



(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 I629064 B

(45) 公告日：中華民國 107 (2018) 年 07 月 11 日

(21) 申請案號：102119838 (22) 申請日：中華民國 97 (2008) 年 11 月 28 日  
 (51) Int. Cl. : A61K38/00 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)  
 (30) 優先權：2007/11/30 美國 61/004,992  
 (71) 申請人：艾伯維生物技術有限責任公司 (百慕達) ABBVIE BIOTECHNOLOGY LTD. (BM)  
 百慕達  
 (72) 發明人：福倫賀夫 沃夫根 FRAUNHOFER, WOLFGANG (DE)；巴特 安妮卡 BARTL,  
 ANNIKA (DE)；克洛司 漢斯 傑根 KRAUSE, HANS-JUERGEN (DE)；泰斯寇  
 普 馬克司 TSCHOEPE, MARKUS (DE)；卡樂塔 凱瑟雷那 KALETA,  
 KATHARINA (DE)  
 (74) 代理人：陳長文  
 (56) 參考文獻：  
 US 2006/0149042A1 US 2007/0172475A1  
 US 2007/0184045A1  
 審查人員：林奕萍  
 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：36 共 245 頁

## (54) 名稱

蛋白質調配物及製造其之方法

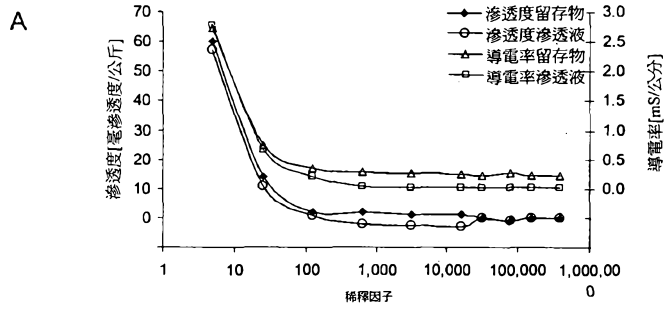
PROTEIN FORMULATIONS AND METHODS OF MAKING SAME

## (57) 摘要

本發明係提供包含水與蛋白質之含水調配物，及其製造方法。本發明之含水調配物可為高蛋白質調配物，及/或可具有由於低含量離子性賦形劑所造成之低程度導電率。亦被包含在本發明中者為包含水與具有低滲透度蛋白質之調配物。

The invention provides an aqueous formulation comprising water and a protein, and methods of making the same. The aqueous formulation of the invention may be a high protein formulation and/or may have low levels of conductivity resulting from the low levels of ionic excipients. Also included in the invention are formulations comprising water and proteins having low osmolality.

指定代表圖：



B

稀釋/交換因子	開始條件	5	25	125	625	3125	15652	31250	78125	156250	390625
留存物pH	5.26	5.37	5.35	5.35	5.36	5.40	5.44	5.56	5.44	5.58	5.62
留存物滲透度	305	60	14	2	2	1	1	0	-1	0	0
留存物導電率	11.7	2.74	0.74	0.34	0.30	0.27	0.25	0.23	0.26	0.22	0.22
滲透液pH	5.88	5.38	5.32	5.06	5.13	5.02	4.52	5.91	4.84	5.66	5.47
滲透液滲透度	1.0	57.0	10.8	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
滲透液導電率	0.01	2.77	0.66	0.19	0.04	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02

圖13

# 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】

蛋白質調配物及製造其之方法

PROTEIN FORMULATIONS AND METHODS OF MAKING SAME

## 相關申請案

本申請案係主張關於2007年11月30日提出申請之美國臨時申請案號61/004992之優先權益。此優先權申請案之內容係據此併入供參考。

## 【先前技術】

醫藥蛋白質調配物之基本原理為某些不安定性必須被克服。蛋白質之降解途徑可被分隔成涉及化學不安定性與物理不安定性之兩個不同種類。化學不安定性會經過鍵結形成或分裂而導致蛋白質之改質。化學不安定性問題之實例包括脫醯胺作用、消旋作用、水解作用、氧化作用、 $\beta$ 脫除及二硫化物交換。另一方面，物理不安定性不會導致蛋白質中之共價改變。而是，其係涉及在蛋白質之高序結構(二級及以上)上之改變。其包括變性作用、吸附至表面、聚集及沉澱作用(Manning等人, *Pharm. Res.* 6, 903 (1989))。

一般所接受的是，此等不安定性，其可具有對於醫藥蛋白質調配物之商業生存能力與功效之大影響，可藉由在調配物中加入其他分子而被克服。蛋白質安定性可藉由在溶液中加入會與蛋白質交互作用之賦形劑而被改良，以保持蛋白質安定、可溶性及未經聚集。例如，鹽化合物及其他離子物種為對蛋白質調配物之極常用添加劑。其會藉由以非專一性方式結合至蛋白質，而幫助戰鬥蛋白質之變性作用，及增加熱安定性。鹽化合物(例如NaCl、KCl)已被成功地使用於市售胰島素

製劑中，以戰鬥聚集與沉澱作用(同前出處，在911處)。胺基酸(例如組胺酸、精胺酸)已被証實當作爲調配物添加劑使用時，會降低在蛋白質二級結構上之變更(Tian等人, *Int'l J. Pharm.* 355, 20 (2007))。常用添加劑之其他實例包括多元醇物質，譬如甘油與糖類，及界面活性劑，譬如清潔劑，非離子性(例如Tween、Pluronic)與陰離子性(十二基硫酸鈉)兩者。添加劑之幾乎一般性普及於所有液體市售蛋白質調配物中，係顯示未具有此種化合物之蛋白質溶液可能遭遇由於不安定性所致降解之挑戰。

