



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202216196 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：110123627

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 06 月 28 日

(51)Int. Cl.：

*A61K39/395 (2006.01)**A61K9/08 (2006.01)**A61K47/26 (2006.01)**A61K47/22 (2006.01)**A61K47/12 (2006.01)**A61K47/20 (2006.01)**A61P37/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/06/29 南韓

10-2020-0079135

(71)申請人：南韓商韓元生物製藥股份有限公司(南韓) HANALL BIOPHARMA CO., LTD. (KR)
南韓

(72)發明人：安惠敬 AHN, HYE A KYUNG (KR)；金英珠 KIM, YOUNG JU (KR)；鄭美真 JUNG, MI JIN (KR)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：20 共 76 頁

(54)名稱

抗 FcRn 抗體之調配物

(57)摘要

在本發明的一個態樣中，提供一種具有 4.0 至 8.0 之 pH 的醫藥調配物，其包含(a)一 HL161BKN 抗體或其片段、(b)至少一選自於甘露醇、山梨醇、精胺酸、組胺酸、甘胺酸及其等鹽的添加物、(c)一選自於檸檬酸鹽或組胺酸的緩衝劑系統，以及(d)一界面活性劑。存在於該調配物中的 HL161BKN 具有改善的穩定性並且係無毒，且因此具有用於產業應用的高潛力。

In one aspect of the present invention, there is provided a pharmaceutical formulation having a pH of 4.0 to 8.0, comprising (a) an HL161BKN antibody or a fragment thereof, (b) at least one additive selected from mannitol, sorbitol, arginine, histidine, glycine and salts thereof, (c) a buffer system selected from citrate or histidine, and (d) a surfactant. HL161BKN present in the formulation has improved stability and is non-toxic, and thus has a high potential for industrial application.

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗FcRn抗體之調配物

【英文發明名稱】

FORMULATION FOR ANTI-FcRn ANTIBODY

【中文】

在本發明的一個態樣中，提供一種具有4.0至8.0之pH的醫藥調配物，其包含(a)一HL161BKN抗體或其片段、(b)至少一選自於甘露醇、山梨醇、精胺酸、組胺酸、甘胺酸及其等鹽的添加物、(c)一選自於檸檬酸鹽或組胺酸的緩衝劑系統，以及(d)一界面活性劑。存在於該調配物中的 HL161BKN具有改善的穩定性並且係無毒，且因此具有用於產業應用的高潛力。

【英文】

In one aspect of the present invention, there is provided a pharmaceutical formulation having a pH of 4.0 to 8.0, comprising (a) an HL161BKN antibody or a fragment thereof, (b) at least one additive selected from mannitol, sorbitol, arginine, histidine, glycine and salts thereof, (c) a buffer system selected from citrate or histidine, and (d) a surfactant. HL161BKN present in the formulation has improved stability and is non-toxic, and thus has a high potential for industrial application.

【指定代表圖】(無)

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗FcRn抗體之調配物

【英文發明名稱】

FORMULATION FOR ANTI-FcRn ANTIBODY

【技術領域】

發明領域

【0001】 本發明係有關於一種針對HL161BKN而最佳化的調配物，其中該HL161BKN係一抗FcRn抗體。

【先前技術】

發明背景

【0002】 長期以來已從遺傳、環境及免疫學的角度研究自體免疫疾病的成因，但是該疾病的確切成因仍未知。許多近期研究已揭露有一些自體免疫疾病係由IgG型自體抗體所造成。事實上，在自體免疫疾病之診斷及治療的研究中，已廣泛地研究疾病特異性自體抗體的存在與否與根據其降低之治療效果之間的關係。

【0003】 作為此等自體免疫疾病的一治療劑，該第一線藥劑係一全身性高劑量類固醇注射，且當症狀嚴重或者難以使用類固醇控制時，則應用高劑量IVIG (靜脈內免疫球蛋白)投與或者血漿清除術。當反覆使用高劑量類固醇時可能會產生微弱效應或者產生嚴重副作用。就IVIG以及血漿清除術而言，治療成本高並且具有多種副作用及感染風險，因此迫切需要開發在此治療領域中的一治療劑。

【0004】 另一方面，近期正在研究一種使用一FcRn抗體之用於自體免疫疾病的治療劑(韓國專利公開號10-2014-0147606)。其係一種具有新策略的藥物，其中該抗體阻斷參與IgG循環的FcRn(新生兒Fc受體)，並增加體內IgG的分解代謝，

從而降低自體抗體的水平以治療該等疾病。此抗FcRn抗體預期作為一可以解決現有治療劑之問題的產品。

【0005】然而，為了將此抗體應用於嚴重的自體免疫疾病，諸如尋常型天庖瘡、視神經脊髓炎，以及重症肌無力，其等係因為體內產生會對抗自體抗原之自體抗體所造成，因此需要一種針對此抗體而最佳化的調配物以及一種針對該投與方法而最佳化的調配物。

先前技術文獻

專利文獻

【0006】(專利文獻1) KR 10-2014-0147606 A

【發明內容】

發明概要

技術問題

【0007】為了開發一種針對一抗FcRn抗體而最佳化的調配物以用於治療嚴重自體免疫疾病而進行研究的結果，本發明人開發一種針對HL161BKN而最佳化的緩衝劑及調配物，其中該HL161BKN係一抗FcRn抗體。

問題解決方案

【0008】為了達成以上目的，在本發明的一個態樣中，提供一種醫藥調配物，其包含(a)一抗FcRn抗體或其片段、(b)至少一選自於甘露醇、山梨醇、精胺酸、組胺酸、甘胺酸及其等鹽的添加物、(c)一選自於檸檬酸鹽或組胺酸的緩衝劑系統，以及(d)一界面活性劑。

發明之效果

【0009】根據本發明之醫藥調配物係一種針對HL161BKN而最佳化的醫藥組成物，其具有4.0至8.0的pH，且其包含(a)一抗FcRn抗體或其片段、(b)至少一選自於甘露醇、山梨醇、精胺酸、組胺酸、甘胺酸及其等鹽的添加物、(c)一選自於

檸檬酸鹽或組胺酸的緩衝劑系統，以及(d)一界面活性劑，並且確認在該調配物中的HL161BKN的穩定性得到改善。

【圖式簡單說明】

【0010】 圖1顯示藉由使用DSC(差示掃描量熱法)分析HL161BKN之熱穩定性而獲得之結果。

【0011】 圖2顯示在pH 5.0、6.0、7.0及8.0的檸檬酸鈉-磷酸鹽緩衝劑條件下，藉由確認HL161BKN之4週加速穩定性而獲得之結果。

【0012】 圖3係研究HL161BKN之調配物的流程示意圖。

【0013】 圖4顯示根據賦形劑測試之結果，藉由確認根據各種賦形劑所產生之HL161BKN (210 mg/mL)之聚集體及片段的變化量而獲得之結果。

【0014】 圖5顯示藉由使用CEX-HPLC根據每個賦形劑條件分析HL161BKN (210 mg/mL)之電荷變異體的模式而獲得之結果。

【0015】 圖6顯示根據賦形劑之組合，HL161BKN之聚集體變化量的變異數分析(ANOVA)的結果。

【0016】 圖7顯示藉由確認根據賦形劑之組合所產生之HL161BKN (210 mg/mL)之聚集體及片段的變化量而獲得之結果。

【0017】 圖8顯示藉由使用實驗設計(DOE)根據賦形劑之組合分析HL161BKN之聚集體及片段的變化量而獲得之結果。

【0018】 圖9顯示藉由使用CEX-HPLC根據賦形劑之組合分析HL161BKN之電荷變異體的模式而獲得之結果。

【0019】 圖10顯示藉由在額外賦形劑測試中確認HL161BKN (210 mg/mL)之聚集體及片段的變化量而獲得之結果。

【0020】 圖11顯示藉由使用CEX-HPLC在額外賦形劑測試中根據賦形劑條件分析HL161BKN之電荷變異體的模式而獲得之結果。

【0021】圖12顯示藉由根據PSB20的存在與否，確認HL161BKN (210 mg/mL)對於攪拌應力的影響而獲得之結果。

【0022】圖13顯示藉由在攪拌測試中根據PSB20的存在與否確認HL161BKN之單體的變化而獲得之結果。

【0023】圖14顯示藉由在黏度降低賦形劑測試中確認HL161BKN (210 mg/mL)之聚集體及片段的變化量而獲得之結果。

【0024】圖15顯示藉由在第一次賦形劑篩選中確認HL161BKN (210 mg/mL)之聚集體及片段的變化而獲得之結果。

【0025】圖16顯示藉由使用CEX-HPLC根據第一次賦形劑篩選條件分析HL161BKN之電荷變異體的模式而獲得之結果。

【0026】圖17顯示藉由在第二次賦形劑篩選中確認HL161BKN (210 mg/mL)之聚集體及片段的變化而獲得之結果。

【0027】圖18顯示藉由使用CEX-HPLC根據第二次賦形劑條件分析HL161BKN之電荷變異體的模式而獲得之結果。

【0028】圖19顯示藉由確認HL161BKN之不溶性亞可見顆粒(sub-visible particles)之數目的變化而獲得之結果。

【0029】圖20顯示藉由確認根據HL161BKN調配物中HL161BKN之濃度的黏度而獲得之結果。在此，當HL161BKN的濃度為170 mg/mL時，該黏度被確認係10 cP。

【實施方式】

用於執行本發明之詳細說明

【0030】在本發明的一個態樣中，提供一種具有4.0至8.0之pH的醫藥調配物，其包含(a)一抗FcRn抗體或其片段、(b)至少一選自於甘露醇、山梨醇、精胺酸、組胺酸、甘胺酸及其等鹽的添加物、(c)一選自於檸檬酸鹽或組胺酸的緩衝劑

系統，以及(d)一界面活性劑。

【0031】 此外，該醫藥調配物可進一步包含甲硫胺酸。此外，該醫藥調配物可進一步包含諸如蔗糖及海藻糖的醣類。

【0032】 該緩衝劑系統係指因為其酸鹼對應物而能抵抗pH變化的一緩衝劑。

【0033】 如在本文中所使用，術語「組胺酸緩衝劑」係指一含有一組胺酸離子的緩衝劑。在此，該組胺酸緩衝劑的具體實施態樣可以係選自於由以下所組成之群組中的任一者，但不限於此：一組胺酸氯化物緩衝劑、一組胺酸醋酸鹽緩衝劑、一組胺酸磷酸鹽緩衝劑，以及一組胺酸硫酸鹽緩衝劑。

【0034】 如在本文中所使用，術語「檸檬酸鹽緩衝劑」係指一含有一檸檬酸根離子的緩衝劑。在此，該檸檬酸鹽緩衝劑的具體實施態樣可以係選自於由以下所組成之群組中的任一者，但不限於此：一檸檬酸鈉緩衝劑、一檸檬酸鉀緩衝劑、一檸檬酸鈣緩衝劑，以及一檸檬酸鎂緩衝劑。

【0035】 如在本文中所使用，術語「界面活性劑」係指一醫藥上可接受的賦形劑，其係用於保護一蛋白質調配物對抗諸如攪拌及剪切的機械應力。該界面活性劑的具體實施態樣可以係選自於由以下所組成之群組中的任一界面活性劑：聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆(poloxamer)、曲通(Triton)、十二烷基硫酸鈉、月桂基磺酸鈉、辛基糖苷鈉、月桂基-磺基甜菜鹼、肉豆蔻基-磺基甜菜鹼、亞油基-磺基甜菜鹼、硬脂基-磺基甜菜鹼、月桂基-肌胺酸、肉豆蔻基-肌胺酸、亞油基-肌胺酸、硬脂基-肌胺酸、亞油基-甜菜鹼、肉豆蔻基-甜菜鹼、鯨蠟基-甜菜鹼、月桂基醯胺基丙基-甜菜鹼、椰油醯胺基丙基-甜菜鹼、亞油醯胺基丙基-甜菜鹼、肉豆蔻醯胺基丙基-甜菜鹼、棕櫚醯胺基丙基-甜菜鹼、異硬脂醯胺基丙基-甜菜鹼、肉豆蔻醯胺基丙基-二甲基胺、棕櫚醯胺基丙基-二甲基胺、異硬脂醯胺基丙基-二甲基胺、甲基椰油

鹼基鈉、甲基油基-牛磺酸鈉、聚乙二醇、聚丙二醇，以及乙烯與丙二醇之共聚物。在此，該界面活性劑較佳地係聚山梨醇酯20。

【0036】 此外，該醫藥調配物可以係一水性調配物，較佳地係一可注射液體調配物。

【0037】 在此，該抗FcRn抗體可以係HL161BKN。

【0038】 該HL161BKN包含一重鏈可變區以及一輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含具有SEQ ID NO: 5之胺基酸的H-CDR1、具有SEQ ID NO: 6之胺基酸的H-CDR2，以及具有SEQ ID NO: 7之胺基酸的H-CDR3，且其中該輕鏈可變區包含具有SEQ ID NO: 8之胺基酸的L-CDR1、具有SEQ ID NO: 9之胺基酸的L-CDR2，以及具有SEQ ID NO: 10之胺基酸的L-CDR3。

【0039】 此外，該HL161BKN可包含在以下表1中所示之重鏈區以及輕鏈區。此外，該重鏈以及該輕鏈可以係由在表2中所示之該等核酸編碼。

表1

項目	胺基酸序列					SEQ ID NO
重鏈	QLLLQESGPG	LVKPSETLSL	TCTVSGGSLS	SSFSYWVWIR	QPPGKGLEWI	1
	GTIYYSGNTY	YNPSLKSRLT	ISVDTSKNHF	SLKLSSVTAA	DTAVYYCARR	
	AGILTGYLDS	WGQGTLLTVS	SASTKGPSVF	PLAPSSKSTS	GGTAALGCLV	
	KDYFPEPVTV	SWNSGALTSG	VHTFPAVLQS	SGLYSLSSVV	TVPSSSLGTQ	
	TYICNVNHKP	SNTKVDKRVE	PKSCDKHTHC	PPCPAPEAAG	GPSVFLFPPK	
	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQY	
	NSTYRVVSVL	TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	ALPAPIEKTI	SKAKGQPREP	
	QVYTLPPSRE	EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTTTP	
	VLDS DGSFFL	YSKLTVDKSR	WQQGNVFSCS	VMHEALHNHY	TQKSLSLSPG	
輕鏈	SYVLTSQSPSV	SVAPGQTARI	TCGGNNIGSK	SVHWYQQKPG	QAPVLVVYDD	2
	SDRPSGIPER	FSASNSGNTA	TLTISRVEAG	DEADYYCQVW	DSSSDHVVFG	
	GGTKLTVLGQ	PKAAPSVTLF	PPSSEELQAN	KATLVCLISD	FYPGAVTVAW	
	KADSSPVKAG	VETTTTPSKQS	NNKYAASSYL	SLTPEQWKSH	RSYSCQVTHE	
	GSTVEKTVAP	TECS				

【0040】 該抗體的醣基化位點如下：Asn301、N-聚醣(G0F、G1F、G0-GlcNac、Man5)。

表2

項目	核苷酸序列														SEQ ID NO
編碼重鏈之多核苷酸	CAG	CTG	CTG	CTG	CAA	GAA	TCC	GGC	CCT	GGC	CTG	GTG	AAA	CCC	3
	TCC	GAG	ACA	CTG	TCC	CTG	ACC	TGC	ACC	GTG	TCC	GGC	GGC	TCC	
	CTG	TCC	TCC	AGC	TTC	TCC	TAC	TGG	GTC	TGG	ATC	CGG	CAG	CCC	
	CCT	GGC	AAG	GGC	CTG	GAA	TGG	ATC	GGC	ACC	ATC	TAC	TAC	TCC	
	GGC	AAC	ACC	TAC	TAC	AAC	CCC	AGC	CTG	AAG	TCC	CGG	CTG	ACC	
	ATC	TCC	GTG	GAC	ACC	TCC	AAG	AAC	CAC	TTC	AGC	CTG	AAG	CTG	
	TCC	TCC	GTG	ACC	GCC	GCT	GAC	ACC	GCC	GTG	TAC	TAC	TGT	GCC	
	AGA	AGG	GCC	GGC	ATC	CTG	ACC	GGC	TAC	CTG	GAC	TCT	TGG	GGC	
	CAG	GGC	ACC	CTG	GTG	ACA	GTG	TCC	TCC	GCC	TCC	ACC	AAG	GGC	
	CCC	TCC	GTG	TTC	CCT	CTG	GCC	CCC	TCC	AGC	AAG	TCC	ACC	TCT	
	GGC	GGC	ACC	GCT	GCC	CTG	GGC	TGT	CTG	GTG	AAA	GAC	TAC	TTC	
	CCC	GAG	CCC	GTG	ACC	GTG	TCC	TGG	AAC	TCT	GGC	GCC	CTG	ACC	
	TCC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCT	GCC	GTG	CTG	CAG	TCC	TCC	GGC	
	CTG	TAC	TCC	CTG	TCC	AGC	GTG	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	TCT	
	CTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	ATC	TGC	AAC	GTG	AAC	CAC	AAG	CCC	
	TCC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	CGG	GTG	GAA	CCC	AAG	TCC	TGC	
	GAC	AAG	ACC	CAC	ACC	TGT	CCC	CCC	TGT	CCT	GCC	CCT	GAA	GCT	
	GCT	GGC	GGC	CCT	AGC	GTG	TTC	CTG	TTC	CCC	CCA	AAG	CCC	AAG	
	GAC	ACC	CTG	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCC	GAA	GTG	ACC	TGC	GTG	
	GTG	GTG	GAC	GTG	TCC	CAC	GAG	GAC	CCT	GAA	GTG	AAG	TTC	AAT	
	TGG	TAC	GTG	GAC	GGC	GTG	GAA	GTG	CAC	AAC	GCC	AAG	ACC	AAG	
	CCC	AGA	GAG	GAA	CAG	TAC	AAC	TCC	ACC	TAC	CGG	GTG	GTG	TCC	
	GTG	CTG	ACC	GTG	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAC	GGC	AAA	GAG	
	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAG	GCC	CTG	CCT	GCC	CCC	ATC	
	GAA	AAG	ACC	ATC	TCC	AAG	GCC	AAG	GGC	CAG	CCC	CGC	GAG	CCC	
	CAG	GTG	TAC	ACA	CTG	CCC	CCT	AGC	CGG	GAA	GAG	ATG	ACC	AAG	
	AAC	CAG	GTG	TCC	CTG	ACA	TGC	CTG	GTG	AAG	GGC	TTC	TAC	CCC	
	TCC	GAC	ATT	GCC	GTG	GAA	TGG	GAG	TCC	AAC	GGC	CAG	CCC	GAG	
	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACC	CCT	GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	CCC	GGC	
	TCA	TTC	TTC	CTG	TAC	TCC	AAG	CTG	ACC	GTG	GAC	AAG	TCC	CGG	
	TGG	CAG	CAG	GGC	AAC	GTG	TTC	TCC	TGC	TCC	GTG	ATG	CAC	GAG	
	GCC	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACC	CAG	AAG	TCC	CTG	TCC	CTG	AGC	
	CCC	GGC													
編碼輕鏈之多核苷酸	TCT	TAC	GTG	CTG	ACC	CAG	TCC	CCC	TCC	GTG	TCC	GTG	GCT		4
	CCT	GGC	CAG	ACC	GCC	AGA	ATC	ACC	TGT	GGC	GGC	AAC	AAC		
	ATC	GGC	TCC	AAG	TCC	GTG	CAC	TGG	TAT	CAG	CAG	AAG	CCC		
	GGC	CAG	GCC	CCC	GTG	CTG	GTG	GTG	TAC	GAC	GAC	TCC	GAC		
	CGG	CCC	TCT	GGC	ATC	CCT	GAG	CGG	TTC	TCC	GCC	TCC	AAC		
	TCC	GGC	AAC	ACC	GCC	ACC	CTG	ACC	ATC	TCC	AGA	GTG	GAA		
	GCC	GGC	GAC	GAG	GCC	GAC	TAC	TAC	TGC	CAA	GTG	TGG	GAC		
	TCC	TCC	TCC	GAC	CAC	GTG	GTG	TTC	GGC	GGA	GGC	ACC	AAG		
	CTG	ACC	GTG	CTG	GGC	CAG	CCT	AAG	GCC	GCT	CCC	TCC	GTG		
	ACC	CTG	TTC	CCC	CCA	TCC	TCC	GAG	GAA	CTG	CAG	GCC	AAC		
	AAG	GCC	ACC	CTG	GTC	TGC	CTG	ATC	TCC	GAC	TTC	TAC	CCT		
	GGC	GCC	GTG	ACC	GTG	GCC	TGG	AAG	GCC	GAC	AGC	TCT	CCT		
	GTG	AAG	GCC	GGC	GTG	GAA	ACC	ACC	ACC	CCC	TCC	AAG	CAG		
	TCC	AAC	AAC	AAA	TAC	GCC	GCC	TCC	TCC	TAC	CTG	TCC	CTG		
	ACC	CCC	GAG	CAG	TGG	AAG	TCC	CAC	CGG	TCC	TAC	AGC	TGC		
	CAA	GTG	ACA	CAC	GAG	GGC	TCC	ACC	GTG	GAA	AAG	ACC	GTG		
	GCC	CCT	ACC	GAG	TGC	TCC									

