑 4
1	磷酸 鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	蔗糖 10% (w/v)	-	脯胺酸 5.8% (w/v)

調配物 #P15-x	緩衝 系統	pH	濃度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3	添加劑 4
2	磷酸 鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)	-	脯胺酸 5.8% (w/v)
3	磷酸 鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	海藻糖 10% (w/v)	-	-
4	磷酸 鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	-	乙醇 2% (w/v)	麩胺酸 7.3% (w/v)
5	磷酸 鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	-	PEG 400 1% (w/v)	天門冬胺 酸 8.7% (w/v)
6	磷酸 鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	海藻糖 10% (w/v)	-	天門冬胺 酸 8.7% (w/v)
7	磷酸 鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	蔗糖 10% (w/v)	甘油 5% (w/v)	甘胺酸 1.9 % (w/v)
8	磷酸 鹽 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)	PEG 400 1% (w/v)	-
9	Tris 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	海藻糖 10% (w/v)	PEG 400 1% (w/v)	脯胺酸 5.8% (w/v)
10	Tris 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)	-	天門冬胺 酸 8.7% (w/v)
11	Tris 10 mM		100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	蔗糖 10% (w/v)	乙醇 2% (w/v)	-



調配物 #P15-x	緩衝 系統	pH	濃度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3	添加劑 4
12	Tris 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	-	甘油 5% (w/v)	-
13	Tris 10 mM		100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	海藻糖 10% (w/v)	甘油 5% (w/v)	麩胺酸 7.3% (w/v)
14	Tris 10 mM		100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	-	-	甘胺酸 1.9 % (w/v)
15	Tris 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	蔗糖 10% (w/v)	-	麩胺酸 7.3% (w/v)
16	Tris 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)	乙醇 2% (w/v)	甘胺酸 1.9 % (w/v)

表 12 - 分析#P16-凍乾物之添加劑篩選及程序開發

調配物 #P16-x	緩衝系 統	pH	強度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3	添加劑 4
1	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/小 瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)	-
2	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/小 瓶	PS80 0.1% (w/v)	海藻糖 5% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)	-
3	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/小 瓶	PS80 0.05% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)	-

調配物 #P16-x	緩衝系 統	pH	強度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3	添加劑 4
4	磷酸鹽 10 mM	7.0	100 mg/小 瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)	PEG 4000 1% (w/v)

表 13 - 38 mg/mL 之分析#P17-FDS-添加劑篩選

調配物 #P17-x-FDS	緩衝系統	pH	濃度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3
1	Tris/磷酸 鹽 3.3 mM	7.0	38 mg/mL	PS80 0.033% (w/v)	蔗糖 3.33% (w/v)	-
2	Tris/磷酸 鹽 3.3 mM	7.0	38 mg/mL	PS80 0.033% (w/v)	蔗糖 1.67% (w/v)	甘露醇 1% (w/v)
3	Tris /磷酸 鹽 3.3 mM	7.0	38 mg/mL	PS80 0.033% (w/v)	-	甘胺酸 0.37% (w/v)

表 14 - 分析#P17-凍乾物之添加劑篩選及程序開發

調配物 #P17-x	緩衝系統	pH	強度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3
1	Tris/磷酸鹽 10 mM	7.0	190 mg/小 瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 10% (w/v)	-
2	Tris/磷酸鹽 10 mM	7.0	190 mg/小 瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)
3	Tris/磷酸鹽 10 mM	7.0	190 mg/小 瓶	PS80 0.1% (w/v)	-	甘胺酸 2.2% (w/v)



調配物	緩衝系統	pH	強度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3
#P17-x						

【0202】 總之，基於上述研究，選擇蔗糖作為賦形劑，因為其使前導抗體安定。此外，眾所周知的，蔗糖為一種凍乾物保護劑，所以其將可改善凍乾的調配物。事實上，無蔗糖的凍乾作用造成 HMW 增加(參見圖 19)。另外，發現 5%蔗糖對調配物為最佳的。

實例 5 –安定劑

【0203】 如上所述，在調配物開發程序的下一步係決定用於前導抗體調配物之最佳賦形劑。賦形劑必須足以安定此前導抗體，且與凍乾作用相容。試驗數種不同的安定劑，例如各種濃度的甘露醇、天門冬胺酸、脯胺酸、甘胺酸、精胺酸和白胺酸。就此可參見下列和上文表 10-14。

表 15 - 分析#P18-凍乾物之添加劑篩選及程序開發

調配物	緩衝系統	pH	強度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3
#P18-x						
1	Tris/磷酸鹽 10 mM	7.0	175 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)
2	Tris /磷酸鹽 10 mM	7.0	175 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	天門冬胺 酸 4.3% (w/v)
3	Tris /磷酸鹽 10 mM	7.0	175 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	脯胺酸 5.8% (w/v)

表 16 -分析#P20-FDS -35 mg/mL 之添加劑篩選

調配物 #P20-x-FDS	緩衝系統	pH	濃度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3
1	Tris/磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/mL	PS80 0.07% (w/v)	蔗糖 1.75% (w/v)	甘露醇 1.05% (w/v)
2	Tris /磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/mL	PS80 0.07% (w/v)	蔗糖 1.75% (w/v)	天門冬胺 酸 1.05% (w/v)
3	Tris/磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/mL	PS80 0.07% (w/v)	蔗糖 1.75% (w/v)	脯胺酸 1.05% (w/v)
4	Tris/磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/mL	PS80 0.07% (w/v)	蔗糖 1.75% (w/v)	甘胺酸 1.05% (w/v)
5	Tris/磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/mL	PS80 0.07% (w/v)	蔗糖 1.75% (w/v)	精胺酸 1.05% (w/v)

表 17 - 分析#P20-凍乾物之添加劑篩選及程序開發

調配物 #P20-x	緩衝系統	pH	強度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3
1	Tris/磷酸鹽 10 mM	7.0	175 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)
2	Tris/磷酸鹽 10 mM	7.0	175 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	天門冬 胺酸 3% (w/v)
3	Tris/磷酸鹽 10 mM	7.0	175 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	脯胺酸 3% (w/v)



調配物 #P20-x	緩衝系統	pH	強度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3
4	Tris/磷酸鹽 10 mM	7.0	175 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	甘胺酸 3% (w/v)
5	Tris/磷酸鹽 10 mM	7.0	175 mg/ 小瓶	PS80 0.1% (w/v)	蔗糖 5% (w/v)	精胺酸 3% (w/v)

表 18 -分析#P21- 35 mg/ml 之添加劑篩選

調配物 #P21-x	緩衝系統	pH	濃度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3
1	Tris/磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	蔗糖 1% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)
2	Tris/磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	蔗糖 1% (w/v)	磺丁基醚-β-環糊精 3% (w/v)
3	Tris /磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	蔗糖 1% (w/v)	N-乙醯基-半胱胺酸 3% (w/v)
4	Tris/磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	蔗糖 1% (w/v)	白胺酸 0.3% (w/v)
5	Tris/磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	蔗糖 1% (w/v)	L-離胺酸單鹽酸鹽 3% (w/v)
6	Tris /磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	蔗糖 1% (w/v)	N-乙醯基-半胱胺酸 0.03% (w/v)

調配物	緩衝系統	pH	濃度	添加劑 1	添加劑 2	添加劑 3
#P21-x						
70	Tris/磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	蔗糖 1% (w/v)	甘露醇 3% (w/v)
8	Tris/磷酸鹽 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	-	-

0 等同#P21-1 調配物，但當於 5°C 儲存時因為氮氣此樣本為惰性的

【0204】 這些篩選的目的為就有關 HMW 形成，發現進一步安定前導抗體之添加劑(分析#12、15、20-FDS 和 21)。由於前導抗體對聚集作用的高敏感性，發現期望的長期儲存溫度(亦即 5°C)係與監測添加劑之效應有關。

【0205】 進行一實驗設計(DoE)-篩選模型，一階、D-最適矩陣，用以篩選不同的糖、多醇、胺基酸和溶劑對 HMW 形成之效應(分析#15)。此 DoE 之結果係彙整於表 19 中。

表 19 -分析#15 (DoE)有關添加劑篩選之結果

參數	HMW	DSC	結論
糖和多醇	甘露醇有輕微穩定作用	蔗糖和海藻糖有輕微穩定作用	糖和多醇有輕微正面效應
胺基酸	天門冬胺酸有強烈穩定作用及，甘胺酸、脯胺酸和麩析胺酸有輕微穩定作用	天門冬胺酸有強烈穩定作用及，甘胺酸和脯胺酸有輕微穩定作用	天門冬胺酸、甘胺酸和脯胺酸有正面效應
溶劑	乙醇有強烈的不穩定	乙醇有強烈的不穩定	無或有溶劑之不穩定效應
緩衝系統	無效應	ND	緩衝系統間無差異



【0206】 發現對 HMW 具有效應之添加劑係分開於分析#12 和 20-FDS 中測試：

- 發現胺基酸甘胺酸(#P12-1 和 P20-4-FDS)和脯胺酸(#P20-3-FDS)對於最小化 HMW 形成，具有最佳效應(參見圖 13 和圖 14)，
- 甘露醇(#P20-1-FDS)為其次(參見圖 14)，
- 接著蔗糖(#P12-3)和海藻糖(#P12-4)，其效用低很多(參見圖 13)，
- 最後，在 4%濃度時，並未確認天門冬胺酸 8%之正面效應(#P20-2-FDS)(參見圖 14)。

在分析#21 期間測試了數個其他的添加劑：

- 發現離胺酸(#P21-5)對 HMW 形成具有輕微的正面效應(參見圖 15)，
- 發現甘露醇(#P21-1)在此分析中為最佳的。

【0207】 已發現，添加脯胺酸至調配物中有二種效應：其藉由降低液體調配物中之聚集速率，控制 HMW 形成，及其係作為一膨脹劑使餅塊在凍乾調配物中更細緻。亦發現，添加甘露醇至凍乾調配物使此餅塊變得細緻。

【0208】 接著於前導抗體調配物中測試各種濃度的脯胺酸(參見表 23)。測試 1%和 3%濃度。以 UPLC 分析樣本，及結果係如表 20 和 21，及圖 16 中所示。表 20 和 21 係顯示調配物中可使用濃度 1 或 3%之脯胺酸。這些數據亦確定脯胺酸對 HMW 動能之正面效應。再者，帶有 3%脯胺酸之凍乾餅塊略微細緻(較少回縮)，其確認了脯胺酸作為安定物之角色(結果未顯示)。

表 20 – 1%脯胺酸

F1 (1%脯胺酸)				
安定性 n° 2				
時間(h)	單體% (M)	1/M	1/M - 1/M0	%HMW
0	95.0	0.01053		4.2
3.5	92.6	0.01080	0.00027	6.6
7	90.6	0.01104	0.00051	8.7
24	82.0	0.01220	0.00167	17.4

表 21 – 3% 脯胺酸

F5 (3%脯胺酸)				
安定性 n° 2				
時間(h)	單體% (M)	1/M	1/M - 1/M0	%HMW
0	95.3	0.01049		3.8
3.5	93.2	0.01073	0.00024	6
7	91.6	0.01092	0.00042	7.8
24	84.1	0.01189	0.00140	15.1

【0209】 總之，雖然藉由添加賦形劑，亦即甘露醇和胺基酸，例如甘胺酸和脯胺酸，明顯地降低 HMW 形成，但在 100 mg/mL 之前導抗體濃度時有利的效應並不夠強到足以達到滿意的保存期限。因此，開發一凍乾調配物以及凍乾程序。

實例 6 – 凍乾調配物

【0210】 就冷凍/乾燥程序，係將 5 至 5.5 mL 所欲的 FDS 原型(範圍 20-38 mg/mL 之前導抗體濃度)分散於 15 mL 小瓶(參見實例表 13 和表 14)。

【0211】 於分散在 15 mL 小瓶接近 5 至 5.5 mL 最終調配物之 20 至 38 mg/mL 預濃縮的溶液上，進行冷凍/乾燥程序。

【0212】 使用來自 Usifroid 之三種不同類型的凍乾系統：PL45 (分析 #14)、SMH-300 (分析#17)和 SMH-90 (分析#16, 18, 20)。凍乾循環之詳情請參見表 22。凍乾步驟間的溫度變化斜率為 1°C/min。

表 22 - 用於各分析之凍乾循環

分析#	冷凍溫度 T _{冷凍}	於 T _{冷凍} 之時間	初次乾燥溫度	初次乾燥步驟的時間	第二次乾燥溫度	第二次乾燥步驟的時間	保持在 20°C 的時間
				0		間	0
14	-45°C	100 min	-10°C	20 h	30°C	7 h	14 h
16	-42°C	60 min	-25°C	46 h	30°C	18 h	18 h
17	-45°C	60 min	-25°C	51 h	30°C	21 h	20h

分析#	冷凍溫度 T _{冷凍}	於 T _{冷凍} 之時間	初次乾燥溫度	初次乾燥步驟的時間 0	第二次乾燥溫度	第二次乾燥步驟的時間	保持在 20°C 的時間 0
18	-42°C	60 min	-25°C	37 h	30°C	18 h	18 h
20	-42°C	60 min	-25°C	53 h	40°C	18 h	3 h

0 於實驗期間根據產物溫度測量來設定

0 此循環結束僅在標準操作時間期間

【0213】 然後將得到的乾燥物質藉由添加適量的 WFI 重建至 100 mg/mL 之目標濃度(1.0 至 1.6 mL)。

【0214】 就凍乾分析#P16-20，係將 1 mL FDS 溶液於-20°C 冷凍，於室溫解凍一次及然後分析。

【0215】 亦測試中間物 DS(HAP 步驟終了- BD)之冷凍和解凍(分析 #9)。就此分析，係將置於 50 mL HDPE Nalgene 瓶之 20 mL 的 DS 於-20°C 和-70°C 冷凍，於室溫解凍一次及然後分析。

【0216】 進行下列分析法：

- 目測檢查外觀(澄清度和顏色)
- 光線遮蔽(HIAC)用於定量次-可視性粒子
- SEC 用於蛋白純度
- SDS-PAGE 用於蛋白純度
- IEF 用於電荷異質性
- FCM 用於定量次-可視性粒子
- DLS 用於聚集作用
- DSC 用於變性溫度
- SLS 用於膠體安定性
- FT-IR 光譜用於二級結構
- 螢光光譜用於三級結構
- 卡爾費雪(Karl ficher)用於殘餘水百分比測定(用於凍乾物)
- XRPD 用於餅塊之晶體/非晶基質測量(用於凍乾物)

【0217】 選擇調配物和凍乾程序之主要準則為：

監測下列參數：

- 凍乾程序期間之前導抗體的安定性
- 重建溶液的安定性
- FDS(凍乾前之溶液)的安定性
- 餅塊的細緻度
- 重建時間
- 餅塊的安定性

【0218】 選擇冷凍乾燥週期以避免餅塊崩解(參見表 22)：

- 冷凍溫度係設定在完全固化溫度以下，亦即略低於玻璃轉換溫度(T_g')，其係藉由 DSC 對各候選 FDS(凍乾前之溶液)進行測量(參見圖 17)。
- 初次乾燥溫度係經設定使樣本的溫度保持在崩解溫度以下(其係接近 T_g')(參見圖 17)。

【0219】 於各凍乾分析期間所得到的餅塊全部皆為細緻的(參見圖 18)且重建時間係在五分鐘內。即使這些參數對於開發期間之監測很重要，但其與區別調配物並不相關。

【0220】 在冷凍步驟期間，係選擇 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 之冷卻速率用以避免顯著的前導抗體濃度和 pH 改變。選擇第二次乾燥溫度用於得到餅塊中殘餘水量，以卡爾費雪測量係低於 1% (參見表 22)。

【0221】 前導抗體之安定性係以 SEC 和 SDS-PAGE 測量純度，及以 DLS 和 FCM 測量粒子形成來評估。區別調配物之相關準則為重建之前和之後的 HMW 量和重建後次-可視性粒子的計數。

【0222】 就評估凍乾程序之影響，係以各調配物之凍乾前和重建後 HMW 之量代表，以及此量的增加-相對於凍乾前之量的百分比(參見圖 19 和圖 20)。各圖中虛線係指增加 10%。提供良好安定性之候選物為：

- 磷酸鹽與蔗糖 10 %：#P14-2
- 磷酸鹽和 Tris 與蔗糖 5 % + 甘露醇 3 %：#P14-3 和 P14-8
- 磷酸鹽與甘露醇 3 % + 甘胺酸 1 %：#P14-6
- Tris/磷酸鹽與蔗糖 5 % + 甘露醇 3 %：#P20-1
- Tris/磷酸鹽與蔗糖 5 % + 天門冬胺酸 3 %：#P20-2

- Tris/磷酸鹽與蔗糖 5 % + 脯胺酸 3 % : #P20-3
- Tris/磷酸鹽與蔗糖 5 % + 甘胺酸 3 % : #P20-4

【0223】 請注意，在無任何賦形劑下(#P14-1)，此前導抗體對於凍乾程序強烈不穩定，因為在凍乾之前和之後觀察到 HMW 增加約 130%。此結果預期係如在 20°C 和 -70°C 時於 DS 上所作的冷凍/解凍循環(分析#9)，顯示前導抗體強烈的不穩定性(參見圖 21) – 冷凍為凍乾程序的第一步驟。

【0224】 有關次-可視性粒子，以 FCM 進行重建溶液間的比較顯示下列候選物具較佳的安定性：

- Tris/磷酸鹽與蔗糖 5 % + 脯胺酸 3 % : #P20-3
- Tris/磷酸鹽與蔗糖 5 % + 甘胺酸 3 % : #P20-4

注意：分析#14 未測定。

【0225】 就餅塊重建後安定前導抗體，係使用之前發現可降低聚集作用之賦形劑(參見有關液體調配物之賦形劑篩選的部份)。重建後前導抗體之安定性係以 SEC 針對純度，及以 DLS 和 FCM 針對粒子形成作評估。區別調配物之相關準則為：

- 重建後 24h 之 HMW 量(儲存於 5°C)
- 機械應力後粒子之數目

【0226】 重建後 24h 有關 HMW 形成(儲存於 5°C)，提供最佳安定性之候選物為(參見圖 22 和圖 23)：

- 磷酸鹽與甘露醇 3 % + 甘胺酸 1 % : #P14-6
- Tris/磷酸鹽與蔗糖 5 % + 脯胺酸 3 % : #P20-3
- Tris/磷酸鹽與蔗糖 5 % + 甘胺酸 3 % : #P20-4

接著：

- 磷酸鹽與蔗糖 10 % : #P14-2
- 磷酸鹽和 Tris 與蔗糖 5 % + 甘露醇 3 % : #P14-3、P14-7 和 P14-8
- Tris/磷酸鹽與蔗糖 5 % + 甘露醇 3 % : #P20-1

【0227】 就評估凍乾物之安定性，係於製造後立刻(分析#16-20)進行重建和一至二個月之後(分析 #18-20)進行重建。將候選的凍乾物儲存於 5°C (分析#16-20)和 20°C (分析#17)。餅塊的安定性係以 SEC 針對純度，及以 FCM 針對粒子形成，及以 XRPD 針對餅塊結構來評估。

【0228】 有關 HMW 和可視性/次-可視性粒子形成，發現所有的調配物當儲存於 5°C 時皆為穩定的(參見圖 24 和圖 25)。分析#17 和 20 在 5°C 一個月後所觀察到的 HMW 量稍微增加於下列分析中未再重現(未顯示)。再者，當儲存於 20°C 時觀察到 HMW 量稍微增加(參見圖 24)。

【0229】 FDS 安定性，其為確定 DP 品質之重要參數，係列入分析 #16-18 和 20 考量中。在此程序階段時前導抗體的安定性係以 SEC 針對純度，及以 DLS 和 FCM 針對粒子形成作評估。發現儲存於 5°C 對於監測添加劑對前導抗體安定性之效應有重大意義。在 FDS 上進行一冷凍/解凍循環對於區別調配物亦為重要的。

【0230】 有關儲存於 5°C 時前導抗體之安定性，結果係描述於有關添加劑之部份(參見圖 14)。最佳的安定性係得自：

- Tris/磷酸鹽與蔗糖 1.75 % + 脯胺酸 1.05 %：#P20-3-FDS
- Tris/磷酸鹽與蔗糖 1.75 % + 甘胺酸 1.05 %：#P20-4-FDS

接著：

- Tris/磷酸鹽與蔗糖 1.75 % + 甘露醇 1.05 %：#P20-1-FDS

【0231】 有關一個冷凍/解凍循環後，前導抗體之安定性，以 FCM 進行粒子計數顯示下列候選調配物為安定的：

- Tris/磷酸鹽與蔗糖 1.67 % + 甘露醇 1 %：#P17-2-FDS
- Tris/磷酸鹽與蔗糖 1.75 % + 甘露醇 1.05 %：#P20-1-FDS
- Tris/磷酸鹽與蔗糖 1.75 % + 脯胺酸 1.05 %：#P20-3-FDS

【0232】 總之，考慮下列標準：程序處理期間前導抗體之安定性，餅塊之樣態和安定性以及重建時間，重建溶液和 FDS 的安定性，有 2 種候選調配物明顯勝出：

- Tris/磷酸鹽與蔗糖 5 % + 甘露醇 3%
- Tris/磷酸鹽與蔗糖 5% + 脯胺酸 3%

實例 2-6 之結論

【0233】 在預調配操作期間，由選擇緩衝系統(Tris/磷酸鹽)之 pH 範圍(≥ 7.0)及特別是添加界面活性劑：濃度 0.2 % 之聚山梨醇酯 80，管理可視性/次-可視性粒子的形成。

【0234】 然而，HMW 之形成仍為液體調配物之問題。雖然 HMW 形成因選擇適當的 pH (7.0)和某些賦形劑(亦即蔗糖、甘露醇和胺基酸，例如甘胺酸和脯胺酸)而顯著地降低，但在 100 mg/mL 時有利的效應並不足以防止 HMW 形成而達到預期的液體調配物之滿意的保存效期。

【0235】 因此開發一凍乾調配物連同一凍乾程序。為了防止凍乾過程期間的聚集作用，係選擇一低溫保護劑：濃度 5%之蔗糖。選擇用於安定液體調配物之賦形劑係於凍乾過程中測試以便更能安定凍乾前之液體(濃度：35 mg/mL)和重建的溶液(濃度：100 mg/mL)。有一些賦形劑係與凍乾程序相容並於其中選擇二種：濃度 3%之甘露醇和脯胺酸。選擇的主要標準為：餅塊的細緻度和安定性以及 FDS (凍乾前之溶液)和重建溶液的安定性。

【0236】 二種長期安定性之調配物差別為一種賦形劑(參見表 23)：
原型 1：脯胺酸
原型 2：甘露醇

表 23 - 調配物之說明		
化合物	濃度	功能
前導抗體	100 mg/mL	活性成份
Tris/磷酸鹽	10 mM	緩衝劑- pH 7.0
聚山梨醇酯 80	0.2% (p/v)	可視性/次-可視性粒子之安定劑
蔗糖	5% (p/v)	低溫保護劑+HMW 之安定劑
原型 1：脯胺酸 3%	3% (p/v)	HMW 之安定劑+增強劑
原型 2：甘露醇 3%	3% (p/v)	HMW 之安定劑+增強劑

另外的調配物研究(實例 7-8)

- 【0237】 用於實例 7-8 之縮寫：
- DP：藥物產品
 - DS：藥物基質
 - FD：調配的藥物基質
 - FIM：第一次人體中
 - GRAS：一般認定為安全的
 - HDPE：高密度聚乙烯

HMW：	高分子量
IEF：	等電聚焦
IL：	介白素
LMW：	低分子量
PC：	聚碳酸酯
PES：	聚醚砜
PP：	聚丙烯
PVDF：	聚偏氟乙烯
RT：	室溫
SC：	皮下
Td1：	第一變性溫度
TOR：	離開冷藏時間

概述

【0238】 這些研究的目的(實例 7-8)為針對液態前導抗體對 HMW 形成之高傾向，改善 FDS 安定性。

【0239】 此研究計畫係以由預-調配物研究(實例 2-6)中得到的先前知識為基準來定義並集中在 35 mg/mL 之 FDS 於室溫時 HMW 形成之動能。

【0240】 所使用的所有緩衝劑和賦形劑為已有販售的抗體產品或供非經腸使用的其他產品，特言之其全部為 GRAS (一般認定為安全的)。pH 範圍係介於 6.2 至 7.4。

【0241】 總計 50 種不同的調配物並排與表 23 所述的調配物比較。主要的結果為：

- pH 值約 6.2 降低前導抗體溶解度：以琥珀酸鹽和組胺酸分別觀察到凝膠形成和沉澱
- 此外，組胺酸應避免在 pH 6.6，因為溶液略為乳白色及熱安定性稍低
- 在介於 6.6 至 7.4 之 pH 範圍，對 HMW 形成動力學無明確的 pH 效應
- 增加離子強度對 HMW 形成動力學有不穩定效應
- 磷酸鹽和檸檬酸鹽為最佳的試驗緩衝劑，前提為其係在低濃度例如 1.75 mM 時