蛋白質調配物之主要目標係爲保持特定蛋白質在其原本醫藥活性形式上之安定性，歷經長時期，以保證醫藥蛋白質藥物之可接受存放期。但是，保持蛋白質於溶液中之安定性與溶解度，在其中添加劑係被加入治療劑中之醫藥調配物上係特別具挑戰性。迄今，生物學調配物係需要其他賦形劑，以保持蛋白質安定性。典型上，液體醫藥調配物係含有多種供安定性用之添加劑。例如，用於人類生長激素之病患自行投藥之液體調配物，Norditropin SimpleXx<sup>®</sup>，係含有添加劑甘露醇(糖醇)、組胺酸及聚氧體(poloxamer) 188 (界面活性劑)，以使激素安定化。

醫藥添加劑必須爲可溶性、無毒性，及在會提供對特定治療蛋白質之安定化作用之特定濃度下使用。由於添加劑之安定化作用爲蛋白質-與濃度依賴性，故被考慮用於醫藥調配物中之各添加劑必須小心地經測試，以確保其不會造成不安定性，或具有對於調配物之化學或物理組成之其他負面作用。用以使蛋白質安定化之成份可造成關於隨著時間之蛋白質安定性，或在儲存期間於改變之環境中之蛋白質安定性之問題。

典型上，長存放期係以下述方式達成，儲存呈冷凍形式之蛋白質(例如在-80°C下)，或經由使蛋白質接受冷凍乾燥方法，意即藉由儲存

呈凍乾形式之蛋白質，使得在即將使用之前需要重配步驟，且因此產生關於病患方便性之顯著缺點。但是，使蛋白質調配物冷凍以供儲存可導致蛋白質與添加劑之局部高濃度，其可造成在調配物內之pH、降解及蛋白質聚集上之局部極端。此外，熟諳此藝者習知冷凍與解凍過程經常會衝擊蛋白質安定性，意謂即使儲存呈冷凍形式之醫藥蛋白質亦可伴隨著由於冷凍與解凍步驟所致之安定性損失。而且，冷凍乾燥之第一個處理步驟係涉及冷凍，其可負面地衝擊蛋白質安定性。於工業環境中，可使醫藥蛋白質在藥物製造(保持步驟、儲存、再冷凍及再解凍，以增加在藥物產物充填最後處理上之時機與批次大小靈活性)期間，及在後續藥物充填最後處理(冷凍乾燥)期間接受重複冷凍-解凍處理。由於習知遭遇蛋白質不安定性現象之危險係隨著增加醫藥蛋白質所遭遇到之冷凍-解凍循環之次數而增加，故達成會保持蛋白質安定性歷經重複冷凍-解凍過程之調配條件為一項具挑戰性之工作。在生物醫藥工業中，有需要可被冷凍與解凍，而不會在調配物中產生不想要性質之調配物，該性質尤其是pH、體積滲莫濃度、密度或蛋白質或賦形劑濃度之梯度。

以蛋白質為基礎之醫藥產物經常必須被調配在高濃度下，以達治療功效。高度濃縮之蛋白質調配物係為治療用途所想要，因為其允許具有較小體積之劑量，限制病患不舒服性，且係被較經濟地包裝與儲存。但是，高蛋白質濃度調配物之發展係提出許多挑戰，包括製造、安定性、分析及尤其是對於治療蛋白質為傳輸挑戰。例如，當在調配物中之蛋白質濃度被提升時，關於蛋白質之聚集、不溶性及降解之困難通常會增加(關於回顧，可參閱Shire, S.J.等人, *J. Pharm. Sci.*, 93, 1390 (2004))。先前未見及之負面作用可因添加劑而造成，其在較低濃度之添加劑或蛋白質下會提供有利作用。高濃度蛋白質調配物之生產可導致關於乳白色、聚集及沉澱作用之重要問題。除了非自然蛋白質

聚集與微粒子形成之可能性以外，可能發生可逆自體結合，其可造成增加之黏度或會使藉由注射之傳輸複雜化之其他性質。高黏度亦可因過濾途徑而使製造高蛋白質濃度複雜化。

因此，醫藥蛋白質調配物典型上會小心地使成份與濃度平衡，以增強蛋白質安定性與治療要求條件，同時限制任何負面之副作用。生物學調配物應包含安定蛋白質，即使在高濃度下亦然，使用特定量之賦形劑降低可能之治療併發症、儲存問題及整體成本。

因蛋白質及其他生物高分子係獲得作為藥物分子之增加興趣，故關於傳輸此種分子之調配物正變成一項重要問題。

儘管在大規模製造供治療使用之蛋白質上之革命性發展，此等藥劑於身體中之有效與合宜傳輸仍然為主要挑戰，此係由於其固有物理化學與生物學性質所致，包括經過生物膜之不良滲透、大的分子大小、短血漿半生期、自體結合、物理與化學不安定性、聚集、吸附及致免疫性。

### 【發明內容】

本發明係針對以下令人驚訝之發現，經調配於水中之蛋白質會於長期液體儲存或其他處理步驟期間，譬如冷凍/解凍與冷凍乾燥，保持溶解度以及安定性，即使在高濃度下亦然，

本發明係關於包含水與蛋白質之含水蛋白質調配物之方法與組合物，其中蛋白質為安定的，而無需其他藥劑。明確言之，本發明之方法與組合物係以滲濾方法為基礎，其中含有吾人感興趣蛋白質之第一種溶液係使用水作為滲濾媒質而被滲濾。進行此方法，以致與水有至少經測定之體積交換，例如五倍體積交換。藉由進行本發明之方法，在與最初蛋白質溶液比較下，所形成之含水調配物在賦形劑之整體百分比上具有顯著降低。例如，在與最初蛋白質溶液比較下，95-99%較少之賦形劑係被發現於含水調配物中。

儘管在賦形劑上之降低，蛋白質仍然保持可溶性，且保有其生物學活性，即使在高濃度下亦然。於一方面，本發明之方法會造成組合物包含增加濃度之蛋白質，同時降低其他成份，譬如離子性賦形劑。因此，在含水調配物中之蛋白質之流體動力學直徑相對於標準緩衝溶液譬如磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中之相同蛋白質係為較小。