【0041】 在此，該醫藥調配物可具有20 cP或更少的黏度。具體地，該醫藥調配物可具有1 cP至20 cP的黏度。此外，該醫藥調配物可具有10 cP至20 cP的黏度，並可具有約10 cP、約11 cP、約12 cP、約13 cP、約14 cP、約15 cP、約16 cP、約17 cP、約18 cP、約19 cP，或者約20 cP的黏度。

【0042】 此外，該醫藥調配物可具有250 mOs/kg至500 mOs/kg的重量滲透濃度(osmolality)。具體地，該醫藥調配物可具有300 mOs/kg至450 mOs/kg或者350 mOs/kg至400 mOs/kg的重量滲透濃度。此外，該醫藥調配物可具有約250 mOs/kg、約260 mOs/kg、約270 mOs/kg、約280 mOs/kg、約290 mOs/kg、約300 mOs/kg、約310 mOs/kg、約320 mOs/kg、約330 mOs/kg、約340 mOs/kg、約350 mOs/kg、約360 mOs/kg、約370 mOs/kg、約380 mOs/kg、約390 mOs/kg、約400 mOs/kg、約410 mOs/kg、約420 mOs/kg、約430 mOs/kg、約440 mOs/kg、約450 mOs/kg、約460 mOs/kg、約470 mOs/kg、約480 mOs/kg、約490 mOs/kg，或者約500 mOs/kg的重量滲透濃度。

【0043】 此外，該醫藥調配物可包括濃度為50 mg/mL至250 mg/mL的HL161BKN。具體地，該醫藥調配物可包括濃度為60 mg/mL至250 mg/mL、70 mg/mL至250 mg/mL、80 mg/mL至250 mg/mL、90 mg/mL至250 mg/mL，或者100 mg/mL至250 mg/mL的HL161BKN。此外，該醫藥調配物可包括濃度為120 mg/mL至230 mg/mL、150 mg/mL至220 mg/mL，或者180 mg/mL至210 mg/mL的HL161BKN。此外，該醫藥調配物可包括濃度為約50 mg/mL、約60 mg/mL、約70 mg/mL、約80 mg/mL、約90 mg/mL、約100 mg/mL、約110 mg/mL、約120 mg/mL、約130 mg/mL、約140 mg/mL、約150 mg/mL、約160 mg/mL、約170 mg/mL、約180 mg/mL、約190 mg/mL、約200 mg/mL、約210 mg/mL、約220 mg/mL、約230 mg/mL、約240 mg/mL，或者約250 mg/mL的HL161BKN。

【0044】 此外，該醫藥調配物可具有4.0至8.0的pH。具體地，該醫藥調配物

可具有4.0至7.0的pH。較佳地，該醫藥調配物可具有5.0至6.0的pH。此外，該醫藥調配物可具有約pH 5.0、約pH 5.1、約pH 5.2、約pH 5.3、約pH 5.4、約pH 5.5、約pH 5.6、約pH 5.7、約pH 5.8、約pH 5.9、約pH 6.0、約pH 6.1、約pH 6.2、約pH 6.3、約pH 6.4、約pH 6.5、約pH 6.6、約pH 6.7、約pH 6.8、約pH 6.9，或者約pH 7.0。

【0045】此外，可包括濃度為10 mM至400 mM的添加劑。在此，作為添加劑，甘露醇、山梨醇、精胺酸、組胺酸或者甘胺酸可被單獨使用，且其等之兩者或多者可被組合使用。具體地，可包括濃度分別為10 mM至400 mM、20 mM至300 mM、50 mM至250 mM，或者100 mM至150 mM的添加劑。具體地，可包括濃度分別為約10 mM、約20 mM、約30 mM、約40 mM、約50 mM、約60 mM、約70 mM、約80 mM、約90 mM、約100 mM、約110 mM、約120 mM、約130 mM、約140 mM、約150 mM、約160 mM、約170 mM、約180 mM、約190 mM、約200 mM、約210 mM、約220 mM、約230 mM、約240 mM、約250 mM、約260 mM、約270 mM、約280 mM、約290 mM，或者約300 mM的添加劑。

【0046】此外，可組合使用該等添加劑之兩者。在一個實施態樣中，該添加劑可包括甘露醇以及山梨醇。在一個實施態樣中，該添加劑可包括甘露醇以及精胺酸。在一個實施態樣中，該添加劑可包括甘露醇以及組胺酸。在一個實施態樣中，該添加劑可包括甘露醇以及甘胺酸。在一個實施態樣中，該添加劑可包括山梨醇以及精胺酸。在一個實施態樣中，該添加劑可包括山梨醇以及組胺酸。在一個實施態樣中，該添加劑可包括山梨醇以及甘胺酸。在一個實施態樣中，該添加劑可包括精胺酸以及組胺酸。在一個實施態樣中，該添加劑可包括精胺酸以及甘胺酸。在一個實施態樣中，該添加劑可包括組胺酸以及甘胺酸。在此，各個添加劑可以係以上述濃度被包括在一醫藥調配物中。

【0047】該醫藥調配物的一個實施態樣可以係一種具有5.0至6.0之pH的醫

藥調配物，其包含(a) 100 mg/mL至 250 mg/mL的抗FcRn抗體、(b) 50至250 mM L-精胺酸或其鹽酸鹽、(c) 50至250 mM L-組胺酸，以及(d) 0.01至0.05%聚山梨醇酯20。

【0048】 在此，該抗FcRn抗體係如上所述。此外，該醫藥調配物可以係一水性調配物，且可以係一可注射液體調配物。此外，上述醫藥調配物可經皮下投與。

【0049】 此外，已確認該醫藥調配物在加速條件下非常穩定。具體地，在加速條件下(25°C，60%的相對濕度)6個月測試的結果顯示，聚集體及片段的含量可以係約10%或更少。此外，在上述條件下的聚集體及片段的含量可以係約9%或更少、約8%或更少、約7%或更少、約6%或更少、約5.5%或更少，或者約5.0%或更少。

【0050】 此外，已確認該醫藥調配物即使在長期儲存條件下也非常穩定。具體地，在5°C及36個月的條件下，聚集體及片段的含量可以係約10%或更少。此外，在上述條件下的聚集體及片段的含量可以係約9%或更少、約8%或更少、約7%或更少、約6%或更少、約5%或更少、約4%或更少、約3%或更少、約2%或更少、約1.8%或更少、約1.5%或更少、或者約1.2%或更少。

【0051】 此外，該醫藥調配物可用於治療自體免疫疾病。在此，該自體免疫疾病可以係選自於由以下所組成之群組中的任一者：重症肌無力(MG)、甲狀腺眼病(TED)、溫性自體免疫溶血性貧血(WAIHA)、視神經脊髓炎(NMO)、免疫性血小板缺乏紫斑症(ITP)、尋常型天疱瘡(PV)、慢性脫髓鞘多發性神經炎(CIDP)、狼瘡性腎炎(LN)，以及膜性腎病變(MN)。

針對HL161BKN而最佳化之調配物的篩選

【0052】 針對每個條件製備濃度為約210 mg/mL的HL161BKN，且在40°C的加速條件下儲存4週，並分析濃度(A280)、濁度(A340)、純度(SEC-HPLC、CEX-

HPLC)、黏度、重量滲透濃度、不溶性亞可見顆粒(MFI)等等以評估該樣品的穩定性以及皮下投與的適合性。

【0053】 首先，針對在現有抗體產品中常用的11種賦形劑進行篩選測試。結果確認L-組胺酸、L-精胺酸鹽酸鹽、L-甘胺酸、D-山梨醇，以及D-甘露醇具有降低聚集體之形成的作用。

【0054】 透過五種經選定之賦形劑的組合測試協同作用。結果確認L-精胺酸鹽酸鹽以統計學上顯著水平($p < 0.01$)降低聚集體之形成。

【0055】 藉由結合聚集體及片段作用之效應值的比較結果，L-組胺酸以及D-甘露醇被選擇作為賦形劑。此外，作為額外賦形劑之篩選的結果，額外地選擇L-甲硫胺酸，其展現降低聚集體之形成的作用。此外，已確認組胺酸可以被使用作為一基礎緩衝劑。此外，選擇高純度0.02%聚山梨醇酯20，其展現抑制在產品儲存及運輸期間可能發生之攪拌應力所導致之聚集體之形成的作用。

【0056】 接著，對經選定之組胺酸基礎緩衝劑以及L-精胺酸鹽酸鹽、D-甘露醇，以及L-甲硫胺酸賦形劑進行第一次濃度篩選測試。在此，將PBS20的濃度固定在0.02%並進行。結果確認在不含賦形劑之50 mM組胺酸基礎緩衝劑的條件下具有高穩定性。此外，根據該等賦形劑條件而增加之聚集體及片段的量並未顯示顯著差異，但是隨著經添加之L-精胺酸鹽酸鹽的濃度增加，聚集體之形成降低。

【0057】 另一方面，已確認D-甘露醇的存在與否以及L-甲硫胺酸的濃度所造成的差別不大。因此，選擇L-精胺酸鹽酸鹽以及0.02% PSB20在一L-組胺酸基礎緩衝劑中以作為一HL161BKN調配物。

【0058】 最後，為了選擇L-組胺酸以及L-精胺酸鹽酸鹽的最佳濃度，使用HL161BKN之兩個批次進行第二次濃度篩選。結果，根據該賦形劑之濃度條件而增加之聚集體及片段的量並未顯示顯著差異，並且已確認在所有條件下黏度及

重量滲透濃度的測量值係20 cP或更少以及250至500 mOsmol/kg，其係適合用於皮下投與。

【0059】 此外，作為使用微流成像(MFI)對每個條件樣品進行不溶性亞可見顆粒分析之結果，確認了不溶性亞可見顆粒數目增加最少的條件；並且透過純度(聚集體及片段)、黏度，以及重量滲透濃度測試來評估該穩定性以及皮下注射(SC)投與適合性以選擇該最終調配物。

【0060】 綜上所述，選擇約100 mM L-組胺酸、約100 mM L-精胺酸鹽酸鹽，以及約0.02%聚山梨醇酯20 (pH 6.0)作為HL161BKN之非臨床及1期臨床試驗的調配物。

【0061】 在下文中，將透過該等實施例更詳細地描述本發明。此等實施例僅用於闡明本發明，且對於所屬技術領域中具有通常知識者顯而易見的是本發明的範圍不受此等實施例的限制。

I. HL161BKN之製備

製備實施例1。用於製備HL161抗體之基因建構體及含有其等之載體的製備

【0062】 為了製備HL161BKN，將一多核苷酸裝載至該pCHO 1.0載體(Life Technologies)中，其中該多核苷酸具有SEQ ID NO: 3之核酸序列，其編碼一包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列的重鏈。此外，將一多核苷酸裝載至該pCHO 1.0載體中，其中該多核苷酸具有SEQ ID NO: 4之核酸序列，其編碼一包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的輕鏈。

製備實施例2。HL161BKN細胞系之製備以及HL161BKN之生產

【0063】 使用在製備實施例1中所製備之表現載體來轉化CHO-S細胞，並進行胺甲喋呤及嘌呤黴素的選擇程序，且然後製備一最終生產細胞系。該經製備之細胞系係作為一細胞庫而被製備並儲存，並用於HL161BKN之生產。在一含有培養基(Dynamis培養基 + 8 mM L-麩醯胺酸)的生物反應器中，藉由每2天添加一額

外的培養基(EPB+)來進行抗體之生產，並在培養約15天之後回收該上清液。此後，進行一蛋白質A管柱，並在低pH下進行病毒去活化，且然後進行陰離子交換層析(AEX)以及陽離子交換層析(CEX)。此後，在濃縮以及緩衝劑交換(超濾/滲濾)之後，藉由無菌過濾進行純化。透過諸如SEC-HPLC、CE-SDS、cIEF、ELISA、效力，以及濃度之分析來確認所產生之抗體樣品的品質。

製備實施例3。HL161BKN之基本性質的分析

【0064】 進行HL161BKN之熱穩定性、根據pH在加速條件下的穩定性測試，以及溶解度測試。對於熱穩定性，藉由DSC(差示掃描量熱法)分析T_m值，且對於每個pH的加速條件實驗，在37°C下儲存1個月時監測聚集體及片段之形成的程度。

【0065】 對於用於T_m值分析的DSC，使用來自於五松高科技醫療產業促進基金會(Osong Hi-tech Medical Industry Promotion Foundation)的設備。在25°C至100°C的範圍內進行實驗，且該等結果係如圖1所示被確認。其顯示該IgG1型之典型DSC直方圖，並確認根據該CH域及Fv域之曲線。HL161BKN展現79.9°C的高T_m，且經分析係在熱力學上非常穩定。

【0066】 此外，使用pH 5.0、6.0、7.0及8.0的檸檬酸鈉-磷酸鹽緩衝劑，製備濃度為10 mg/mL的HL161BKN。此後，在37°C下儲存4週時使用SEC-HPLC確認聚集體或片段之形成的程度。結果，聚集體或片段之形成會隨著pH增加而增加(圖2)。

【0067】 基於此結果，使用具有低濃度或高濃度的緩衝劑，其係5.0及6.0的低pH，製備濃度為100 mg/mL的HL161BKN，且然後在40°C的加速條件下儲存4週時進行穩定性測試。結果，HL161BKN在pH 5.0至6.0的低pH條件下展現穩定的趨勢，並且在所有條件下整體維持高水平的單體。

【0068】 此外，為了確認HL161BKN的溶解度，以6個步驟將其濃縮至10至

300 mg/mL的濃度，並逐步採集樣品且目視觀察，並進行A280 nm (濃度)、A340 nm (濁度)，以及SEC-HPLC純度之分析。結果確認HL161BKN的濁度會隨著其濃度增加而逐漸地增加，但在高達268 mg/mL的濃度下該單體純度幾乎沒有變化。

II. 針對HL161BKN而最佳化之調配物的選擇

製備實施例1。針對HL161BKN而最佳化之調配物的篩選

【0069】 此實驗之目的係為了開發HL161BKN之高濃度皮下投與產品而選擇該藥物物質及藥物產品的調配物。在此實驗中，使用HL161BKN-B005、HL161BKN-B018，以及HL161BKN-B021之三個生產批次，且所使用之試劑及儀器係如下所示(表3)。

表3

成分	製造商
D-(+)-海藻糖二水合物	Sigma
D-甘露醇	Sigma
D-甘露醇	Avantor
D-山梨醇	Sigma
L-精胺酸單鹽酸鹽	Merck
L-組胺酸單鹽酸鹽單水合物	Merck
L-組胺酸	Sigma
L-組胺酸	Avantor
聚山梨醇酯20 (PSB20)	Sigma
聚山梨醇酯20 (PSB20)	Avantor
聚山梨醇酯80 (PSB80)	Merck
氯化鈉	Merck
蔗糖	Bioshop
蔗糖	Avantor
L-甘胺酸	Merck
L-甲硫胺酸	Avantor
L-離胺酸-單鹽酸鹽	Tianjin Tianyao pharmaceuticals
L-纈胺酸	Evonik
無水硫酸鈉	Deajung
氯化銨	Sigma

檸檬酸，無水	Avantor
檸檬酸，無水	Merck
乙腈	B&J
檸檬酸三鈉，二水合物	Merck
檸檬酸三鈉，二水合物	Avantor
1.5 mL微量離心管	Axygen
Amicon® ultra centricon，15 mL	Millipore
Amicon® ultra centricon，4 mL	Millipore

【0070】 用於此調配物測試之儀器係如下所示(表4)。

表4

儀器	製造商	目錄號碼
離心機	Gyrogen	1580-MGR
mv-ROC黏度計	Rheosense	mv-ROC
滲壓計	Gonotec	Osmomat 3000
溫度&濕度室	Jeio tech	TH-TG-300
Nanodrop	Termoscientific	Nanodrop2000
Propac WCX-10	Dionex	054993
TSK gel G3000SWXL	TOSOH	5788
TSK SWXL 保護管柱	TOSOH	8543
水浴	Daihan	DH.WB000111
Waters alliance HPLC	Waters	E2695 / 2489
MyLab intelli混合器	MyLab	SLRM-3
MFI 5200顆粒分析器	ProteinSimple	4000-015-001
Stat-ease Design-Expert®軟體	Stat-Ease	Version 7.0

製備實施例2。測試方法

【0071】 針對HL161BKN之調配物選擇測試主要分為一賦形劑篩選測試以及一賦形劑濃度篩選測試，並進行測試。具體地，以與圖3中相同之方式進行實

驗。

實施例1。賦形劑篩選

實施例1.1。賦形劑測試

【0072】 選擇蔗糖、D-海藻糖、D-甘露醇、D-山梨醇、L-精胺酸HCl、L-組胺酸HCl、L-組胺酸、L-甘胺酸、聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80，以及氯化鈉(NaCl)，其等係目前在市場上常用於抗體產品中的11種賦形劑。具體地，在12種緩衝劑條件中使用5 mM檸檬酸鈉(pH 6.0)作為一基礎緩衝劑進行該賦形劑測試(表5)。

【0073】 使用AMICON®(Cutoff MW. 30,000)將HL161BKN濃縮至1 mL或更少，且然後將一緩衝劑交換為相應的緩衝劑條件以獲得210 mg/mL的最終濃度。每個條件之樣品係以0.3至0.5 mL製備，並且在40°C下在1.5 mL微量離心管中儲存4週。在第0週、第2週，以及第4週取樣以評估濃度(A280)、濁度(A340)，以及純度(SEC-HPLC、CEX-HPLC)的變化。