- 在所有試驗的賦形劑中，最佳的安定效應係由甘胺酸 10 和 72 mM 及蔗糖 2.4% 所得到。然而，此安定效應並未使 HMW 形成顯著減緩。

【0242】 總之，實例 7-8 之結果並不能鑑別出可顯著改善表 23 所述的調配物有關 HMW 形成之新賦形劑組合。建議為保留下列調配物(參見表 24): 磷酸鹽 6.5 mM/Tris 3.7 mM, pH 7.0, PS80 0.2% (w/v), 蔗糖 5% (w/v), 脯胺酸 3% (w/v)。

表 24 - 調配物說明	
組份	濃度
前導抗體	100 mg/mL
磷酸鹽	6.5 mM
Tris	3.7 mM
蔗糖	5% (w/v)
脯胺酸	3% (w/v)
PS80	0.2% (w/v)

前言

【0243】 前導抗體為以細胞激素 IL-4 和 IL-13 為標靶之基因工程人源化雙特異性抗體(BsAb)。其分子量，以質譜所測量，為 198 kDa，及其 Ip，以 IEF 所測量範圍係介於 5.8 至 6.2 之間。

【0244】 主要的製造 DS 過程變化為執行 IIb 階段，及 4 在 I/IIa 階段和 IIb 階段 DS 和 DP 品質之間規畫一可比較性研究。作為 DS 製造變化的部份，決定進行一項以降低液態中 HMW 形成為目標之調配物研究。因此，調配物之可能的改良應包括在可比較性研究中。

【0245】 請注意，在同時，IIb 階段之 DP 製造程序係針對擴大規模、FDS 解凍和 DP 劑量/小瓶變成 100 mg/7 mL 小瓶，而非 150 mg/15 mL 小瓶，進行最適化。此研究係與調配物開發平行進行。

【0246】 目前此研究(實例 7-8)之目標產品特性係規定下列藥物產品之特徵：

- 給藥路徑：SC 注射
- DP 形式：凍乾的

- 濃度：100 mg/mL 之重建溶液
- 保存效期：24 個月
- 儲存溫度：2°C-8°C
- 劑量強度：100 mg/小瓶
- 主容器：7 mL 1 型管狀透明玻璃小瓶

【0247】 藥物基質應在於 1L 聚碳酸酯瓶中調配成 35 mg/mL，之後存放於-20°C。在冷凍-乾燥之前不添加賦形劑或進行稀釋。

【0248】 預-調配物和調配物之 FIM 研究，得到下列結論：

- 避免酸性 pH < 6.0 (低的熱安定性和膠體安定性)和鹼性 pH > 7.5 (LMW 形成和於熱應力下電荷同型變化)。
- 使用濃度 0.2%之聚山梨醇酯 80 與緩衝系統磷酸鹽/Tris, pH 7.0 組合，顯著降低可視性/次-可視性粒子
- HMW 形成動能隨前導抗體濃度增加，且 100 mg/mL 之試驗的調配物不足以防止 HMW 形成達到預期的液體調配物之滿意的保存效期。
- 液態中 HMW 形成驅使開發朝向凍乾的 DP，其係由 35 mg/mL FDS 以略低於 1/3 起始體積重建(凍乾前)，達到 100 mg/mL。選擇一低溫保護劑和凍乾保護劑：濃度 5%之蔗糖。
- 選用於 I 和 IIa 階段之調配物係如下：磷酸鹽 6.5 mM/Tris 3.7 mM, pH 7.0, PS80 0.2% (w/v), 蔗糖 5% (w/v), 脯胺酸 3% (w/v).
- 此調配物可針對 HMW 形成藉由與經鑑定具有些微正面效應之賦形劑，亦即：蔗糖、甘露醇和胺基酸，例如甘胺酸和脯胺酸組合，進行最適化。

【0249】 已鑑別出液態中 HMW 形成為主要的降解途徑。動能係隨溶液的溫度(於 DP 中在 5°C 比在 RT 時慢 10 倍)和隨前導抗體濃度增加：
35 mg/mL 之 FDS 於 RT： Δ HMW= +1.6%(在 7h 內)及+4.1%(在 24h 內)
100 mg/mL 之 DP 於 RT： Δ HMW= +0.6%(在 1h 內)及+3.5%(在 5h 內)

目的

【0250】 此研究(實例 7-8)之目的係就 HMW 形成而言，增加前導抗體於液態中之安定性。為了設定此研究之定量指標，係提出下列數值：

- 就使用穩定性為 DP 重建後於 RT 下 5h： Δ HMW< +1% in 5h,
- 為了使 DP 製造容易，就 FDS 為 TOR 12h： Δ HMW< +1% in 12h.

【0251】 這些指標值係考慮 100 mg/mL 之重建 DP 的使用條件和當 35 mg/mL 之 FDS 離開冷藏狀況時之處理製造條件。這些數值應依照目標產品的品質性質(Quality Target Product Profile)作調整。

研究設計

【0252】 此研究(實例 7-8)所提出的方法係用於在 35 mg/mL 之前導抗體濃度時於廣泛範圍的調配物上篩選組合的賦形劑。

【0253】 調配物的篩選係集中在能潛在地影響 HMW 形成之安定賦形劑。此研究係決定下列各項：

- 在此篩選中 PS80 和蔗糖係保持在調配物第 I 階段濃度，因為已證明在這些濃度時對 HMW 形成無負面效應並已觀察到對製造過程及/或重建有強烈的正面影響
- pH 範圍緊縮在 6.2 至 7.4 之間，因為之前的研究已顯示保持在約 pH 7 的 pH 之優勢
- 篩選此 pH 範圍內的 5 種可注射緩衝劑(單獨或與數種賦形劑組合)：其他的緩衝系統及/或添加劑(主要地胺基酸、蔗糖(除了已包含在第 I 階段調配物中之外)和鹽類)。

藥物基質

【0254】 用於此研究(實例 7-8)之 DS 係描述於表 25 中。

表 25 - DS 說明

批件編號#	類型	製造日期	製造商	調配物	濃度	儲存	所用的分析
LT-10006-DS	FDS			磷酸鹽 2.22 mM/Tris 1.28 mM, 蔗糖 1.75%, 脯胺酸 1.05%, PS80 0.07%	33 mg/mL	-20°C	H04-150 至 190
VAB-YKR 1-000079	DS			蔗糖 2.1%	42 mg/mL	-20°C	H04-193

藥物基質

【0255】 用於此研究之 DP(實例 7-8)係以第 I/IIa 階段的調配物所調配 (磷酸鹽 6.5 mM/Tris 3.7 mM, pH 7.0, PS80 0.2%, 蔗糖 5%, 脯胺酸 3%)(參見表 26)。

表 26 - DP 說明

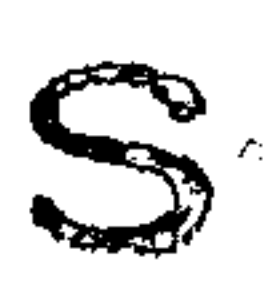
DP 凍乾物 #	製造日期	製造商	強度/模式	來自 FDS #
H04-016			150mg /15mL 小瓶	CER0315 和 CER0375
H04-046			150mg/15mL 小瓶	CER0378、CER0382 和 CER0392
C1016207			150mg/15mL 小瓶	GMP2
H04-193			100mg /7mL 小瓶	H04-193

配方

【0256】 實例 7-8 中各分析之配方係列於表 27 中。

表 27 - 配方

調配物分析 #	緩衝系統	pH	賦形劑之公稱組成 0	公稱濃度 (mg/mL)
H04-150 A1	琥珀酸鹽 10 mM	6.2	蔗糖 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-150 A2	琥珀酸鹽 10 mM	6.2	Tris 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-150 A3	琥珀酸鹽 10 mM	6.2	組胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-150 A4	琥珀酸鹽 10 mM	6.2	脯胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-150 A5	琥珀酸鹽 10 mM	6.2	甘胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-150 A6	琥珀酸鹽 10 mM	6.2	Tris 10 mM-甘胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
初步試驗 (P-H04-144)	組胺酸 10 mM	6.2	蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25



調配物分析 #	緩衝系統	pH	賦形劑之公稱組成 0	公稱濃度 (mg/mL)
初步試驗 (P-H04-148)	組胺酸 10 mM	6.2	甘胺酸 10 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-150 B1	組胺酸 10 mM	6.6	蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-150 B2	組胺酸 10 mM	6.6	Tris 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-150 B3	組胺酸 10 mM	6.6	脯胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-150 B4	組胺酸 10 mM	6.6	甘胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-150 C	-	6.8	蔗糖 2.1%-PS80 0.07%	36.25
H04-150 D	磷酸鹽 3.33 mM /Tris 1.92 mM	6.9	蔗糖 8.42% -PS80 0.07%	36.25
H04-163 A1	檸檬酸鹽 10 mM	6.6	蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-163 A2	檸檬酸鹽 10 mM	6.6	Tris 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-163 A3	檸檬酸鹽 10 mM	6.6	組胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-163 A4	檸檬酸鹽 10 mM	6.6	脯胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-163 A5	檸檬酸鹽 10 mM	6.6	甘胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-163 A6	檸檬酸鹽 10 mM	6.6	Tris 10 mM- 甘胺酸 10 mM- 蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-163 B1	磷酸鹽 10 mM	6.6	蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-163 B2	磷酸鹽 10 mM	7.0	蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25

調配物分析 #	緩衝系統	pH	賦形劑之公稱組成 0	公稱濃度 (mg/mL)
H04-163 B3	磷酸鹽 10 mM	7.0	Tris 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-163 B4	磷酸鹽 10 mM	7.0	組胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-163 B5	磷酸鹽 10 mM	7.0	脯胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-163 B6	磷酸鹽 10 mM	7.0	甘胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-172 A1	Tris 10 mM	7.0	蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-172 A2	Tris 10 mM	7.4	蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
			琥珀酸鹽 10 mM NaCl	36.25
H04-172 A3	Tris 10 mM	7.4	7.5 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	
H04-172 A4	Tris 10 mM	7.0	組胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-172 A5	Tris 10 mM	7.4	組胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-172 A6	Tris 10 mM	7.4	甘胺酸 10 mM-蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-172 B1	磷酸鹽 1.75 mM	7.0	蔗糖 1.75% -PS80 0.07%	36.25
H04-172 B2	磷酸鹽 1.75 mM	7.0	蔗糖 4% -PS80 0.07%	36.25
H04-185 A1	-	6.8	蔗糖 4.15%-PS80 0.07%	36.25
H04-185 A2	-	6.8	甘胺酸 72 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-185 B1	磷酸鹽 1.75 mM	6.8	甘胺酸 72 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-185 B2	磷酸鹽 1.75 mM	6.8	蔗糖 4.15%-PS80 0.07%	36.25

調配物分析 #	緩衝系統	pH	賦形劑之公稱組成 0	公稱濃度 (mg/mL)
H04-185 B3	磷酸鹽 1.75 mM	6.8	苯甲酸鈉 37.8 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-185 B4	磷酸鹽 1.75 mM	6.8	NaCl 38.5 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-185 B5	磷酸鹽 5.25 mM	6.8	甘胺酸 72 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-185 C1	檸檬酸鹽 5.25 mM	6.8	甘胺酸 72 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-185 C2	檸檬酸鹽 1.75 mM	6.8	甘胺酸 72 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-185 C3	檸檬酸鹽 1.75 mM	6.8	蔗糖 4.15%-PS80 0.07%	36.25
H04-185 C4	檸檬酸鹽 10 mM	6.8	甘胺酸 72 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-185 D	磷酸鹽 2.22 mM /Tris 1.28 mM	6.8	脯胺酸 91 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-187 A1	磷酸鹽 2.22 mM /Tris 1.28 mM	6.7	脯胺酸 91 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-187 A2	磷酸鹽 2.22 mM /Tris 1.28 mM	6.8	脯胺酸 91 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-187 A3	磷酸鹽 2.22 mM /Tris 1.28 mM	7.0	脯胺酸 91 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-187 A4	磷酸鹽 2.22 mM /Tris 1.28 mM	7.2	脯胺酸 91 mM-蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25
H04-190 A1	-	6.8	蔗糖 20.5%-PS80 0.07%	20
H04-190 A2	-	6.8	蔗糖 13.42%-PS80 0.07%	36.25

調配物分析 #	緩衝系統	pH	賦形劑之公稱組成 0	公稱濃度 (mg/mL)
H04-190 A2	-	6.8	蔗糖 1.75%-PS80 0.07%	36.25

賦形劑的量係以 w/v 之%來表示

製造程序

【0257】 在實例 7-8 中之調配物係以由濃度 42 mg/mL 之 UF/DF 於蔗糖 2.1%中得來的前導抗體之濃縮溶液所製造。將此前導抗體溶液以濃的賦形劑之儲存溶液稀釋。

UF/DF 製程

【0258】 在 UF/DF 過程中(實例 7-8)，先將 35 mg/mL 之最初的蛋白溶液濃縮至 40 mg/mL，然後交換緩衝劑。滲濾後，將蛋白溶液濃縮至高於 42 mg/mL，其為目標最終濃度(參見表 28)。

【0259】 各 UF/DF 所用的物質和處理條件係如表 28 所述。在 UF/DF 結束時，將前導抗體濃度以蔗糖 2.1%調整至 42 mg/mL。

表 28 - UF/DF 製造參數

調配物 分析#	膜	比率：蛋 白的克(g) 數/膜 m ² (g/m ²)	滲濾期間之 蛋白濃度 (mg/mL)	通過的滲 濾體積之 數量	緩衝 劑交 換	UF/DF 結束 時之蛋白濃 度(mg/mL)
H04-137	Pellicon 3® 0.11 m ²	216	40	9	蔗糖 2.1%	48.5

調配物調整

【0260】 將 UF/DF 溶液後之前導抗體(實例 7-8)以適量的濃儲存液稀釋至所欲的最終濃度。用於此研究之參照物和製造的濃縮溶液之組成係彙整於表 29 中。

表 29 - 濃縮儲存溶液配方

調配物分析#	緩衝系統	賦形劑之公稱組成 ^a	pH 調整至
P -H04-138	琥珀酸鹽 60 mM	-	5.9
P -H04-139	琥珀酸鹽 60 mM	Tris 60 mM	5.9
P -H04-140	琥珀酸鹽 60 mM	組胺酸 60 mM	6.2
P -H04-141	琥珀酸鹽 60 mM	脯胺酸 60 mM	5.9
P -H04-142	琥珀酸鹽 60 mM	甘胺酸 60 mM	5.9
P -H04-143	琥珀酸鹽 60 mM	Tris 60 mM-甘胺酸 60 mM	5.9
P -H04-144	組胺酸 60 mM	-	6.1
P -H04-145	組胺酸 60 mM	-	6.6
P -H04-146	組胺酸 60 mM	Tris 60 mM	6.4
P -H04-147	組胺酸 60 mM	脯胺酸 60 mM	6.5
P -H04-148	組胺酸 60 mM	甘胺酸 60 mM	6.1
P -H04-149	組胺酸 60 mM	甘胺酸 60 mM	6.6
(H04-150)	磷酸鹽 20 mM /Tris 11.5 mM	蔗糖 40%	無調整
P -H04-151	檸檬酸鹽 60 mM	-	6.4
P -H04-152	檸檬酸鹽 60 mM	Tris 60 mM	6.3
P -H04-153	檸檬酸鹽 60 mM	組胺酸 60 mM	6.6
P -H04-154	檸檬酸鹽 60 mM	脯胺酸 60 mM	6.4
P -H04-155	檸檬酸鹽 60 mM	甘胺酸 60 mM	6.4
P -H04-156	檸檬酸鹽 60 mM	Tris 60 mM-甘胺酸 60 mM	6.2
P -H04-157	磷酸鹽 60 mM	-	6.4
P -H04-158	磷酸鹽 60 mM	-	7
P -H04-159	磷酸鹽 60 mM	Tris 60 mM	6.9
P -H04-160	磷酸鹽 60 mM	組胺酸 60 mM	7
P -H04-161	磷酸鹽 60 mM	脯胺酸 60 mM	7
P -H04-162	磷酸鹽 60 mM	甘胺酸 60 mM	6.8
P -H04-164	Tris 60 mM	-	7.3
P -H04-165	Tris 60 mM	-	7.7
P -H04-166	Tris 60 mM	琥珀酸鹽 60 mM NaCl 45 mM	7.7

調配物分析#	緩衝系統	賦形劑之公稱組成 ^a	pH 調整至
P -H04-167	Tris 60 mM	組胺酸 60 mM	7.2
P -H04-168	Tris 60 mM	組胺酸 60 mM	7.5
P -H04-169	Tris 60 mM	甘胺酸 60 mM	7.6
P -H04-170	磷酸鹽 10.5 mM	-	7.2
P -H04-171	磷酸鹽 10.5 mM	蔗糖 13.5%	7.2
P -H04-173	-	蔗糖 14.4%	無調整 ^t
P -H04-174	-	甘胺酸 432 mM	無調整
P -H04-175	磷酸鹽 10.5 mM	甘胺酸 432 mM	6.8
P -H04-176	磷酸鹽 10.5 mM	蔗糖 14.4%	6.8
P -H04-177	磷酸鹽 10.5 mM	苯甲酸鈉 227 mM	6.8
P -H04-178	磷酸鹽 10.5 mM	NaCl 231 mM	6.8
P -H04-179	磷酸鹽 31.5 mM	甘胺酸 432 mM	6.8
P -H04-180	檸檬酸鹽 31.5 mM	甘胺酸 432 mM	6.8
P -H04-181	檸檬酸鹽 10.5 mM	甘胺酸 432 mM	6.8
P -H04-182	檸檬酸鹽 10.5 mM	蔗糖 14.4%	6.8
P -H04-183	檸檬酸鹽 60 mM	甘胺酸 432 mM	6.8
P -H04-184	磷酸鹽 13.3 mM /Tris 7.7 mM	脯胺酸 547 mM	7
P -H04-186	磷酸鹽 13.3 mM /Tris 7.7 mM	脯胺酸 547 mM	6.5
P -H04-189 1	-	蔗糖 37.5%	無調整
P -H04-189 2	-	蔗糖 70%	無調整

賦形劑的量係以 w/v 之%來表示

【0261】 將各調配物於層流下無菌過濾(Millex® GV)並將濾液酌情(1 至 2mL)分散於 2 mL I 型玻璃小瓶並以塞子塞住用於各安定性時間點分析。

應力條件
熱應力

【0262】 根據調配物分析，實例 7-8 中所進行的熱應力條件係列於表 30 中。

表 30 - 熱應力條件		
調配物分析#	溫度應力	應力時間
H04-150	RT ⁰	天數：1、2 和 3
	5°C ⁰	天數：2、3 和 6
H04-163	RT ⁰	天數：1、2 和 3
	5°C ⁰	天數：2、3 和 7
H04-172	RT ⁰	天數：1、2、3 和 6
	5°C ⁰	天數：2、3 和 6
H04-185	RT ⁰	天數：1、2 和 3
	5°C ⁰	天數：2、3 和 6
H04-187	RT ⁰	16h、24h 和 40h
H04-190	RT ⁰	16h、40h 和 48h
H04-193	5°C ⁰	21h、30h 和 46h
	25°C ⁰	21h、30h 和 46h

⁰ 由於實驗室空調，RT 範圍係介於 21°C 至 29°C

⁰ 於標準的非 GMP 冷藏室中進行

⁰GMP 恆溫室

分析方法說明

- 【0263】 實例 7-8 中進行下列分析方法：
- 目測檢查外觀(澄清度和顏色)
 - 以自然光線觀察置於 7 mL 小瓶中的溶液
 - HPLC-SEC 測量蛋白純度
 - 2 管柱 PROSEC 300S- 250 x 4.6 mm 於 35°C
 - 移動相：磷酸鹽 0.1 M/NaCl 0.2 M pH 7.0
 - 偵測：280 nm
 - 注射：10 µL (濃度 5 mg/mL)

- 流速：0.2 mL/min
- 總操作時間：40 min

進行下列分析方法：

- UPLC-SEC 測量蛋白純度
- 管柱：1 Acquity BEH200 SEC (150 x 4.6 mm dp=1.7 μ m)於 40°C
- 移動相：Na₂HPO₄ 50 mM/NaClO₄ 300 mM at pH 7.0
- 偵測：UV at 280 nm
- 注射：1 μ L (5 mg/mL 之溶液)標準 3014ET
- 注射：2 μ L (2.0 mg/mL 之溶液)
- 流速：0.3 mL/min
- 總操作時間：8 min

監測下列分析方法：

- DSC 測量變性溫度：
- 使用示差掃描熱分析儀(DSC)預估不酮調配物中的抗體熱安定性
- 以 VP-毛細管 DSC 從 25°C 至 100°C 於 1°C/min 之加熱速率下進行熱量測量。
- 容量曲線給予有關變性溫度 Td (°C)(最大峰值)之資料。.

評估標準

- SEC：當差異等於或低於 0.5%之 HMW 時，結果係視為相當的。
- DSC：當 Td1 差異等於或低於 0.4°C 時，結果係視為相當的。

UPLC 與 HPLC 法

【0264】 於開發用於第 I 階段之 HPLC 上進行第一次篩選(分析 #H04-150 至 172)。當分析一連串大量的樣本時，已觀察到有關影響 HMW 量測量之基線漂移。

【0265】 對於第二次篩選(分析#H04-185 至 190)，為了得到精確的 HMW 量演變，係使用無觀察到基線漂移之 UPLC 法。即使在 200 個以上的樣本注射至相同管柱後，亦觀察到標準之相同的層析圖形。

SEC 測量之參照

【0266】 為了比較不同系列有關 HMW 隨時間之演變，係使用第 I 階段調配物作為參照：

- 對於第一次篩選(分析#H04-150 至 172)，就各 3 個系列得到第 I 階段 FDS，藉由以 WFI 重建 35 mg/mL 之 DP 凍乾物#H04-016。
- 對於第二次篩選(分析#H04-185 to 190)，除了前面的第 I 階段 FDS (H04-016) 外，就各 3 個系列，使用新鮮製造之另外的第 I 階段 FDS 連同試驗調配物。再者，使用第 3 個第 I 階段 FDS 參照(#LT-10006-DS)：非冷凍乾燥，但僅解凍。

【0267】 出乎意料地，HMW 動力學在各種參照物間似乎不相同。將二種另外的 DP 凍乾物連同 DP 凍乾物#H04-016 進行試驗作比較。在 RT 下 40h 後 DP 凍乾物內的差異變得明顯。然而，解凍的參照物，#LT-10006-DS 在 RT 下從 16h 明顯地於所有的 DP 凍乾物不同。此 DP 凍乾物比解凍的參照#LT-10006-DS 物顯現較快的 HMW 動力學，且因此不能用於比較此研究中所製造的調配物(此研究之調配物係由解凍的 FDS 製造(參見有關製造程序之章節)至此調配物第 I/IIa 階段。

【0268】 使用相同批件和新鮮製備的冷凍-乾燥 DP，在解凍的 FDS 和 DP 凍乾物間並未觀察到 HMW 動力學上明顯的差異。因此，在此研究中新鮮製造的調配物上所觀察到的 HMW 動力學應同樣在冷凍-乾燥後之相同的調配物上觀察到。

【0269】 由這些分析得出的結論不能推廣到所有的 DP 凍乾物及所有的解凍 FDS。不同批件間之 HMW 比較可依照各種參數而定且將需要特定和個別的研究。

結果與討論

【0270】 所有實例 7-8 中所製造的調配物含有至少 1.75% (w/v)的蔗糖和接近 0.07% (w/v)的 PS80。這些濃度為公稱值且係以用於前導抗體起始溶液之稀釋因子為基礎。有關 PS80 濃度，係假設 UF/DF 期間 PS80 吸收可忽略不計。這些賦形劑濃度係與此第 I 階段調配物相同。

實例 7 – 緩衝劑篩選

【0271】 在此實例中係篩選 6.2 至 7.4 之 pH，且在此範圍內所有可注射的緩衝劑皆有測試：琥珀酸鹽、組胺酸、檸檬酸鹽、磷酸鹽和 Tris。

A) 緩衝劑種類和 pH

【0272】 在此第一次篩選中(分析#H04-150 至 172)，係測試濃度 10 mM 之上述緩衝劑，與數種賦形劑組合其將進一步詳述於實例 8-添加劑篩選。注意，緩衝劑濃度係固定在 10 mM 且其對 HMW 形成的影響可參見有關緩衝劑濃度部份(實例 7)。

DSC

【0273】 DSC 結果顯示，所有的調配物與參照為相當的($T_d1 = 65.5^{\circ}\text{C}$)，但組胺酸調配物除外，其熱安定性稍低($T_d1 = 64.7^{\circ}\text{C}$ 至 65.1°C)(參見圖 26)。

開始時之目測檢查

【0274】 所有的調配物皆為澄清的且與參照物相當，但 pH 6.2 之調配物及 pH 6.6 之組胺酸調配物除外。

【0275】 在 pH 6.2，在二種試驗緩衝劑中觀察到溶解度下降：

- 於 RT 下組胺酸調配物沉澱(參見圖 27)
- 於 RT 下琥珀酸鹽調配物略為乳白色且在 5°C 可觀察到凝膠形成(參見圖 27)，當溶液回到 RT 及緩和振盪時其可回復。琥珀酸鹽可能具有螯合性質。

pH 6.6 之組胺酸調配物在 RT 下比參照物略顯乳白色。

SEC 之 HMW 演變

【0276】 因為本處所呈現的結果係來自 3 個不同系列，所以 HMW 演變不能直接比較，僅能與參照物比較。

- 組胺酸 pH 6.6 在 RT 與參照物相當，但在 5°C 時略佳(就單獨組胺酸為 +2.4% 而參照物於 144h 為 +3.2%)。

- 檸檬酸鹽 pH 6.6 在 RT 比參照物略佳(於 24h 內，單獨檸檬酸鹽為+4.6%而參照物為+5.2%)而在 5°C 時與參照物相當。
- 磷酸鹽 pH 6.6 在 RT 比參照物略佳(於 48h 內，單獨磷酸鹽為+8.2%而參照物為+9.0%)而在 5°C 時與參照物相當。
- 磷酸鹽 pH 7 在 RT 和 5°C 時與參照物相當。
- Tris pH 7 在 RT 比參照物略差(於 48h 內，Tris 單獨為+7.8%而參照物為+7.0%)而在 5°C 時與參照物相當。
- Tris pH 7.4 在 RT 和 5°C 時與參照物相當。

參見圖 28.