本發明之調配物具有許多勝過標準緩衝調配物之優點。於一方面，含水調配物包含高蛋白質濃度，例如50至200毫克/毫升或更多。所有大小之蛋白質均可被加入本發明調配物中，即使在增加之濃度下亦然。儘管高濃度之蛋白質，該調配物仍具有最低聚集，且可使用各種方法與形式儲存，

例如冷凍，未具有預期伴隨著高蛋白質調配物之有害作用。

本發明之調配物並不需要賦形劑，例如界面活性劑與緩衝系統，其係被使用於傳統調配物中，以使溶液中之蛋白質安定化。由於低含量離子性賦形劑之結果，故本發明之含水調配物具有低導電率，例如低於2 mS/公分。本發明之方法與組合物亦提供具有低滲透度之含水蛋白質調配物，例如不大於30毫滲透度/公斤。此外，本文中所述之調配物係優於標準調配物，因其具有降低之致免疫性，此係由於缺少蛋白質安定化作用所需要之其他藥劑所致。

本發明之方法與組合物可用以提供包含水與吾人感興趣之任何類型蛋白質之含水調配物。於一方面，本發明之方法與組合物係用於大蛋白質，包括大於47 kDa之蛋白質。抗體及其片段，包括用於活體內與活體外目的者，係為可用於本發明方法與組合物中之蛋白質之另一項實例。

再者，為製備蛋白質與肽調配物所必須之多步驟純化與濃縮方法，係經常於組合物中引進變異性，以致調配物之精確組成可隨著批料而改變。聯邦條例係需要藥物組合物在其調配物上應為高度地一

致，而不管製造位置或批號爲何。本發明之方法可用以產生蛋白質被調配於水中之溶液，緩衝劑與賦形劑係以精確量被加回其中，允許產生具有精確濃度之緩衝劑及/或賦形劑之蛋白質調配物。

於一項具體實施例中，本發明係提供包含蛋白質與水之含水調配物，其中調配物具有某些特徵，譬如但不限於低導電率，例如導電率低於約2.5 mS/公分，蛋白質濃度至少約10微克/毫升，滲透度不超過約30毫滲透度/公斤，及/或蛋白質具有分子量( $M_w$ )大於約47 kDa。於一項具體實施例中，本發明之調配物具有經改良之安定性，譬如但不限於呈液體形式，歷經長期時間(例如至少約3個月或至少約12個月)之安定性，或經過至少一個冷凍/解凍循環之安定性(若非更多個冷凍/解凍循環時)。於一項具體實施例中，調配物係爲安定的，歷經至少約3個月，呈選自包括冷凍、經凍乾或噴霧乾燥之形式。

於一項具體實施例中，被加入本發明調配物中之蛋白質可具有最小之大小，包括例如 $M_w$ 大於約47 kDa， $M_w$ 大於約57 kDa， $M_w$ 大於約100 kDa， $M_w$ 大於約150 kDa， $M_w$ 大於約200 kDa，或 $M_w$ 大於約250 kDa。蛋白質之濃縮物亦可使用。

於一項具體實施例中，本發明之調配物具有低導電率，包括例如導電率低於約2.5 mS/公分，導電率低於約2 mS/公分，導電率低於約1.5 mS/公分，導電率低於約1 mS/公分，或導電率低於約0.5 mS/公分。

於一項具體實施例中，被加入本發明調配物中之蛋白質係具有特定濃度，包括例如濃度爲至少約1毫克/毫升，至少約10毫克/毫升，至少約50毫克/毫升，至少約100毫克/毫升，至少約150毫克/毫升，至少約200毫克/毫升，或大於約200毫克/毫升。

於一項具體實施例中，本發明之調配物具有滲透度不超過約15毫滲透度/公斤。

於一項具體實施例中，本發明係提供包含水與特定濃度蛋白質之



含水調配物，其中蛋白質具有流體動力學直徑( $D_h$ )，其係至少約50%小於緩衝溶液中特定濃度下之蛋白質之 $D_h$ 。於一項具體實施例中，蛋白質之 $D_h$ 係至少約50%小於磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中特定濃度下之蛋白質之 $D_h$ ；蛋白質之 $D_h$ 係至少約60%小於PBS中特定濃度下之蛋白質之 $D_h$ ；

蛋白質之 $D_h$ 係至少約70%小於PBS中特定濃度下之蛋白質之 $D_h$ 。

於一項具體實施例中，本發明係提供包含蛋白質譬如但不限於抗體或抗原結合片段之含水調配物，其中蛋白質具有流體動力學直徑( $D_h$ )小於約5微米。於一項具體實施例中，蛋白質具有 $D_h$ 小於約3微米。

任何蛋白質可被使用於本發明之方法與組合物中。於一項具體實施例中，調配物係包含治療蛋白質。於一項具體實施例中，調配物係包含抗體或其抗原結合片段。可被加入本發明方法與組合物中之抗體或抗原結合片段之類型，包括但不限於嵌合抗體、人類抗體、人化抗體及功能部位抗體(dAd)。於一項具體實施例中，抗體或其抗原結合片段為抗-TNF $\alpha$ ，譬如但不限於阿達利母馬(adalimumab)或古利馬伯(golimumab)，或抗-IL-12抗體，譬如但不限於J695。此外，本發明之調配物亦可包含至少兩種不同類型之蛋白質。

於本發明之又另一項具體實施例中，調配物可進一步包含不可離子化之賦形劑。不可離子化賦形劑之實例包括但不限於糖醇或多元醇(例如甘露醇或花楸醇)、非離子性界面活性劑(例如聚花楸酸酯80、聚花楸酸酯20、聚花楸酸酯40、聚花楸酸酯60)、糖(例如蔗糖)。可進一步被加入本發明調配物中之不可離子化賦形劑之其他非限制性實例，包括非海藻糖、植物蜜糖及麥芽糖。