表5

緩衝劑	目標 濃度 (mg/mL)	11種賦形劑										
		蔗糖 (mM)	D-海 藻糖 (mM)	D-甘 露醇 (mM)	D-山 梨醇 (mM)	L-精 胺酸 HCl (mM)	L-組 胺酸 HCl (mM)	L-組 胺酸 (mM)	L-甘 胺酸 (mM)	PSB20 (%)	PSB80 (%)	NaCl (mM)
5 mM 檸檬 酸鈉 (pH6.0)	210	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	250	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	150

實施例1.2。賦形劑組合測試

【0074】 當組合在實施例1.1中所選擇之五種賦形劑(L-組胺酸、L-精胺酸鹽酸鹽、L-甘胺酸、D-山梨醇，以及D-甘露醇)時，已確認是否有一協同作用。具體地，使用DOE(實驗設計)軟體(Stat-ease DESIGN-EXPERT®，7.0版本)在一兩水準因子(2^{n-1})設計中規劃17個條件測試(表6)。具體地，總共進行12個條件測試：5 mM檸檬酸鈉(pH 6.0)基礎緩衝劑條件以及11種賦形劑組合條件。此外，實施例1.1之測試結果係用於僅該等五種賦形劑條件測試。

【0075】 以與實施例1.1中相同之方式進行該測試方法，並進一步測量每個條件之緩衝劑及樣品的重量滲透濃度，並使用該DOE軟體計算ANOVA分析以及效應值。

表6

基礎緩衝劑	HL161BKN 濃度 (mg/mL)	樣品 No.	賦形劑 (mM)				
			組胺酸	精胺酸 HCl	甘胺酸	山梨醇	甘露醇
5 mM 檸檬酸鈉 (pH 6.0)	210	對照組	-	-	-	-	-
		1	50	-	-	-	-
		2	-	50	-	-	-
		3	-	-	100	-	-
		4	-	-	-	250	-
		5	-	-	-	-	200
		6	50	-	100	250	-
		7	50	50	-	250	-
		8	50	50	100	-	-
		9	50	50	-	-	200
		10	50	-	100	-	200
		11		50	100	250	
		12	50	-	-	250	200
		13		50	100		200
		14	-	-	100	250	200
		15		50		250	200
		16	50	50	100	250	200

實施例1.3。額外賦形劑之測試

【0076】 針對該HL161BKN調配物測試進行賦形劑之一額外分析。

【0077】 進行L-甲硫胺酸的一額外測試以及將該檸檬酸鈉(pH 6.0)基礎緩衝劑改為組胺酸(pH 6.0)的一測試，其中該L-甲硫胺酸已知具有降低共價聚集體的作用，且其中該檸檬酸鈉(pH 6.0)基礎緩衝劑可能會在注射期間造成疼痛。此外，當使用含有大量過氧化物的低品質PSB20(聚山梨醇酯20)時，該抗體穩定性會因為氧化作用而降低，因此改為高品質PSB20以用於調配物。此後，確認在調配物中常用之0.02%的濃度下對於攪拌應力之作用。然後，篩選能夠降低該高濃度抗體產品之黏度的一賦形劑。

實施例1.3.1。L-甲硫胺酸以及組胺酸基礎緩衝劑之測試

【0078】 為了確認L-甲硫胺酸之作用以及該基礎緩衝劑5 mM檸檬酸鈉(pH 6.0)是否能改為組胺酸(pH 6.0)，在表7中的六個條件下進行一測試。就該組胺酸基礎緩衝劑而言，將L-組胺酸以及L-組胺酸鹽酸鹽混合以製備並使用具有6.0之pH的組胺酸基礎緩衝劑。以與實施例1.1中相同之方式進行該測試方法。

表7

HL161BKN濃度 (mg/mL)	條件	緩衝劑
210	1	5 mM檸檬酸鈉 (pH 6.0)
	2	5 mM檸檬酸鈉，50 mM甲硫胺酸 (pH 6.0)
	3	5 mM檸檬酸鈉，50 mM 組胺酸(pH 6.0)
	4	5 mM檸檬酸鈉，0.02% PSB20 (pH 6.0)
	5	10 mM組胺酸 (pH 6.0)
	6	50 mM組胺酸 (pH 6.0)

實施例1.3.2。聚山梨醇酯20 (PSB20)測試

【0079】 為了確認PSB20對抗攪拌應力的保護作用，在表8中的四個條件下進行一測試。將以與實施例1.1中相同之方式所製備之0.5 mL的各別樣品放置於

一1.5 mL微量離心管中，並且裝在一MyLab intelli混合器上，並在室溫下以10 rpm旋轉1週，且然後進行濃縮、濁度，以及純度(SEC-HPLC)分析。

表8

目標濃度 (mg/mL)	緩衝劑	PSB20	攪拌
210	5 mM檸檬酸鈉 (pH6.0)	-	-
		-	+
		0.02%	-
		0.02%	+

實施例1.3.3。用於黏度降低之賦形劑的篩選

【0080】 為了開發用於皮下投與之HL161BKN高濃度產品，測試一般已知可降低黏度的八種賦形劑。使用50 mM組胺酸(pH 6.0)作為一基礎緩衝劑進行總共9個賦形劑篩選測試(表9)。

【0081】 以與實施例1.1中相同之方式針對每個條件製備1 mL的樣品，並在25°C下測量該黏度。此外，在進行該4週加速穩定性測試的同時，評估每個條件之濃度(A280)以及純度(SEC-HPLC)的變化。

表9

基礎緩衝劑	HL161BKN 濃度 (mg/mL)	條件	8種賦形劑							
			L-組胺 酸HCl (mM)	L-離胺 酸HCl (mM)	L-精胺 酸HCl (mM)	甘胺酸 (mM)	L-纈胺 酸(mM)	NaCl (mM)	Na ₂ SO ₄ (mM)	NH ₄ Cl (mM)
50 mM 組胺酸 (pH6.0)	210	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	100	-	-	-	-	-	-	-
		3	-	100	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	100	-	-	-	-	-
		5	-	-	-	100	-	-	-	-
		6	-	-	-	-	100	-	-	-
		7	-	-	-	-	-	100	-	-
		8	-	-	-	-	-	-	100	-
		9	-	-	-	-	-	-	-	100

實施例1.4。賦形劑濃度篩選

實施例1.4.1。第一次賦形劑濃度篩選

【0082】 兩水準因子(2ⁿ)設計之DOE測試係規劃用於經由實施例1.1、1.2及1.3所選擇之50 mM組胺酸(pH 6.0)基礎緩衝劑以及四種賦形劑(L-甲硫胺酸、L-精胺酸鹽酸鹽、D-甘露醇，以及PSB20)中的三種賦形劑(L-甲硫胺酸、L-精胺酸鹽酸鹽，以及D-甘露醇)，並且在總共9個條件下進行賦形劑濃度篩選(表10)。

【0083】 以與實施例1.1中相同之方式進行實驗，並分析濃度(A280)、濁度(A340)、純度(SEC-HPLC、CEX-HPLC)、黏度，以及重量滲透濃度的變化。

表10

條件	L-甲硫胺酸 (mM)	L-精胺酸HCl (mM)	D-甘露醇 (mM)	PSB20 (%)
1	-	-	-	-
2	50	50	0	0.02
3	10	100	0	0.02
4	10	50	100	0.02
5	10	100	100	0.02
6	50	100	100	0.02
7	50	50	100	0.02
8	50	100	0	0.02
9	10	50	0	0.02

實施例1.4.2。第二次賦形劑濃度篩選

【0084】 為了研究在最終選定之組胺酸基礎緩衝劑以及兩種賦形劑(L-精胺酸鹽酸鹽以及PSB20)之中的L-精胺酸鹽酸鹽的最佳濃度，使用HL161BKN B018及B021之兩個批次在四個條件下進行一4週40°C加速穩定性測試(表11)。以與實施例1.1中相同之方式進行該測試，並分析濃度(A280)、濁度(A340)、純度(SEC-HPLC、CEX-HPLC)、黏度、重量滲透濃度，以及不溶性亞可見顆粒(微流成像；MFI)。

表11

條件	L-組胺酸	L-精胺酸HCl	PSB20 (%)	HL161BKN
----	-------	----------	-----------	----------

	(基礎緩衝劑) (mM)	(mM)		批次#
1	50	100	0.02	B018
2	50	150	0.02	
3	100	100	0.02	
4	150	50	0.02	
1	50	100	0.02	B021
2	50	150	0.02	
3	100	100	0.02	
4	150	50	0.02	

實施例2。賦形劑篩選測試之結果

實施例2.1。賦形劑測試之結果

【0085】 為了評估被選用於賦形劑篩選之11種賦形劑對於HL161BKN樣品之穩定性的影響，在40°C的加速條件下在第0週、第2週，以及第4週進行濃度、濁度、純度、聚集體、片段，以及電荷變異體的分析。經由此等分析，選擇5種賦形劑(L-精胺酸鹽酸鹽、L-組胺酸、D-甘露醇、L-甘胺酸，以及D-山梨醇)，其等具有抑制聚集體及片段之形成的良好作用。

實施例2.1.1。濃度(A280)及濁度(A340)分析之結果

【0086】 HL161BKN濃度增加了4週(表12)，其被認為是因為在40°C的加速條件下的緩衝劑蒸發。

表12

賦形劑	0週				2週				4週			
	Meas. OD340	平均	稀釋因子	濃度	Meas. OD340	平均	稀釋因子	濃度	Meas. OD340	平均	稀釋因子	濃度
-	37.090	37.338	10	231.9	41.560	41.567	10	258.2	41.000	40.830	10	253.6
	37.435				41.547				40.747			
	37.489				41.594				40.744			
組胺酸	34.625	34.887	10	216.7	38.327	38.761	10	240.7	37.347	37.508	10	233.0
	34.901				38.999				37.580			
	35.136				38.956				37.596			
組胺酸 HCl	35.391	35.220	10	218.8	35.938	35.735	10	222.0	38.122	38.222	10	237.4
	35.050				35.559				38.241			
	35.220				35.709				38.304			
	33.643	33.813	10	210.0	36.255	36.215	10	224.9	38.682	39.004	10	242.3

精胺酸 HCl	33.697				36.278				39.231			
	34.098				36.113				39.100			
海藻糖	33.000	32.923	10	204.5	33.704	33.671	10	209.1	34.474	34.704	10	215.6
	33.018				33.627				34.809			
	32.752				33.682				34.829			
山梨醇	34.590	34.938	10	217.0	36.956	37.086	10	230.3	38.396	38.591	10	239.7
	34.961				37.169				38.726			
	35.262				37.133				38.652			
蔗糖	33.079	33.120	10	205.7	39.543	39.359	10	244.5	39.865	40.004	10	248.5
	33.104				39.384				39.955			
	33.177				39.151				40.193			
甘露醇	34.599	34.561	10	214.7	38.971	38.988	10	242.2	37.017	37.131	10	230.6
	34.613				38.879				37.034			
	34.471				39.114				37.341			
甘胺酸	33.782	33.608	10	208.7	30.015	30.159	10	187.3	36.080	36.265	10	225.2
	33.296				30.141				36.338			
	33.745				30.320				36.377			
PSB20	36.778	36.623	10	227.5	38.696	39.312	10	244.2	41.305	40.944	10	254.3
	36.524				39.574				40.330			
	36.567				39.666				41.196			
PSB80	32.287	32.284	10	200.5	36.254	36.183	10	224.7	45.823	45.692	10	283.8
	32.445				36.103				45.721			
	32.119				36.193				45.533			
NaCl	30.704	30.708	10	190.7	32.621	32.658	10	202.8	34.538	34.592	10	214.9
	30.679				32.757				34.708			
	30.741				32.597				34.530			

【0087】 另一方面，該濁度在大部分條件中並未增加，或者變化量係0.020或更少。然而，目視觀察到在該PSB20條件中係混濁的，並且確認該濁度(A340)亦大幅地增加(表13)。

表13

條件 No.	賦形劑	濁度(A340)			
		第0週	第2週	第4週	Δ A340 (第4週-第0週)
1	-	0.125	0.122	0.145	0.020
2	蔗糖	0.211	0.166	0.167	-0.044
3	D-海藻糖	0.127	0.099	0.098	-0.029
4	D-甘露醇	0.184	0.111	0.113	-0.071
5	D-山梨醇	0.129	0.106	0.115	-0.014
6	L-精胺酸HCl	0.142	0.095	0.101	-0.041
7	L-組胺酸HCl	0.149	0.108	0.130	-0.019
8	L-組胺酸	0.118	0.112	0.124	0.006

9	L-甘胺酸	0.142	0.100	0.113	-0.029
10	PSB20	0.166	1.159	1.260	1.094
11	PSB80	0.266	0.324	0.275	0.009
12	NaCl	0.162	0.119	0.142	-0.020

實施例2.1.2。聚集體及片段分析之結果

【0088】 SEC-HPLC係用於比較並評估針對每個賦形劑條件所增加之聚集體及片段的量(表14)。相較於該基礎緩衝劑條件，L-精胺酸鹽酸鹽、L-組胺酸、L-組胺酸鹽酸鹽、D-甘露醇、L-甘胺酸，以及D-山梨醇有效地抑制聚集體之形成。此外，0.2% PSB20、0.2% PSB80，以及NaCl反而會增加聚集體之形成。此外，L-組胺酸、L-組胺酸鹽酸鹽、L-精胺酸鹽酸鹽，以及L-甘胺酸係抑制片段之形成的賦形劑，且NaCl會增加片段之形成(表14以及圖4)。

表14

條件 No.	賦形劑	相對純度(單體)			在第2週之變化 (W2-W0)		在第4週之變化 (W4-W0)	
		第0週	第2週	第4週	Δ聚集體	Δ片段	Δ聚集體	Δ片段
1	-	100.0	92.1	84.4	4.3	2.9	10.0	4.3
2	蔗糖	100.0	93.6	87.3	3.3	2.5	7.6	3.9
3	D-海藻糖	100.0	94.9	90.6	2.2	2.5	4.5	4.1
4	D-甘露醇	100.0	95.1	91.5	1.9	2.6	3.6	4.2
5	D-山梨醇	100.0	94.9	91.4	2.0	2.7	3.8	4.0
6	L-精胺酸HCl	100.0	97.5	96.7	0.2	2.1	0.1	3.0
7	L-組胺酸HCl	100.0	96.1	94.7	2.0	1.7	2.3	2.7
8	L-組胺酸	100.0	95.8	94.7	2.0	1.8	2.0	2.5
9	L-甘胺酸	100.0	96.2	93.2	1.6	1.9	3.6	2.7
10	PSB20	100.0	95.9	84.0	0.9	2.8	10.5	4.0
11	PSB80	100.0	83.5	81.5	12.5	2.4	13.0	3.7
12	NaCl	100.0	86.6	70.7	8.2	4.0	20.1	6.5

實施例2.1.3。電荷變異體分析之結果

【0089】 使用CEX-HPLC確認根據每個賦形劑條件HL161BKN之電荷變異體的變化模式。結果，並未觀察到電荷變異體的明顯變化。然而，該主峰在PSB20及NaCl條件中大幅地降低(圖5)。此為可預期的因為所增加之聚集體。

實施例2.2。賦形劑組合測試之結果

【0090】 評估在實施例1.1之賦形劑測試中所選擇之五種賦形劑的組合對於HL161BKN樣品之穩定性的影響。具體地，進行該40°C 4週加速測試，並選擇可有效地抑制聚集體及片段之形成的L-精胺酸鹽酸鹽、L-組胺酸，以及D-甘露醇。

【0091】 為了確認經由該賦形劑篩選測試所選擇之賦形劑是否會透過組合而具有一協同作用，使用實驗設計(DOE)軟體規劃一條條件測試。進行總共12個條件測試，包括一基礎緩衝劑條件以及11種賦形劑組合條件。實施例1.1之測試結果係用於該等五種賦形劑單獨條件測試(表15)。

【0092】 當藉由ANOVA分析聚集體之變化量的比較結果時，發現一種以統計學上顯著水平($p < 0.01$)降低聚集體之形成的賦形劑。然而，沒有賦形劑係以統計學上顯著水平降低片段之形成。

【0093】 另一方面，就HL161BKN而言，聚集體之形成模式會因為賦形劑之組合而異，但是藉由賦形劑之組合並沒有協同作用。賦形劑之種類係參考該ANOVA分析以及效應值之比較排序而選擇。

表15

條件 No.	L-組胺酸	L-精胺酸HCl	L-甘胺 酸	D-山梨醇	D-甘露醇	測試
	50 mM	50 mM	100 mM	250 mM	200 mM	
1	-1	-1	-1	-1	1	X
2	1	-1	1	1	-1	O
3	1	1	-1	1	-1	O
4	1	-1	-1	-1	-1	X
5	1	1	1	-1	-1	O

6	-1	1	-1	-1	-1	X
7	-1	-1	-1	1	-1	X
8	1	1	-1	-1	1	O
9	1	-1	1	-1	1	O
10	1	1	1	1	1	O
11	1	-1	-1	1	1	O
12	-1	1	1	-1	1	O
13	-1	-1	1	1	1	O
14	-1	1	1	1	-1	O
15	-1	1	-1	1	1	O
16	-1	-1	1	-1	-1	X
17	-1	-1	-1	-1	-1	O

實施例2.2.1。濃度(A280)及濁度(A340)分析之結果

【0094】 HL161BKN的濃度增加了4週，其被認為是因為在40°C的加速條件下的緩衝劑蒸發(表16)。另一方面，濁度並未增加或者顯示稍微增加至0.054或更少(表17)。

表16

條件	0週				2週				4週			
	Meas. OD280	平均	稀釋因子	濃度	Meas. OD280	平均	稀釋因子	濃度	Meas. OD280	平均	稀釋因子	濃度
2	36.559	36.471	10	226.5	36.286	36.333	10	225.7	38.797	39.513	10	245.4
	36.505				36.411				39.767			
	36.349				36.301				39.976			
3	34.230	34.367	10	213.5	37.192	37.215	10	231.2	37.316	37.342	10	231.9
	34.393				37.254				37.534			
	34.477				37.200				37.177			
5	35.852	35.860	10	222.7	38.200	38.062	10	236.4	37.938	37.988	10	236.0
	35.768				38.003				37.875			
	35.961				37.984				38.151			
8	33.291	33.364	10	207.2	36.967	37.044	10	230.1	38.593	38.709	10	240.4
	33.395				37.064				38.919			
	33.406				37.102				38.616			
9	34.744	34.872	10	216.6	36.676	36.908	10	229.2	37.359	37.306	10	231.7
	34.994				37.078				37.507			
	34.877				36.971				37.053			
10	35.955	35.986	10	223.5	36.084	36.158	10	224.6	37.998	38.015	10	236.1
	36.051				36.124				37.981			
	35.952				36.265				38.067			
11	34.664	34.419	10	213.8	36.009	36.020	10	223.7	36.216	36.293	10	225.4
	34.410				35.972				36.272			

	34.182				36.080				36.391			
12	35.834	35.976	10	223.5	36.878	36.956	10	229.5	39.354	39.027	10	242.4
	36.063				37.016				38.856			
	36.031				36.973				38.872			
13	34.637	34.713	10	215.6	39.294	39.173	10	243.3	38.173	38.248	10	237.6
	34.706				38.945				38.372			
	34.797				39.280				38.199			
14	34.242	34.259	10	212.8	38.398	38.458	10	238.9	35.047	35.016	10	217.5
	34.401				38.349				35.041			
	34.134				38.628				34.959			
15	34.681	34.769	10	216.0	34.802	34.916	10	216.9	37.212	37.332	10	231.9
	34.761				34.819				37.388			
	34.865				35.128				37.397			
17	36.082	36.074	10	224.1	38.488	38.520	10	239.3	41.257	41.353	10	256.8
	36.121				38.548				41.370			
	36.019				38.525				41.431			