【0277】 有關 HMW 形成，在 pH 6.6 時，磷酸鹽和檸檬酸鹽為相當的，而在 pH 7.0 時，磷酸鹽比 Tris 略微安定。上述 10 mM 緩衝劑不能直接與第 I/IIa 階段調配物相比較，因為用於此篩選之參照物係從另外的批件所製造的凍乾物(參見上文有關 SEC 測量之參照物部份)。

結論

【0278】 有關濃度 10 mM 之緩衝系統篩選，可結論出：

- pH 值約 6.2 (接近 pI)降低前導抗體溶解度：
- pH 6.2 之琥珀酸鹽觀察到凝膠形成
- pH 6.2 之組胺酸觀察到沉澱
- 此外，組胺酸應避免在 pH 6.6，因為溶液為乳白色及熱安定性稍低
- 在 6.6 至 7.4 之範圍內，下列試驗緩衝劑對 HMW 形成無明確的 pH 效應傾向：組胺酸、檸檬酸鹽、磷酸鹽和 Tris
- 雖然在 10 mM 時檸檬酸鹽和磷酸鹽似乎為最佳的緩衝劑，但緩衝劑對於 HMW 形成效應非常弱

B)第 I/IIa 階段調配物之 pH 微調

【0279】 為了測定相同的操作上 pH 對 HMW 形成的影響，係於第 I 階段調配物上於範圍 6.7 至 7.2 內篩選 pH (分析 #H04-187)。

DSC

【0280】 DSC 結果顯示，所有的調配物係與參照物相當(pH 7.0) (參見圖 29)。

SEC 之 HMW 演變

【0281】 當 pH 從 6.7 增加至 7.2 時，HMW 形成有輕微降低的傾向(參見圖 30)，然而，此現象僅在 RT 下 24h 後才變得明顯(pH 6.7 為+4.1%而 pH 7.2 為+3.4%)。

結論

【0282】 以緩衝劑磷酸鹽 2.2 mM/Tris 1.3 mM (調配物第 I 階段)，在 RT 下 24h 後於範圍 6.7 至 7.2 內有些微 pH 效應。然而，此效應為微弱的，因為就前 16h 並不明顯。由此確認了在此 pH 範圍內，pH 對 HMW 形成之微弱效應。

C) 緩衝劑濃度

【0283】 檸檬酸鹽和磷酸鹽係以比 10 mM 更小的濃度作測試：0、1.75 和 5.25 mM，以便於調查緩衝劑濃度對 HMW 形成的影響(分析#H04-185)。pH 係設定在試驗範圍的中間點：pH= 6.8。所有的調配物含有 72 mM 之甘胺酸用以調整滲透壓，及如在關於結果和討論部份之開始中所言，1.75%蔗糖和約 0.07% PS80。

DSC

【0284】 DSC 結果顯示，所有的調配物係與參照物相當(調配物第 I 階段) (參見圖 31)。注意，不含緩衝劑的甘胺酸(185A2)比其他試驗的調配物安定性略低(Td1 約 1°C 差異)。

SEC 之 HMW 演變

【0285】 對於二種試驗的緩衝劑，當緩衝劑濃度降低時，HMW 形成有降低的傾向，以無緩衝劑和 1.75mM 之緩衝劑得到最佳結果(例如，在 RT

下 48h 內，檸檬酸鹽 10 mM 為+7.8%及無緩衝劑為+7.0%) (參見圖 32)。1.75 mM 之檸檬酸鹽和無緩衝劑者係與參照物相當(例如，在 RT 下 48h 內，檸檬酸鹽為+7.1%及無緩衝劑為+7.0%，而參照物為+6.8%)。

結論

【0286】 緩衝劑濃度降低對 HMW 形成動力學具有些微的安定效應。此效應可能與離子強度有關。無緩衝劑和 1.75 mM 檸檬酸鹽緩衝劑就 HMW 形成而言為最佳的候選物，緊接著為 1.75 mM 磷酸鹽。這些帶有 72 mM 甘胺酸的試驗緩衝劑與第 I/IIa 階段調配物相當。

實例 8 – 添加劑篩選

【0287】 添加劑甘胺酸、脯胺酸、組胺酸和 Tris 之篩選係結合緩衝劑篩選來進行(第一次篩選：分析#H04-150 至 172)以便於測定賦形劑間潛在的協同性。添加劑氯化鈉、苯甲酸鈉、甘胺酸和蔗糖之篩選(第二次篩選：分析#H04-185 至 190)係於磷酸鹽或檸檬酸鹽上(來自第一次篩選之最佳緩衝劑選擇(實例 7))進行。

【0288】 調配物含有 1.75% 蔗糖和約 0.07% PS80。

A) 氯化鈉和苯甲酸鈉

【0289】 測試氯化鈉和苯甲酸鈉用以分別評估離子強度和親水性相互作用對 HMW 形成之效應。這些添加劑係於磷酸鹽 1.75 mM pH 6.8 濃度未超過此第 I 階段調配物滲透壓上進行試驗(FDS 中 165 mOsm/kg)。

DSC

【0290】 DSC 結果顯示，NaCl 調配物係與參照物相當(NaCl 之 Td1= 65.7°C，及參照物為 65.6°C)，而苯甲酸鈉調配物熱安定性略低(Td1= 65.0°C)。

SEC 之 HMW 演變

【0291】 對於二種試驗的添加劑，相較於對照物，對 HMW 形成有明確的負面效應(例如在 RT 下 24h 內，38.5mM 之 NaCl 為+5.2%，37.8mM 之苯甲酸鈉為+5.2%而參照物為+3.2%)。對於二種賦形劑此演變相類似，在本處僅顯示 NaCl 結果(參見圖 33)。

結論

【0292】 如所示，對於緩衝劑濃度，帶有 NaCl 或苯甲酸鈉之離子強度增加對 HMW 形成動力學有明確的負面效應。再者，親水性相互作用對 HMW 形成之效應，由於添加了苯甲酸鈉而未觀察到。

B) 甘胺酸、脯胺酸甘胺酸、組胺酸和 Tris

【0293】 這些添加劑(甘胺酸、脯胺酸、組胺酸和 Tris)係以 10 mM 之濃度進行測試(第一次篩選：分析#H04-150 至 172)。

DSC

【0294】 DSC 結果顯示，所有含上述添加劑之調配物係與無緩衝劑調配物(單獨)相當。

SEC 之 HMW 演變

【0295】 雖然在 RT 下 48h 和 5°C 係下 6 天後可看到傾向，但調配物間的差異很小：

- 組胺酸緩衝劑：
 - At RT：Ø (no 添加劑 s)=甘胺酸> 脯胺酸>Tris
 - At 5°C：Ø >甘胺酸= 脯胺酸 > Tris
- 檸檬酸鹽緩衝劑：
 - At RT：甘胺酸>脯胺酸=組胺酸=Tris=(Tris+甘胺酸) > Ø
 - At 5°C：甘胺酸>脯胺酸=組胺酸=Tris=(Tris+甘胺酸)=Ø
- 磷酸鹽緩衝劑：
 - At RT：甘胺酸= 脯胺酸=Ø >組胺酸= Tris

-At 5°C：甘胺酸> 脯胺酸=Ø=組胺酸= Tris

• Tris 緩衝劑：

-At RT：甘胺酸>Ø=組胺酸

-At 5°C：甘胺酸=Ø=組胺酸

結論

【0296】 有關 HMW 形成，這些添加劑的效應微微弱的，雖然可到有傾向：

- 10 mM 之甘胺酸具有些微正面效應
- 10 mM 之組胺酸和脯胺酸似乎無效應
- 10 mM 之 Tris 不具有安定效應及可能有些微的不安定效應

C)蔗糖和甘胺酸

【0297】 在第二次篩選中(分析#H04-185)，另外量的 2.4%蔗糖(除了包含在所有調配物中之已添加的 1.75%蔗糖之外，其得到總計 4.15% (w/v) 的蔗糖)和濃度 72 mM 之甘胺酸係於最佳選擇的緩衝劑(參見關於緩衝劑篩選部份)進行測試。將這些濃度最大化以不超過此調配物第 I 階段滲透壓(FDS 中 165 mOsm/kg)。

DSC

【0298】 DSC 結果顯示，所有的蔗糖 2.4%和甘胺酸 72mM 調配物係與參照物相當(例如就蔗糖之情況，1.75 mM 磷酸鹽之 Td1= 65.7°C 而參照物為 65.6°C)。

SEC 之 HMW 演變

【0299】 當相較於僅含有蔗糖的調配物對於檸檬酸鹽 1.75 mM 和無緩衝劑，確認甘胺酸有些微正面影響(參見圖 34)。然而，此正面影響僅在 RT 下 48h 後為明顯的。

結論

【0300】 有關 HMW 形成，對於所指的時序表(RT 下< 24h)，於最佳候選緩衝劑上測試的蔗糖和甘胺酸調配物係與第 I 階段調配物相當。

實例 7-8 之結論

【0301】 對於此研究，製造大約 50 種調配物並以目前的第 I/IIa 階段調配物並列作比較。範圍從 6.2 至 7.4 之 pH 篩選，涉及所有在此 pH 範圍內可注射的緩衝劑，單獨或與數種賦形劑(皆為 GRAS)組合，用以評估賦形劑間潛在的協同性。

【0302】 此處為主要的結論：

- pH 值約 6.2 降低了前導抗體溶解度：以琥珀酸鹽和組胺酸分別觀察到凝膠形成和沉澱；
- 此外，組胺酸應避免在 pH 6.6，因為溶液為乳白色及熱安定性稍低；
- 在介於 6.6 至 7.4 之 pH 範圍，對 HMW 形成動力學無明確的 pH 效應；
- 增加離子強度對 HMW 形成動力學有不穩定效應；
- 磷酸鹽和檸檬酸鹽為最佳的試驗緩衝劑，前提為其係在低濃度例如 1.75 mM 時；
- 在所有試驗的賦形劑中，最佳的安定效應係由 10 和 72 mM 甘胺酸及 2.4% 蔗糖所得。然而，此安定效應並未使 HMW 形成顯著減緩；及
- 脯胺酸，其在 10 mM 時無效應，可用作為等張劑(91 mM 脯胺酸之效應(在 FDS 第 I 階段調配物中之脯胺酸濃度)並未就有關 HMW 形成作評估(例如，評估有或無脯胺酸之 FDS 第 I 階段調配物)。

【0303】 總之，實例 7-8 之結果並未鑑定出可就 HMW 形成顯著改善目前調配物之新的賦形劑組合。亦即，實例 7-8 之結果確認了實例 1-6 之結果。建議保留目前第 I/IIa 階段的調配物用於第 IIb 階段研究。因此目前的調配物係如下(參見表 31)：磷酸鹽 6.5 mM/Tris 3.7 mM, pH 7.0, PS80 0.2% (w/v), 蔗糖 5% (w/v), 脯胺酸 3% (w/v)。

表 31 - 第 I/IIa/IIb 階段調配物說明

組份	濃度
前導抗體	100 mg/mL
磷酸鹽	6.5 mM
Tris	3.7 mM
蔗糖	5% (w/v)
脯胺酸	3% (w/v)
PS80	0.2% (w/v)

【0304】 目前調配物之用量調整(在無添加新的賦形劑下，微調賦形劑濃度)可針對第 III 階段/商業調配物來進行。

【序列表】(請換頁單獨記載)

序列表

<110> 賽諾菲公司
<120> 抗IL4/抗IL-13之雙特異性抗體調配物
<130> 14-646-WO
<150> US 61/816,899
<151> 2013-04-29

<150> EP 14305160.5
<151> 2014-02-05

<160> 21
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-IL13 hB-B13 VL3

<400> 1
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-IL13 hB-B13 VH2

<400> 2

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
20 25 30
Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-IL4 h8D4-8 VL1

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

S

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 4
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-IL4 h8D4-8 VH1

<400> 4

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 5
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-IL4 h8D4-8 VH2

<400> 5

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Asp Ala Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120



<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hB-B13 VL3 CDR1

<400> 7

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hB-B13 VL3 CDR2

<400> 8

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hB-B13 VL3 CDR3

<400> 9

Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg Thr
1 5

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hB-B13 VH2 CDR1

<400> 10

Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser Ser Ile Asn
1 5 10

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hB-B13 VH2 CDR2

<400> 11

Asp Gly Arg Ile Asp
1 5

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hB-B13 VH2 CDR3

<400> 12

Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe
1 5 10

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> h8D4-8 VL1 CDR1

<400> 13

His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp Leu Ser
1 5 10



<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> h8D4-8 VL1 CDR2

<400> 14

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> h8D4-8 VL1 CDR3

<400> 15

Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> h8D4-8 VH1 CDR1

<400> 16

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His
1 5 10

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> h8D4-8 VH1 CDR2

<400> 17

Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg

1 5

<210> 18
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> h8D4-8 VH1 CDR3

<400> 18

Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> h8D4-8 VH2 CDR1

<400> 19

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His
1 5 10

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> h8D4-8 VH2 CDR2

<400> 20

Ile Asp Ala Ser Asp Gly Glu Thr Arg
1 5

<210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> h8D4-8 VH2 CDR3

<400> 21



Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
1 5 10

申請專利範圍

1. 一種安定的抗體調配物，係包括：
一雙特異性抗-IL-4/抗-IL-13 抗體或其抗原結合片段，其包括式輕鏈可變區 1 (VL1)-連接子-輕鏈可變區 2 (VL2)之輕鏈和式重鏈可變區 1 (VH1)-連接子-重鏈可變區 2 (VH2)之重鏈，其中 VL1 和 VH1 係形成 IL-13 抗原結合區，而 VL2 和 VH2 係形成 IL-4 抗原結合區，其中抗體或其抗原結合片段之濃度為從約 50 mg/mL 至約 150 mg/mL；及
一適合將調配物的 pH 維持在 pH 7 之緩衝系統，其中該緩衝系統包含 Tris 緩衝劑和磷酸鹽緩衝劑；且
其中該調配物具有 15 mM 或更低的鹽濃度，以便於降低調配物之離子強度，且
其中該調配物包含甘露醇。
2. 如請求項 1 之調配物，其中
VL1 係包括 SEQ ID NO：1 之 CDR 序列；
VH1 係包括 SEQ ID NO：2 之 CDR 序列；
VL2 係包括 SEQ ID NO：3 之 CDR 序列；及
VH2 係包括 SEQ ID NO：4 或 5 之 CDR 序列。
3. 如請求項 1 之調配物，其中
VL1 係包括 SEQ ID NO：1 之胺基酸序列；
VH1 係包括 SEQ ID NO：2 之胺基酸序列；
VL2 係包括 SEQ ID NO：3 之胺基酸序列；及
VH2 係包括 SEQ ID NO：4 或 5 之胺基酸序列。
4. 如請求項 1 之調配物，其中該輕鏈係包括式 N-VL1-連接子-VL2-CL，其中 CL 為抗體之輕鏈恆定區，且其中重鏈係包括式 N-VH1-連接子-VH2-CH1-CH2-CH3，其中 CH2-CH3 係相當抗體之 Fc 區。
5. 如請求項 1-4 中任一項之調配物，其中該連接子係包括 SEQ ID NO：6 之胺基酸序列。
6. 如請求項 1-4 中任一項之調配物，其中該抗體或其抗原結合片段 進一步係包括一恆定區。

7. 如請求項 6 之調配物，其中該恆定區係由 CH1、CH2、CH3 和 CL 組成之群中選出。
8. 如請求項 1 之調配物，其中該雙特異性抗體或其抗原結合片段為一人源化 IgG4 雙特異性抗體或其抗原結合片段。
9. 如請求項 1-4 中任一項之調配物，其中該抗體或其抗原結合片段之濃度為 100 mg/mL。
10. 如請求項 1-4 中任一項之調配物，其中該緩衝系統係包括至少二種緩衝劑。
11. 如請求項 1-4 中任一項之調配物，其中該緩衝系統濃度為 10 mM。
12. 如請求項 1 之調配物，其中該 Tris 緩衝劑濃度為 3.7 mM。
13. 如請求項 1 之調配物，其中該磷酸鹽緩衝劑濃度為 6.3 mM。
14. 如請求項 1 之調配物，其中該 Tris 緩衝劑濃度為 3.7 mM，而該磷酸鹽緩衝劑濃度為 6.3 mM。
15. 如請求項 1 至 4 中任一項之調配物，其中該調配物進一步係包括一非離子界面活性劑。
16. 如請求項 15 之調配物，其中該非離子界面活性劑濃度為 0.05%至 0.2% (w/v)。
17. 如請求項 15 之調配物，其中該非離子界面活性劑為聚山梨醇酯。
18. 如請求項 17 之調配物，其中該聚山梨醇酯為聚山梨醇酯 80。
19. 如請求項 18 之調配物，其中該聚山梨醇酯 80 濃度為 0.05%至 0.2% (w/v)。
20. 如請求項 19 之調配物，其中該聚山梨醇酯 80 濃度為 0.2% (w/v)。
21. 如請求項 1-4 中任一項之調配物，其中該調配物進一步係包括糖。
22. 如請求項 21 之調配物，其中該糖濃度為 5% (w/v)。
23. 如請求項 21 之調配物，其中該糖為雙糖。
24. 如請求項 23 之調配物，其中該雙糖為蔗糖。
25. 如請求項 24 之調配物，其中該蔗糖濃度為 5% (w/v)。
26. 如請求項 1 之調配物，其中該甘露醇濃度為 1%至 3% (w/v)。
27. 如請求項 1 之調配物，其中該甘露醇濃度為 3% (w/v)。
28. 如請求項 1-4 中任一項之調配物，其中該調配物為一凍乾調配物。

29. 一種安定的凍乾抗體調配物，係包括：

100 mg/mL 的雙特異性抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段係包括一包含 SEQ ID NO：2 和 4 之胺基酸序列的重鏈可變區及一包含 SEQ ID NO：1 和 3 之胺基酸序列的輕鏈可變區；

10 mM 的緩衝系統，其中該緩衝系統係包括 3.7 mM 之 Tris 緩衝劑濃度和 6.3 mM 之磷酸鹽緩衝劑濃度；

0.2% (w/v) 聚山梨醇酯 80；

5% (w/v) 蔗糖；及

3% (w/v) 甘露醇；

其中該調配物的 pH 為 pH 7。

圖式

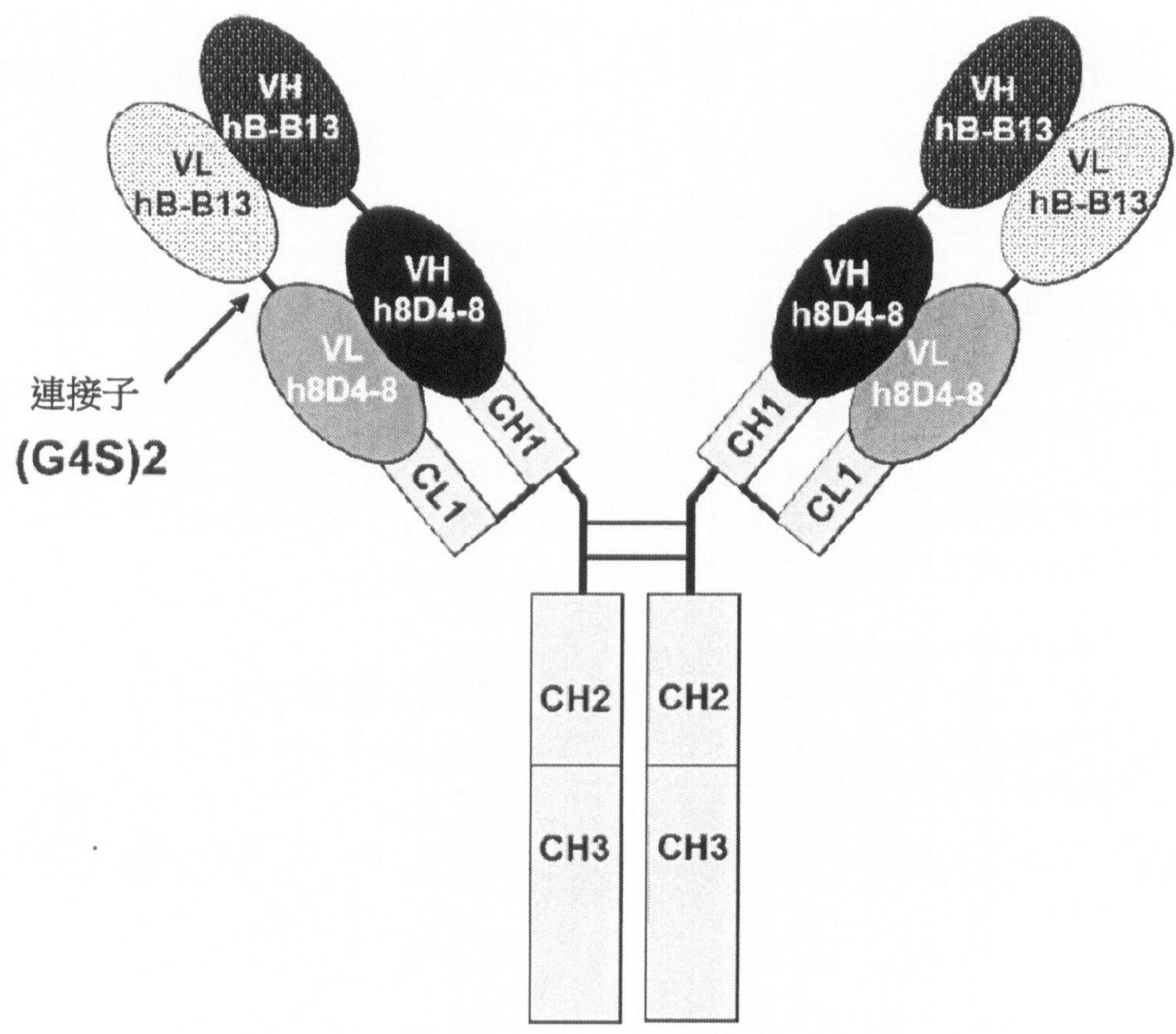


圖 1

抗-IL13 hB-B13 VL3(SEQ ID NO:1):
DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RASESVD** SYGQSYMHWY QQKAGQPPKL
LIY**LASNLES** GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YC**QQNAEDSR**
TFGGGTKLEI K

抗-IL13 hB-B13 VH2(SEQ ID NO:2):
EVQLKESGPG LVAPGGSLSI TCTVS**GFSLT** DSSINWVRQP PGKGLEWLGM
IWG**DGRIDYA** DALKSRLSIS KDSSKSQVFL EMTSLRTDDT ATYYCARDGY
FPYAMDFWGQ GTSVTVSS

抗-IL4 h8D4-8 VL1(SEQ ID NO:3):
DIQMTQSPAS LSVSVGDIIT LTC**HASQNID** VWLSWFQQKP GNIPKLLIYK
ASNLHTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYC**QQ** AHSYPFTFGG
GTKLEIKR

抗-IL4 h8D4-8 VH1(SEQ ID NO:4):
QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT** SYWIHWIKQR PGQGLEWIGM
IDPSDGETRL NQRFQGRATL TVDE**ST**STAY MQLRSPTSED SAVYYCTRL**LK**
EYGNYSFYF DVWGAGTLVT VSSA

抗-IL4 h8D4-8 VH2(SEQ ID NO:5):
QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT** SYWIHWIKQR PGQGLEWIGM
ID**AS**DGETRL NQRFQGRATL TVDE**ST**STAY MQLRSPTSED SAVYYCTRL**LK**
EYGNYSFYF DVWGAGTLVT VSSA