於一項具體實施例中，調配物不包含選自包括滲透性改變劑、安定劑、界面活性劑、抗氧化劑、低溫保護劑、膨鬆劑、凍乾保護劑、鹼性成份及酸性成份之作用劑。

本發明之調配物可適用於任何用途，包括活體外與活體內兩種用途。於一項具體實施例中，本發明之調配物係適合經由投藥模式投予病患，包括但不限於皮下、靜脈內、吸入、皮內、經皮、腹膜腔內及肌內。本發明之調配物可用於治療病患中之病症。

亦被包含在本發明中者為可用以傳輸本發明調配物之裝置。此種裝置之實例包括但不限於注射器、筆、植入物、無針頭注射裝置、吸入裝置及貼藥。

於一項具體實施例中，本發明之調配物為醫藥調配物。

本發明亦提供一種製備包含蛋白質與水之含水調配物之方法，此方法包括在第一種溶液中提供蛋白質，及使該第一種溶液接受滲濾，使用水作為滲濾媒質，直到與水之至少五倍體積交換已被達成為止，於是製備含水調配物。於一項具體實施例中，在所形成調配物中之蛋白質係保有其生物學活性。

本發明係進一步提供一種製備蛋白質之含水調配物之方法，此方法包括在第一種溶液中提供蛋白質；使該第一種溶液接受滲濾，使用水作為滲濾媒質，直到與水之至少五倍體積交換已被達成為止，於是製備經滲濾之蛋白質溶液；及濃縮經滲濾之蛋白質溶液，於是製備蛋白質之含水調配物。於一項具體實施例中，在所形成調配物中之蛋白質係保有其生物學活性。

於一項具體實施例中，經滲濾蛋白質溶液之濃縮係經由離心分離達成。

於一項具體實施例中，滲濾媒質包括水。

於一項具體實施例中，係使第一種溶液接受以水之滲濾，直到達成至少約六倍體積交換為止。

於一項具體實施例中，係使第一種溶液接受以水之滲濾，直到達成至少約七倍體積交換為止。

於一項具體實施例中，含水調配物係具有賦形劑之最後濃度為至少約95%低於第一種溶液。

於一項具體實施例中，含水調配物係具有賦形劑之最後濃度為至少約99%低於第一種溶液。

於一項具體實施例中，第一種蛋白質溶液係得自哺乳動物細胞表現系統，且已被純化，以移除宿主細胞蛋白質(HCP)。

於一項具體實施例中，本發明之方法係進一步包括添加賦形劑至含水調配物中。

## 發明詳述

### I. 定義

為使本發明可更容易地被明瞭，係首先定義某些術語。

於本文中使用之"酸性成份"一詞係指一種作用劑，包括具有酸性pH，意即小於7.0之溶液。酸性成份之實例包括磷酸、鹽酸、醋酸、檸檬酸、草酸、琥珀酸、酒石酸、乳酸、蘋果酸、乙醇酸及反丁烯二酸。於一項具體實施例中，本發明之含水調配物不包含酸性成份。

於本文中使用之"抗氧化劑"一詞係意指一種作用劑，其會抑制氧化作用，且因此係用以防止製劑因氧化過程之變質。此種化合物，舉例言之，包括而不限於丙酮、酸性硫酸鈉、抗壞血酸、棕櫚酸抗壞血酸酯、檸檬酸、丁基化羥基甲苯醚、丁基化羥基甲苯、氫亞磷酸、單硫基甘油、沒食子酸丙酯、甲硫胺酸、抗壞血酸鈉、檸檬酸鈉、硫化鈉、亞硫酸鈉、亞硫酸氫鈉、甲醛次硫酸鈉、硫基乙醇酸、偏亞硫酸氫鈉、EDTA (乙底酸鹽)、戊烯酸鹽及一般熟諳此藝者所已知之其他化合物。

"含水調配物"一詞係指其中溶劑為水之溶液。

於本文中使用之"鹼性成份"一詞係指一種作用劑，其係為鹼性，意即pH值大於7.0。鹼性成份之實例包括氫氧化鉀(KOH)與氫氧化鈉

(NaOH)。

於本文中使用之"膨鬆劑"一詞係意指用以對可重配固體添加膨鬆度，及/或在製備期間幫助控制調配物性質之化合物。此種化合物，舉例言之，包括而不限於葡聚糖、海藻糖、蔗糖、聚乙烷基四氫吡咯酮、乳糖、肌醇、花楸醇、二甲亞砷、甘油、白蛋白、乳糖醛酸鈣及一般熟諳此藝者所已知之其他化合物。

於本文中使用之"導電率"一詞係指水溶液傳導兩個電極間之電流之能力。一般而言，導電率或比導電率係為物質傳導電流能力之一種度量方式。在溶液中，電流係藉由離子輸送流動。因此，隨著漸增量之離子存在於水溶液中，溶液將具有較高導電率。關於導電率之度量單位為mmhos (mS/公分)，且可使用例如由Orion研究公司(Beverly, MA)所銷售之電導率計度量。溶液之導電率可藉由改變其中離子之濃度而被變更。例如，離子性賦形劑在溶液中之濃度可被變更，以達成所要之導電率。

於本文中使用之"低溫保護劑"一詞一般係包括會對蛋白質提供安定性而免於冷凍所引致壓力之作用劑。低溫保護劑之實例包括多元醇，例如甘露醇，且包括糖，例如蔗糖，以及包括界面活性劑，例如聚花楸酸酯、聚氧體(poloxamer)或聚乙二醇等。低溫保護劑亦有助於調配物之滲透性。

於本文中使用之"超過濾"或"UF"術語係指其中係使溶液或懸浮液接受半滲透性薄膜之任何技術，該薄膜會保留巨分子，同時允許溶劑與小溶質分子通過。超過濾可用以增加巨分子在溶液或懸浮液中之濃度。於一項較佳具體實施例中，超過濾係用以增加蛋白質在水中之濃度。