表17

條件	0週		2週		4週	
	Meas. OD340	平均	Meas. OD340	平均	Meas. OD340	平均
2	0.120	0.119	0.105	0.105	0.140	0.141
	0.117		0.104		0.143	
	0.121		0.106		0.141	
3	0.102	0.101	0.104	0.106	0.126	0.121
	0.101		0.108		0.118	
	0.099		0.106		0.119	
5	0.113	0.106	0.133	0.131	0.161	0.160
	0.102		0.129		0.158	
	0.103		0.131		0.160	
8	0.090	0.090	0.105	0.107	0.120	0.121
	0.093		0.107		0.121	
	0.086		0.108		0.122	
9	0.103	0.103	0.111	0.112	0.140	0.141
	0.103		0.110		0.141	
	0.104		0.114		0.143	
10	0.099	0.098	0.114	0.112	0.132	0.133
	0.097		0.109		0.134	
	0.099		0.112		0.133	
11	0.104	0.102	0.117	0.116	0.136	0.136
	0.101		0.117		0.137	
	0.101		0.114		0.135	
12	0.110	0.104	0.096	0.096	0.099	0.101
	0.102		0.097		0.102	
	0.100		0.095		0.101	
13	0.112	0.110	0.100	0.099	0.098	0.099
	0.110		0.099		0.101	
	0.107		0.097		0.097	
14	0.101	0.098	0.108	0.106	0.143	0.142
	0.098		0.107		0.141	

	0.096		0.104		0.142	
15	0.107	0.105	0.099	0.099	0.117	0.117
	0.105		0.102		0.117	
	0.102		0.097		0.117	
17	0.122	0.119	0.106	0.104	0.114	0.115
	0.118		0.104		0.116	
	0.116		0.103		0.114	

實施例2.2.2。聚集體及片段分析之結果

【0095】 SEC-HPLC係用於比較並評估針對每個賦形劑組合條件所增加之聚集體及片段的量(表18以及圖7)。此外，藉由ANOVA分析總共17個條件之SEC-HPLC數據，包括實施例1.1之僅該賦形劑條件測試。結果確認L-精胺酸鹽酸鹽以統計學上顯著水平($p<0.01$)降低聚集體之形成(圖6)，且沒有賦形劑係以統計學上顯著水平降低片段之形成。

【0096】 此外，比較聚集作用及片段作用之效應值的結果確認當L-組胺酸、D-甘露醇，以及D-山梨醇被使用作為賦形劑時，HL161BKN之聚集體及片段之形成會降低。然而，在該等賦形劑之間並沒有協同作用。D-甘露醇以及D-山梨醇係異構體，並選擇其中經常使用的D-甘露醇(圖8)。

表18

條件 No.	賦形劑	相對純度(單體)			在第2週之變化 (W2-W0)		在第4週之變化 (W4-W0)	
		第0週	第2週	第4週	Δ 聚集體	Δ 片段	Δ 聚集體	Δ 片段
2	H+S+G	100.0	95.7	95.7	2.3	1.8	1.8	2.2
3	H+A+S	100.0	95.9	96.5	2.1	1.8	1.1	2.2
5	H+A+G	100.0	95.2	95.1	2.3	2.2	2.1	2.5
8	H+A+M	100.0	96.5	97.2	1.4	1.8	0.4	2.3
9	H+M+G	100.0	95.4	95.8	2.5	1.9	1.8	2.2
10	H+A+S+M+G	100.0	95.9	96.2	2.1	1.7	1.3	2.3
11	H+S+M	100.0	95.7	95.7	2.2	1.8	1.9	2.1
12	A+M+G	100.0	96.7	96.3	1.1	2.0	0.9	2.5
13	S+M+G	100.0	96.6	96.6	1.1	2.0	0.7	2.4
14	A+S+G	100.0	97.5	94.7	0.0	2.3	0.6	4.3

15	A+S+M	100.0	96.9	97.2	0.6	2.2	-0.4	3.0
17	(-)對照組	100.0	92.6	88.9	4.1	2.7	6.6	3.6

* A：50 mM L-精胺酸鹽酸鹽、H：50 mM L-組胺酸、G：100 mM L-甘胺酸、M：200 mM D-甘露醇、S：250 mM D-山梨醇

實施例2.2.3。電荷變異體分析之結果

【0097】 使用CEX-HPLC確認根據該賦形劑組合條件HL161BKN之電荷變異體的變化模式。結果，並未觀察到電荷變異體(鹼性及酸性變異體)的明顯變化(圖9)。

實施例2.2.4。黏度及重量滲透濃度分析之結果

【0098】 測量每個賦形劑組合條件之黏度的結果確認當添加L-精胺酸鹽酸鹽時該黏度會降低。該重量滲透濃度會隨著經添加之賦形劑的數目及濃度增加而增加。具體地，已確認添加50 mM L-精胺酸鹽酸鹽、50 mM L-組胺酸，以及100 mM L-甘胺酸會分別地增加約100 mOsmol/kg的重量滲透濃度；添加200 mM D-甘露醇會增加約200 mOsmol/kg的重量滲透濃度；以及添加250 mM D-山梨醇會增加約250 mOsmol/kg的重量滲透濃度(表19)。

【0099】 一般而言，皮下注射的重量滲透濃度與人體的重量滲透濃度相似(約 290 mOsmol/kg)，且係被調節在約 250 至 500 mOsmol/kg 的範圍內(PCT/EP2009/066675)。因此，考量到HL161BKN濃度，確定該調配物緩衝劑的重量滲透濃度應該被調節在約220至450 mOsmol/kg的範圍內。因此，考量到該重量滲透濃度範圍，決定進行賦形劑濃度篩選的後續測試。

表19

條件 No.	賦形劑	黏度(cP，25°C)		重量滲透濃度 (mOsmol/kg)	
		緩衝劑	樣品	緩衝劑	樣品
2	H+S+G	1.066	N/A	498	683

3	H+A+S	1.052	16.700	485	617
5	H+A+G	0.925	19.641	320	395
8	H+A+M	1.002	15.941	434	549
9	H+M+G	1.021	14.807	451	593
10	H+A+S+M+G	1.198	27.865	831	1103
11	H+S+M	1.465	23.680	631	850
12	A+M+G	1.250	39.732	425	560
13	S+M+G	1.055	22.291	471	613
14	A+S+G	1.358	32.547	606	814
15	A+S+M	1.199	19.176	607	788
17	(-)對照組	1.115	57.890	23	37

* A：50 mM L-精胺酸鹽酸鹽、H：50 mM L-組胺酸、G：100 mM L-甘胺酸、M：200 mM D-甘露醇、S：250 mM D-山梨醇

實施例2.3。額外賦形劑測試之結果

【0100】 進行一額外賦形劑測試。結果，50 mM組胺酸(pH 6.0)被使用作為一基礎緩衝劑，且L-甲硫胺酸以及0.02% PSB20被選擇作為額外的賦形劑，其中該L-甲硫胺酸具有抑制聚集體之形成的作用，且其中該0.02% PSB20在攪拌應力條件下可抑制聚集體之形成。

實施例2.3.1。L-甲硫胺酸以及組胺酸基礎緩衝劑測試之結果

1) 濃度(A280)及濁度(A340)分析之結果

【0101】 該HL161BKN濃度增加了4週，其被認為是因為在40°C的加速條件下的緩衝劑蒸發(表20)。該濁度並未增加或者顯示稍微增加至0.1或更少(表21)。

表20

條件	T0				T2				T4			
	Meas. OD280	平均	稀釋因子	濃度	Meas. OD280	平均	稀釋因子	濃度	Meas. OD280	平均	稀釋因子	濃度
10 mM	33.102	33.179	10	206.1	37.997	38.120	10	236.8	34.364	34.382	10	213.6

檸檬酸 鈉， pH 6	33.293				37.989				34.337			
	33.143				38.374				34.446			
10 mM 檸檬酸鈉， 50 mM 甲硫胺酸， pH 6	32.352	32.289	10	200.6	34.964	34.778	10	216.0	33.135	33.026	10	205.1
	32.215				34.658				33.137			
	32.301				34.712				32.805			
10 mM 檸檬酸鈉， 50 mM組胺 酸HCl，pH 6	35.852	35.817	10	222.5	40.067	40.309	10	250.4	38.534	38.685	10	240.3
	35.773				40.413				38.776			
	35.826				40.447				38.746			
10 mM 檸檬酸鈉， 0.02% PSB20， pH6	33.336	33.529	10	208.3	37.538	37.818	10	234.9	33.866	33.795	10	209.9
	33.572				37.905				33.662			
	33.678				38.012				33.857			
10 mM 組 胺酸，pH 6	32.976	32.987	10	204.9	37.096	37.358	10	232.0	37.282	37.254	10	231.4
	33.024				37.358				37.246			
	32.960				37.619				37.234			
50 mM 組 胺酸，pH 6	33.019	32.937	10	204.6	37.23	37.071	10	230.3	39.888	39.889	10	247.8
	32.837				37.024				40.019			
	32.954				36.959				39.761			

表21

條件	T0		T2		T4	
	Meas. OD340	平均	Meas. OD340	平均	Meas. OD340	平均
10 mM檸檬酸鈉， pH 6	0.110	0.111	0.116	0.116	0.127	0.125
	0.115		0.117		0.124	
	0.109		0.114		0.124	
10 mM檸檬酸鈉， 50 mM甲硫胺酸， pH 6	0.112	0.112	0.100	0.101	0.103	0.103
	0.115		0.106		0.104	
	0.108		0.098		0.103	
10 mM檸檬酸鈉， 50 mM組胺酸，pH 6	0.111	0.108	0.118	0.119	0.135	0.135
	0.107		0.122		0.136	
	0.105		0.117		0.134	
10 mM檸檬酸鈉， 0.02% PSB20，pH 6	0.114	0.115	0.123	0.120	0.123	0.123
	0.115		0.119		0.123	
	0.116		0.117		0.122	
10 mM 組胺酸，pH 6	0.102	0.103	0.116	0.116	0.149	0.146
	0.108		0.118		0.143	
	0.100		0.115		0.146	
50 mM 組胺酸，pH 6	0.097	0.095	0.125	0.123	0.153	0.152
	0.096		0.122		0.152	
	0.092		0.123		0.150	

2) 聚集體及片段分析之結果

【0102】 相較於該基礎緩衝劑條件，L-甲硫胺酸展現抑制聚集體之形成的優異作用。此外，藉由0.02% PSB20，聚集體之形成並沒有增加。此外，添加L-組胺酸作為一賦形劑之條件的結果與使用L-組胺酸作為一基礎緩衝液之條件的結果相似，且相較於在10 mM組胺酸條件中，在50 mM組胺酸條件中聚集體之形成會降低(表22以及圖10)。

表22

條件 No.	相對純度(單體)			在第2週之變化(W2-W0)		在第4週之變化(W4-W0)	
	第0週	第2週	第4週	Δ 聚集體	Δ 片段	Δ 聚集體	Δ 片段
1	100.0	90.1	82.5	5.1	3.9	9.9	6.0
2	100.0	95.7	92.4	2.2	1.8	4.3	2.7
3	100.0	95.1	93.9	2.7	1.9	3.0	2.7
4	100.0	88.8	83.5	5.8	4.4	7.7	7.2
5	100.0	94.4	91.9	3.3	1.9	4.4	3.1
6	100.0	96.2	95.1	1.8	1.7	1.8	2.8

3) 電荷變異體分析之結果

【0103】 作為CEX-HPLC分析之結果，並未觀察到電荷變異體(鹼性及酸性變異體)的明顯變化(圖11)。

實施例2.3.2。聚山梨醇酯20測試之結果

1) 濃度(A280)及濁度(A340)分析之結果

【0104】 作為在室溫下攪拌測試之結果，濃度幾乎沒有變化。不具有PSB20之被攪拌的樣品在視覺上變成白色，且無法測量該濁度(圖12)。另一方面，具有PSB20之樣品在攪拌條件下在視覺上稍微混濁，且該濁度增加約0.227(表23)。

【0105】 由此，確認PSB20具有保護高濃度HL161BKN對抗攪拌所造成之

應力的作用。

表23

PSB20	攪拌	相對純度(單體)			濁度(A340)		
		第0週	第1週	Δ濃度 (W1-W0)	第0週	第1週	Δ濃度 (W1-W0)
-	-	206.1	206.6	0.5	0.111	0.115	0.004
-	+	206.1	NA*	NA	0.111	NA	NA
0.02%	-	208.3	197.4	-10.9	0.115	0.126	0.011
0.02%	+	208.3	212.3	4.0	0.115	0.342	0.227

*NA：不適用

2) 聚集體及片段分析之結果

【0106】攪拌應力會增加聚集體之形成，且已確認PSB20具有抑制聚集體之形成的作用。另一方面，片段並未因為攪拌應力而增加(表24以及圖13)。

表24

PSB20	攪拌	相對純度(單體)		第1週 (W1-W0)	
		第0週	第1週	Δ聚集體	Δ片段
-	-	100.0	94.7	4.6	0.2
-	+	100.0	NA	NA	NA-
0.02%	-	100.0	94.3	5.0	0.2
0.02%	+	100.0	90.6	8.3	0.2

*NA：不適用

實施例2.3.3。用於黏度降低之賦形劑的篩選結果

1) 濃度(A280)及黏度分析之結果

【0107】該HL161BKN濃度增加了4週(表25)，其被認為是因為在40°C的加速條件下的緩衝劑蒸發。相較於條件1，當添加L-組胺酸鹽酸鹽、L-精胺酸鹽酸

鹽，以及L-甘胺酸時該黏度會降低，但是該效果並不顯著。另一方面，就L-離胺酸鹽、NaCl、Na₂SO₄，以及NH₄Cl而言，該黏度大幅地增加(表26)。

表25

條件			第0週				第2週				第4週			
			Meas. OD280	平均	稀釋因子	濃度	Meas. OD280	平均	稀釋因子	濃度	Meas. OD280	平均	稀釋因子	濃度
210 mg/mL	1	50 mM組胺酸，pH 6	33.850	33.934	10	210.8	38.622	38.502	10	239.1	41.008	41.277	10	256.4
			33.922				38.514				41.264			
			34.031				38.369				41.559			
	2	50 mM組胺酸，100 mM組胺酸HCl，pH 6	32.763	32.539	10	202.1	35.180	35.132	10	218.2	38.764	38.979	10	242.1
			32.386				35.054				39.112			
			32.469				35.161				39.061			
	3	50 mM組胺酸，100 mM甘胺酸，pH 6	32.403	32.500	10	201.9	36.711	36.544	10	227.0	36.376	36.440	10	226.3
			32.556				36.893				36.527			
			32.541				36.028				36.418			
	4	50 mM組胺酸，100 mM精胺酸HCl，pH 6	32.554	32.619	10	202.6	37.297	37.092	10	230.4	36.304	36.403	10	226.1
			32.649				36.950				36.488			
			32.655				37.028				36.418			
	5	50 mM組胺酸，100 mM離胺酸HCl，pH 6	33.940	34.026	10	211.3	37.492	37.491	10	232.9	40.240	40.630	10	252.4
			34.269				37.509				40.916			
			33.870				37.471				40.733			
	6	50 mM組胺酸，100 mM纈胺酸，pH 6	35.426	35.637	10	221.3	38.475	38.518	10	239.2	37.653	37.850	10	235.1
			35.763				38.581				38.070			
			35.722				38.499				37.828			
	7	50 mM組胺酸，100 mM NH ₄ Cl，pH 6	35.017	34.997	10	217.4	37.585	37.575	10	233.4	39.127	39.392	10	244.7
			35.230				37.434				39.621			
			34.743				37.707				39.428			
	8	50 mM組胺酸，100 mM NaCl，pH 6	35.734	35.647	10	221.4	37.912	37.844	10	235.1	38.064	38.115	10	236.7
			35.597				37.807				38.364			
			35.611				37.812				37.917			
	9	50 mM組胺酸，100 mM Na ₂ SO ₄ ，pH 6	35.553	35.655	10	221.5	35.367	35.383	10	219.8	36.852	37.118	10	230.5
			35.792				35.440				37.310			
			35.620				35.343				37.191			

表26

條件No.	賦形劑	黏度(cP，25℃)	
		緩衝劑	樣品
1	-	1.047	19.723
2	L-組胺酸HCl	1.240	18.487
3	L-離胺酸HCl	1.101	26.472
4	L-精胺酸HCl	1.105	17.768
5	L-甘胺酸	1.070	17.716
6	L-纈胺酸	1.086	20.753
7	NaCl	0.980	25.620
8	Na ₂ SO ₄	1.088	24.135
9	NH ₄ Cl	1.049	30.414

2) 聚集體及片段分析之結果

【0108】藉由SEC-HPLC分析來分析該等聚集體及片段。結果，相較於條件1，當添加L-組胺酸鹽酸鹽以及L-精胺酸鹽酸鹽時，所形成之聚集體相對地較少，且沒有賦形劑會降低片段之形成(表27以及圖14)。

表27

條件No.	賦形劑	相對純度(單體%)			在第2週之變化(W2-W0)		在第4週之變化(W4-W0)	
		第0週	第2週	第4週	Δ聚集體	Δ片段	Δ聚集體	Δ片段
1	-	100.0	92.4	89.4	5.2	2.2	6.9	3.3
2	L-組胺酸HCl	100.0	94.4	92.4	3.0	2.4	3.9	3.5
3	L-離胺酸HCl	100.0	93.7	92.1	3.8	2.3	4.5	3.1
4	L-精胺酸HCl	100.0	94.6	92.8	3.0	2.2	3.8	3.2
5	L-甘胺酸	100.0	93.7	91.7	3.9	2.2	4.9	3.2
6	L-纈胺酸	100.0	93.6	92.2	3.9	2.3	4.4	3.1
7	NaCl	100.0	93.2	91.4	4.2	2.4	5.3	3.1
8	Na ₂ SO ₄	100.0	94.1	92.3	3.6	2.2	4.4	3.0
9	NH ₄ Cl	100.0	93.4	91.6	4.1	2.3	4.8	3.2

實施例2.4。賦形劑濃度篩選之結果

實施例2.4.1。第一次賦形劑濃度篩選之結果

【0109】 為了篩選在上述實施例1.3中所選擇之組胺酸基礎緩衝劑(pH 6.0)以及在0.02% PSB20中三種賦形劑(L-甲硫胺酸、L-精胺酸鹽酸鹽，以及D-甘露醇)的濃度，在總共9個條件下進行一測試(表28)。結果，除了組胺酸基礎緩衝劑之外，亦選擇L-精胺酸鹽酸鹽以及PSB20作為賦形劑。

表28

條件No.	L-甲硫胺酸 (mM)	L-精胺酸HCl (mM)	D-甘露醇 (mM)	PSB20 (%)
1	-	-	-	-
2	50	50	0	0.02
3	10	100	0	0.02
4	10	50	100	0.02
5	10	100	100	0.02
6	50	100	100	0.02
7	50	50	100	0.02
8	50	100	0	0.02
9	10	50	0	0.02

1) 濃度(A280)及濁度(A340)分析之結果

【0110】 該HL161BKN濃度在4週內增加約15%，其被認為是因為在40°C的加速條件下的緩衝劑蒸發(表29)。在每個條件中的濁度僅顯示平均約0.048的不顯著增加(表30)。

表29

條件	0週				2週				4週			
	Meas. OD280	平均	稀釋 因子	濃度	Meas. OD280	平均	稀釋 因子	濃度	Meas. OD280	平均	稀釋 因子	濃度