圖 2

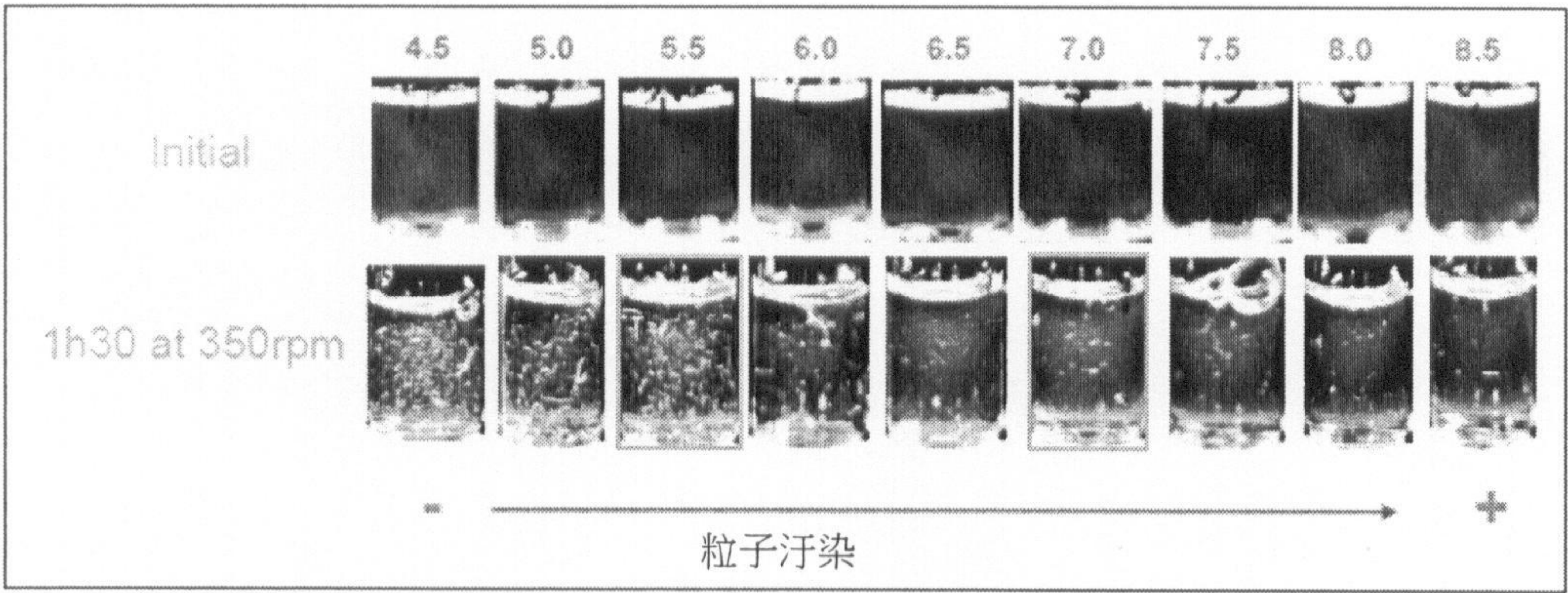


圖 3

9

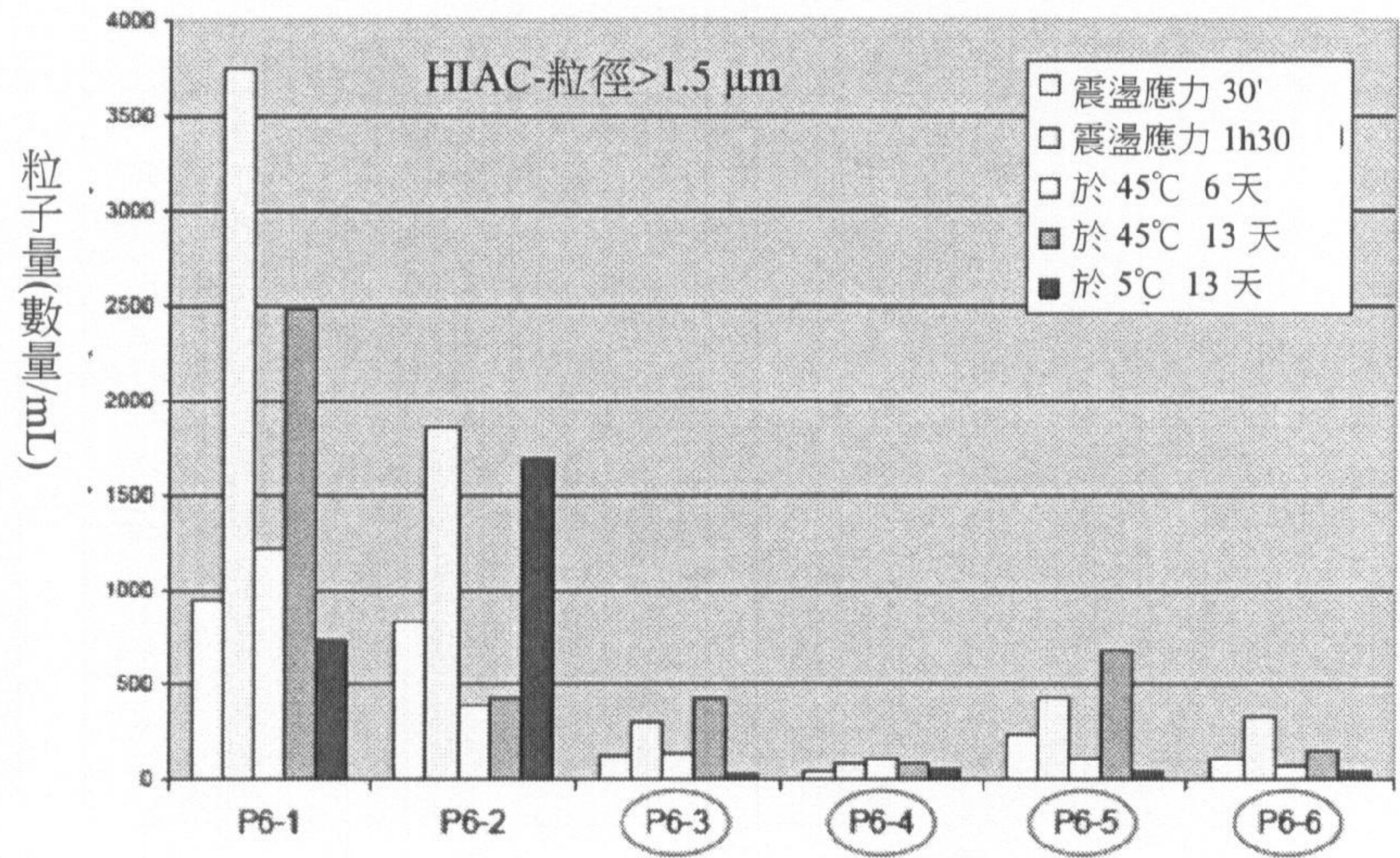


圖 4

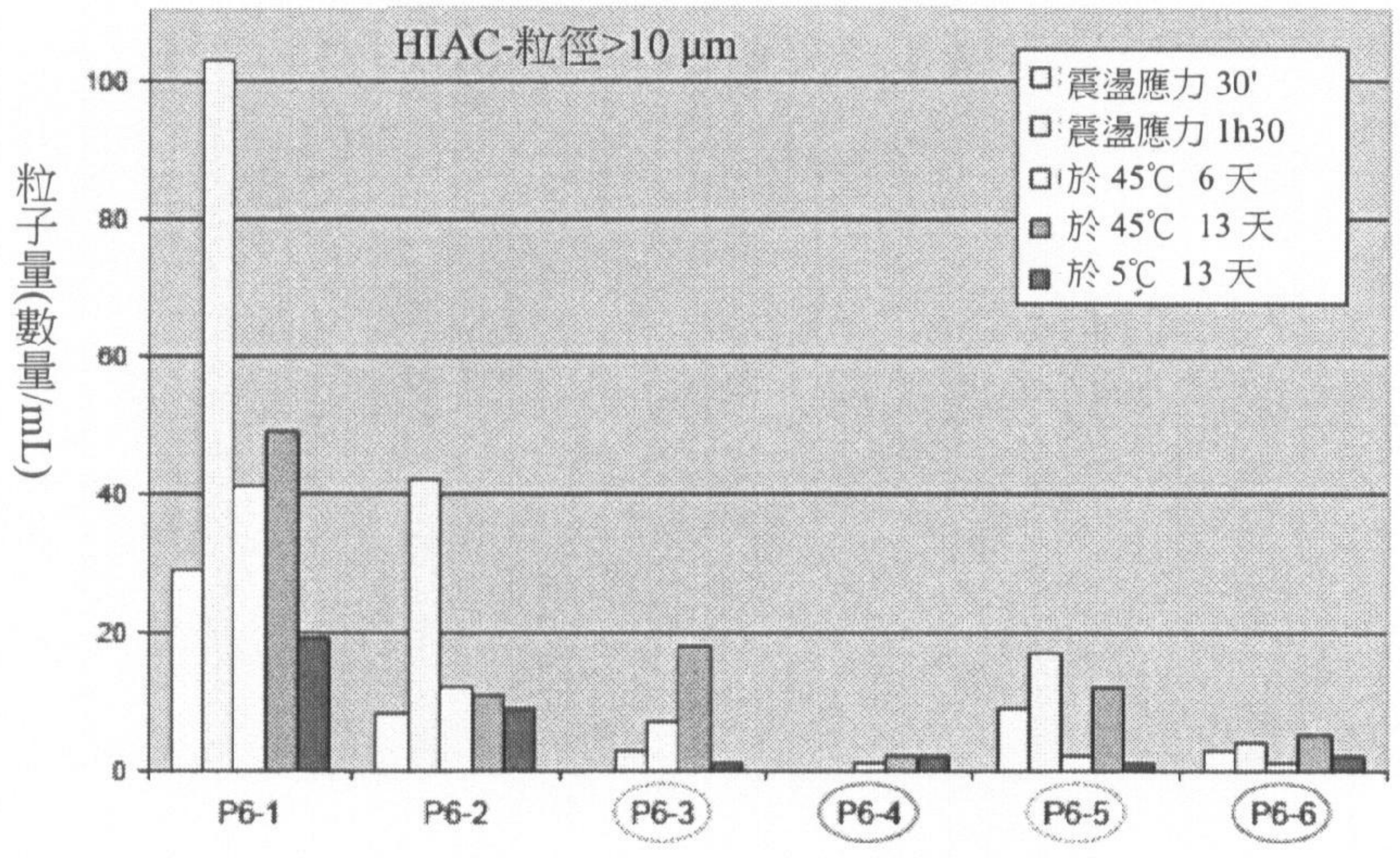


圖 5

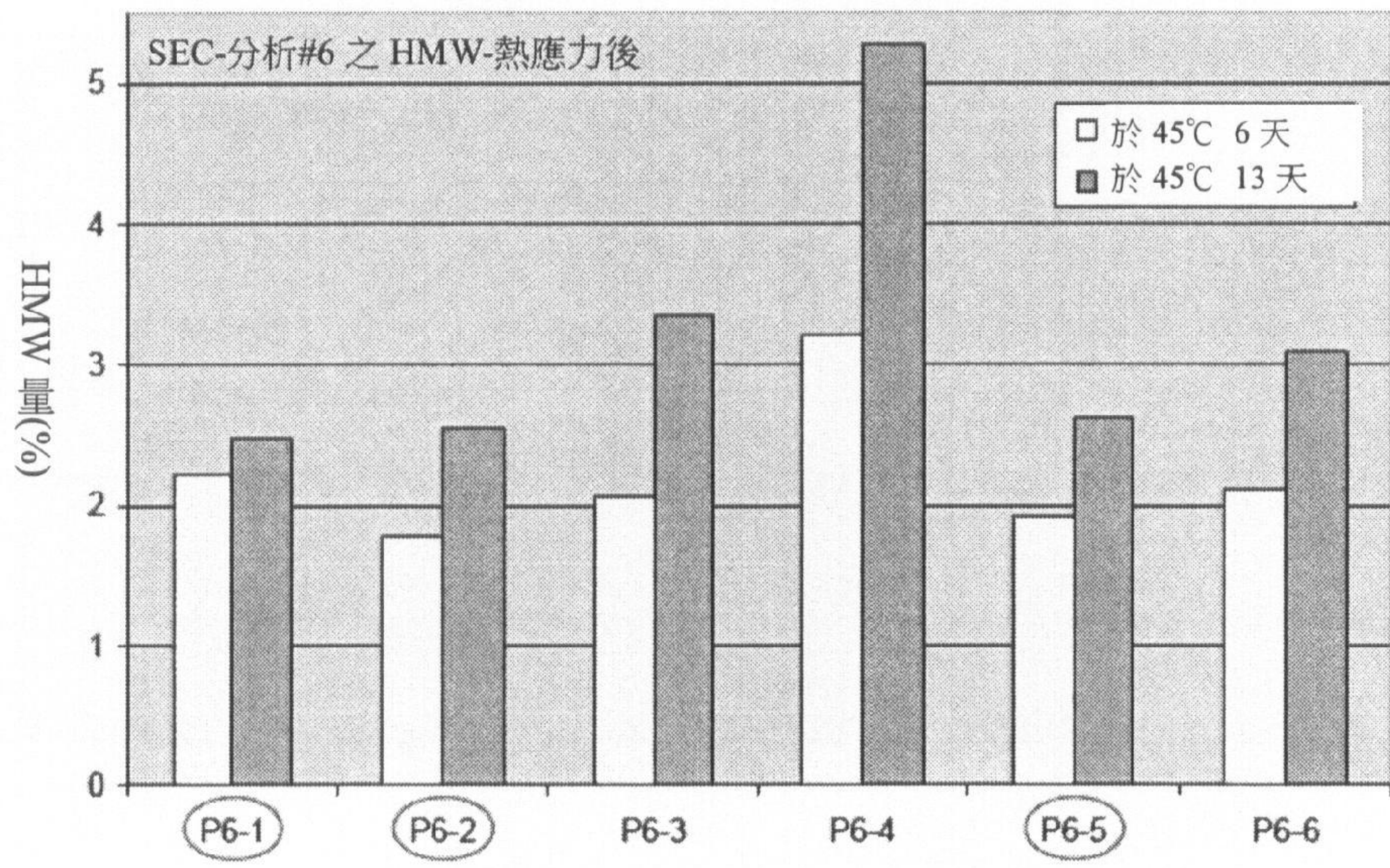


圖 6

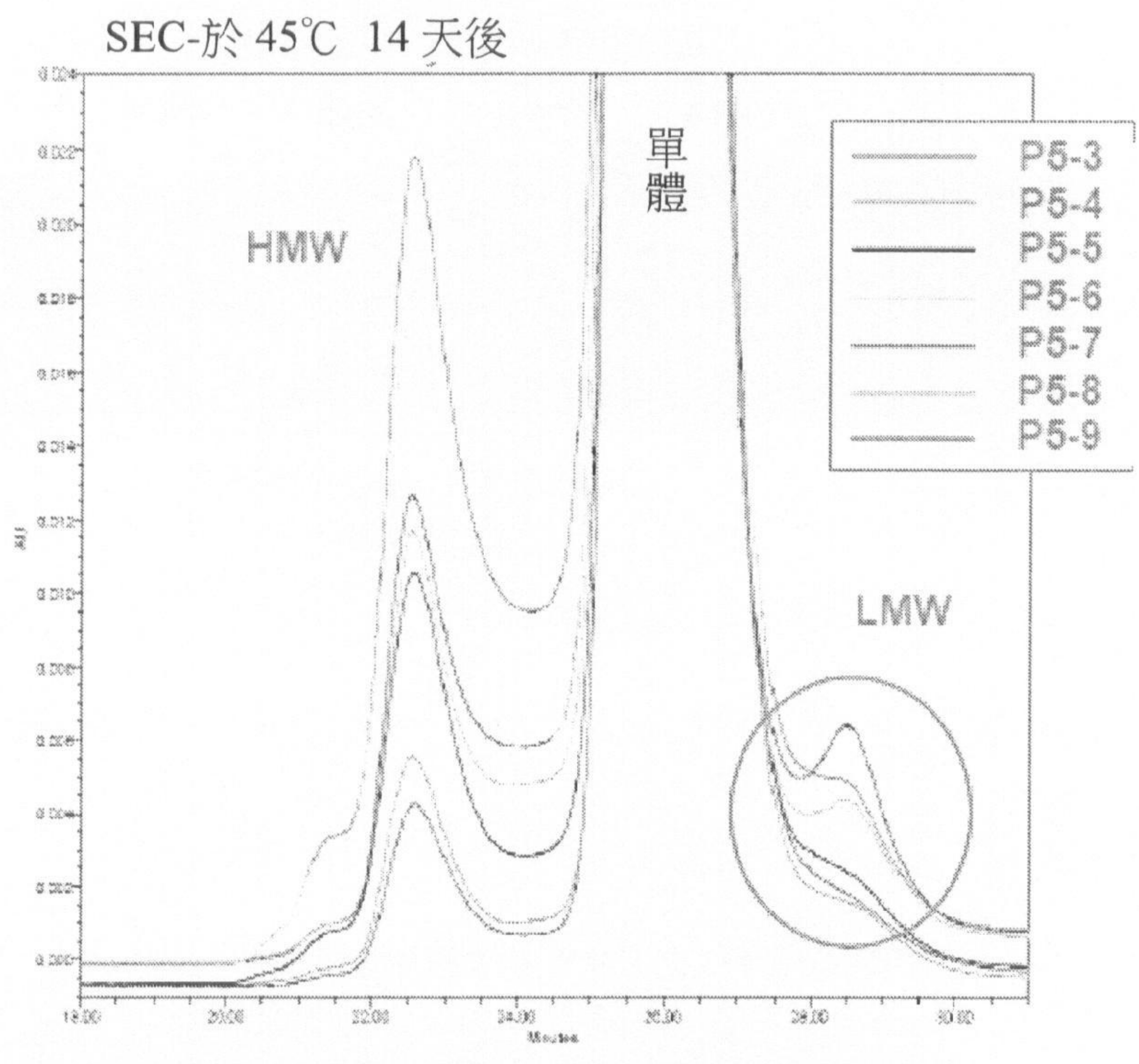


圖 7

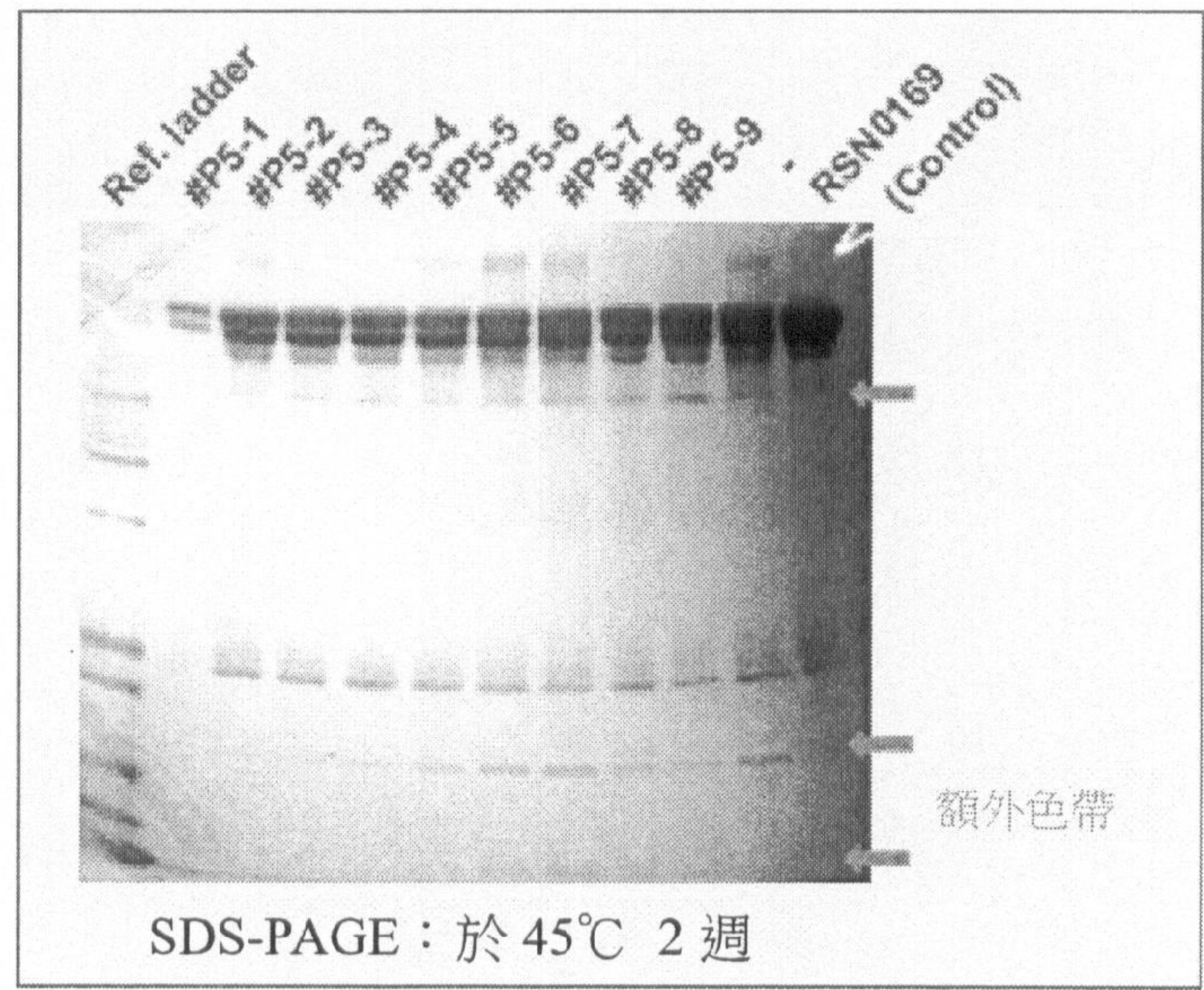


圖 8

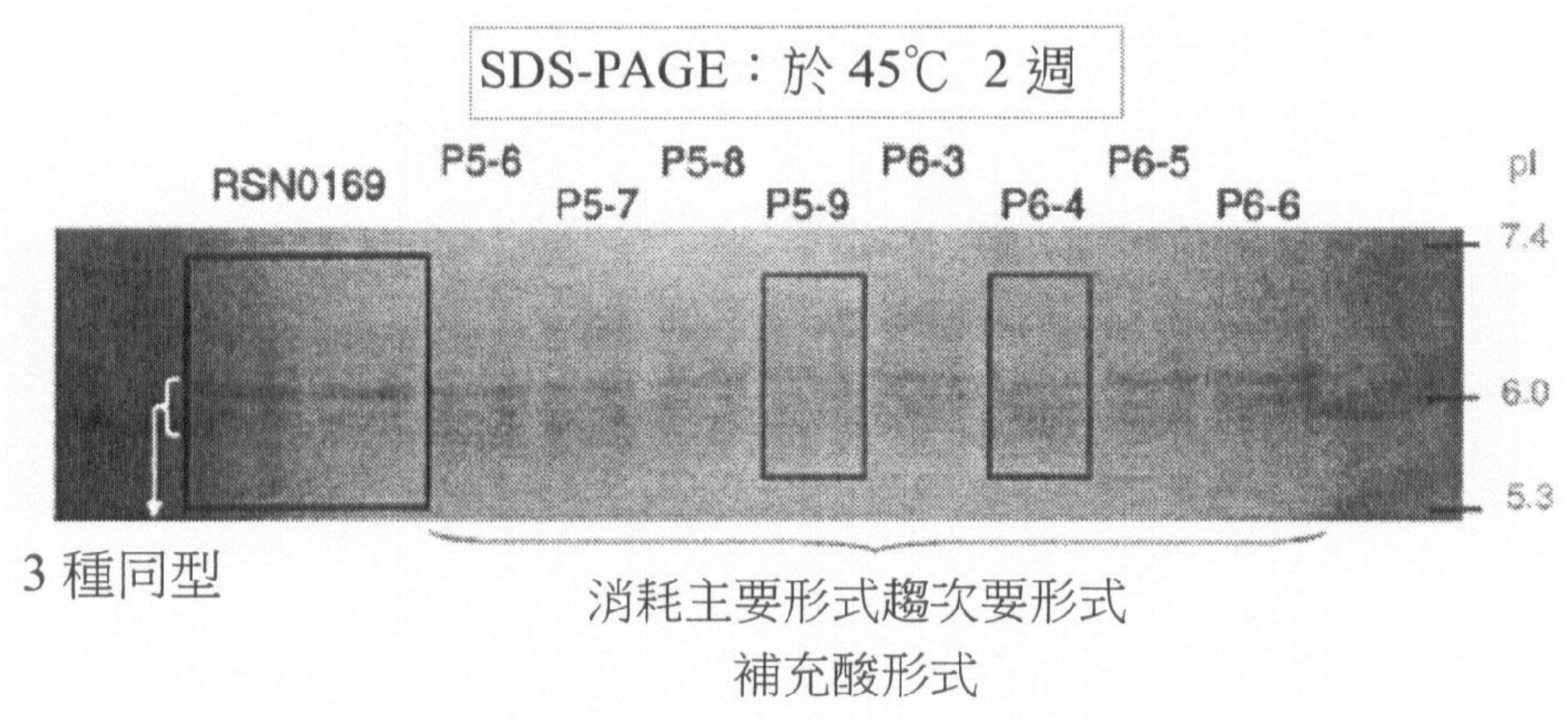


圖 9

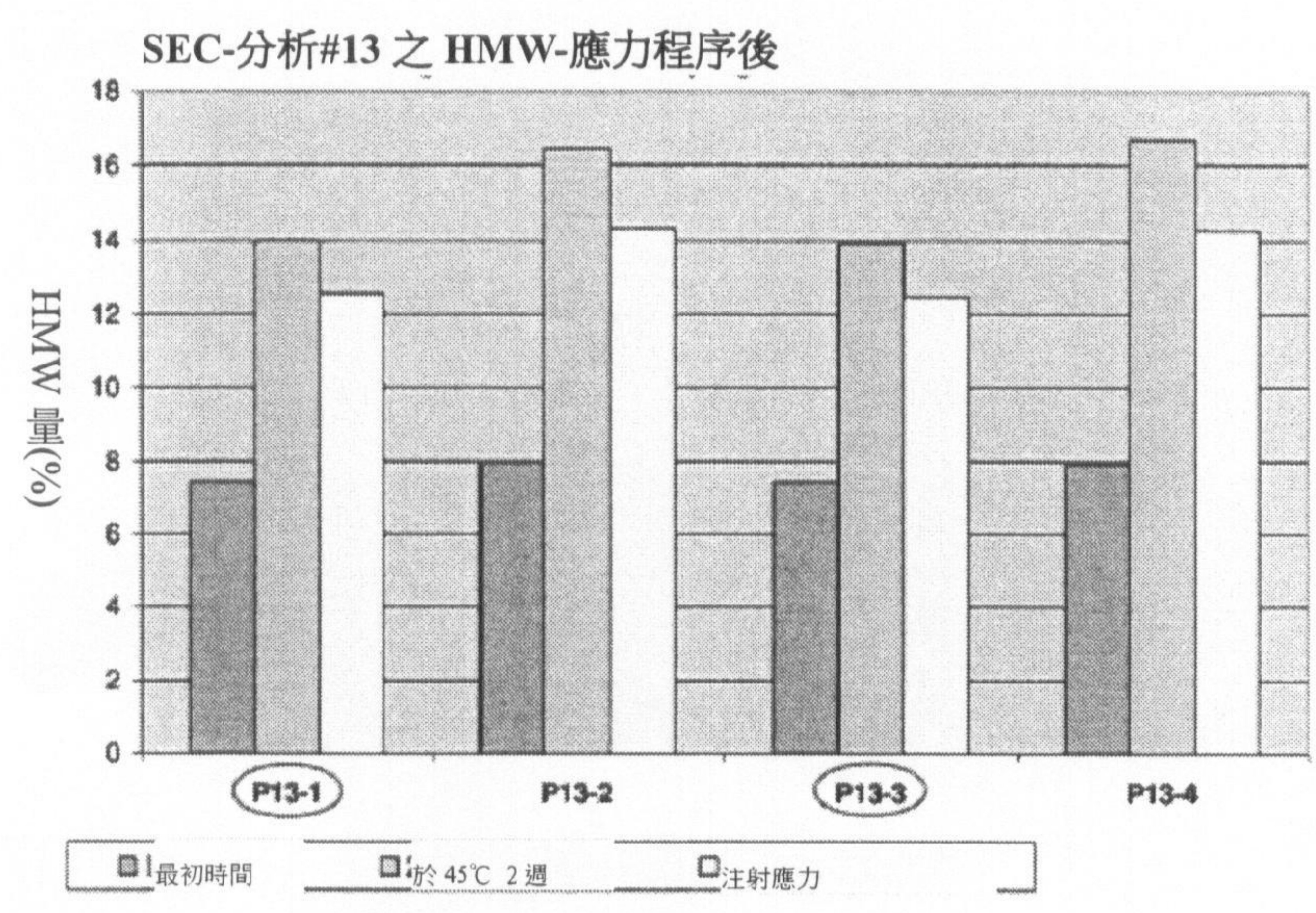


圖 10

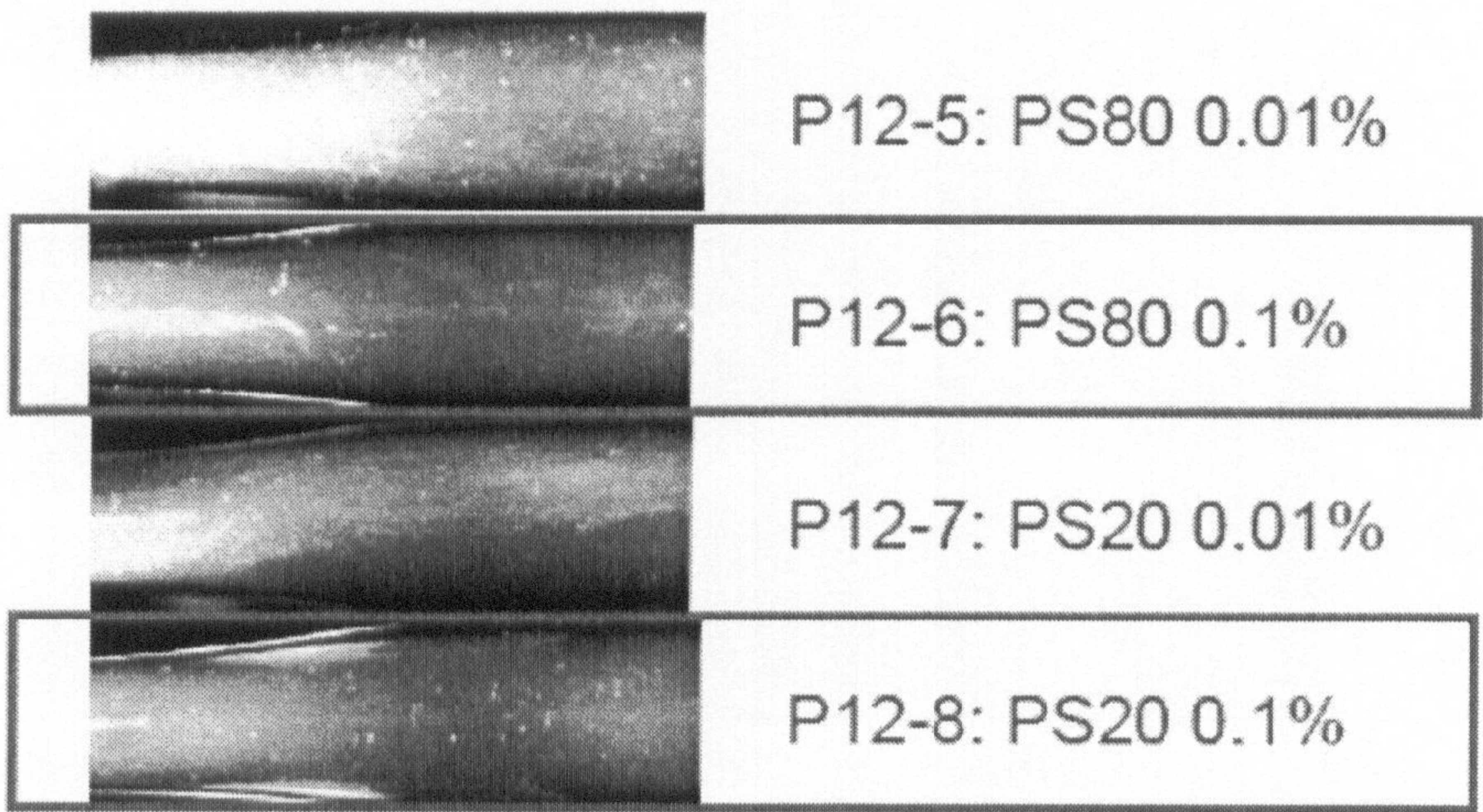