於本文中使用之"滲濾"或"DF"術語係用以意謂特殊化種類之過濾，其中留存物係以溶劑稀釋，並再過濾，以降低可溶滲透成份之濃

度。滲濾可以或可以不導致增加所保留成份(包括例如蛋白質)之濃度。例如，在連續滲濾中，溶劑係在與產生濾液之相同速率下被持續地添加至留存物中。於此情況中，留存物體積與所保留成份之濃度不會在此過程期間改變。另一方面，在不連續或相繼稀釋滲濾中，超過濾步驟係接著為添加溶劑至留存物側；若被添加至留存物側之溶劑體積不等於或大於所產生濾液之體積，則所保留成份將具有高濃度。滲濾可用以變更巨分子之溶液或懸浮液之pH、離子強度、鹽組成、緩衝劑組成或其他性質。

於本文中使用的"滲濾/超過濾"或"DF/UF"術語係指會無論是相繼或同時地達成超過濾及/或滲濾之任何方法、技術或技術組合。

於本文中使用的"滲濾步驟"一詞係指在滲濾方法期間之總體積交換。

"賦形劑"一詞係指一種作用劑，其可被添加至調配物中，以提供所要之稠度(例如變更膨鬆性質)，改良安定性，及/或調整滲透度。常用賦形劑之實例包括但不限於糖類、多元醇、胺基酸類、界面活性劑及聚合體。"離子性賦形劑"或"可離子化賦形劑"術語，當可交換地使用於本文中時，係指一種具有淨電荷之作用劑。於一項具體實施例中，離子性賦形劑在某些調配條件(譬如pH)下具有淨電荷。離子性賦形劑之實例包括但不限於組胺酸、精胺酸及氯化鈉。

"非離子性賦形劑"或"不可離子化賦形劑"術語，當可交換地使用於本文中時，係指一種未具有淨電荷之作用劑。於一項具體實施例中，非離子性賦形劑在某些調配條件(譬如pH)下未具有淨電荷。非離子性賦形劑之實例包括但不限於糖類(例如蔗糖)、糖醇類(例如甘露醇)及非離子性界面活性劑(例如聚花楸酸酯80)。

於本文中使用的"第一種蛋白質溶液"或"第一種溶液"術語係指於本發明方法中所使用之最初蛋白質溶液或起始物質，意即被滲濾至水

中之最初蛋白質溶液。於一項具體實施例中，第一種蛋白質溶液包含離子性賦形劑、非離子性賦形劑及/或緩衝系統。

粒子之"流體動力學直徑"或" $D_h$ "術語係指具有水密度及與該粒子相同速度之球體之直徑。因此，於本文中使用之"蛋白質之流體動力學直徑"一詞係指對溶液中之蛋白質使用動態光散射(DLS)之大小測定。DLS-度量儀器係度量在固定散射角下自溶液中蛋白質散射之光線強度中之時間依賴性波動。蛋白質 $D_h$ 係測定自強度中之時間依賴性波動之強度自相關功能。散射強度數據係使用DLS儀器軟體處理，以測定關於流體動力學直徑之數值與散射分子(意即蛋白質試樣)之大小分佈。

於本文中使用之"凍乾保護劑"一詞包括會在水移除期間，在乾燥或冷凍乾燥方法期間，對蛋白質提供安定性之作用劑，例如藉由保持蛋白質之適當構形。凍乾保護劑之實例包括醣，特別是二-或三醣。低溫保護劑亦可提供凍乾保護作用。

於本文中關於組合物，例如含水調配物，所使用之"醫藥"一詞，其可用於治療疾病或病症。

"蛋白質"一詞係意謂包括胺基酸之順序，鏈長對其係足以產生較高程度之二級及/或三級及/或四級結構。此係為區別"肽"或未具有此種結構之其他小分子量藥物。於一項具體實施例中，在本文中使用的蛋白質係具有分子量為至少約47 kD。被涵蓋於本文中使用的定義內之蛋白質之實例包括治療蛋白質。"具治療活性之蛋白質"或"治療蛋白質"係指可用於治療目的之蛋白質，意即在病患中用於治療病症。

應注意的是，雖然治療蛋白質可用於治療目的，但本發明並不限於此種用途，因該蛋白質亦可用於活體外研究。於一項較佳具體實施例中，治療蛋白質為融合蛋白質或抗體或其抗原結合部份。於一項具體實施例中，本發明之方法與組合物包含至少兩種不同蛋白質，其係被定義

為具有不同胺基酸順序之兩種蛋白質。其他不同蛋白質不包括蛋白質之降解產物。

於本文中使用之"蛋白質係被溶於水中"措辭係指其中蛋白質係被溶於水溶液中之蛋白質調配物，其中小分子(例如緩衝劑、賦形劑、鹽、界面活性劑)之量已藉由DF/UF處理而被降低。即使小分子之完全脫除，於絕對意義上，不能藉由DF/UF處理而達成，但可藉由應用DF/UF達成之賦形劑之理論降低，係足夠大以產生基本上只在水中之蛋白質調配物。例如，在連續模式DF/UF擬案中使用6次體積交換，賦形劑之理論降低為~99.8% ( $c_i = e^{-x}$ ，其中 $c_i$ 為最初賦形劑濃度，而 $x$ 為體積交換之次數)。

"醫藥調配物"一詞係指製劑，其係呈此種形式，以致允許活性成份之生物學活性為有效，因此可被投予病患，供治療使用。

"安定"調配物係為於其中之蛋白質在儲存時基本上係保有其物理安定性及/或化學安定性及/或生物學活性者。關於度量蛋白質安定性之各種分析技術可於此項技藝中取得，且係被回顧於例如肽與蛋白質藥物傳輸，247-301, Vincent Lee編著, Marcel Dekker公司, New York, N.Y., Pubs. (1991)與Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)中。於一項具體實施例中，蛋白質之安定性係根據單體蛋白質在溶液中之百分比測定，具有低百分比之經降解(例如斷裂)及/或聚集之蛋白質。例如，包含安定蛋白質之含水調配物可包含至少95%單體蛋白質。或者，本發明之含水調配物可包含不超過5%聚集體及/或經降解之蛋白質。