210 mg/ mL	1	50 mM組胺酸， pH 6	34.818	34.673	10	215.4	40.515	40.787	10	253.3	39.391	39.579	10	245.8
			34.770				40.963				39.619			
			34.432				40.883				39.726			
	2	50 mM組胺酸， 50 mM 甲 硫 胺 酸，50 mM精胺 酸HCl，pH 6	35.636	35.605	10	221.1	41.353	41.430	10	257.3	40.936	41.245	10	256.2
			35.538				41.565				41.451			
			35.641				41.372				41.349			
	3	50 mM組胺酸， 10 mM 甲 硫 胺 酸，100 mM精 胺酸HCl， pH 6	33.558	33.430	10	207.6	36.078	36.064	10	224.0	34.138	34.161	10	212.2
			33.443				36.145				34.256			
			33.289				35.968				34.088			
	4	50 mM組胺酸， 10 mM 甲 硫 胺 酸，50 mM精胺 酸HCl，100 mM 甘露醇， pH 6	36.486	36.523	10	226.9	40.730	40.791	10	253.4	40.325	40.219	10	249.8
			36.690				40.785				40.367			
			36.393				40.857				39.965			
	5	50 mM組胺酸， 10 mM 甲 硫 胺 酸，100 mM精 胺酸HCl，100 mM甘露醇， pH 6	36.410	36.336	10	225.7	36.240	36.254	10	225.2	37.971	38.208	10	237.3
			36.131				36.256				38.410			
			36.467				36.266				38.243			
	6	50 mM組胺酸， 50 mM 甲 硫 胺 酸，100 mM精 胺酸HCl，100 mM甘露醇， pH 6	35.108	35.125	10	218.2	39.423	39.641	10	246.2	41.750	41.923	10	260.4
			35.132				39.749				41.922			
			35.136				39.752				42.027			
	7	50 mM組胺酸， 50 mM 甲 硫 胺 酸，50 mM精胺 酸HCl，100 mM 甘露醇， pH 6	36.423	36.579	10	227.2	39.168	39.110	10	242.9	43.308	43.031	10	267.3
			36.555				39.018				42.800			
			36.759				39.144				42.985			
	8	50 mM組胺酸， 50 mM 甲 硫 胺 酸，100 mM精 胺酸HCl， pH 6	34.828	35.081	10	217.9	35.673	35.929	10	223.2	37.477	37.722	10	234.3
			35.124				35.967				37.909			
			35.292				36.146				37.779			
	9	50 mM組胺酸， 10 mM 甲 硫 胺 酸，50 mM精胺 酸HCl，pH 6	31.656	31.625	10	196.4	35.713	35.849	10	222.7	34.000	34.103	10	211.8
			31.604				35.884				34.226			
			31.615				35.951				34.084			

表30

條件	T0		T2		T4	
	Meas. OD340	平均	Meas. OD340	平均	Meas. OD340	平均
50 mM組胺酸，pH 6	0.148	0.147	0.170	0.170	0.189	0.191
	0.146		0.169		0.191	
	0.147		0.170		0.192	
50 mM組胺酸， 50 mM甲硫胺酸， 50 mM精胺酸HCl，pH 6	0.145	0.143	0.186	0.182	0.194	0.193
	0.143		0.183		0.191	
	0.141		0.178		0.193	
50 mM組胺酸， 10 mM甲硫胺酸， 100 mM精胺酸HCl， pH 6	0.124	0.123	0.167	0.164	0.180	0.178
	0.122		0.161		0.178	
	0.123		0.165		0.175	
50 mM組胺酸， 10 mM甲硫胺酸， 50 mM精胺酸HCl， 100 mM甘露醇，pH 6	0.149	0.147	0.183	0.181	0.202	0.199
	0.148		0.179		0.198	
	0.145		0.182		0.197	
50 mM組胺酸， 10 mM甲硫胺酸， 100 mM精胺酸HCl， 100 mM甘露醇，pH 6	0.134	0.134	0.173	0.172	0.185	0.184
	0.132		0.172		0.184	
	0.135		0.172		0.184	
50 mM組胺酸， 50 mM甲硫胺酸，100 mM精胺酸HCl， 100 mM甘露醇，pH 6	0.132	0.133	0.172	0.172	0.191	0.190
	0.133		0.170		0.191	
	0.134		0.174		0.188	
50 mM組胺酸， 50 mM甲硫胺酸， 50 mM精胺酸HCl，100 mM甘露醇，pH 6	0.159	0.160	0.180	0.178	0.192	0.194
	0.160		0.175		0.196	
	0.162		0.180		0.193	
50 mM組胺酸， 50 mM甲硫胺酸，100 mM精胺酸HCl，pH 6	0.139	0.138	0.175	0.174	0.191	0.189
	0.139		0.173		0.188	
	0.137		0.174		0.189	
50 mM組胺酸， 10 mM甲硫胺酸， 50 mM精胺酸HCl，pH 6	0.141	0.142	0.164	0.163	0.186	0.184
	0.143		0.160		0.184	
	0.141		0.164		0.182	

2) 聚集體及片段分析之結果

【0111】 作為SEC-HPLC分析之結果，根據每個賦形劑濃度條件所增加之聚集體及片段的量並未顯示一顯著差異。然而，在50 mM組胺酸之基礎緩衝劑條件(條件1)中的穩定性係高的，且當添加100 mM L-精胺酸鹽酸鹽而不是50 mM時，聚集體之形成會降低。此外，已確認根據L-甲硫胺酸之濃度以及經添加之D-甘露醇的存在與否所增加之聚集體及片段的量係與該基礎緩衝劑條件幾乎沒有差異或者稍微增加(表31以及圖15)。

表31

條件 No.	相對純度(單體%)			在第2週之變化(W2- W0)		在第4週之變化(W4- W0)	
	第0週	第2週	第4週	Δ 聚集體	Δ 片段	Δ 聚集體	Δ 片段
1	100.0	96.5	94.8	1.7	1.6	2.6	2.4
2	100.0	95.8	94.2	2.3	1.7	2.9	2.6
3	100.0	96.5	94.6	1.7	1.6	2.6	2.6
4	100.0	95.6	94.1	2.6	1.6	3.3	2.3
5	100.0	96.1	94.7	2.0	1.8	2.6	2.5
6	100.0	95.9	94.3	2.2	1.7	2.8	2.6
7	100.0	95.9	94.1	2.2	1.7	3.2	2.5
8	100.0	95.9	94.5	2.2	1.7	2.8	2.5
9	100.0	94.9	93.0	2.6	2.4	3.4	3.3

3) 電荷變異體分析之結果

【0112】 作為CEX-HPLC分析之結果，根據每個賦形劑條件並未觀察到電荷變異體的明顯變化(圖16)。

4) 黏度及重量滲透濃度分析之結果

【0113】 測量根據每個賦形劑濃度條件之黏度及重量滲透濃度的結果確認，在添加濃度為100 mM而不是50 mM之L-精胺酸鹽酸鹽的條件中，降低該黏度的作用係高的，且其等之大部分具有112至588 mOsmol/kg以滿足重量滲透濃度標準(表32)。

表32

條件 No.	黏度(cP，25°C)				重量滲透濃度 (mOsmol/kg)	
	第0週		第4週		第0週	
	緩衝劑	樣品	樣品	Δ黏度 (W4-W0)	緩衝劑	樣品
1	1.062	18.682	25.033	6.321	80	112
2	1.081	16.426	28.315	11.889	232	297
3	1.120	12.148	15.029	2.881	283	331
4	1.126	19.706	30.707	11.001	305	408
5	1.176	17.528	18.147	0.619	401	500
6	1.185	17.800	29.186	11.386	446	588
7	1.168	25.624	28.682	3.058	349	474
8	1.133	18.321	18.282	-0.039	335	432
9	1.081	13.958	14.756	0.798	192	238

實施例2.4.2。第二次賦形劑濃度篩選

【0114】 在實施例1.4.1之第一次賦形劑濃度篩選中所選擇之組胺酸基礎緩衝劑以及兩種賦形劑之中，為了選擇L-精胺酸鹽酸鹽的最佳濃度，透過在四個條件中的濃度、濁度、純度(聚集體及片段)、黏度、重量滲透濃度測試，以及皮下注射(SC)投與適合性來評估HL161BKN之2批樣品(HL161BKN B018及HL161BKN B021)的穩定性。結果，確定100 mM L-組胺酸、100 mM L-精胺酸鹽酸鹽、0.02% PSB20、pH 6.0為HL161BKN的最終調配物(表33)。

表33

條件	L-組胺酸 (基礎緩衝劑) (mM)	L-精胺酸HCl (mM)	PSB20 (%)	HL161BKN 批次#
1	50	100	0.02	B018
2	50	150	0.02	
3	100	100	0.02	
4	150	50	0.02	
1	50	100	0.02	B021
2	50	150	0.02	
3	100	100	0.02	
4	150	50	0.02	

1) 濃度(A280)及濁度(A340)分析

【0115】 該HL161BKN濃度在4週內幾乎沒有變化，其預期係藉由使用封口膜密封該1.5 mL微量離心管且然後將其儲存在一恆溫恆濕器中來防止該緩衝劑蒸發之效果(表34)。此外，在所有條件下該濁度顯示0.102或更少的不顯著增加(表35)。

表34

條件			0週				2週				4週			
			Meas. OD280	平均	稀釋因子	濃度	Meas. OD280	平均	稀釋因子	濃度	Meas. OD280	平均	稀釋因子	濃度
B018 (pool)	1	50 mM組胺酸， 100 mM精胺酸 HCl，pH 6	35.485	35.547	10	220.8	34.738	34.727	10	215.7	34.493	34.474	10	214.1
			35.354				34.556				34.600			
			35.801				34.887				34.329			
	2	50 mM組胺酸， 150 mM精胺酸 HCl，pH 6	36.112	36.128	10	224.4	36.017	36.022	10	223.7	34.073	34.095	10	211.8
			36.154				36.057				34.010			
			36.117				35.992				34.201			
	3	100 mM 組 胺 酸，100 mM精 胺酸HCl，pH 6	37.151	37.273	10	231.5	35.054	35.005	10	217.4	33.163	33.265	10	206.6
			37.272				35.016				33.197			
			37.396				34.946				33.434			
	4	150 mM 組 胺 酸，50 mM精胺 酸HCl，pH 6	35.793	35.843	10	222.6	33.970	33.994	10	211.1	33.999	34.049	10	211.5
			35.722				34.009				34.146			
			36.015				34.003				34.003			
B021 (13D7)	1	50 mM組胺酸， 100 mM精胺酸 HCl，pH 6	34.958	35.085	10	217.9	36.516	36.453	10	226.4	35.538	35.633	10	221.3
			35.292				36.348				35.522			
			35.004				36.494				35.838			
	2	50 mM組胺酸， 150 mM精胺酸 HCl，pH 6	35.187	35.346	10	219.5	32.950	32.886	10	204.3	35.910	35.973	10	223.4
			35.504				32.955				35.990			
			35.346				32.753				36.019			
	3	100 mM 組 胺 酸，100 mM精 胺酸HCl，pH 6	33.123	33.218	10	206.3	36.664	36.632	10	227.5	34.242	34.278	10	212.9
			33.329				36.712				34.408			
			33.203				36.520				34.184			
	4	150 mM 組 胺 酸，50 mM精胺 酸HCl，pH 6	35.554	35.584	10	221.0	38.367	38.305	10	237.9	36.008	36.052	10	223.9
			35.600				38.500				36.075			
			35.597				38.048				36.072			

表35

條件			T0		T2		T4		Δ OD340 (T4-T0)
			Meas. OD340	平均	Meas. OD340	平均	Meas. OD340	平均	
B018 (pool)	1	50 mM 組胺酸，100 mM精胺酸HCl，pH 6	0.068	0.066	0.084	0.082	0.094	0.092	0.026
			0.068		0.080		0.092		
			0.063		0.083		0.091		
	2	50 mM 組胺酸，150 mM精胺酸HCl，pH 6	0.060	0.060	0.084	0.082	0.092	0.091	0.031
			0.063		0.080		0.092		
			0.057		0.083		0.090		
	3	100 mM 組胺酸，100 mM精胺酸HCl，pH 6	0.065	0.064	0.084	0.082	0.100	0.099	0.034
			0.065		0.082		0.100		
			0.063		0.080		0.096		
	4	150 mM 組胺酸，50 mM精胺酸HCl，pH 6	0.064	0.061	0.084	0.083	0.107	0.107	0.046
			0.060		0.082		0.109		
			0.060		0.082		0.105		
Life tech (13D7)	1	50 mM 組胺酸，100 mM精胺酸HCl，pH 6	0.140	0.142	0.214	0.216	0.244	0.244	0.102
			0.143		0.218		0.245		
			0.142		0.216		0.242		
	2	50 mM 組胺酸，150 mM精胺酸HCl，pH 6	0.139	0.140	0.187	0.186	0.202	0.201	0.061
			0.139		0.186		0.200		
			0.142		0.186		0.202		
	3	100 mM 組胺酸，100 mM精胺酸HCl，pH 6	0.135	0.138	0.195	0.193	0.213	0.214	0.076
			0.142		0.193		0.215		
			0.136		0.192		0.213		
	4	150 mM 組胺酸，50 mM精胺酸HCl，pH 6	0.144	0.140	0.203	0.203	0.230	0.230	0.090
			0.137		0.205		0.229		
			0.139		0.201		0.231		

2) 聚集體及片段分析

【0116】 經由SEC-HPLC分析，根據每個賦形劑條件所增加之聚集體及片段的量並未顯示一顯著差異，但是已確認在條件3(100 mM L-組胺酸、100 mM L-精胺酸HCl、0.02% PSB20、pH 6.0)中以及在條件4(50 mM L-組胺酸、100 mM L-精胺酸HCl、0.02% PSB20、pH 6.0)中，聚集體之形成係最少的(表36以及圖17)。

表36

批次 No.	條件 No.	相對純度(單體)			在第2週之變化 (W2-W0)		在第4週之變化 (W4-W0)	
		第0週	第2週	第4週	Δ 聚集體	Δ 片段	Δ 聚集體	Δ 片段
B018	1	100.0	96.6	94.9	1.5	1.9	2.3	2.7
	2	100.0	96.3	95.2	1.7	2.0	2.2	2.6
	3	100.0	96.7	95.3	1.3	2.0	1.8	2.8
	4	100.0	96.7	95.5	1.1	2.1	1.6	2.9
B021	1	100.0	96.1	94.1	1.5	2.3	2.1	3.7
	2	100.0	96.0	94.3	1.7	2.2	2.2	3.4
	3	100.0	96.4	94.6	1.3	2.2	1.6	3.7
	4	100.0	96.3	94.7	1.3	2.4	1.6	3.7

3) 電荷變異體分析

【0117】 作為CEX-HPLC分析之結果，根據每個賦形劑條件並未觀察到電荷變異體(鹼性及酸性變異體)的明顯變化(圖18)。

4) 黏度及重量滲透濃度分析

【0118】 作為測量根據每個賦形劑濃度條件之黏度及重量滲透濃度之結果，該黏度被調節至11至16 cP，亦即低於20 cP之限制，其係皮下投與產品之黏度限制，且該重量滲透濃度係350至465 mOsmol/kg以滿足250至500 mOsmol/kg的標準(表37)。

表37

批次 No.	條件 No.	黏度(cP , 25°C)			重量滲透濃度 (mOsmol/kg)			
		第0週		第4週	第0週		第4週	
		緩衝劑	樣品	樣品	緩衝劑	樣品	樣品	Δ mOsm (W4-W0)
B018	1	1.146	10.956	14.067	271	350	360	10
	2	1.160	13.126	12.117	360	429	436	7
	3	1.162	13.548	12.024	367	443	446	3
	4	1.153	11.848	11.777	373	465	475	10
B021	1	1.146	13.466	13.834	271	355	434	79
	2	1.160	14.030	11.871	360	453	458	5
	3	1.162	13.132	11.881	367	448	453	5
	4	1.153	15.875	13.351	373	465	471	6

5) 不溶性亞可見顆粒之分析

【0119】 在五松高科技醫療產業促進基金會之新藥開發支持中心使用微流成像(MFI)針對HL161BKN之每個賦形劑條件樣品的不溶性亞可見顆粒進行分析。

【0120】 將每個條件之樣品稀釋至10 mg/mL以比較在5 μm至100 μm之範圍內的亞可見顆粒之數目的增加。結果，在條件3中亞可見顆粒之數目的增加係最少的(表38以及圖19)。

表38

條件 No.	Δ 亞可見顆粒數目 (W4-W1)					總亞可見顆粒數目 (5~100 μm)		
	5≤x<10 μm	10≤x<25 μm	25≤x<50 μm	50≤x<75 μm	75≤x<100 μm	第1週	第4週	Δ 顆粒 (W4-W1)
1	30768	8779	402	26	5	2296	42131	39835
2	14463	3059	240	15	4	949	18920	17971
3	5680	1787	163	16	3	966	8516	7550
4	5940	1658	134	7	1	703	8586	7883

實施例3。穩定性測試

【0121】藉由Catalent(美國)在針對HL161BKN之最終選定之調配物條件下進行一36個月長期儲存及加速穩定性測試。為了評估該穩定性，使用一硼矽玻璃小瓶以及一經聚四氟乙烯塗覆之橡膠塞儲存該藥物產品(DP)。作為在該選定之調配物條件下確認該穩定性之結果，已確認DP的穩定性為36個月，從而確保作為一注射劑開發的可能性(表39以及表40)。

表39

藥物產品，在5 ± 3°C下的長期穩定性										
測試項目	規格	測試時間點(月)								
		0	1	3	6	9	12	18	24	36
外觀	透明無色至微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中；基本上無顆粒	透明微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中。基本上無顆粒	透明微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中，無顆粒	透明微黃色液體在透明無色玻璃小瓶中；基本上無顆粒	透明微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中；基本上無顆粒	透明微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中；基本上無顆粒	透明微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中；基本上無顆粒	透明微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中；基本上無顆粒	透明微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中；基本上無顆粒	透明微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中；基本上無顆粒
pH	5.5-6.5	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9
A280	153-187 mg/mL	176 mg/mL	169 mg/mL	174 mg/mL	175 mg/mL	177 mg/mL	174 mg/mL	174 mg/mL	179 mg/mL	176 mg/mL
CE-SDS，經降低	重鏈及輕鏈之總和≥95.0%	98.6%	98.4%	98.4%	98.5%	98.1%	97.9%	97.8%	98.0%	97.7%
CE-SDS，未降低 ¹⁾	報告完整抗體 (XX.X%)	89.9%	96.0%	95.8%	96.0%	95.4%	96.0%	95.8%	94.5%	95.1%
SEC-HPLC	≥90.0%主峰聚集體及片段 ≤10.0%	99.4% <LLOQ	99.6% <LLOQ	98.4% 1.6%	98.8% 1.2%	99.4% <LLOQ	98.8% 1.2%	96.4% 3.6%	98.5% 1.5%	98.5% 1.5%
cIEF	報告主峰pI值 報告鹼性基團之面積% 報告主要基團之面積% 報告酸性基團之面積%	pI=7.75 B: 1.25% M: 75.61% A: 23.14%	pI=7.78 B: 2.01% M: 77.17% A: 20.81%	pI=7.82 B: 2.01% M: 76.78% A: 21.21%	pI=7.80 B: 2.27% M: 75.29% A: 22.44%	pI=7.87 B: 2.12% M: 75.18% A: 22.70%	pI=7.74 B: 0.91% M: 78.55% A: 20.55%	pI=7.85 B: 2.66% M: 72.64% A: 24.70%	pI=7.82 B: 2.67% M: 72.06% A: 25.27%	pI=7.79 B: 2.21% M: 67.72% A: 30.06%
效力	參考標準之70~130%	82%	108%	92%	107%	118%	118%	110%	96%	106%