圖 11

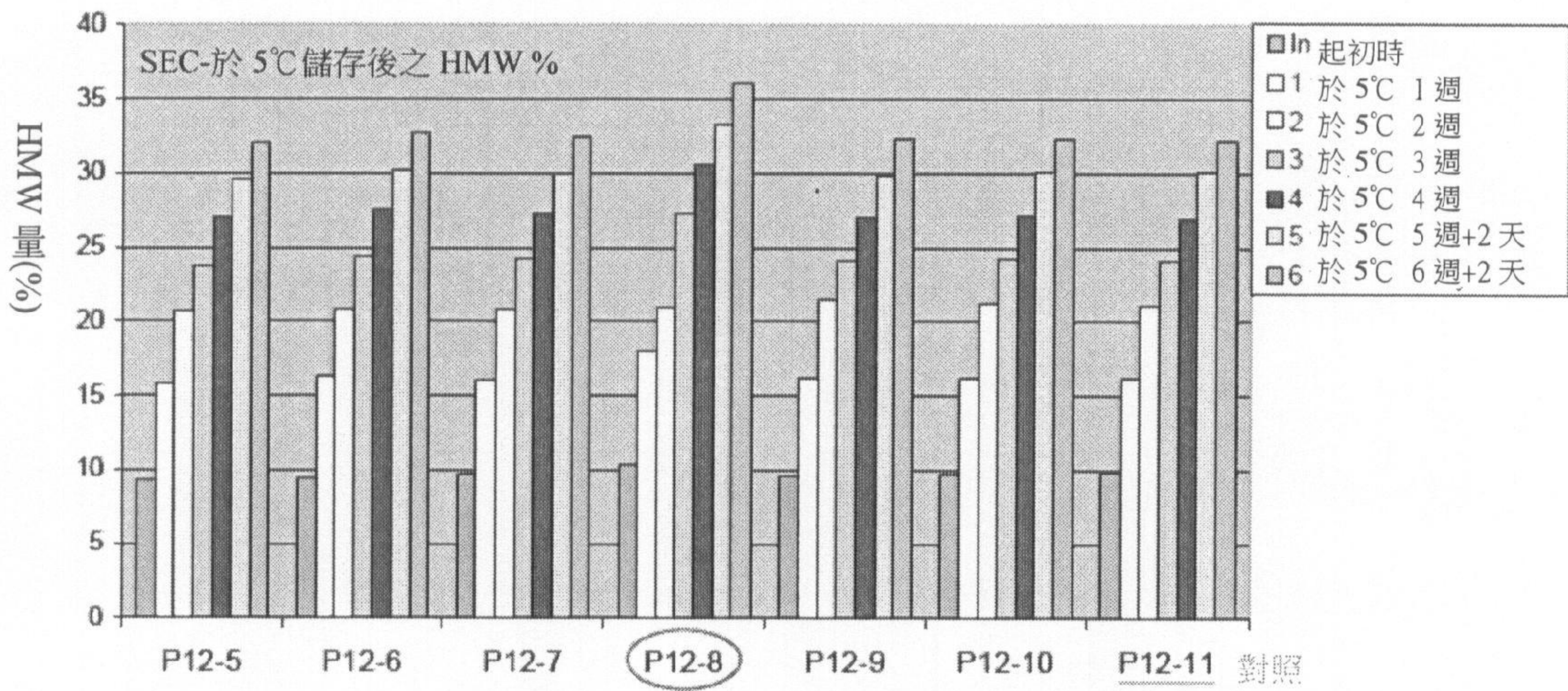


圖 12

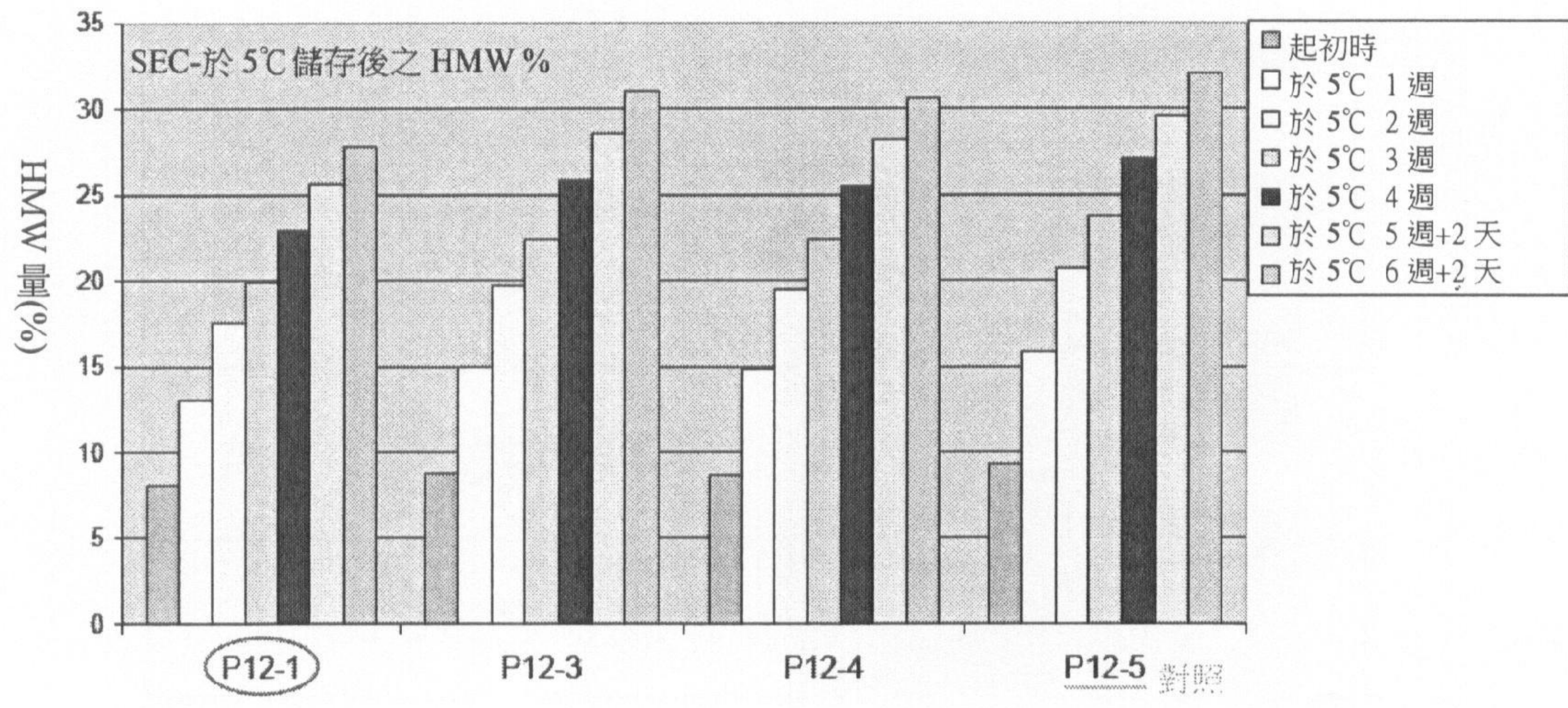


圖 13

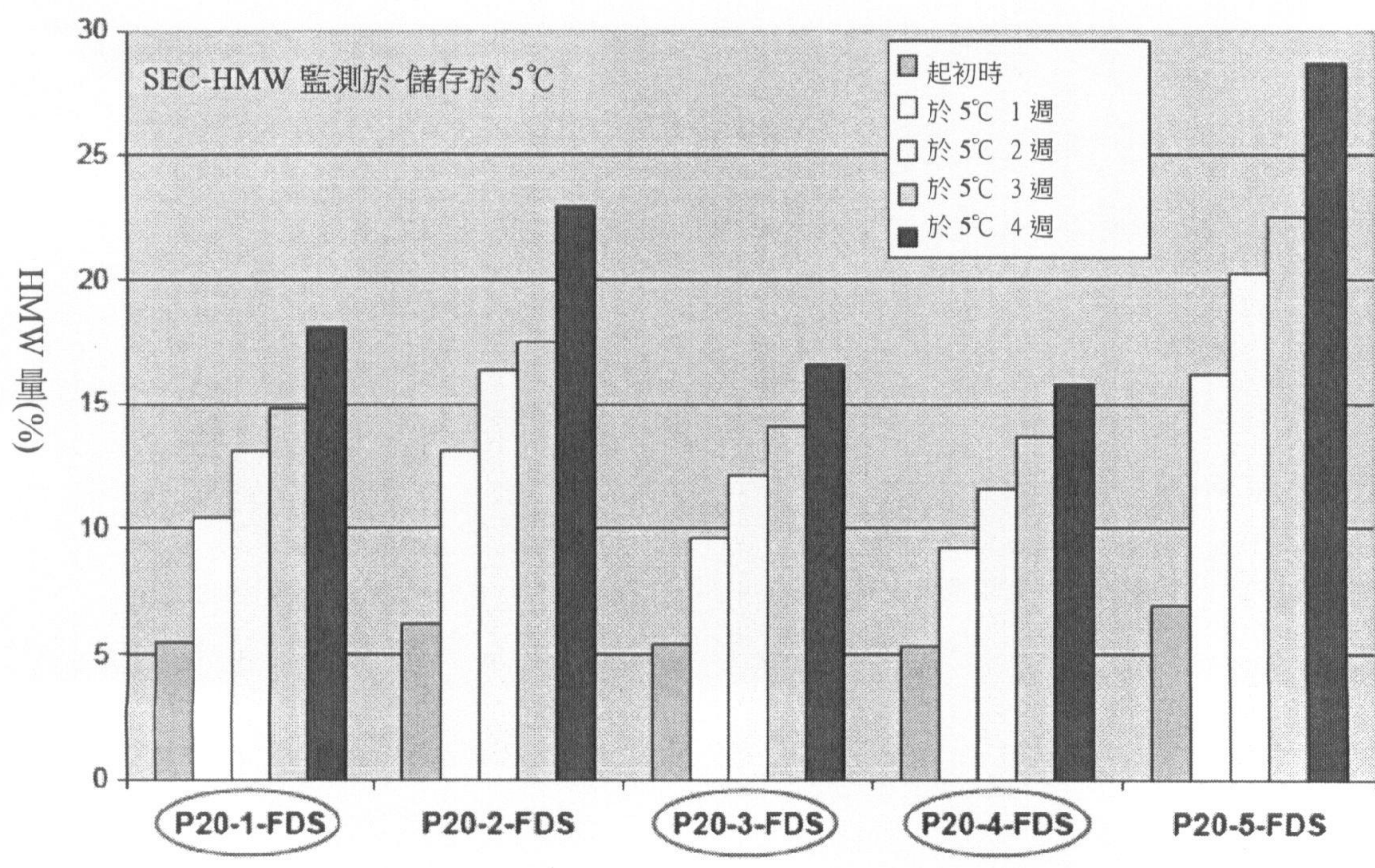


圖 14

S

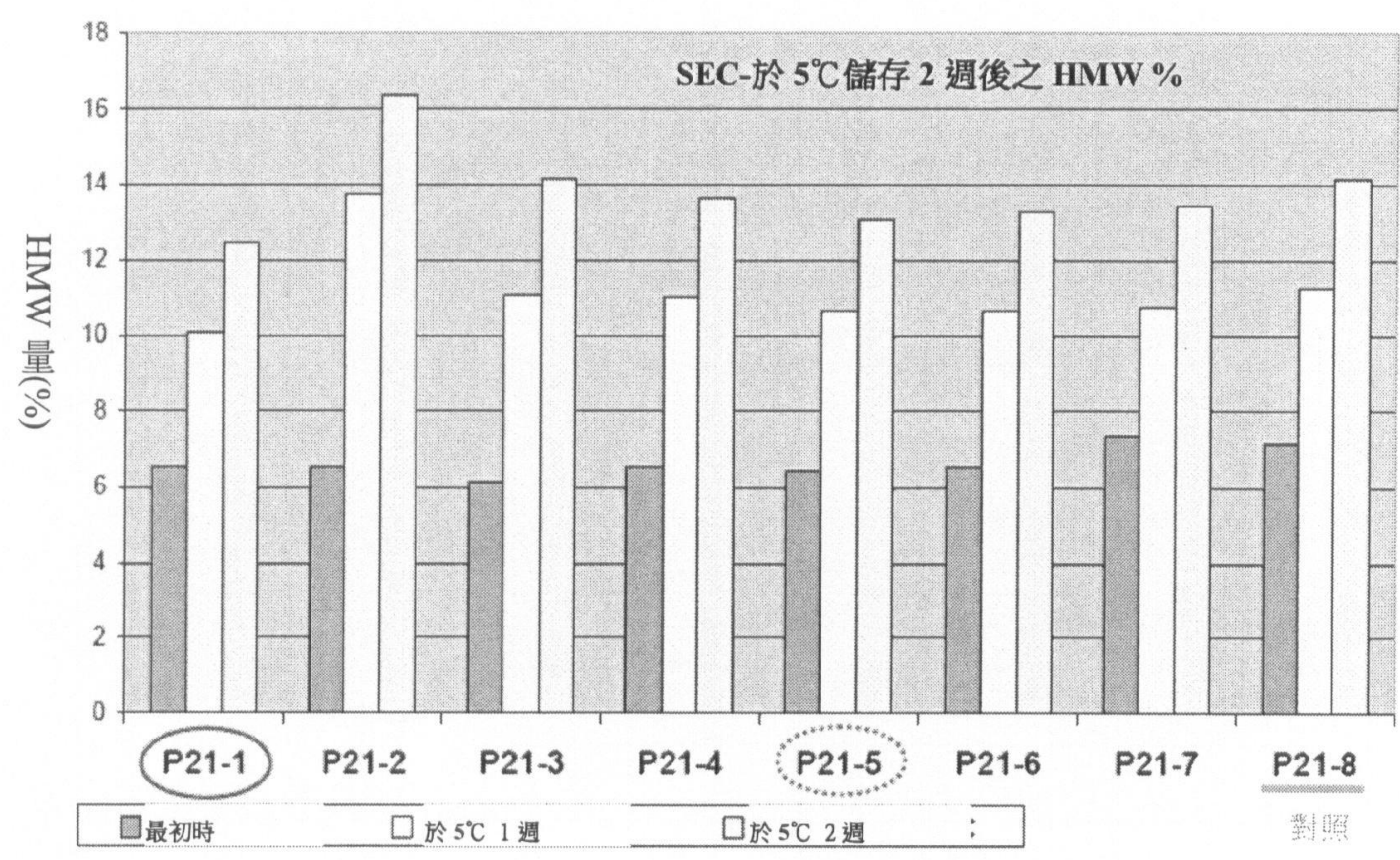


圖 15

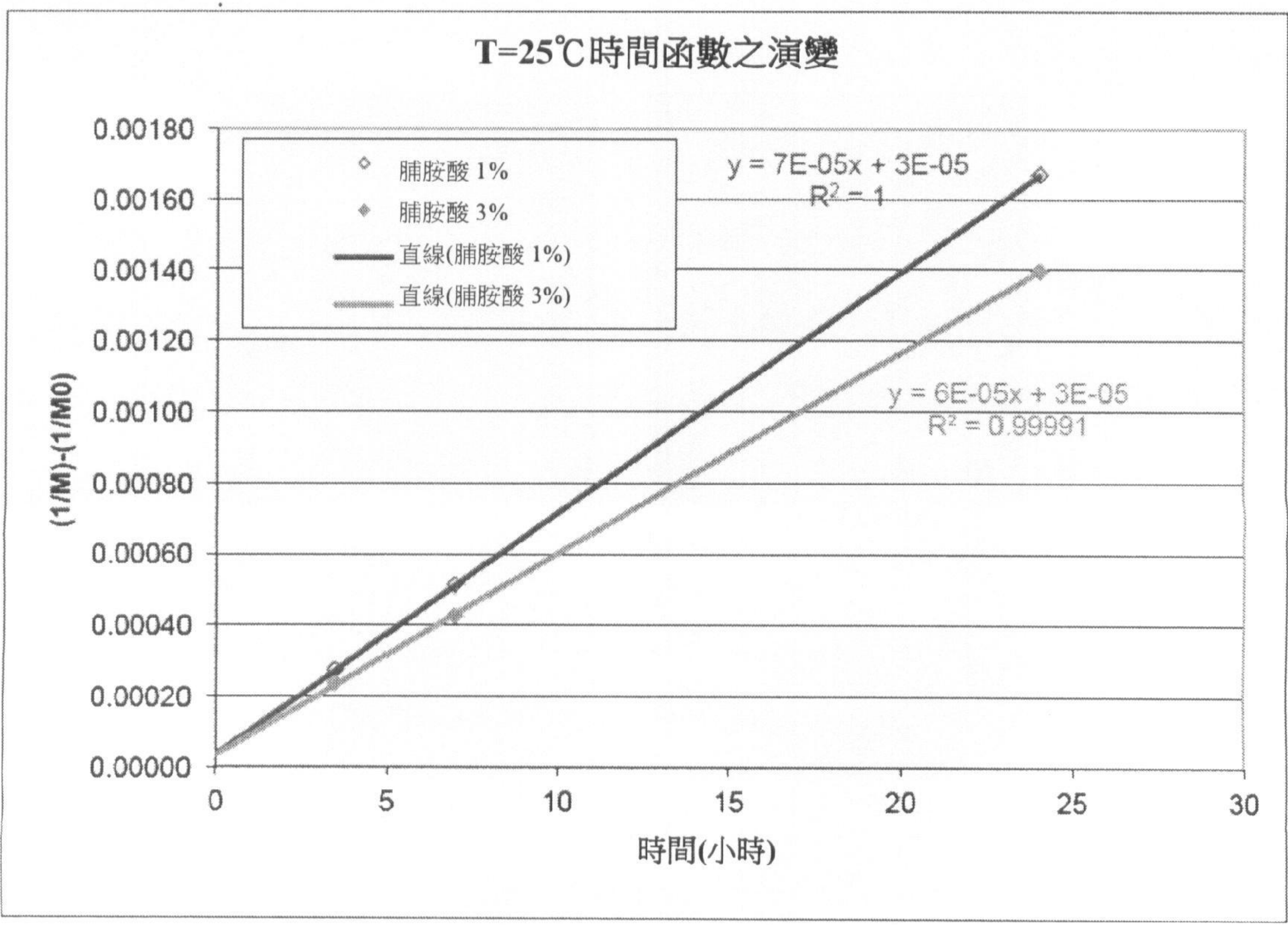


圖 16

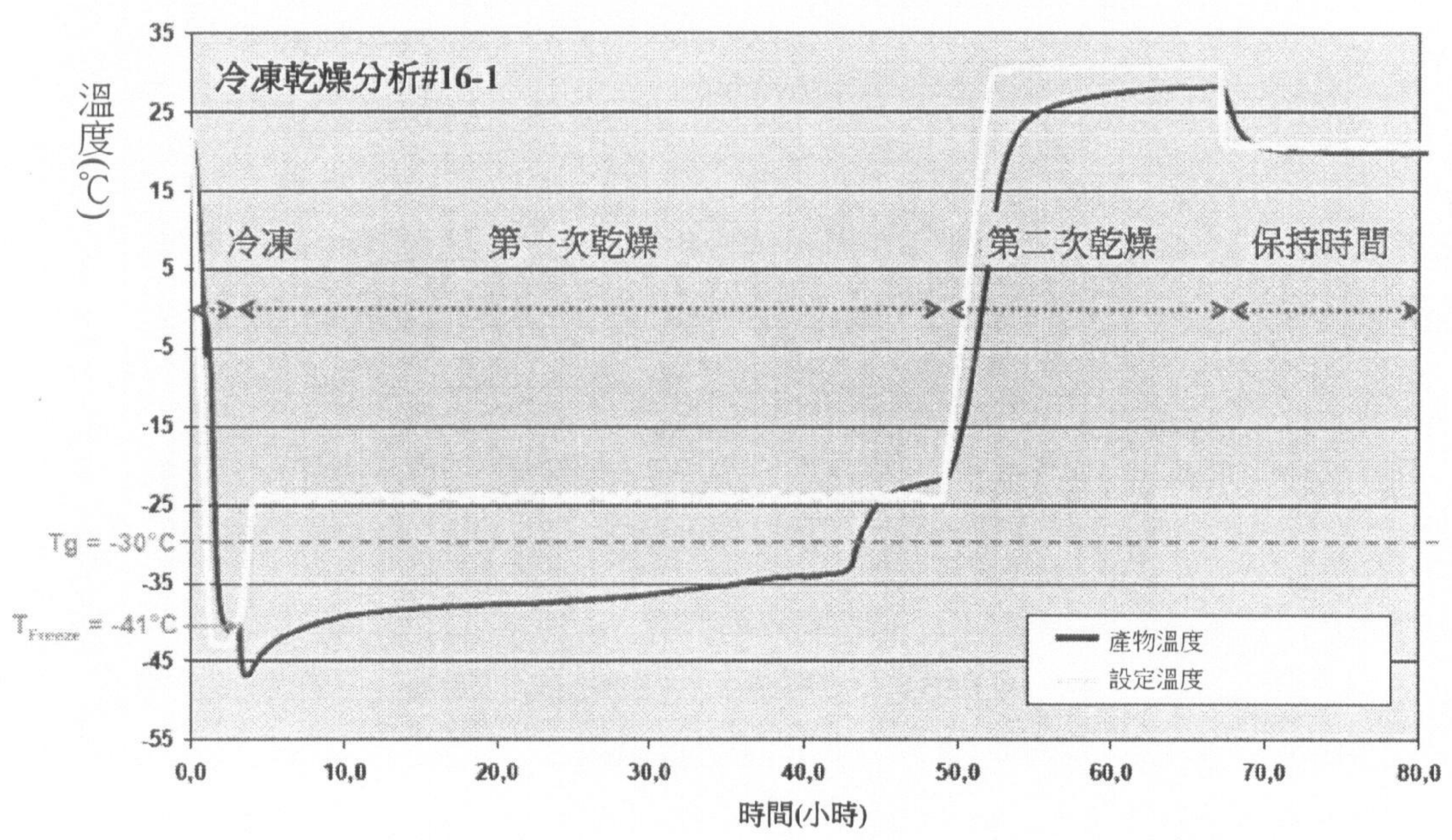


圖 17

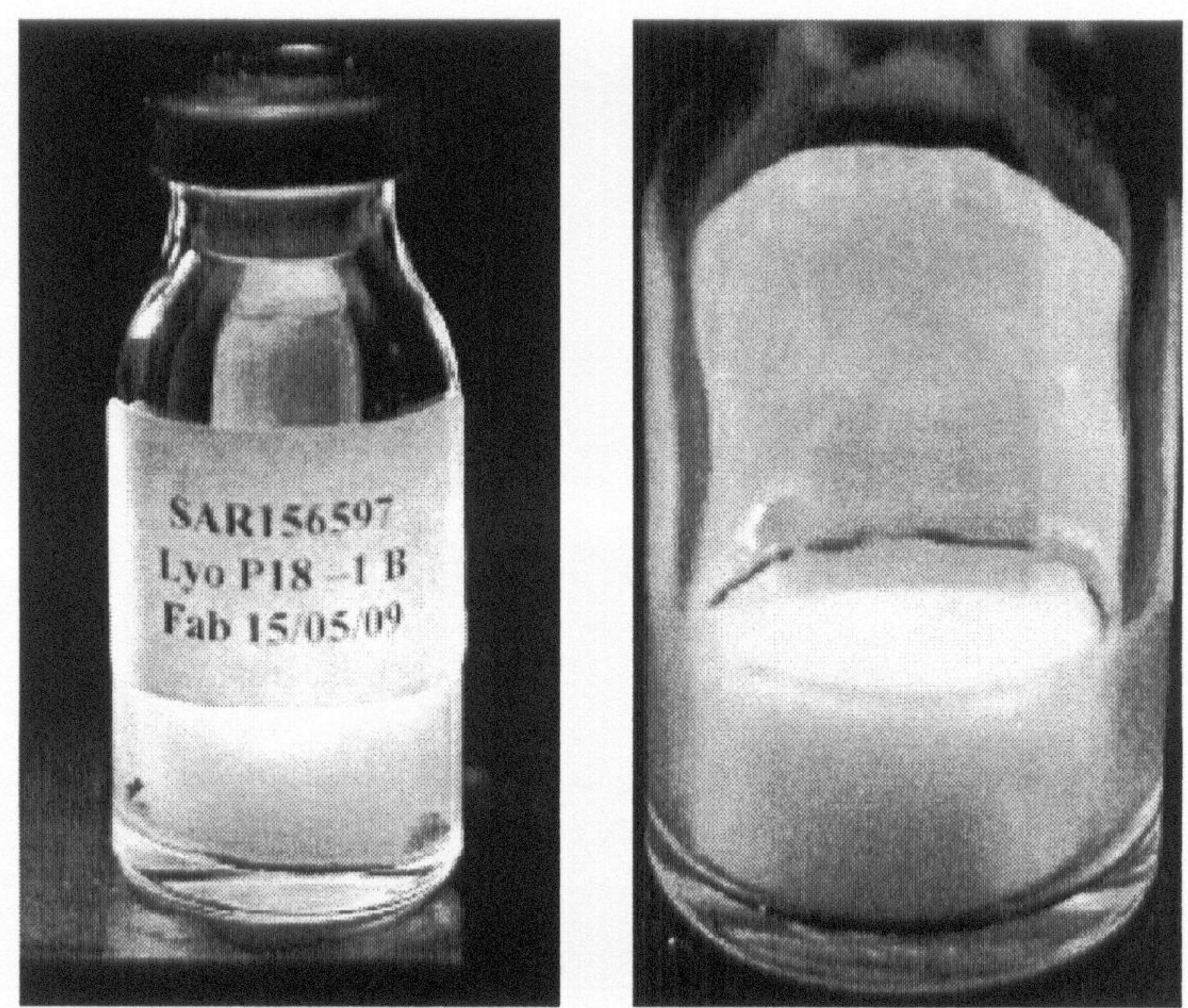


圖 18

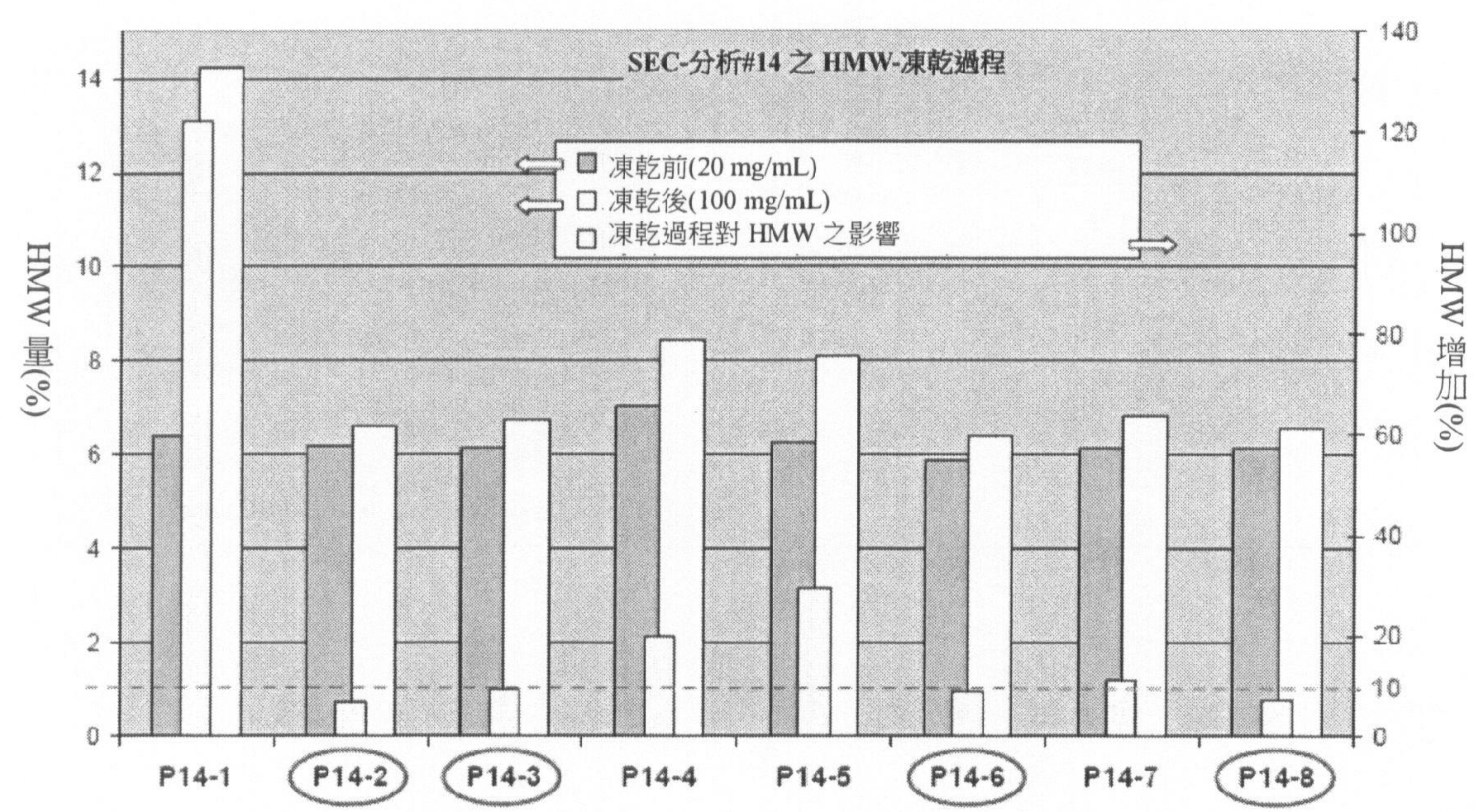


圖 19

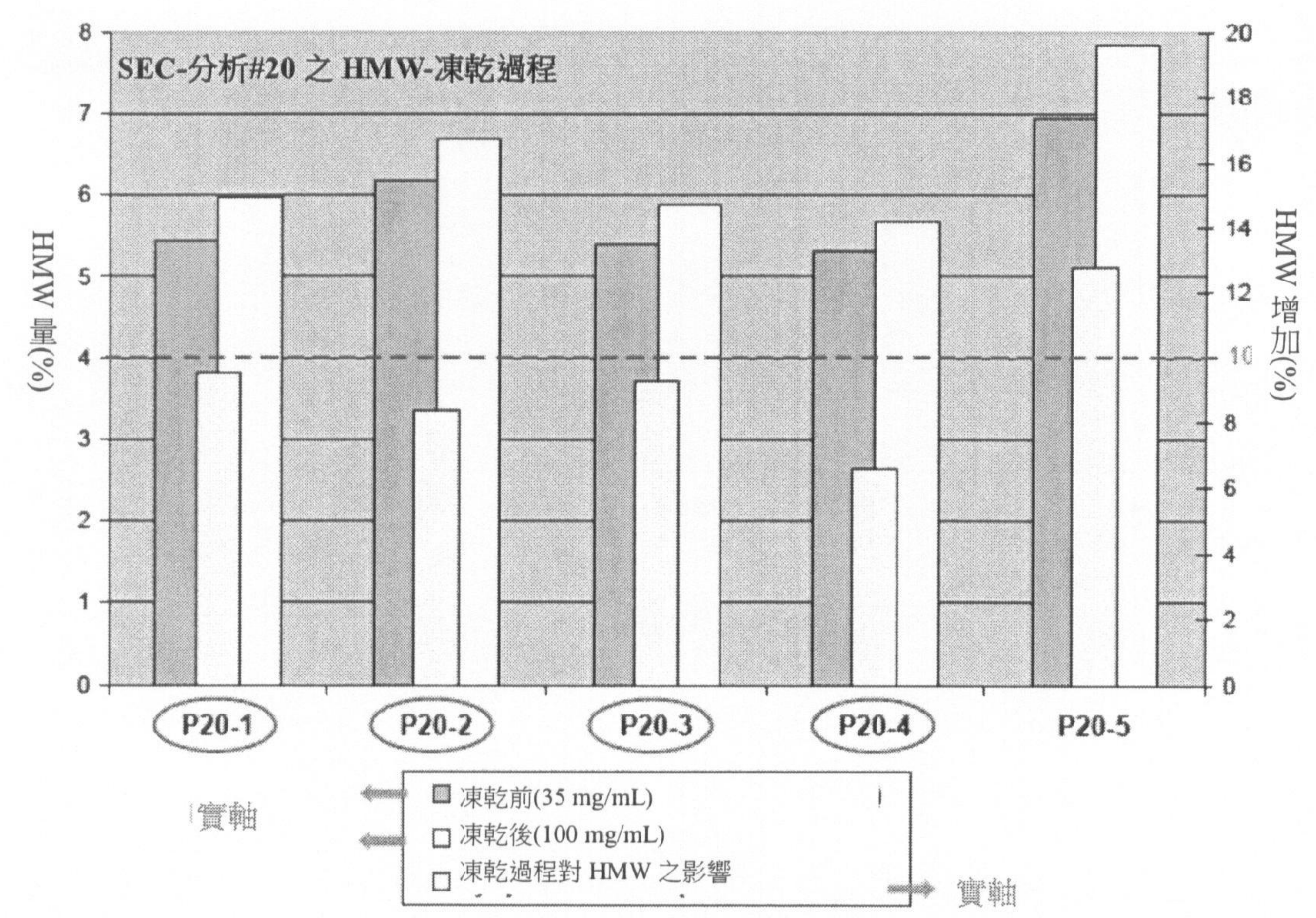