"安定劑"一詞係指會改良或以其他方式增強安定性之賦形劑。安定劑包括但不限於 $\alpha$ -硫辛酸、 $\alpha$ -母育酚、棕櫚酸抗壞血酸酯、苧醇、生物素、酸性亞硫酸鹽、硼、丁基化羥基甲苯醚(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、抗壞血酸及其酯類、類胡蘿蔔素、檸檬酸鈣、乙醯基-L-

卡米汀(camitine)、螯合劑、軟骨素、鉻、檸檬酸、輔酶Q-10、半胱胺酸、半胱胺酸鹽酸鹽、3-脫氫莽草酸(DHS)、EDTA(乙二胺四醋酸；乙底酸二鈉)、硫酸亞鐵、葉酸、反丁烯二酸、沒食子酸烷酯、大蒜、葡萄糖胺、葡萄籽萃取物、古果(gugul)、鎂、蘋果酸、偏亞硫酸氫鹽、N-乙醯半胱胺酸、菸鹼酸、菸鹼醯胺、蕁麻根部、鳥胺酸、沒食子酸丙酯、碧蘿芷、鋸棕櫚、硒、亞硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉、亞硫酸鉀、酒石酸、硫代硫酸鹽、硫基甘油、硫基花楸醇，母育酚及其酯類，例如醋酸母育酚酯、琥珀酸母育酚酯、母育酚三烯醛、d- $\alpha$ -醋酸母育酚酯，維生素A及其酯類、維生素B及其酯類、維生素C及其酯類、維生素D及其酯類，維生素E及其酯類，例如維生素E醋酸酯，鋅，及其組合。

"界面活性劑"一詞一般係包括會保護蛋白質免於空氣/溶液界面所引致壓力及溶液/表面所引致壓力之作用劑。例如，界面活性劑可保護蛋白質免於聚集。適當界面活性劑可包括例如聚花楸酸酯，聚氧化乙烯烷基醚類，譬如Brij 35.RTM.，或聚氧體(poloxamer)，譬如Tween 20、Tween 80或聚氧體(poloxamer) 188。較佳清潔劑為聚氧體類，例如Poloxamer 188、Poloxamer 407；聚氧化乙烯烷基醚類，例如Brij 35.RTM.、克雷莫弗(Cremophor) A25、Sympatens ALM/230；以及聚花楸酸酯/Tween，例如聚花楸酸酯20、聚花楸酸酯80，與聚氧體(Poloxamer)，例如Poloxamer 188，及Tween，例如Tween 20與Tween 80。

於本文中使用的"滲透性改變劑"一詞係意指可用以調整液體調配物滲透性之一或多種化合物。適當滲透性改變劑包括甘油、乳糖、甘露醇、右旋糖、氯化鈉、硫酸鎂、氯化鎂、硫酸鈉、花楸醇、海藻糖、蔗糖、植物蜜糖、麥芽糖及一般熟諳此藝者所已知之其他化合物。於一項具體實施例中，液體調配物之滲透性係約等於血液或血漿之滲透性。



"水"一詞係意指已被純化以移除污染物之水，通常藉蒸餾或逆滲透，於本文中亦稱為"純水"。於一項較佳具體實施例中，在本發明方法與組合物中所使用之水係不含賦形劑。於一項具體實施例中，水包括適合投予病患之無菌水。於另一項具體實施例中，水係意謂包括注射用水(WFI)。於一項具體實施例中，水係指蒸餾水或適用於活體外檢測之水。於一項較佳具體實施例中，滲濾係根據本發明之方法，使用單獨水作為滲濾媒質而進行。

"抗體"一詞，當於本文中指稱時，係包括整個抗體及其任何抗原結合片段(意即"抗原結合部份")或單鏈。"抗體"係指包含藉由二硫鍵互連之至少兩個重(H)鏈與兩個輕(L)鏈之糖蛋白，或其抗原結合部份。各重鏈係包含重鏈可變區(於本文中縮寫成 $V_H$ )與重鏈恒定區域。重鏈恒定區域包含三個功能部位CH1、CH2及CH3。各輕鏈係包含輕鏈可變區(於本文中縮寫成 $V_L$ )與輕鏈恒定區域。輕鏈恒定區域包含一個功能部位CL。 $V_H$ 與 $V_L$ 區域可進一步再分成高可變性之區域，稱為互補性決定區域(CDR)，散佈著更保守之區域，稱為骨架區域(FR)。各 $V_H$ 與 $V_L$ 係由三個CDR與四個FR所組成，以下列順序從胺基末端排列至羧基末端：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重與輕鏈之可變區域含有會與抗原交互作用之結合功能部位。抗體之恒定區域可媒介免疫球蛋白之結合至宿主組織或因子，包括免疫系統之各種細胞(例如效應子細胞)與古典補體系統之第一種成份(C1q)。

於本文中使用的抗體之"抗原結合部份"一詞(或簡稱為"抗體部份")，係指保有專一性地結合至抗原(例如 $TNF\alpha$ 、IL-12)能力之抗體之一或多種片段。已証實抗體之抗原結合功能可藉由全長抗體之片段進行。被涵蓋在抗體之"抗原結合部份"術語內之結合片段，其實例包括(i) Fab片段，一種包含 $V_L$ 、 $V_H$ 、CL及CH1功能部位之單價片段；(ii)

F(ab')<sub>2</sub>片段，一種包含在鉸鏈區域上藉由二硫化物橋基連結之兩個Fab片段之二價片段；(iii) Fd片段，包含V<sub>H</sub>與C<sub>H1</sub>功能部位；(iv) Fv片段，包含抗體之單臂之V<sub>L</sub>與V<sub>H</sub>功能部位，(v) dAd片段(Ward等人, (1989) *Nature* 341 : 544-546)，其包含V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>功能部位；及(vi)經單離之互補性決定區域(CDR)。再者，雖然Fv片段之兩個功能部位V<sub>L</sub>與V<sub>H</sub>係被個別基因編碼，但其可使用重組方法，藉由合成鏈結接合，該鏈結係使得彼等能夠被製成單一蛋白質鏈，其中VL與VH區域係成對，以形成單價分子(稱為單鏈Fv (scFv)；參閱，例如Bird等人(1988) *Science* 242 : 423-426；與Huston等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 5879-5883)。此種單鏈抗體亦意欲被涵蓋在抗體之"抗原結合部份"之術語內。此等抗體片段係使用熟諳此藝者已知之習用技術獲得，且片段係以與完整抗體相同之方式針對利用性經篩檢。於本發明之一項具體實施例中，抗體片段係選自包括Fab、Fd、Fd'、單鏈Fv (scFv)、scFv<sub>a</sub>及功能部位抗體(dAd)。