微粒物質	≥10µm: ≤6000 顆粒/容器 ≥25µm: ≤600 顆粒/容器	≥10 µm: 105 ≥25 µm: 0	未測試	≥10 µm: 4356 ≥25 µm: 73	≥10 µm: 14 ≥25 µm: 0	≥10 µm: 17 ≥25 µm: 2	≥10 µm: 42 ≥25 µm: 1	≥10 µm: 55 ≥25 µm: 1	≥10 µm: 143 ≥25 µm: 5	≥10 µm: 373 ≥25 µm: 10
容器中的 體積	NLT經標記之 體積	1 ml	未測試	未測試	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
內毒素	≤0.5 EU/mg之 蛋白質	<0.1 EU/mg	未測試	未測試	未測試	未測試	<0.1 EU/mg	未測試	<0.1 EU/mg	<0.1 EU/mg
無菌性	無生長	無生長	未測試	未測試	未測試	未測試	無生長	未測試	無生長	無生長

表40

藥物產品，在25 ± 2°C / 60 ± 5%RH下的加速穩定性						
測試項目	規格	測試時間點(月)				
		0	1	3	6	
外觀	透明無色至微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中，基本上無顆粒	透明微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中。基本上無顆粒	透明微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中，基本上無顆粒	透明微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中，基本上無顆粒	透明微黃色液體在一透明無色玻璃小瓶中，基本上無顆粒	
pH	5.5-6.5	5.9	5.9	5.9	5.9	
A280	153-187 mg/mL	176 mg/mL	169 mg/mL	171 mg/mL	177 mg/mL	
CE-SDS ，經降低	重鏈及輕鏈之總和≥95.0%	98.6%	98.3%	97.9%	97.3%	
CE-SDS ，未降低 ¹⁾	報告完整抗體 (XX.X%)	89.9%	95.7%	95.0%	93.7%	
SEC-HPLC	≥90.0%主峰 聚集體及片段 ≤10.0%	99.4% <LLOQ ²⁾	99.1% 0.9%	97.5% 2.6%	94.8% 5.2%	
cIEF	報告主峰pI值 報告鹼性基團之面積% 報告主要基團之面積% 報告酸性基團之面積%	pI=7.75 B: 1.25% M: 75.61% A: 23.14%	pI=7.81 B: 2.54% M: 73.72% A: 23.74%	pI=7.82 B: 3.28% M: 67.30% A: 29.42%	pI=7.77 B: 3.98% M: 60.60% A: 35.42%	
效力	參考標準之 70~130%	82%	104%	79%	72%	
微粒物質	≥10 µm: ≤6000 顆粒/容器 ≥25 µm: ≤600 顆粒/容器	≥10 µm: 105 ≥25 µm: 0	未測試	≥10 µm: 4478 ≥25 µm: 14	≥10 µm: 12 ≥25 µm: 0	

實施例4。最終開發候選抗體調配物之選擇

【0122】 由於HL161BKN在該調配物中在高濃度下展現非常穩定的趨勢，因此欲確認以皮下投與注射劑形式開發的可能性。當開發一注射劑時，已知20 cP或更少的黏度係適用於皮下投與以降低投與部位的疼痛及副作用。因此，在9步驟濃縮條件下濃縮HL161BKN，並且在5°C及25°C條件下測量該黏度。作為確認具有170 mg/mL高濃度之HL161BKN樣品之黏度的結果，已確認其在25°C具有10 cP之黏度，且因此可進行皮下投與(圖20)。

【0123】 在上述調配物研究中已確認，即使在200 mg/mL或更高的高濃度下，HL161BKN亦具有非常穩定的性質。結果，預期未來可開發一自我給與的SC注射產品。考量到其他競爭公司的所有產品皆是輸液型產品，可以藉由增加患者便利性來實現差異化。

【0124】 此外，由於已確認高濃度的HL161BKN在該調配物中係穩定的，因此預期低濃度的HL161BKN在該調配物中亦係穩定的。因此，該調配物可以係以各種濃度應用於HL161BKN。

【符號說明】

(無)

序列表

<110> 南韓商韓元生物製藥股份有限公司 (HANALL BIOPHARMA CO., LTD.)

<120> 抗FcRn抗體之調配物

<140> TW 110123627

<141> 2021-06-28

<150> KR 10-2020-0079135

<151> 2020-06-29

<160> 10

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HL161_重鏈

<400> 1

Gln Leu Leu Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Ser Ser

20 25 30

Phe Ser Tyr Trp Val Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Arg Ala Gly Ile Leu Thr Gly Tyr Leu Asp Ser Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
130						135					140					
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
145					150					155					160	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
				165					170					175		
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
			180					185					190			
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
	195						200					205				
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
210						215					220					
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
225					230					235					240	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
				245					250					255		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
			260					265					270			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
	275						280					285				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
	290					295					300					
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
305					310					315					320	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
				325					330					335		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
			340					345					350			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
		355					360					365				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
	370					375					380					
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	

385390395400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405410415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420425430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435440445

Pro Gly

450

<210>2

<211>214

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>HL161_輕鏈

<400>2

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

151015

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

202530

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr

354045

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser

505560

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65707580

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His

859095

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys

100105110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln

115120125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly

130	135	140
Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly		
145	150	155160
Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala		
	165	170175
Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser		
	180	185190
Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val		
	195	200205
Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
210		

<210> 3
<211> 1350
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼HL161重鏈之多核苷酸

<400> 3	
cagctgctgc tgcaagaatc cggccctggc ctggtgaaac cctccgagac actgtccctg	60
acctgcaccg tgtccggcgg ctccctgtcc tccagcttct cctactgggt ctggatccgg	120
cagccccctg gcaagggcct ggaatggatc ggcaccatct actactccgg caacacctac	180
tacaacccca gcctgaagtc ccggtgacc atctccgtgg acacctccaa gaaccacttc	240
agcctgaagc tgtcctccgt gaccgccgt gacaccgccg tgtactactg tgccagaagg	300
gccggcatcc tgaccggcta cctggactct tggggccagg gcacctggt gacagtgtcc	360
tccgcctcca ccaagggcc ctccgtgttc cctctggccc cctccagcaa gtccacctct	420
ggcggcaccg ctgccctggg ctgtctggtg aaagactact tccccagacc cgtgaccgtg	480
tcctggaact ctggcgccct gacctccggc gtgcacacct tcctgccgt gctgcagtcc	540
tccggcctgt actccctgtc cagcgtggtg accgtgccct ccagctctct gggcaccag	600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gcgggtggaa	660

cccaagtcct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgtc ctgccccctga agctgctggc	720
ggccctagcg tgttccctgtt ccccccaaag cccaaggaca ccctgatgat ctcccgacc	780
cccgaagtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccacgagg accctgaagt gaagttcaat	840
tggtagctgg acggcgtgga agtgcacaac gccaagacca agcccagaga ggaacagtac	900
aactccacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc	960
aaagagtaca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgcctg ccccatcga aaagaccatc	1020
tccaaggcca agggccagcc ccgcgagccc cagggtgtaca cactgcccc tagccgggaa	1080
gagatgacca agaaccaggt gtccctgaca tgcctggtga agggcttcta cccctccgac	1140
attgccgtgg aatgggagtc caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct	1200
gtgctggact ccgacggctc attcttctg tactccaagc tgaccgtgga caagtcccg	1260
tggcagcagg gcaacgtgtt ctctgtctcc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac	1320
accagaagt ccctgtccct gagccccggc	1350

- <210> 4
- <211> 642
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 編碼HL161輕鏈之多核苷酸

<400> 4	
tcttacgtgc tgaccagtc cccctccgtg tccgtggctc ctggccagac cgccagaatc	60
acctgtggcg gcaacaacat cggtccaag tccgtgact ggtatcagca gaagcccggc	120
caggcccccg tgctggtggt gtacgacgac tccgaccggc cctctggcat ccctgagcgg	180
ttctccgect ccaactccgg caacaccgcc accctgacca tcctcagagt ggaagccggc	240
gacgagggcg actactactg ccaagtgtgg gactcctcct ccgaccacgt ggtgttcggc	300
ggaggcacca agctgaccgt gctgggccag cctaaggccg ctccctccgt gacctgttc	360
ccccatcct ccgaggaact gcaggccaac aaggccacc tggtctgcct gatctccgac	420
ttctaccctg gcgccgtgac cgtggcctgg aaggccgaca gctctcctgt gaaggccggc	480

gtggaaacca ccacccctc caagcagtc aacaacaaat acgccgcctc ctcctacctg540

tccctgacct ccgagcagtg gaagtccac cggtcctaca gctgccaaagt gacacacgag600

ggctccaccg tggaaaagac cgtggccctt accgagtgtt cc642

<210>5

<211>5

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>HL161_Hv CDR1

<400>5

Phe Ser Tyr Trp Val

15

<210>6

<211>16

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>HL161_Hv CDR2

<400>6

Thr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

15105

<210>7

<211>11

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>HL161_Hv CDR3

<400>7

Arg Ala Gly Ile Leu Thr Gly Tyr Leu Asp Ser

1510

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HL161_Lv CDR1

<400> 8
Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HL161_Lv CDR2

<400> 9
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HL161_Lv CDR3

<400> 10
Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val
1 5 10

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種具有4.0至8.0之pH的醫藥調配物，其包含

(a) 一抗FcRn抗體或其片段，

(b) 至少一選自於甘露醇、山梨醇、精胺酸、組胺酸、甘胺酸及其等鹽的添加物，

(c) 一選自於檸檬酸鹽或組胺酸的緩衝劑系統，以及

(d) 一界面活性劑。

【請求項2】 如請求項1之醫藥調配物，其中該添加劑係精胺酸或其鹽，且該緩衝劑系統係組胺酸。

【請求項3】 如請求項1之醫藥調配物，其中該界面活性劑係聚山梨醇酯。

【請求項4】 如請求項1之醫藥調配物，其進一步包含甲硫胺酸。

【請求項5】 如請求項1之醫藥調配物，其中該醫藥調配物為一注射劑之形式。

【請求項6】 如請求項1之醫藥調配物，其中該醫藥調配物具有20 cP或更少之黏度。

【請求項7】 如請求項1之醫藥調配物，其中該醫藥調配物具有250 mOs/kg至500 mOs/kg之重量滲透濃度。

【請求項8】 如請求項1之醫藥調配物，其中該抗FcRn抗體或其片段之濃度係50 mg/mL至250 mg/mL。

【請求項9】 如請求項8之醫藥調配物，其中該抗FcRn抗體或其片段之濃度係80 mg/mL至250 mg/mL。

【請求項10】 如請求項1之醫藥調配物，其中該醫藥調配物的pH係4.0至7.0。

【請求項11】 如請求項1之醫藥調配物，其中該抗FcRn抗體包含：

一重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 5之胺基酸的H-CDR1、具有SEQ ID

NO: 6之胺基酸的H-CDR2，以及具有SEQ ID NO: 7之胺基酸的H-CDR3；以及一輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 8之胺基酸的L-CDR1、具有SEQ ID NO: 9之胺基酸的L-CDR2，以及具有SEQ ID NO: 10之胺基酸的L-CDR3。

【請求項12】如請求項1之醫藥調配物，其中該醫藥調配物係經皮下投與。

【請求項13】如請求項1之醫藥調配物，其中該醫藥調配物包含：

(a) 50 mg/mL至250 mg/mL的抗FcRn抗體，

(b) 50至250 mM L-精胺酸或其鹽酸鹽，

(c) 50至250 mM L-組胺酸緩衝劑，以及

(d) 0.01至0.05%聚山梨醇酯20，且

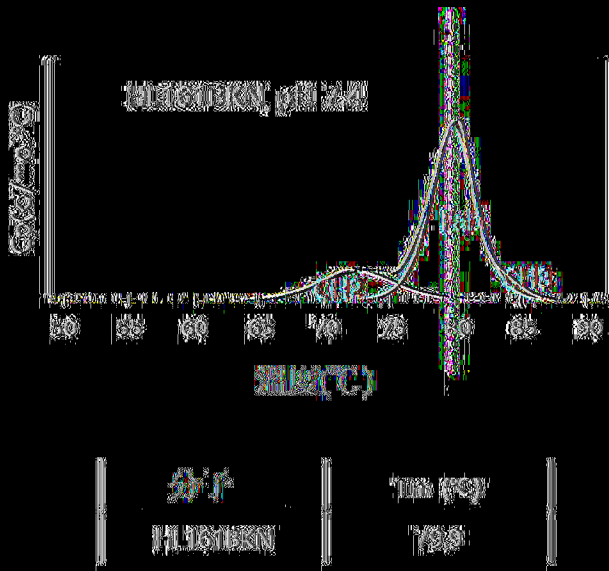
該醫藥調配物具有4.0至7.0的pH。

【請求項14】如請求項1之醫藥調配物，其中該醫藥調配物具有增加之穩定性，其中當在一加速條件(25°C，60%的相對濕度)下儲存6個月時，HL161BKN之聚集體及片段的量係10%或更少。

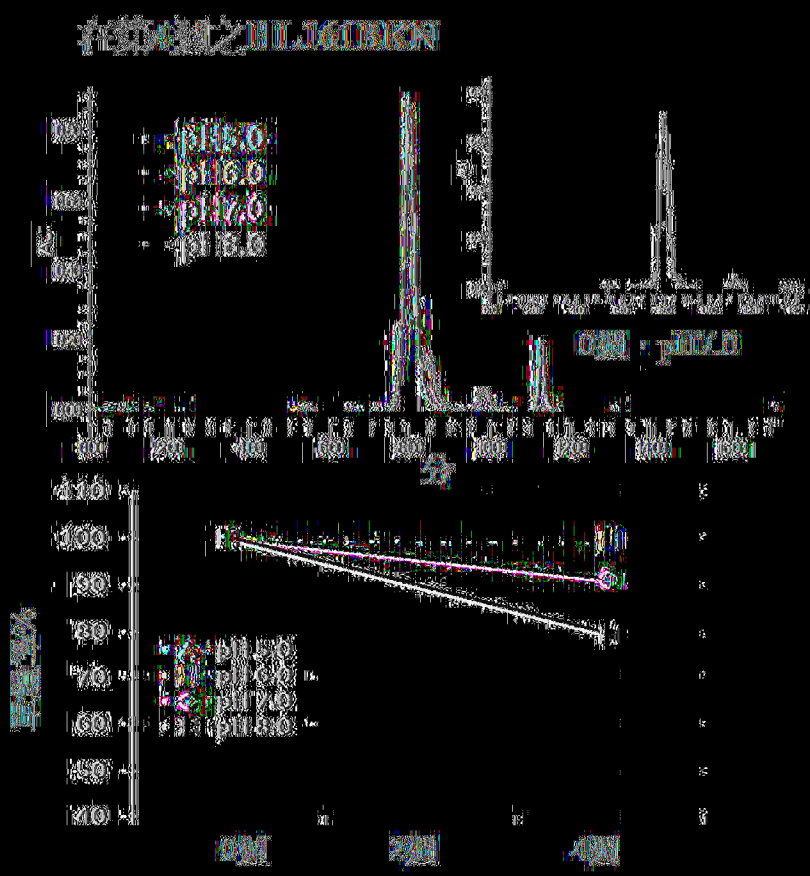
【請求項15】如請求項1之醫藥調配物，其中該醫藥調配物具有增加之穩定性，其中當在一長期儲存條件(5°C)下儲存36個月時，HL161BKN之聚集體及片段的量係10%或更少。

【請求項16】如請求項1之醫藥調配物，其中該醫藥調配物具有增加之穩定性，其中當在一長期儲存條件(5°C)下儲存36個月時，HL161BKN之聚集體及片段的量係5.0%或更少。

【請求項17】如請求項1至請求項16中任一項之醫藥調配物，其中該醫藥調配物係用於治療一自體免疫疾病，該自體免疫疾病係選自於由以下所組成之群組：重症肌無力、甲狀腺眼病、溫性自體免疫溶血性貧血、視神經脊髓炎、免疫性血小板缺乏紫斑症、尋常型天疱瘡、慢性脫髓鞘多發性神經炎、狼瘡性腎炎，以及膜性腎病變。



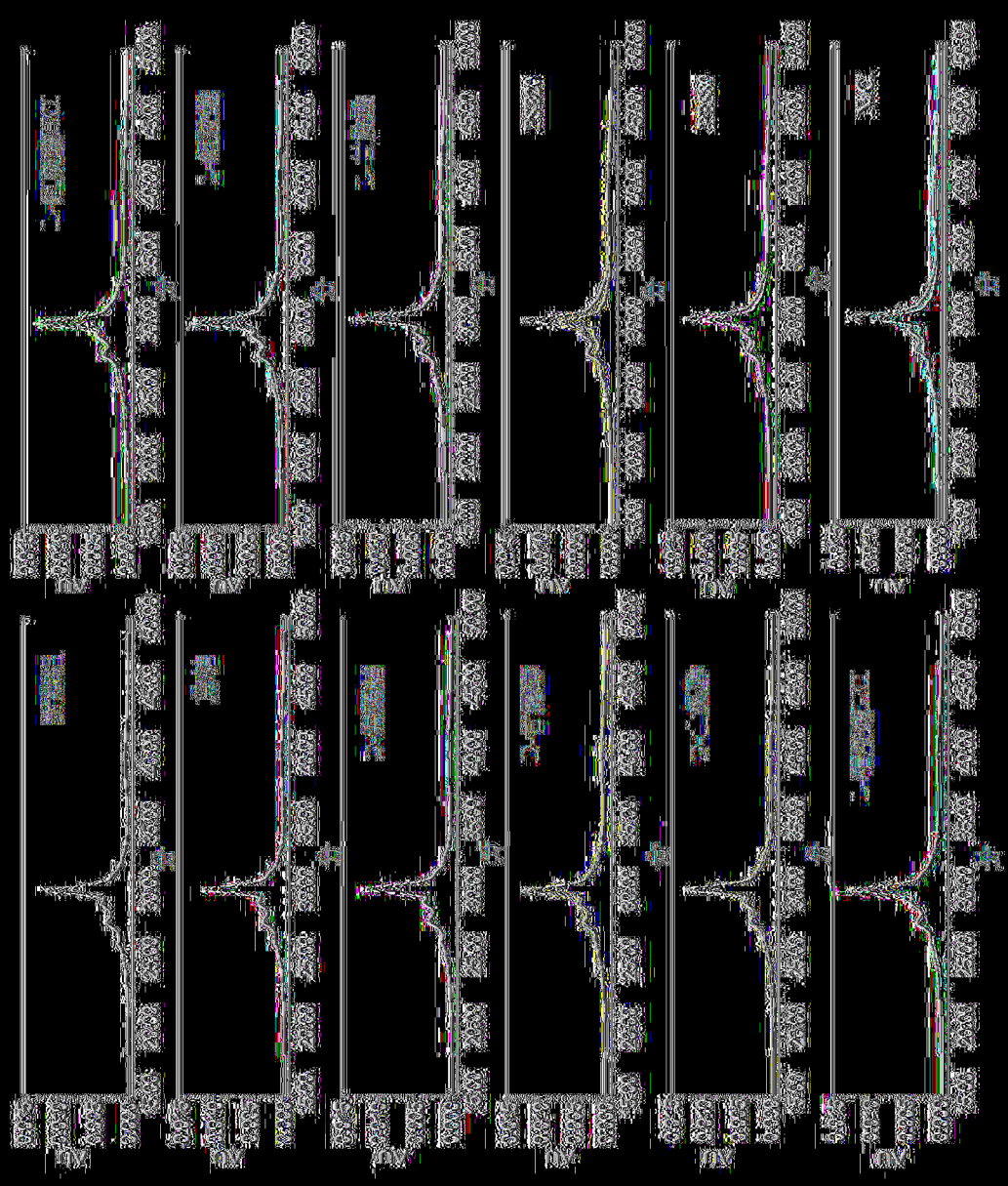
$$\left| \left(\begin{bmatrix} \hat{r}_1 \\ \hat{r}_2 \\ \hat{r}_3 \end{bmatrix} \right) \right|$$