圖 20

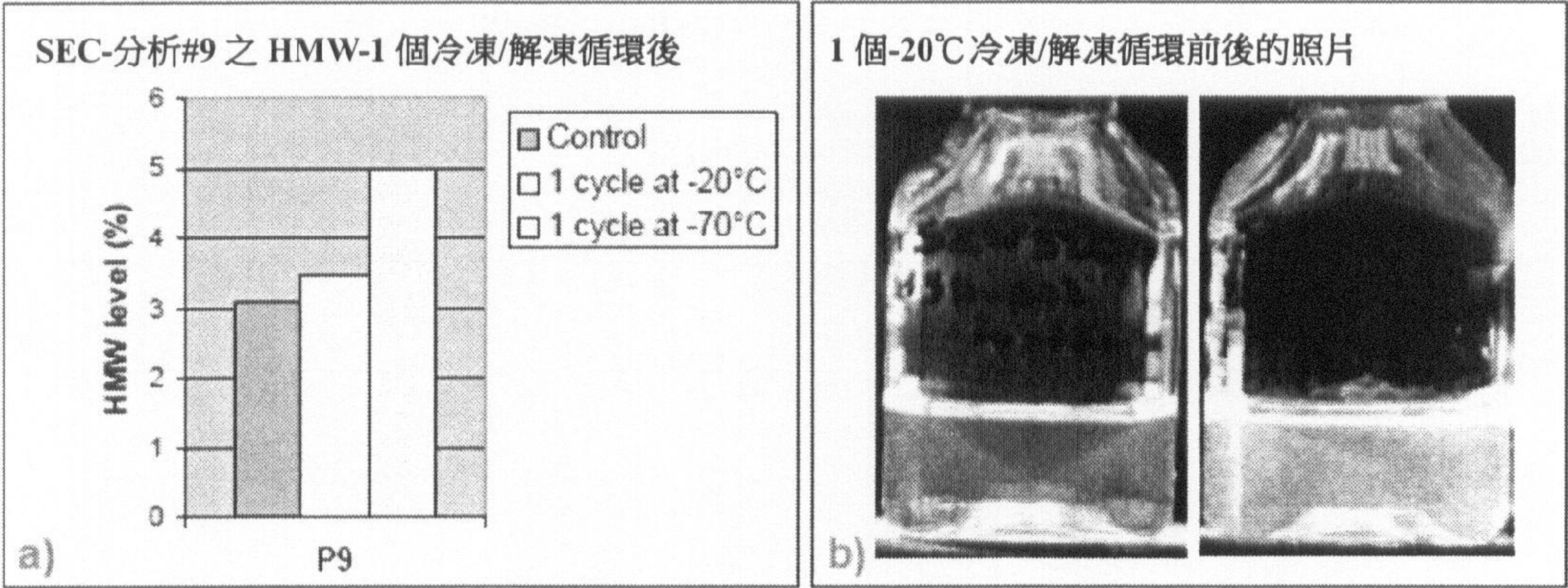


圖 21

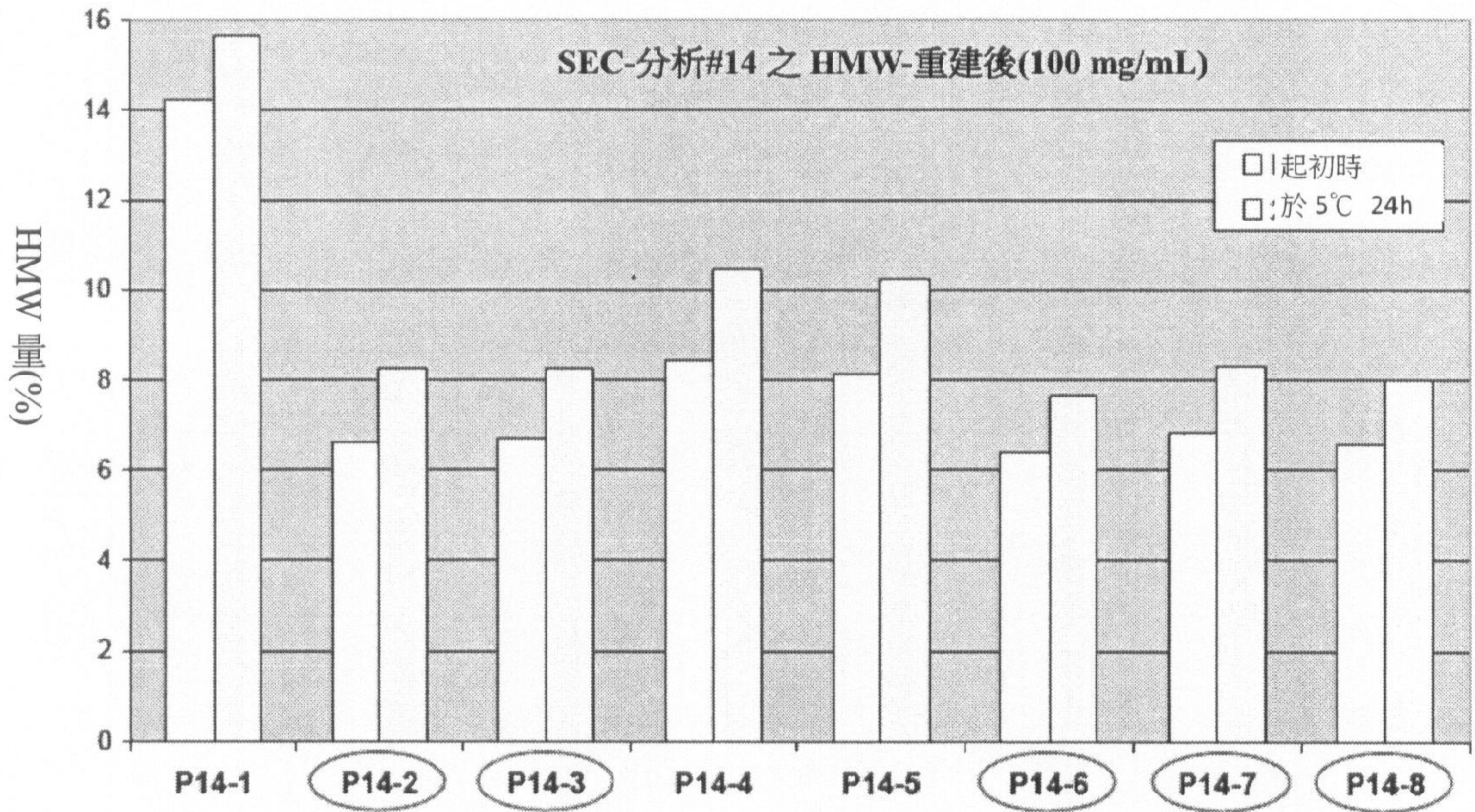


圖 22

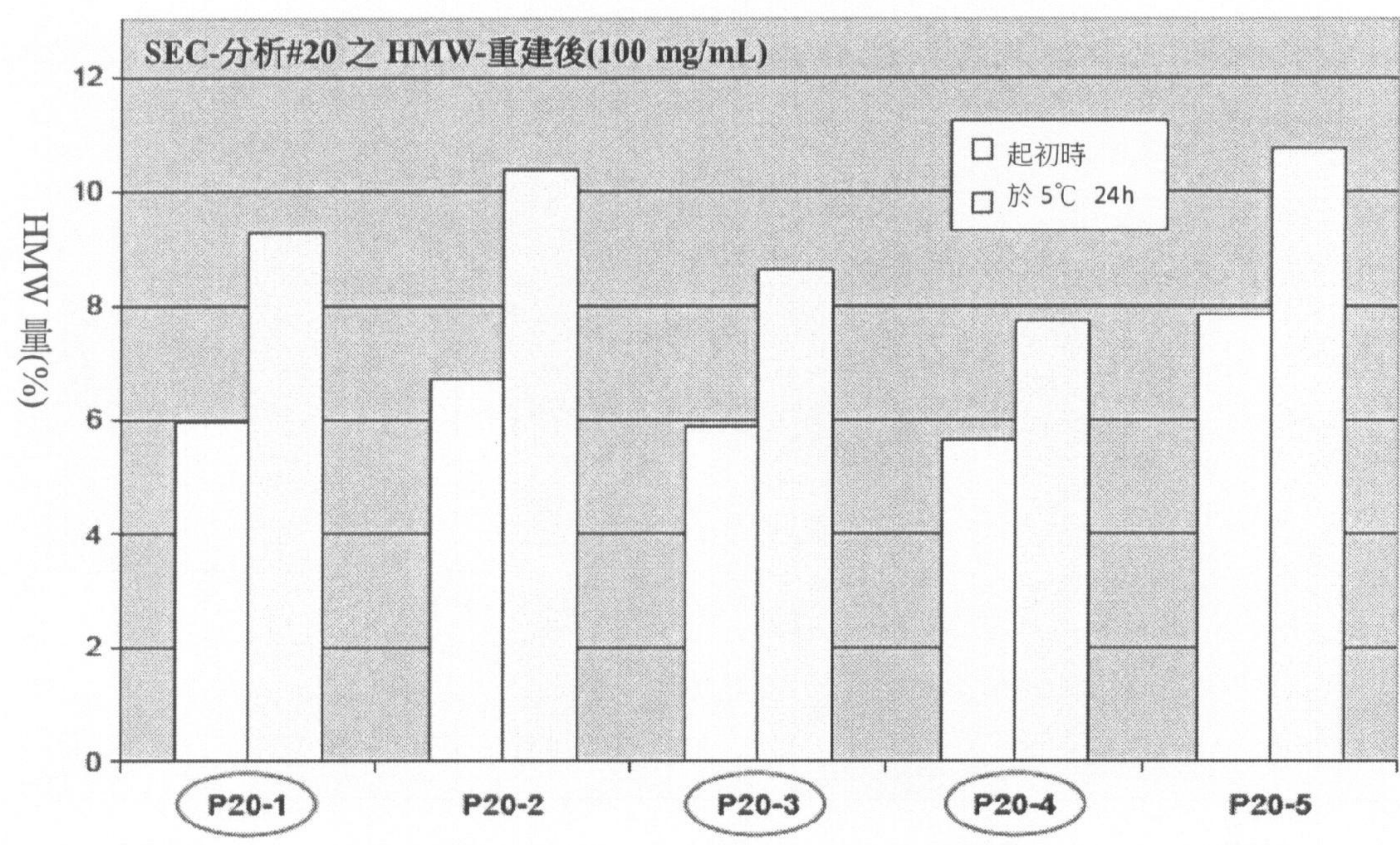


圖 23

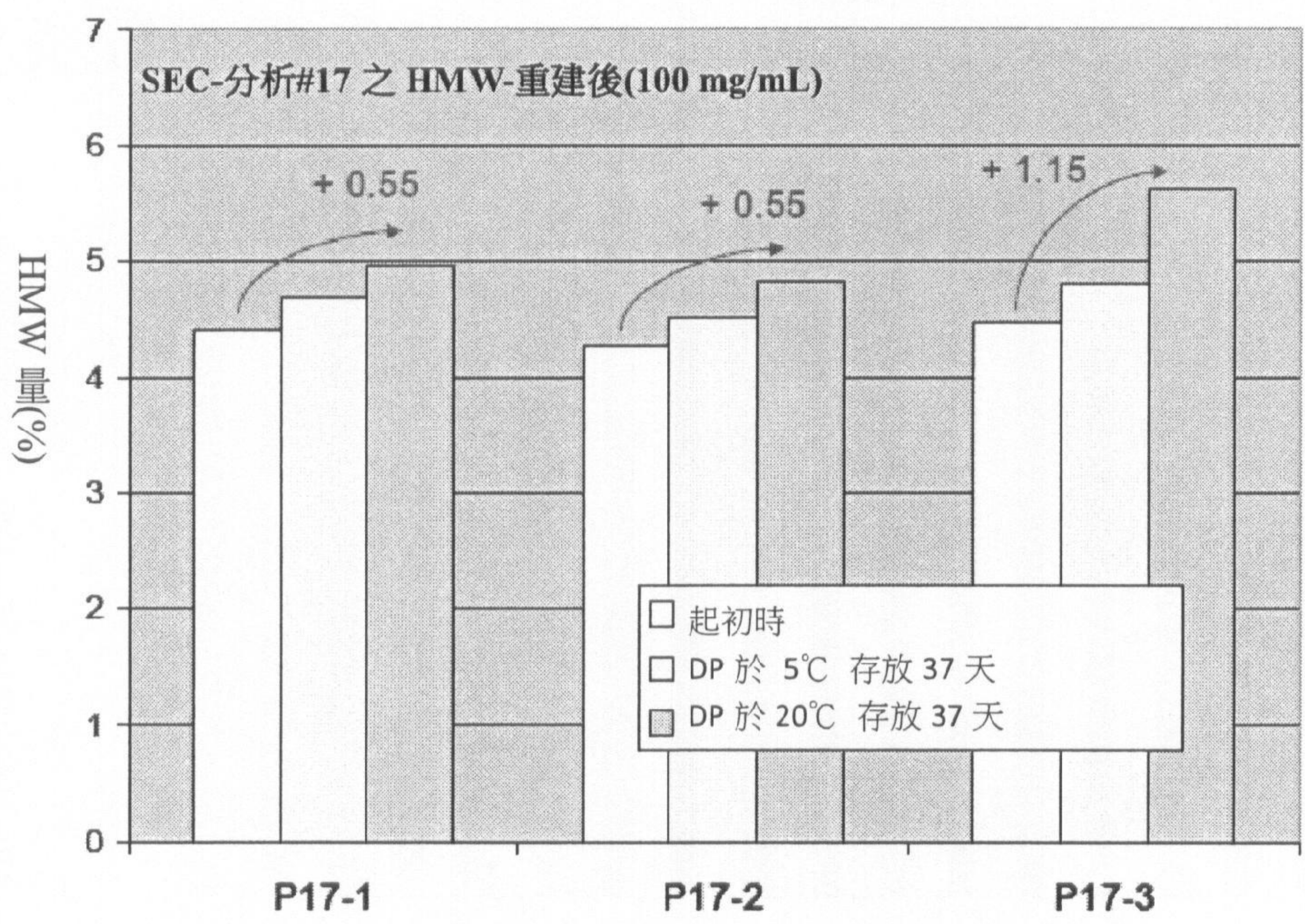


圖 24

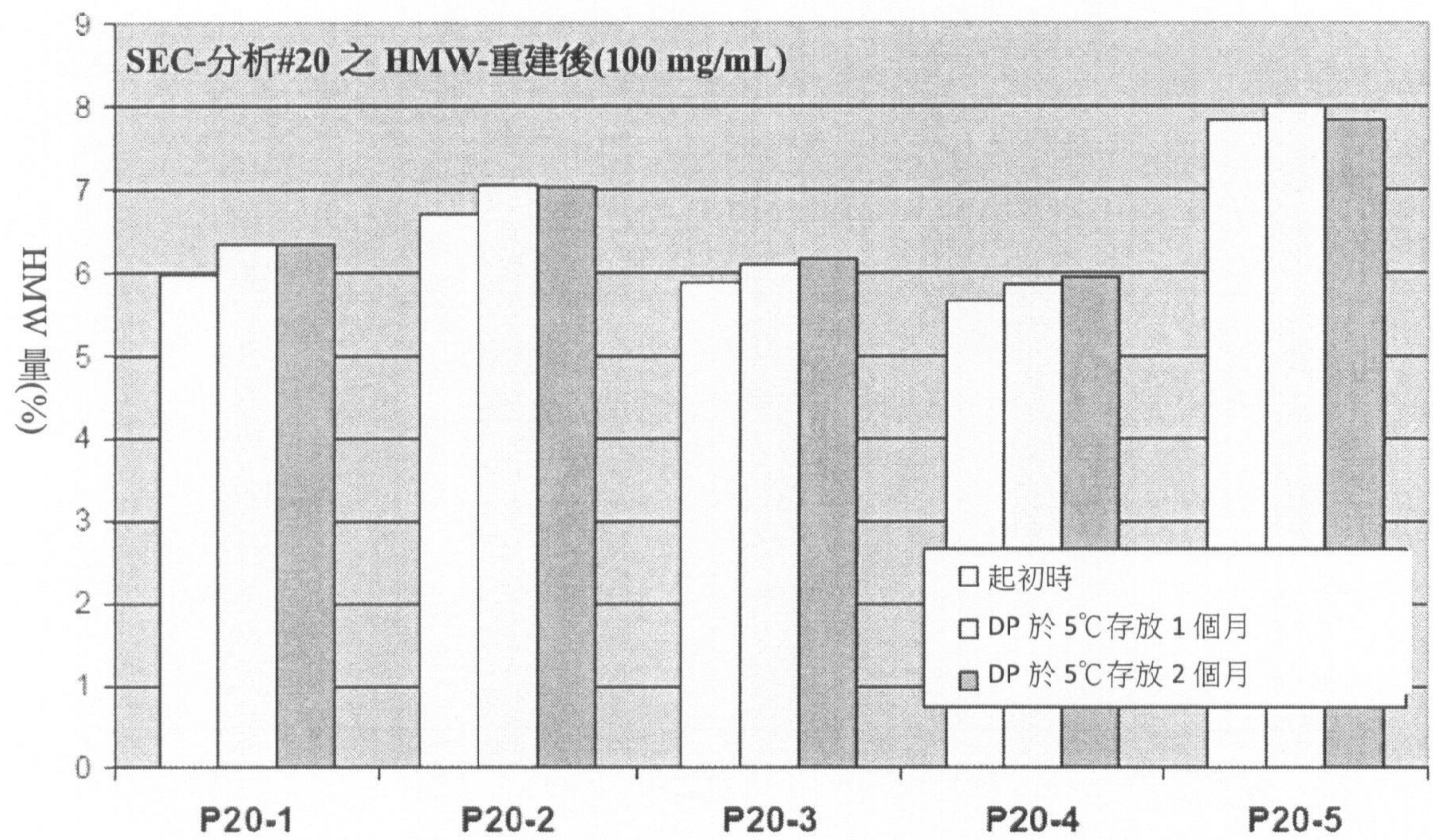


圖 25

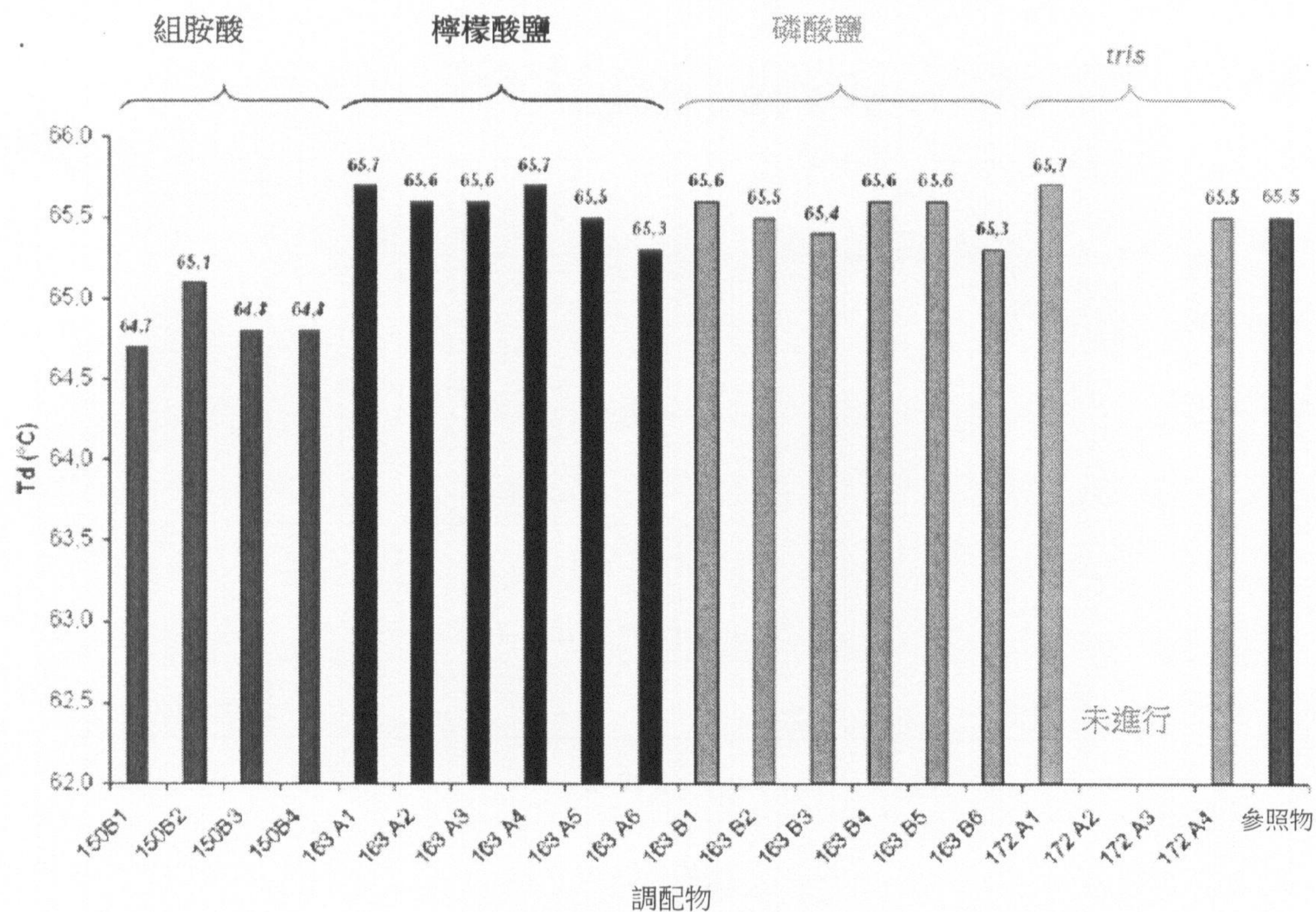
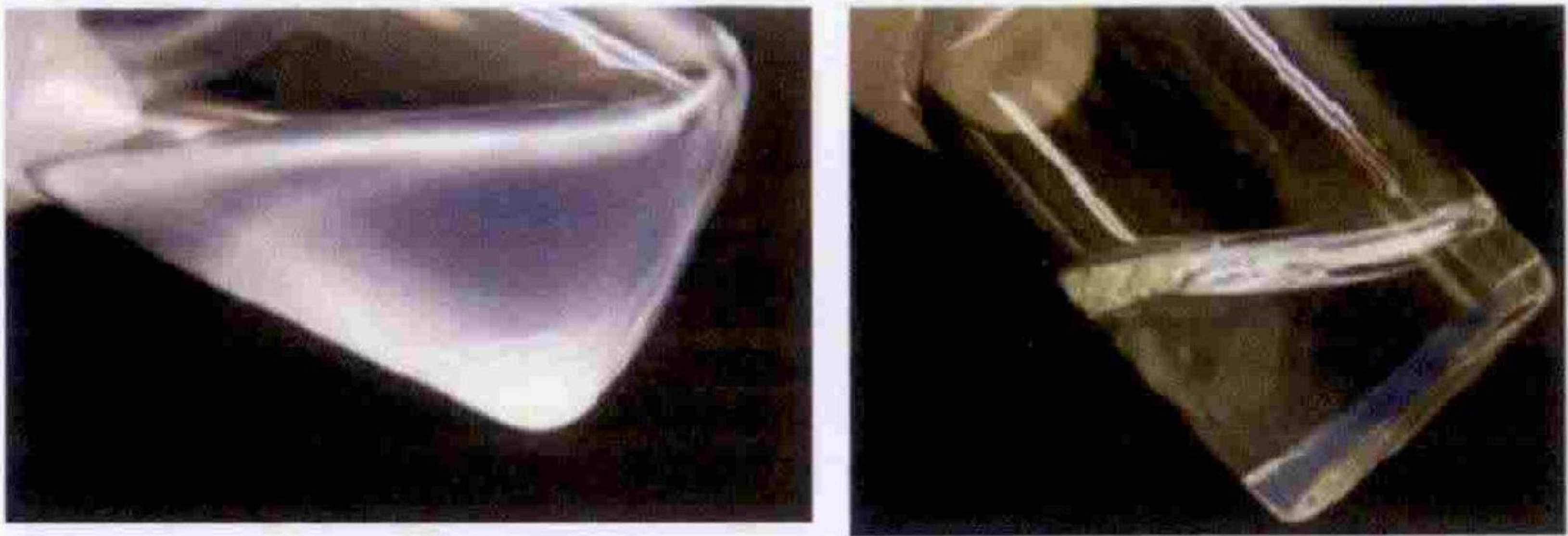


圖 26



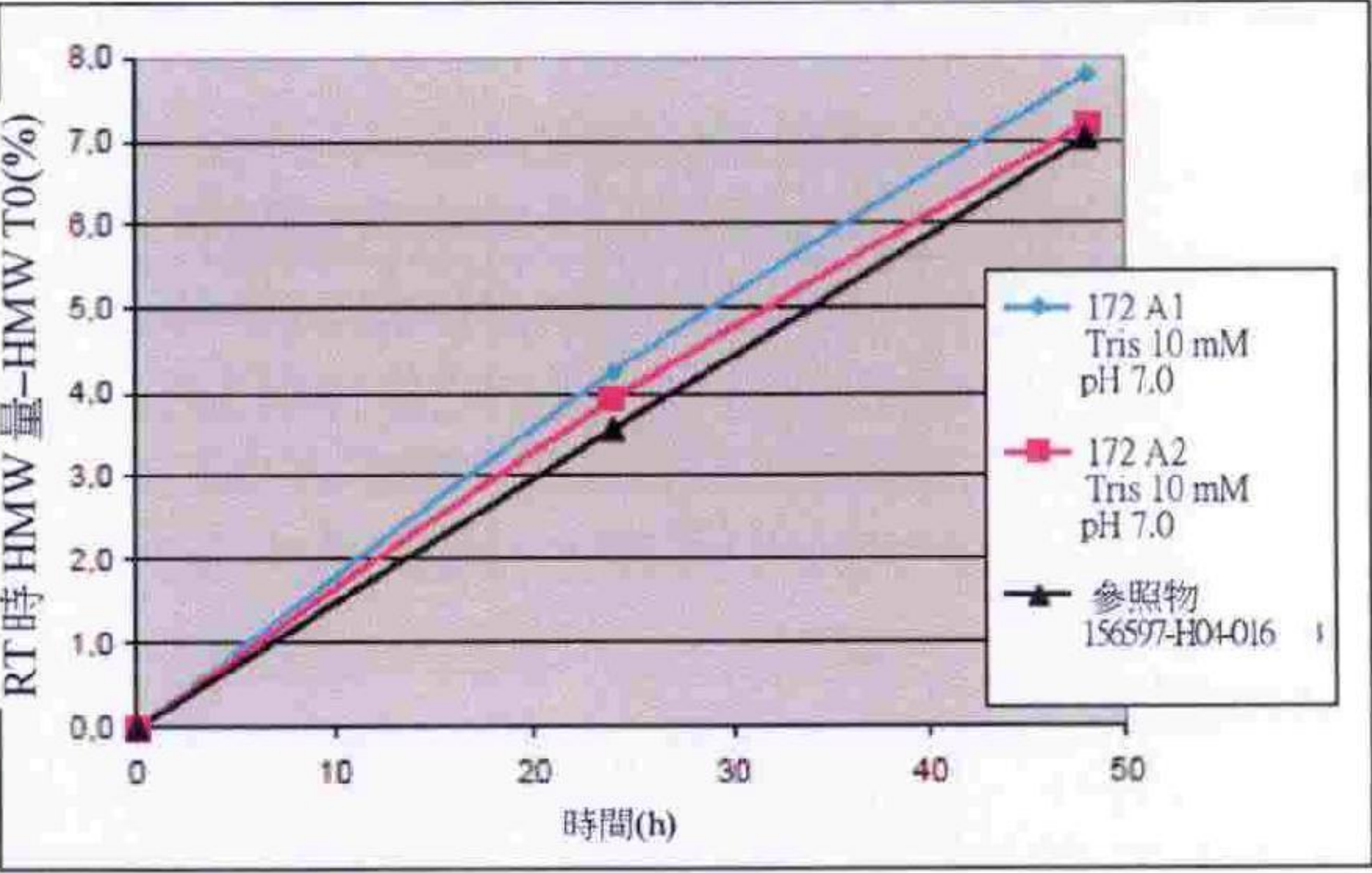
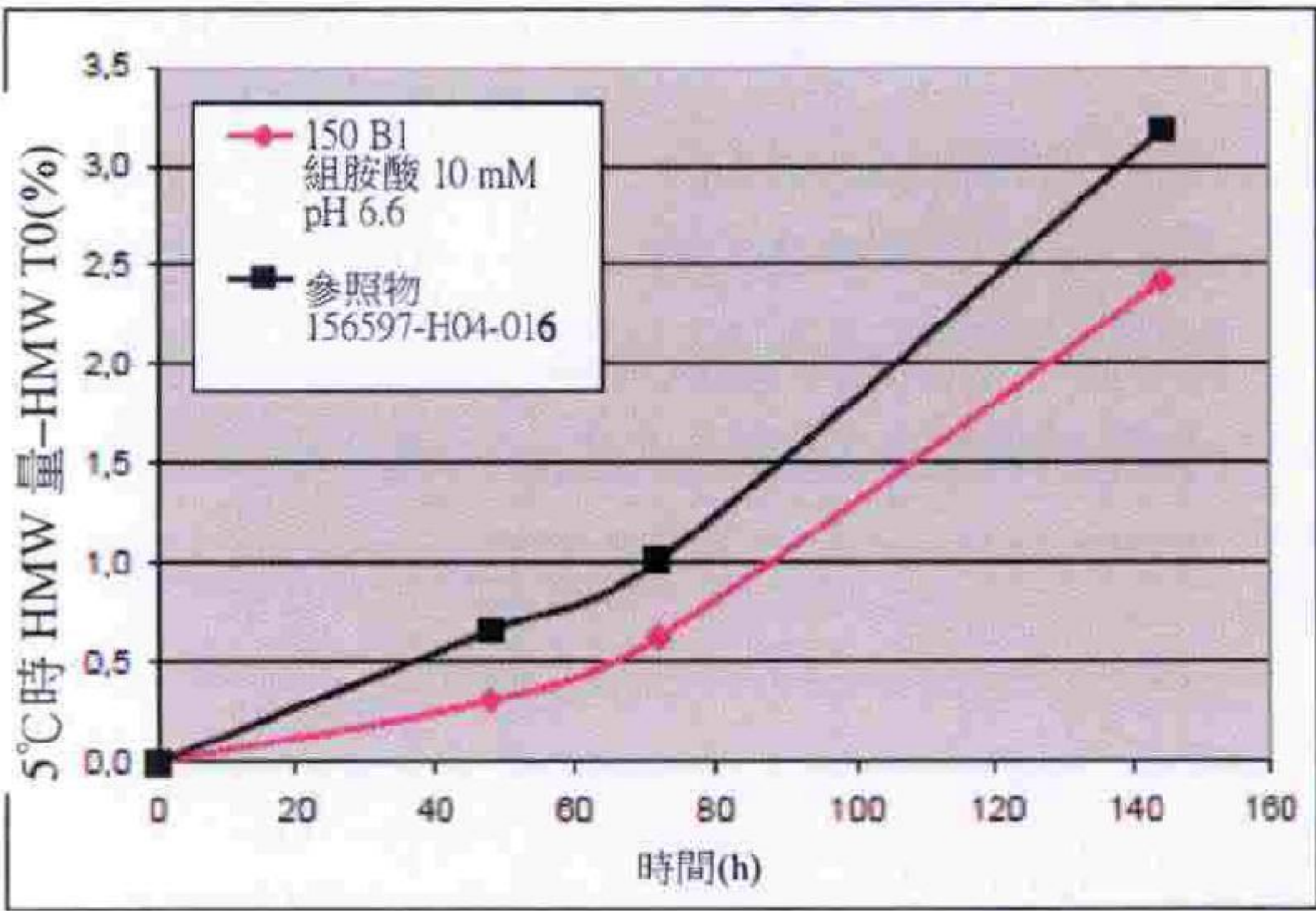
組胺酸 RT

檸檬酸鹽 5°C

圖 27

5°C之 Δ HMW		
時間	150 B1 組胺酸 10 mM pH 6.6	參照物 156597-H04-016
0	0.0	0.0
48	0.3	0.7
72	0.6	1.0
144	2.4	3.2

RT之 Δ HMW			
時間	172 A1 Tris 10 mM pH 7.0	172 A2 Tris 10 mM pH 7.4	參照物 156597-H04-016
0	0.0	0.0	0.0
24	4.2	3.9	3.6
48	7.8	7.2	7.0



RT之 Δ HMW				
時間	163 A1 檸檬酸鹽 10 mM pH 6.6	163 B1 磷酸鹽 10 mM pH 6.6	163 B2 磷酸鹽 10 mM pH 7.0	參照物 156597-H04-016
0	0.0	0.0	0.0	0.0
24	4.6	4.8	5.3	5.2
48	8.5	8.2	8.7	9.0