又再者，抗體或其抗原結合部份可為較大免疫黏連分子之一部份，藉由抗體或抗體部份與一或多種其他蛋白質或肽之共價或非共價鍵締合所形成。此等其他蛋白質或肽可具有官能基，其係允許抗體或其抗原結合部份之純化，或允許其彼此結合或與其他分子結合。因此，此種免疫黏連分子之實例包括使用鏈霉胺基酸核心區域，以製造四聚體單鏈可變片段(scFv)分子(Kipriyanov等人(1995) *人類抗體與雜種瘤* 6 : 93-101)，與使用半胱胺酸殘基、標記物肽及C-末端多組胺酸標記，以製造二價且生物素化之scFv分子(Kipriyanov等人(1994) *Mol. Immunol.* 31 : 1047-1058)。抗體部份，譬如Fab與F(ab')<sub>2</sub>片段，可使用習用技術製自整個抗體，譬如整個抗體之個別木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化。再者，抗體、抗體部份及免疫黏連分子可使用標準重組DNA技術獲得。

在兩個抗體功能部位歸屬於會形成同源對或組群之結構族群，或係衍生自此種族群，且保有此特徵之情況下，其係為"互補"。例如，抗體之VH功能部位與VL功能部位係為互補；兩個VH功能部位不為互補，且兩個VL功能部位不為互補。互補功能部位可在免疫球蛋白超族群之其他成員中發現，譬如T-細胞受體之V $\alpha$ 與V $\beta$ (或 $\gamma$ 與 $\delta$ )功能部位。

"功能部位"一詞係指經折疊之蛋白質結構，其係保有其三級結構，與蛋白質之其餘部份無關。一般而言，功能部位係負責蛋白質之分立功能性質，而在許多情況中可被添加、移除或轉移至其他蛋白質，而不會失去蛋白質其餘部份及/或功能部位之功能。所謂單一抗體可變功能部位係意指包含抗體可變功能部位之順序特徵之經折疊多肽功能部位。因此，其包括完全抗體可變功能部位與經修改之可變功能部位，例如其中一或多個圈環已被不為抗體可變功能部位特徵之順序取代，或已被截頭之抗體可變功能部位，或包括N-或C-末端延伸，以及保有全長功能部位之至少部份結合活性與專一性之可變功能部位經折疊片段。

本發明之可變功能部位可被合併，以形成一組功能部位；例如，互補功能部位可被合併，譬如VL功能部位係與VH功能部位合併。非互補功能部位亦可被合併。功能部位可以多種涉及功能部位藉由共價或非共價方式連結之方式合併。

"dAd"或"功能部位抗體"係指會專一性地結合抗原之單一抗體可變功能部位(V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>)多肽。

於本文中使用的"抗原結合區域"或"抗原結合位置"術語係指抗體分子之部份或其抗原結合部份，其含有會與抗原交互作用，且會在抗體上賦予其對抗原之專一性與親和力之胺基酸殘基。

"抗原決定部位"一詞係意欲指稱能夠在一或多個抗體之抗原結合區域上藉由抗體辨識，且藉由其結合之任何分子之部份。就本發明而

論，應明瞭第一個與第二個"抗原決定部位"為不相同且未藉由單一專一抗體或其抗原結合部份結合之抗原決定部位。

"重組抗體"措辭係指藉由重組方式製備、表現、產生或單離之抗體，譬如使用經轉染至宿主細胞中之重組表現載體所表現之抗體、單離自重組結合抗體庫之抗體、單離自對人類免疫球蛋白基因為轉基因之動物(例如老鼠)之抗體(參閱，例如Taylor等人(1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295)或藉涉及特定免疫球蛋白基因順序(譬如人類免疫球蛋白基因順序)對其他DNA順序之疊接之任何其他方式所製備、表現、產生或單離之抗體。重組抗體之實例包括嵌合、CDR-移植及人化之抗體。

"人類抗體"一詞係指具有相應於或衍生自人類胚細胞系免疫球蛋白順序之可變與恒定區域之抗體，如藉由例如Kabat等人所述者(參閱Kabat等人(1991)具免疫學重要性之蛋白質順序，第五版，美國健康與人類服務部門，NIH公報案號91-3242)。但是，本發明之人類抗體可包含未被人類胚細胞系免疫球蛋白順序編碼之胺基酸殘基(例如在活體外藉由任意或位置專一性致突變或在活體內藉由體細胞突變所引進之突變型)，例如在CDR，且特別是CDR3中。

本發明之重組人類抗體係具有可變區域，且亦可包含衍生自人類胚細胞系免疫球蛋白順序之恒定區域(參閱Kabat等人(1991)具免疫學重要性之蛋白質順序，第五版，美國健康與人類服務部門，NIH公報案號91-3242)。但是，在某些具體實施例中，使此種重組人類抗體接受活體外致突變(或當使用對人類Ig順序為轉基因之動物時，為活體內體細胞致突變)，且因此，重組抗體之VH與VL區域之胺基酸順序係為雖然衍生自且相關於人類胚細胞系VH與VL順序，但在活體內可不天然地存在於人類抗體胚細胞系存庫內之順序。但是，在某些具體實施例中，此種重組抗體為選擇性致突變或回復突變或兩者之結果。