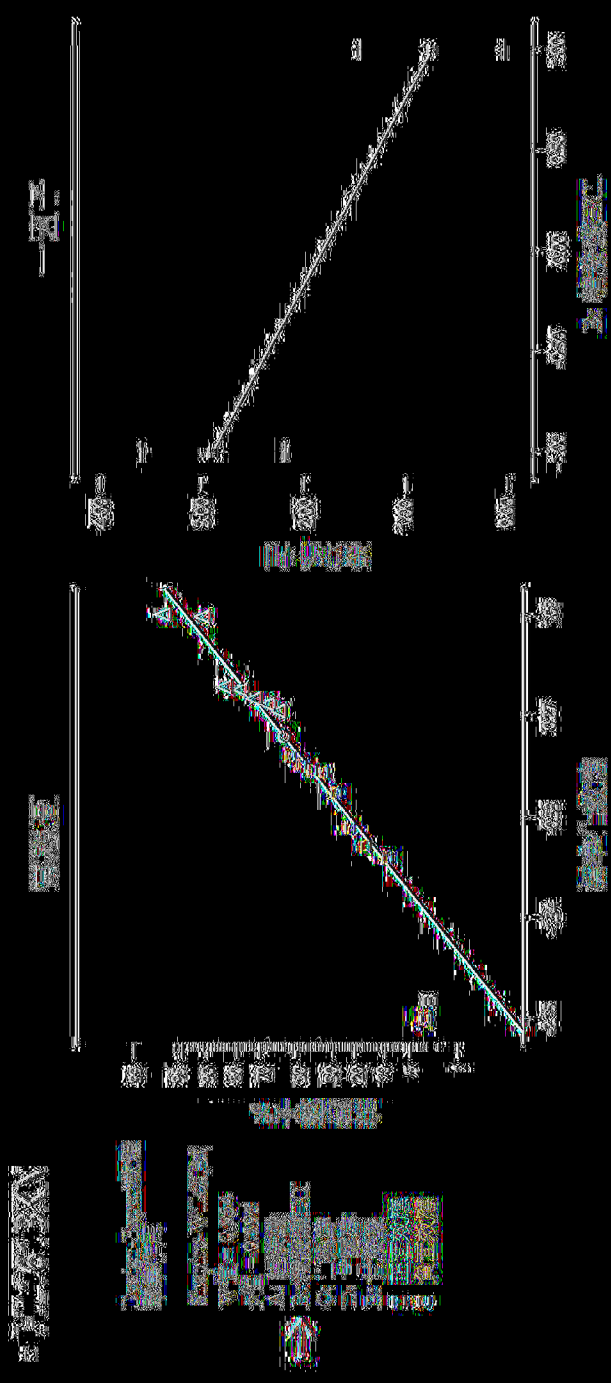
$$\left| \left(\left\| \begin{pmatrix} t_1 \\ t_2 \end{pmatrix} \right\|_2 \right)^2 \right|$$



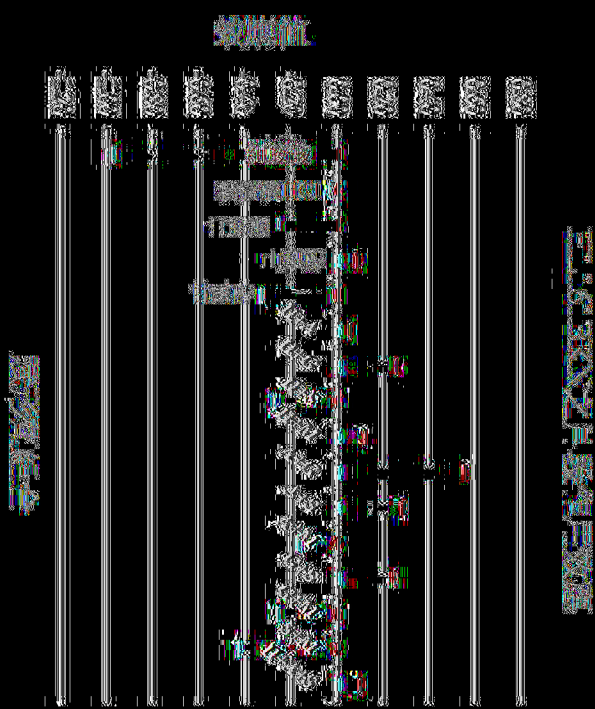
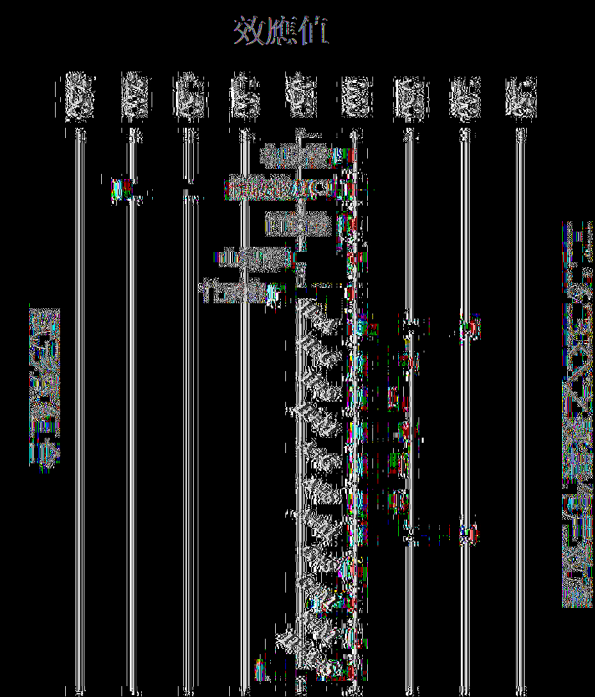
(((3)))



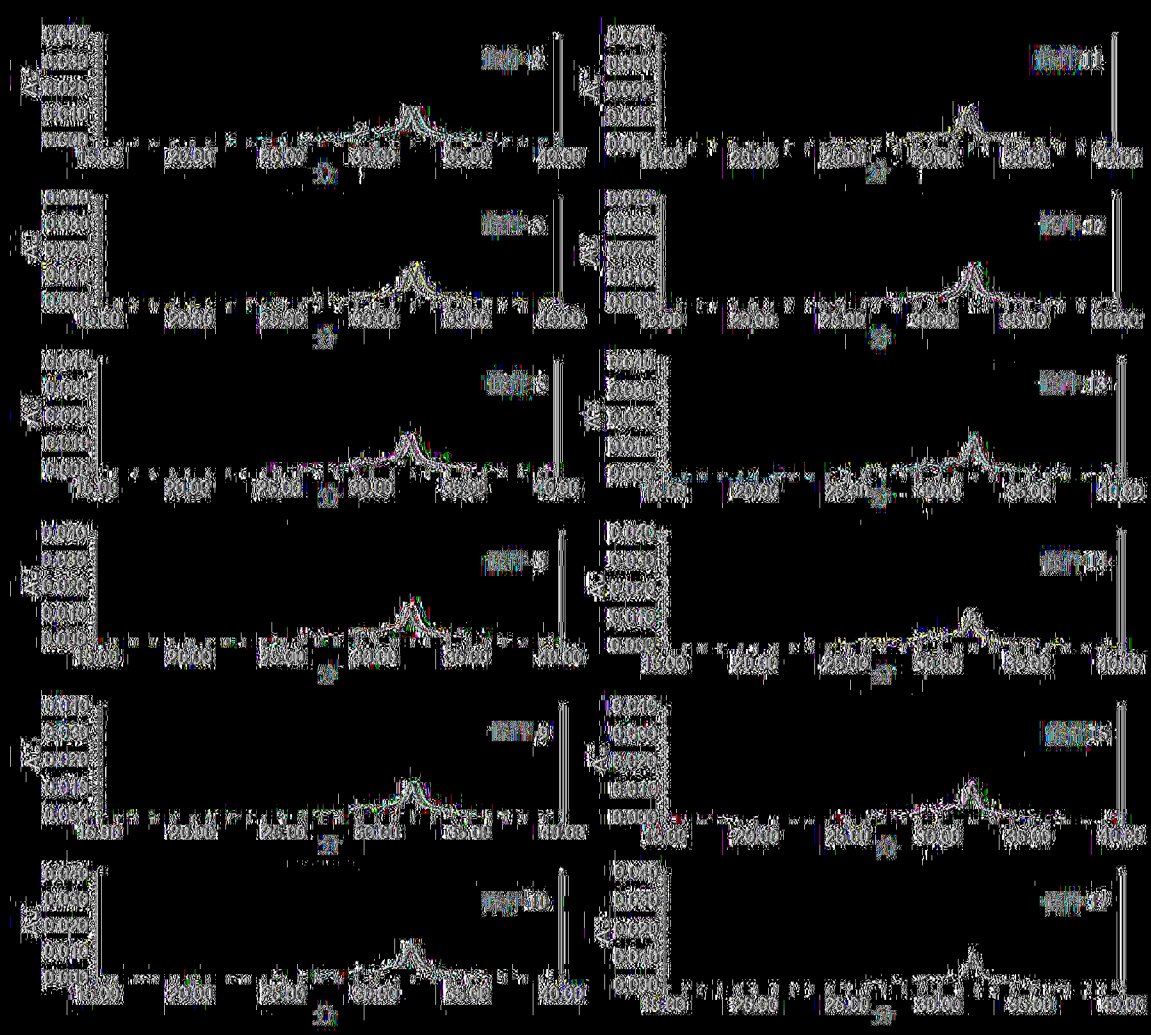
$$\left| \left(\begin{bmatrix} \mathbf{r}_n \\ \mathbf{r}_n \end{bmatrix} \right) \right|_5$$



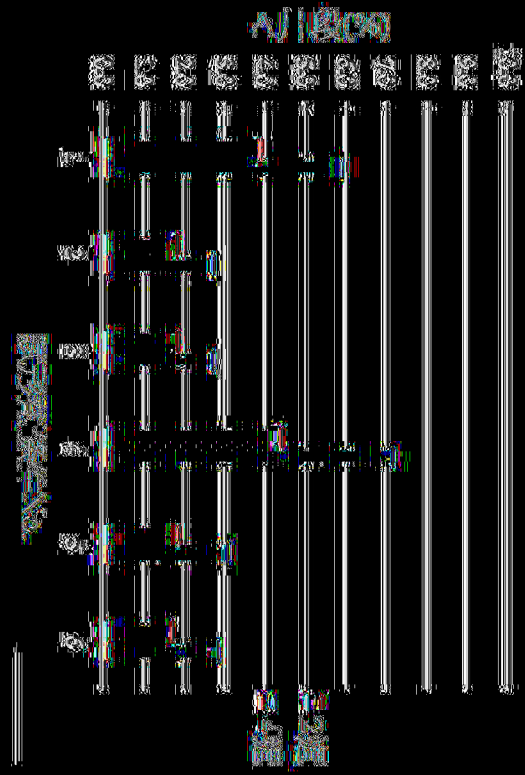
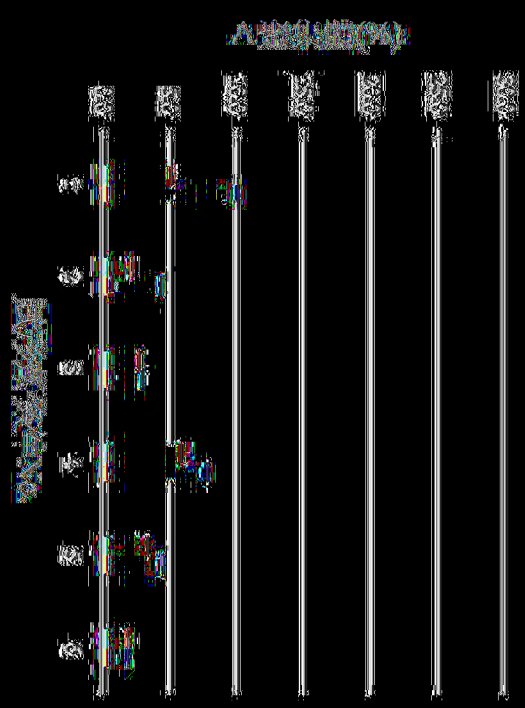
$$|(\begin{smallmatrix} 1 & 1 \\ 1 & 1 \end{smallmatrix})6|$$



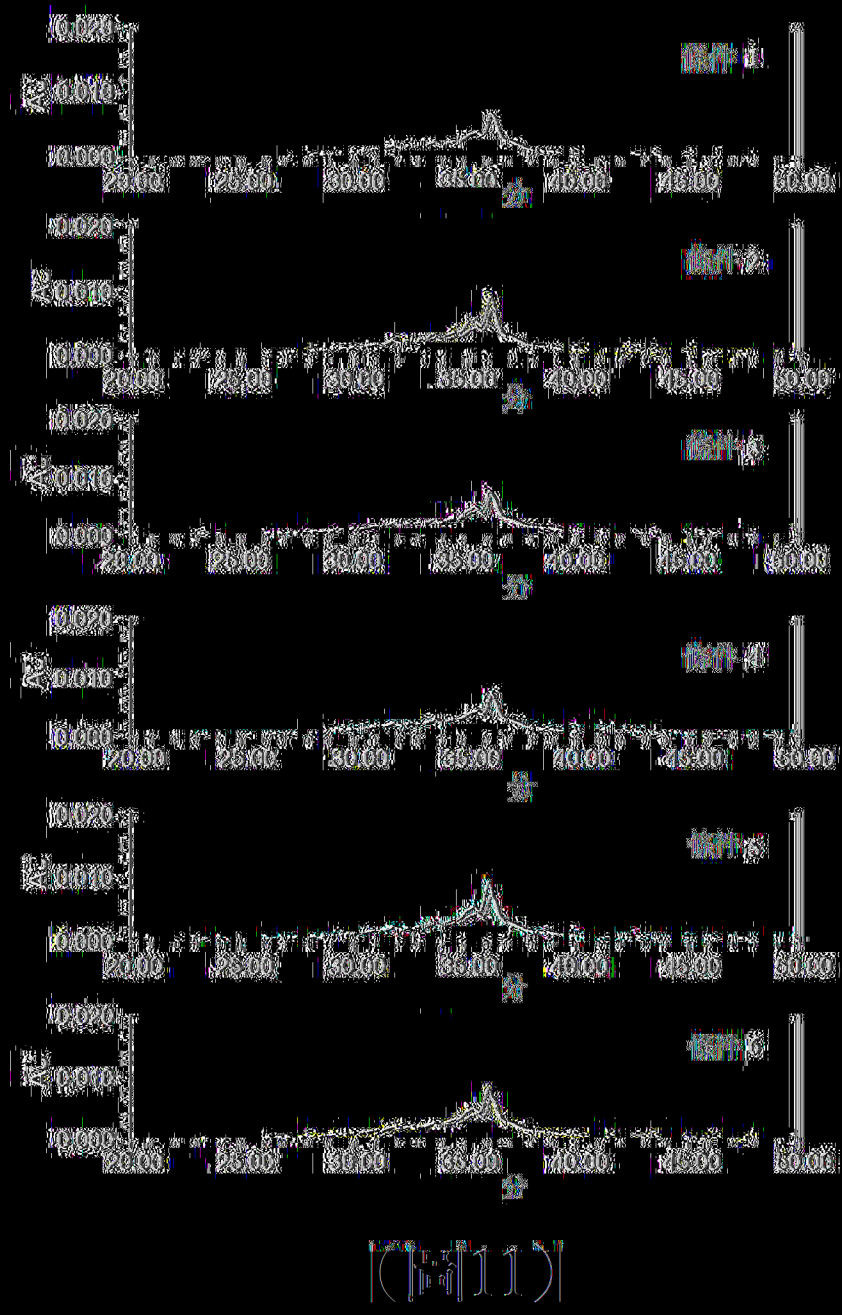
$$\left| \left(\begin{matrix} 1 & 1 \\ 1 & 1 \end{matrix} \right) 8 \right|$$



$$\left| \left(\begin{bmatrix} \hat{b}_n \\ \hat{b}_n \end{bmatrix} \right) \right|_9$$

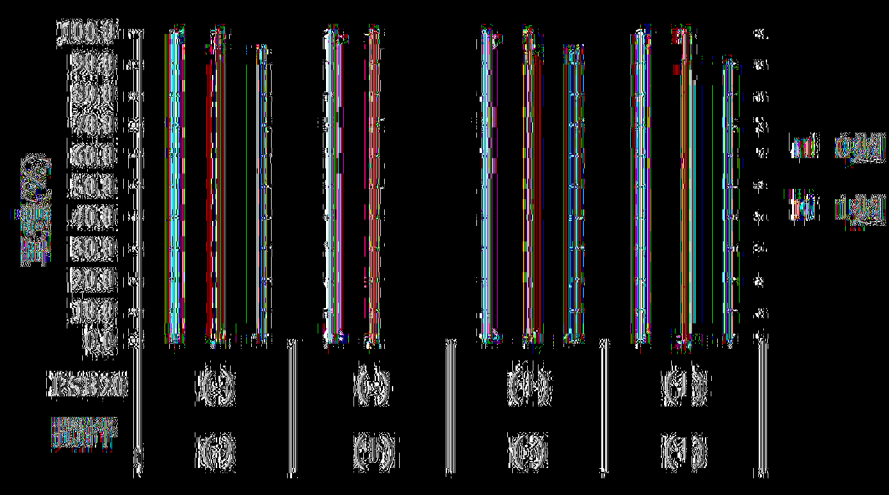


$$\left| \left(\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \right) \right|$$