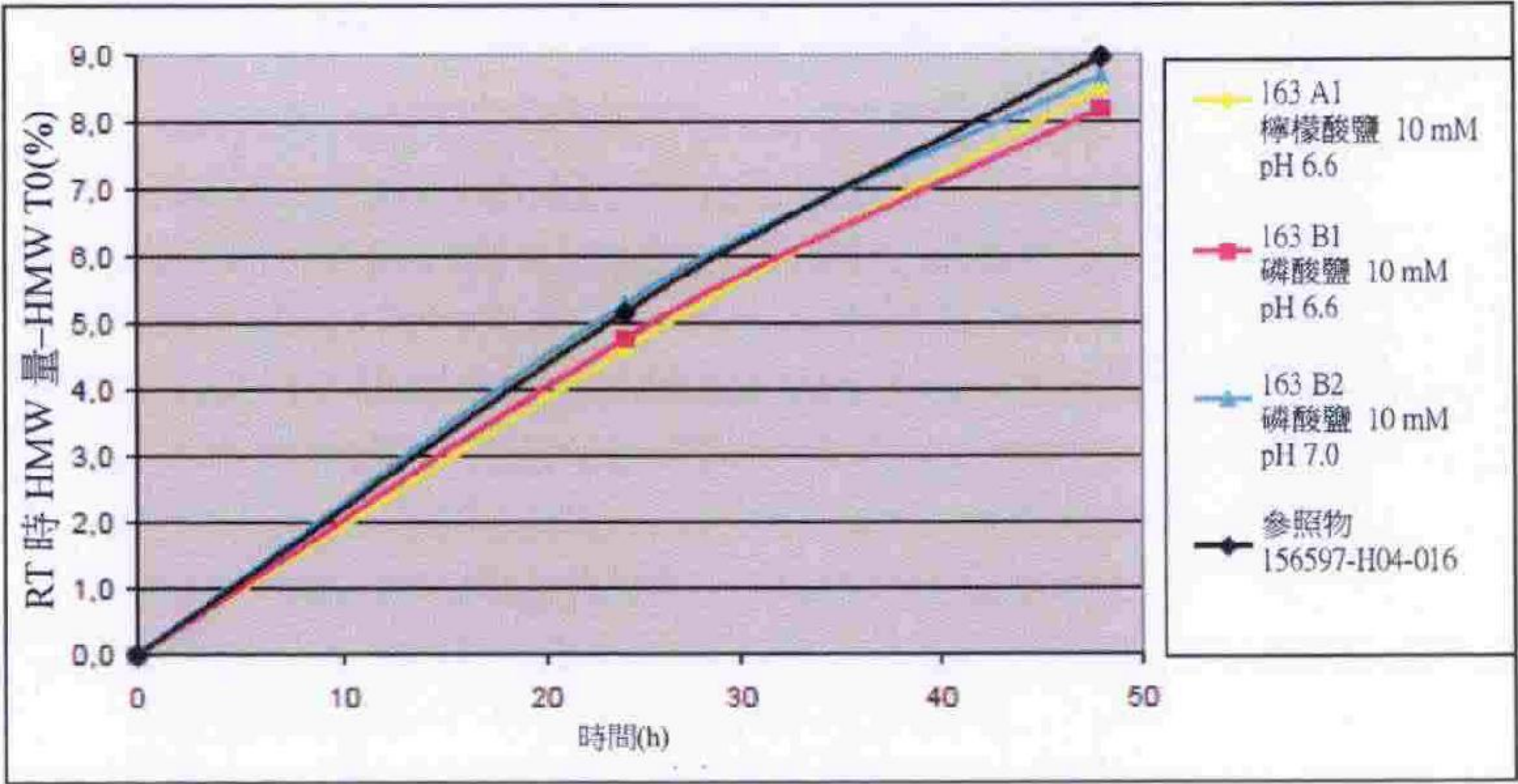


圖 28

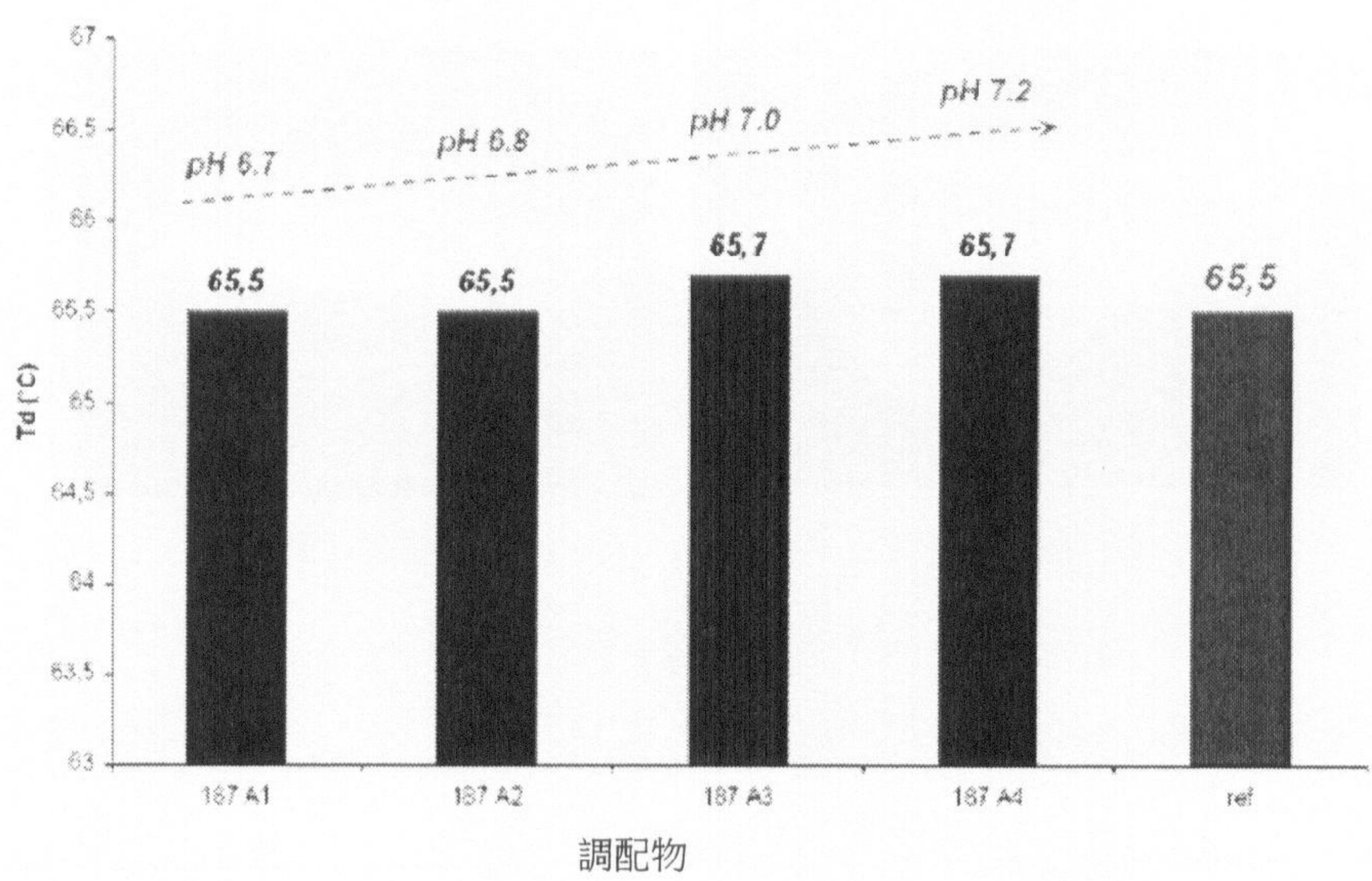


圖 29

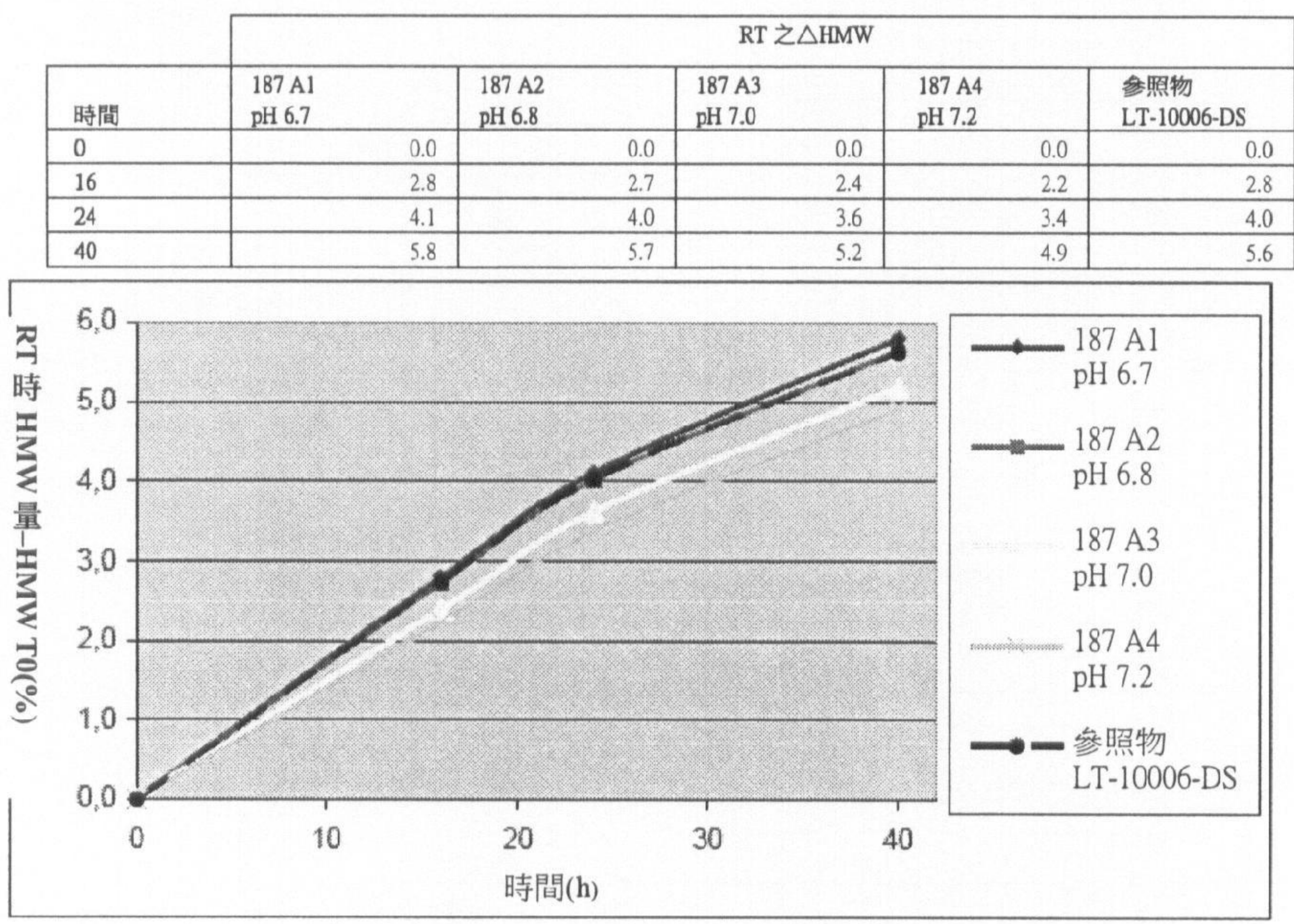


圖 30

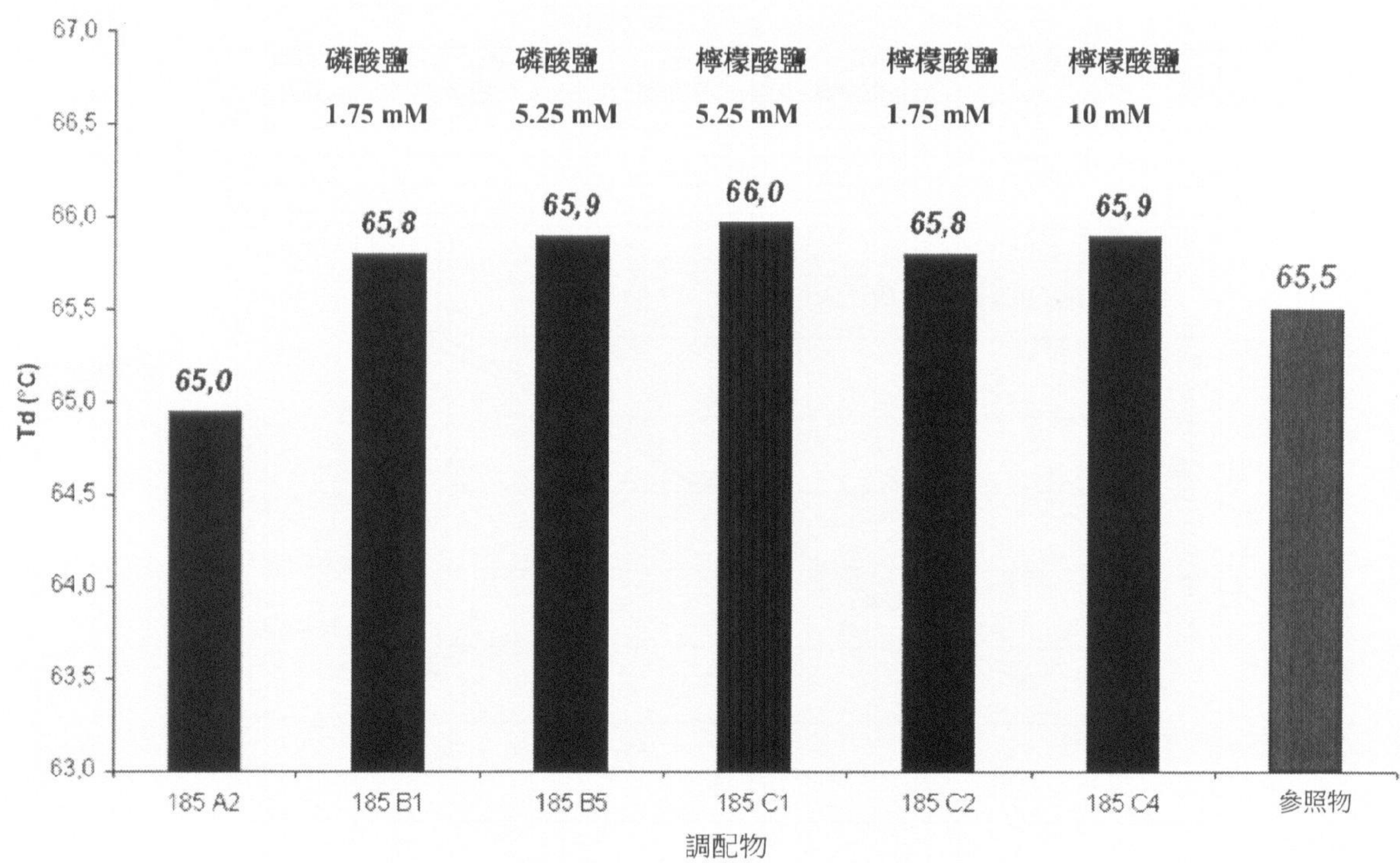
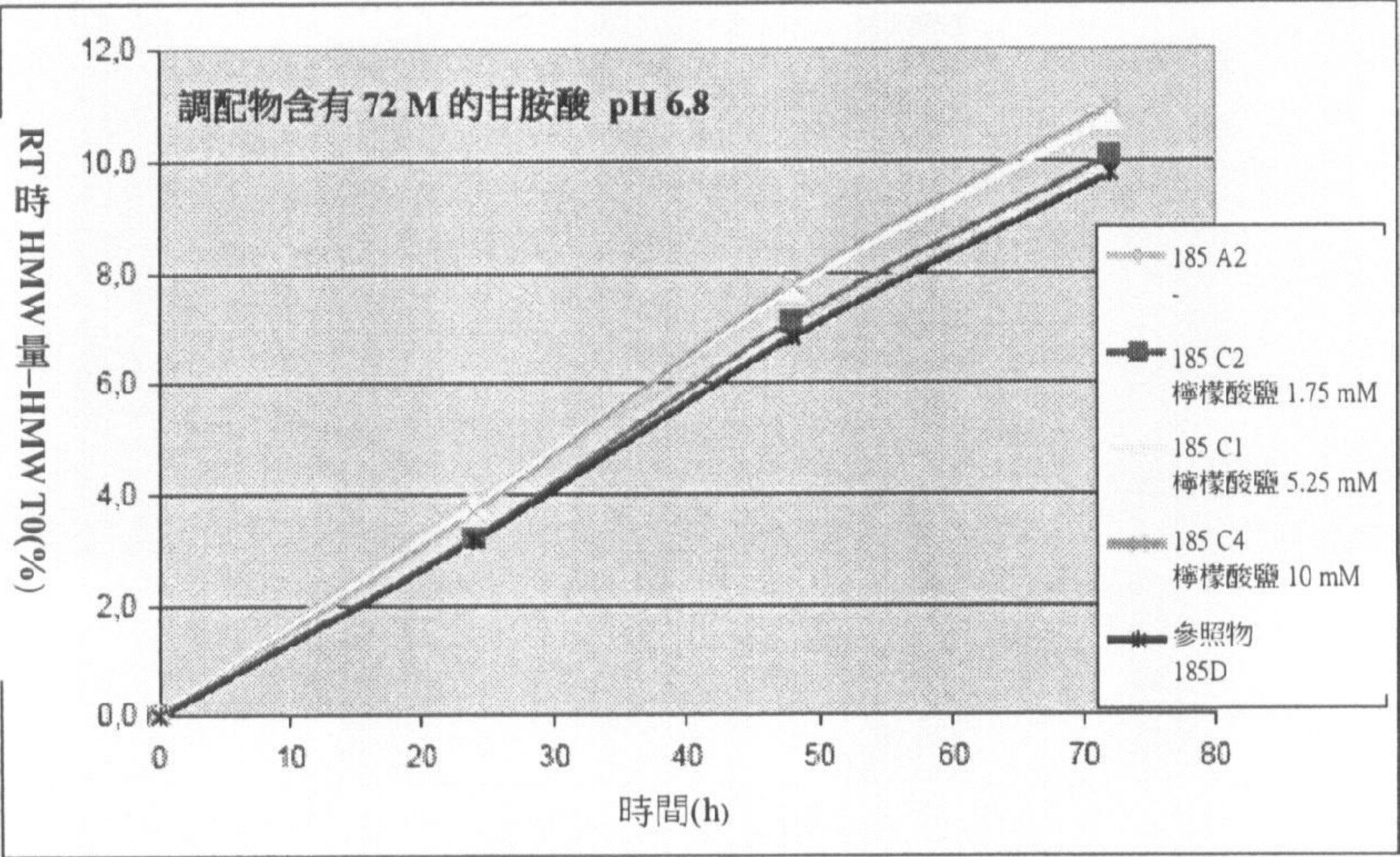


圖 31

RT 之 Δ HMW					
時間	185 A2	185 C2 檸檬酸鹽 1.75 mM	185 C1 檸檬酸鹽 5.25 mM	185 C4 檸檬酸鹽 10 mM	參照物 185D
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24	3.9	3.2	3.8	3.7	3.2
72	7.0	7.1	7.7	1.8	6.8
40	9.8	10.1	10.8	11.0	9.8



RT 之 Δ HMW				
時間	187 A2	185 B1 磷酸鹽 1.75 mM	187 B5 磷酸鹽 5.25 mM	參照物 185D
0	0.0	0.0	0.0	0.0
24	3.9	4.0	3.9	3.2
48	7.0	7.5	8.0	6.8
72	9.8	10.4	11.2	9.8

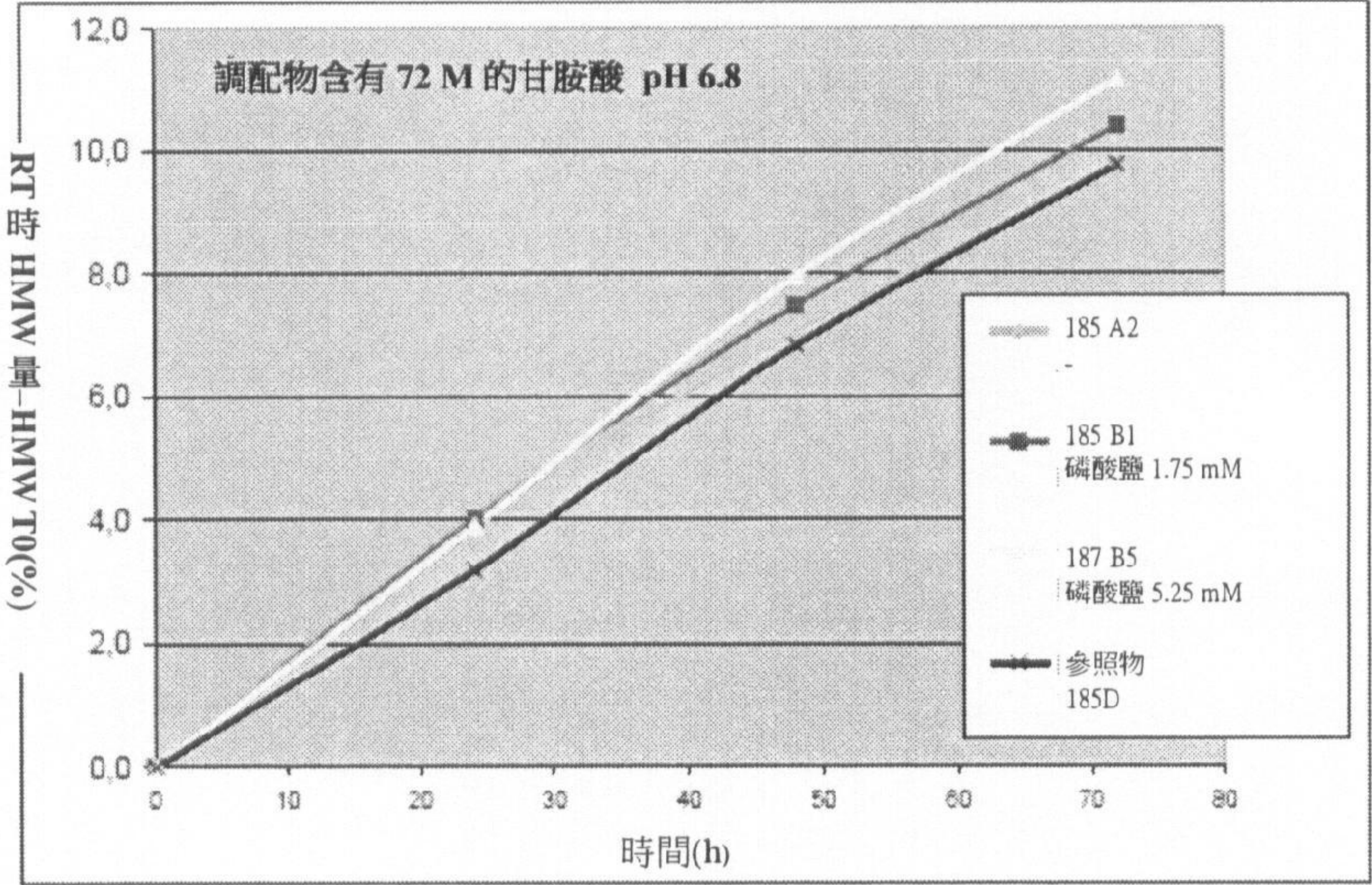


圖 32



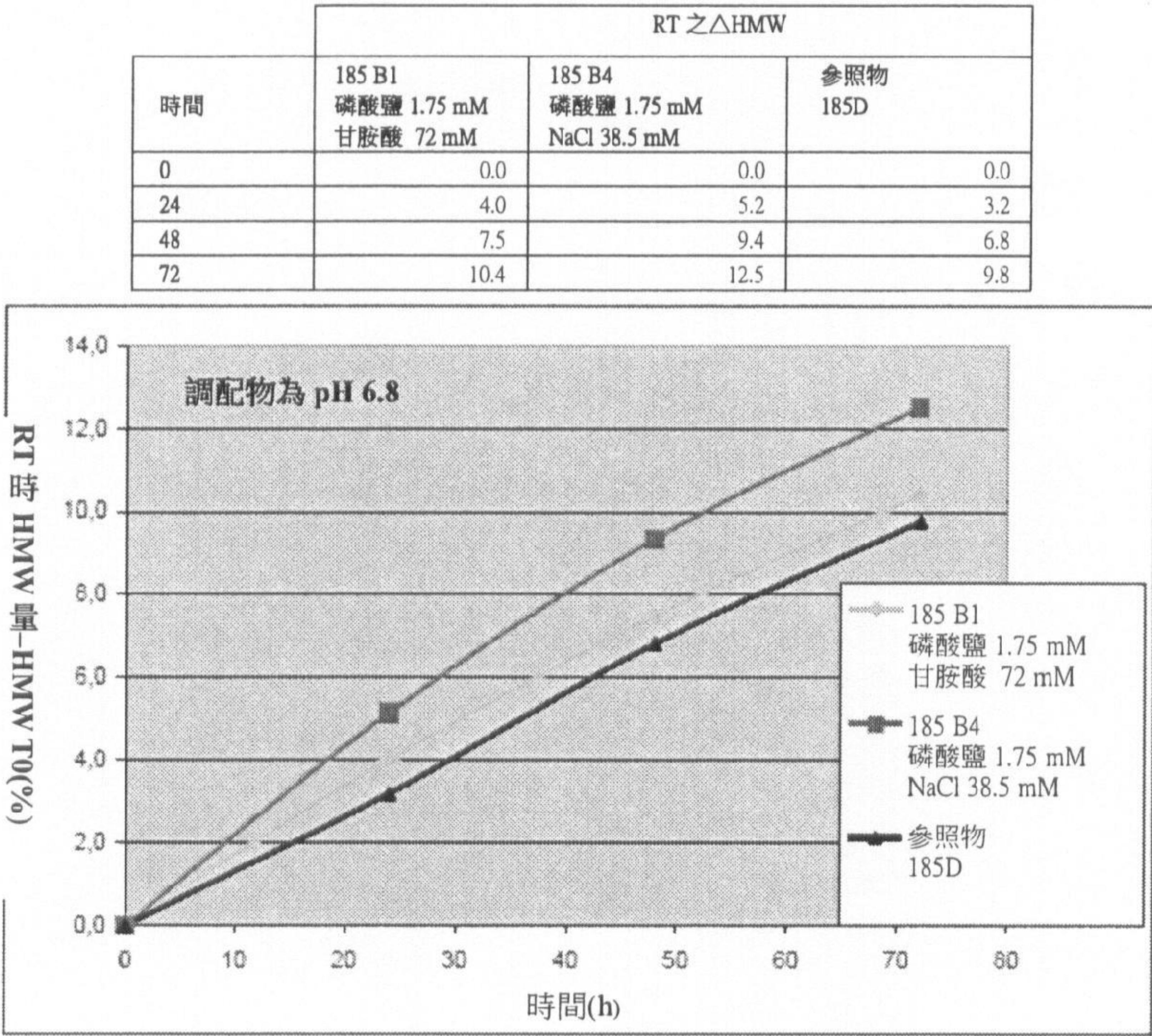


圖 33

RT 之 Δ HMW							
時間	185 B1 - 甘胺酸 72 mM	185 A1 - 蔗糖 2.4%	185 B1 磷酸鹽 1.75 mM 甘胺酸 72 mM	185 B2 磷酸鹽 1.75 mM 蔗糖 2.4%	185 C2 檸檬酸鹽 1.75 mM 甘胺酸 72 mM	185 C3 檸檬酸鹽 1.75 mM 蔗糖 2.4%	參照物 185D
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24	3.9	4.1	4.0	4.2	3.2	4.1	3.2
48	7.0	7.5	7.5	7.5	7.1	7.9	6.8
72	9.8	10.1	10.4	10.4	10.1	10.9	9.8

圖 34