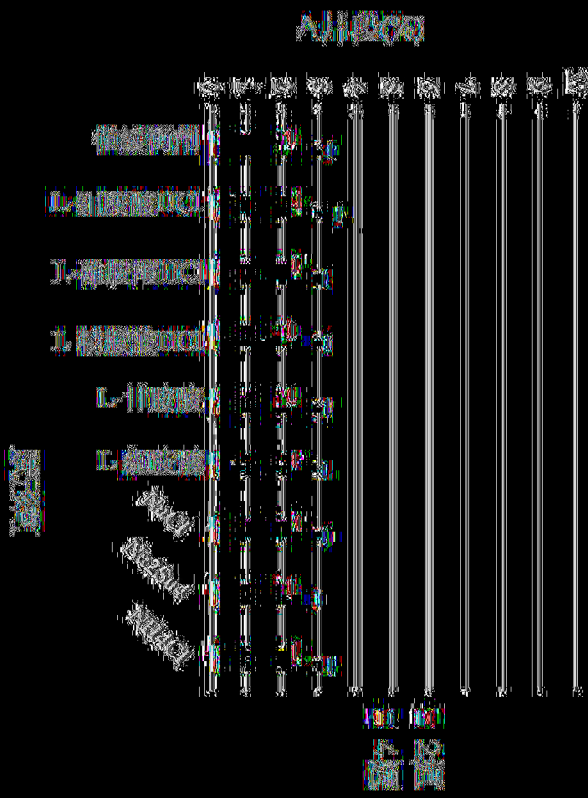
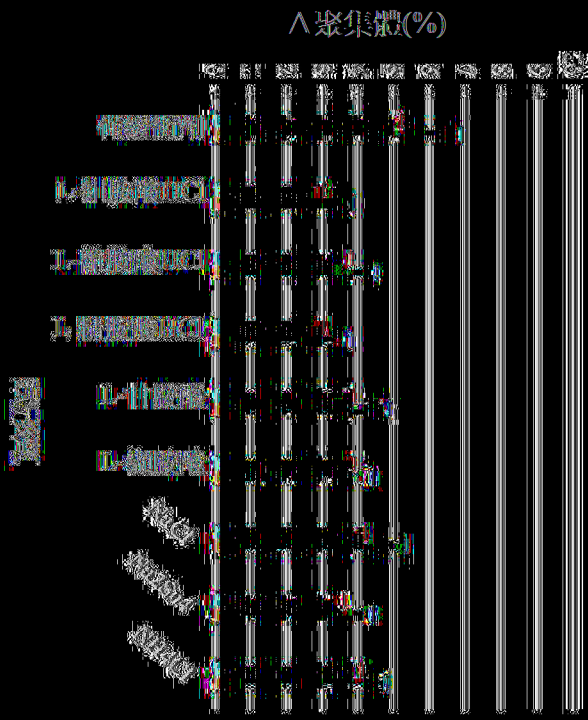




(Fig. 12)



(Fig. 13)



$$\left| \left(\begin{matrix} \hat{a}_1 \\ \hat{a}_2 \\ \hat{a}_3 \\ \hat{a}_4 \end{matrix} \right) \right|_{14}$$

A 發明圖式									
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	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
281	282	283	284	285	286	287	288	289	290
291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370
371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430
431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
461	462	463	464	465	466	467	468	469	470
471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
481	482	483	484	485	486	487	488	489	490
491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
521	522	523	524	525	526	527	528	529	530
531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
541	542	543	544	545	546	547	548	549	550
551	552	553	554	555	556	557	558	559	560
561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
571	572	573	574	575	576	577	578	579	580
581	582	583	584	585	586	587	588	589	590
591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
601	602	603	604	605	606	607	608	609	610
611	612	613	614	615	616	617	618	619	620
621	622	623	624	625	626	627	628	629	630
631	632	633	634	635	636	637	638	639	640
641	642	643	644	645	646	647	648	649	650
651	652	653	654	655	656	657	658	659	660
661	662	663	664	665	666	667	668	669	670
671	672	673	674	675	676	677	678	679	680
681	682	683	684	685	686	687	688	689	690
691	692	693	694	695	696	697	698	699	700
701	702	703	704	705	706	707	708	709	710
711	712	713	714	715	716	717	718	719	720
721	722	723	724	725	726	727	728	729	730
731	732	733	734	735	736	737	738	739	740
741	742	743	744	745	746	747	748	749	750
751	752	753	754	755	756	757	758	759	760
761	762	763	764	765	766	767	768	769	770
771	772	773	774	775	776	777	778	779	780
781	782	783	784	785	786	787	788	789	790
791	792	793	794	795	796	797	798	799	800
801	802	803	804	805	806	807	808	809	810
811	812	813	814	815	816	817	818	819	820
821	822	823	824	825	826	827	828	829	830
831	832	833	834	835	836	837	838	839	840
841	842	843	844	845	846	847	848	849	850
851	852	853	854	855	856	857	858	859	860
861	862	863	864	865	866	867	868	869	870
871	872	873	874	875	876	877	878	879	880
881	882	883	884	885	886	887	888	889	890
891	892	893	894	895	896	897	898	899	900
901	902	903	904	905	906	907	908	909	910
911	912	913	914	915	916	917	918	919	920
921	922	923	924	925	926	927	928	929	930
931	932	933	934	935	936	937	938	939	940
941	942	943	944	945	946	947	948	949	950
951	952	953	954	955	956	957	958	959	960
961	962	963	964	965	966	967	968	969	970
971	972	973	974	975	976	977	978	979	980
981	982	983	984	985	986	987	988	989	990
991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000

|(15)|

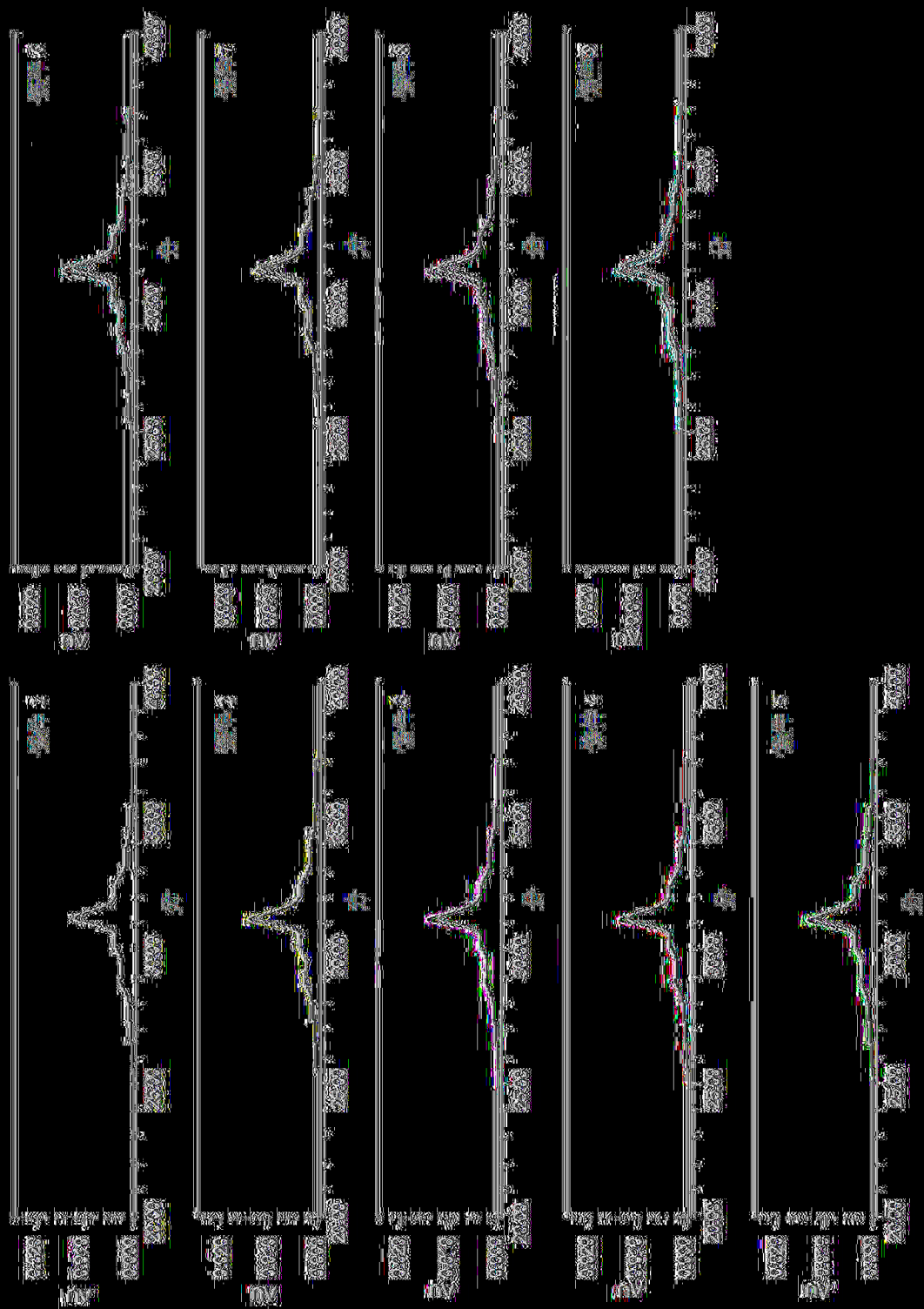
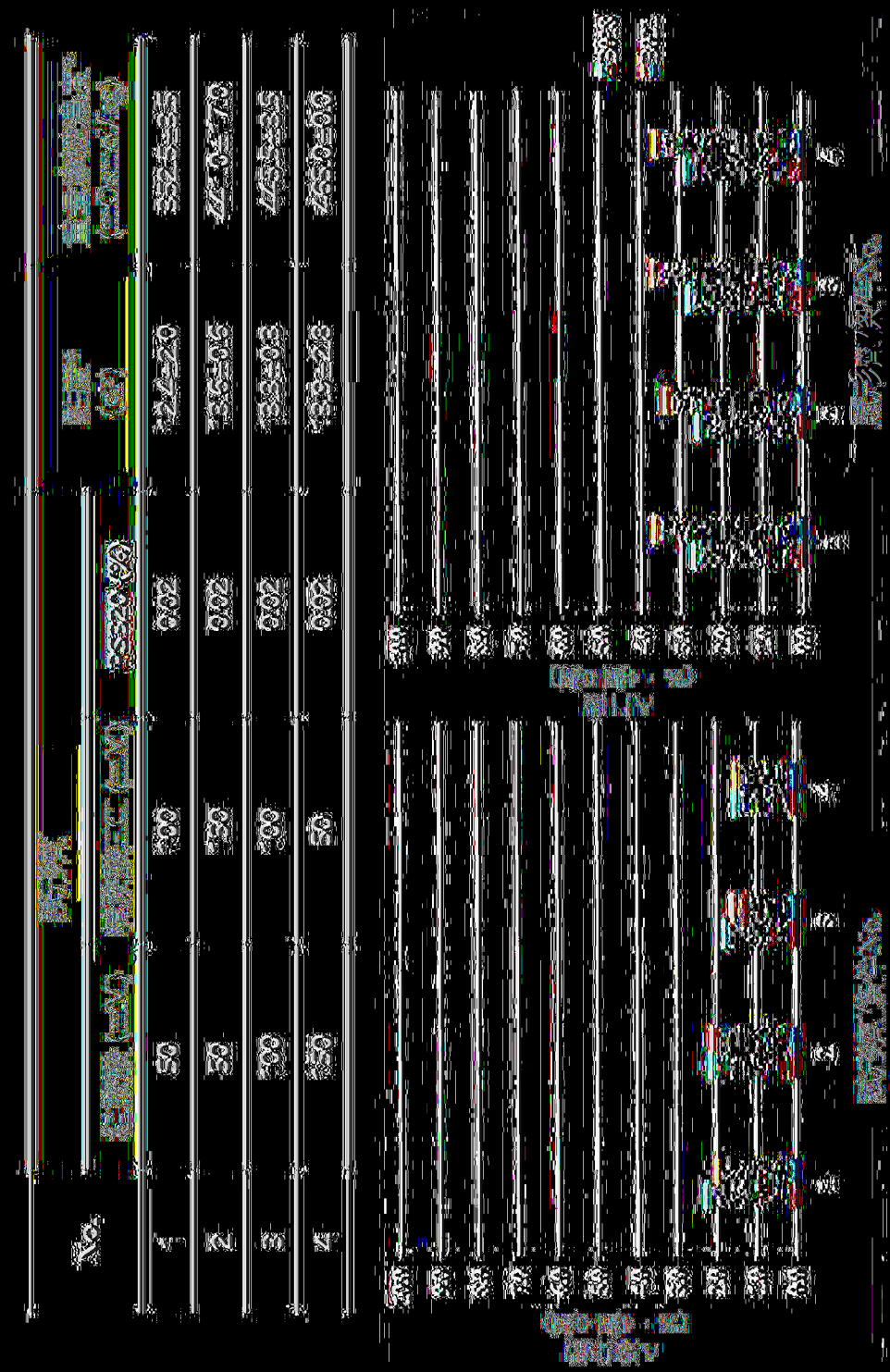
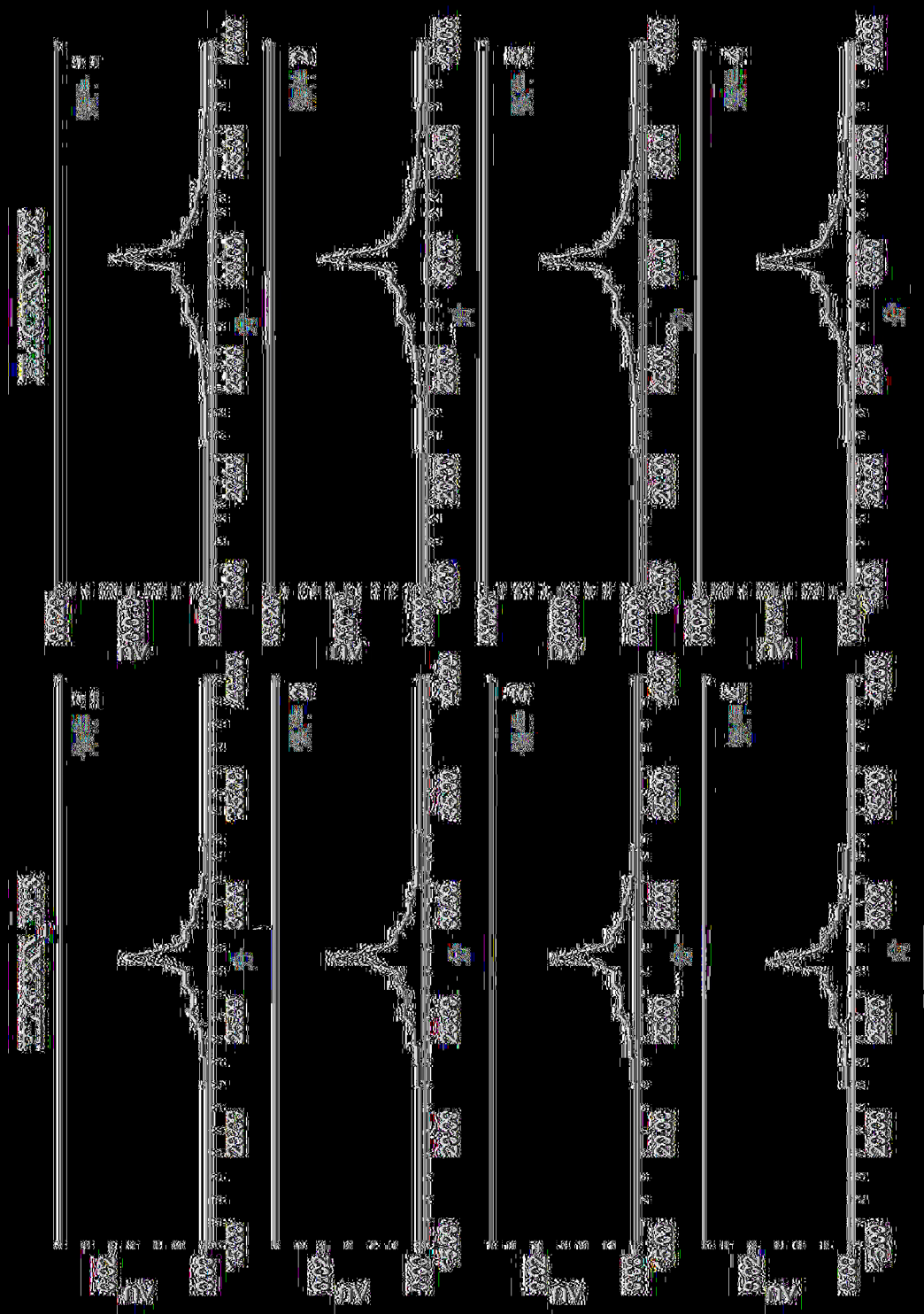


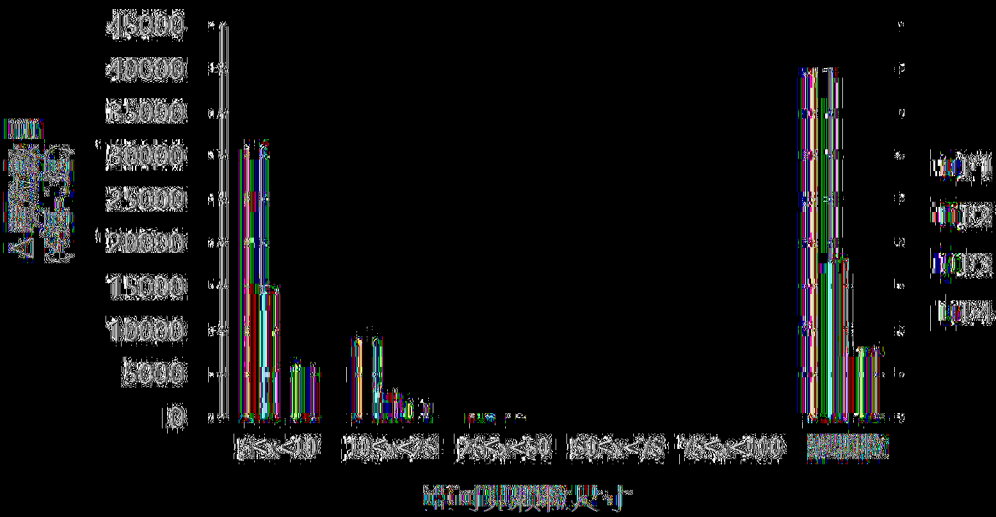
FIG. 16



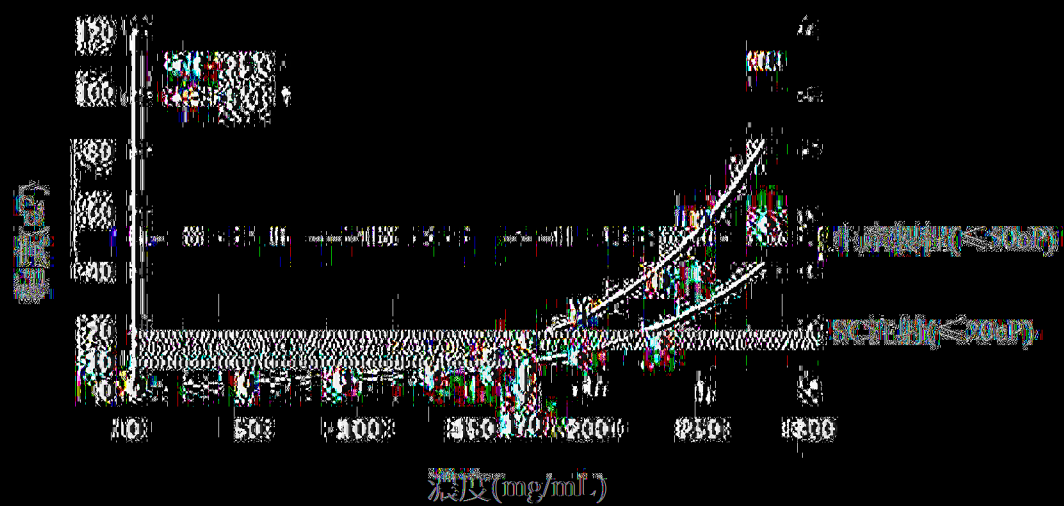
(Fig. 17)



|(18)|



$$\left| \left(\left\| \begin{matrix} \hat{r}_1 \\ \hat{r}_2 \end{matrix} \right\|_{19} \right) \right|$$



$$|(\mathbb{H}_{\mathbb{H}}[20])|$$