"回復突變"一詞係指一種過程，其中人類抗體之一部份或全部體

細胞上突變胺基酸係被得自類同胚細胞系抗體順序之相應胚細胞系殘基置換。本發明人類抗體之重與輕鏈順序係個別地以VBASE資料庫中之胚細胞系順序對準，以確認具有最高類同性之順序。在本發明人類抗體上之差異係經由使此種不同胺基酸編碼之經界定核苷酸位置突變，而回復至胚細胞系順序。經如此確認為回復突變候選者之各胺基酸之角色，應針對在抗原結合中之直接或間接角色進行研究，且在影響人類抗體任何所想要特徵之突變後所發現之任何胺基酸，不應被包含在最後人類抗體中。為使接受回復突變之胺基酸數目降至最低，經發現不同於最接近胚細胞系順序，但與第二種胚細胞系順序中之相應胺基酸相同之胺基酸位置可仍然保持，其條件是第二種胚細胞系順序係與本發明人類抗體之順序相同且共線性，達至少10個，較佳為12個胺基酸，在討論中胺基酸之兩側上。回復突變可發生在抗體最佳化之任何階段下。

"嵌合抗體"一詞係指包含得自一個物種之重與輕鏈可變區域順序及得自另一個物種之恒定區域順序之抗體，譬如，具有經連結至人類恒定區域之老鼠重與輕鏈可變區域之抗體。

"CDR-移植之抗體"一詞係指包含得自一個物種之重與輕鏈可變區域順序，但其中VH及/或VL之一或多個CDR區域順序係被另一個物種之CDR順序置換之抗體，譬如具有老鼠重與輕鏈可變區域，其中一或多個老鼠CDR (例如CDR3)已被人類CDR順序置換之抗體。

"人化抗體"一詞係指包含得自非人類物種(例如老鼠)之重與輕鏈可變區域順序，但其中VH及/或VL順序之至少一部份已被變更為較"像人類"，意即較類似人類胚細胞系可變順序之抗體。一種類型之人化抗體為CDR-移植之抗體，其中人類CDR順序係被引進非人類VH與VL順序中，以置換其相應之非人類CDR順序。

本發明之各種方面係更詳細地描述於下文分項中。

## II. 本發明之方法

一般而言，滲濾係為一種技術，其係使用薄膜，以自含有蛋白質、肽、核酸及其他生質分子之溶液移除、置換鹽或溶劑，或降低其濃度。一旦蛋白質已被純化自因其表現所形成之不純物，例如宿主細胞蛋白質，蛋白質生產操作即經常涉及蛋白質溶液之最後滲濾至調配物緩衝液中。本文中所述之本發明係提供一種獲得含水調配物之方法，其方式是使蛋白質溶液接受滲濾，使用單獨水作為滲濾溶液。

因此，本發明之調配物係以在滲濾方法期間使用水作為調配媒質為基礎，且不倚賴傳統調配媒質，其包含賦形劑，譬如用以使最後調配物中之蛋白質溶解及/或安定化之界面活性劑。本發明係提供一種將蛋白質轉移至純水中，供使用於安定調配物之方法，其中蛋白質仍然留在溶液中，且能夠在高含量下被濃縮，而未使用其他作用劑以保持其安定性。

根據本文之陳述內容，在滲濾或DF/UF之前，此方法係包括首先在第一種溶液中提供蛋白質。蛋白質可被調配在任何第一種溶液中，包括使用此項技藝中經良好建立之技術之調配物，譬如合成技術(例如重組技術、肽合成或其組合)。或者，於本發明方法與組合物中所使用之蛋白質係被單離自蛋白質之內源來源。最初蛋白質溶液可使用純化方法獲得，而其中蛋白質係純化自蛋白質之非均質混合物。於一項具體實施例中，在本發明中所使用之最初蛋白質溶液係得自純化方法，而其中係使被表現於哺乳動物表現系統中之蛋白質，包括抗體，接受許多層析步驟，其會自蛋白質溶液移除宿主細胞蛋白質(HCP)。於一項具體實施例中，第一種蛋白質溶液係得自哺乳動物細胞表現系統，且已被純化，以移除宿主細胞蛋白質(HCP)。純化方法之實例係描述於美國專利申請案號11/732,918 (US 20070292442)中，其係併於本文供參考。應注意的是，沒有根據本發明方法所需要之第一種蛋白質溶液之

特殊製備。

可用於本發明組合物與方法中之蛋白質可為任何大小，意即分子量( $M_w$ )。例如，蛋白質可具有 $M_w$ 等於或大於約1 kDa， $M_w$ 等於或大於約10 kDa， $M_w$ 等於或大於約47 kDa， $M_w$ 等於或大於約57 kDa， $M_w$ 等於或大於約100 kDa， $M_w$ 等於或大於約150 kDa， $M_w$ 等於或大於約200 kDa，或 $M_w$ 等於或大於約250 kDa。上文所列舉 $M_w$ 之中間數目，例如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, 153, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170等等，以及本文所述之所有其他數目，亦意欲成為本發明之一部份。使用任何上文所列舉數值之組合作為上及/或下限之數值範圍係欲被包含在本發明範圍內。例如，於本發明中所使用之蛋白質於大小上可涵蓋範圍從57 kDa至250 kDa，56 kDa至242 kDa，60 kDa至270 kDa等等。

本發明方法亦包括含有至少兩種不同蛋白質之第一種蛋白質溶液之滲濾。例如，蛋白質溶液可含有針對不同分子或相同分子之不同抗原決定部位之兩種或多種類型抗體。

於一項具體實施例中，在溶液中之蛋白質為治療蛋白質，包括但不限於融合蛋白質與酵素。治療蛋白質之實例包括但不限於普莫吉美 (Pulmozyme) (鏈道酶 $\alpha$ )、瑞革蘭尼 (Regranex) (Becaplermin)、亞克提維斯(Activase) (阿帖普酶(Alteplase))、阿度拉酶(Aldurazyme) (Laronidase)、阿美威維(Amevive) (阿列發謝特

(Alefacept))、阿拉內普(Aranesp) (達貝艾波亭(Darbepoetin) alfa)、貝卡列明(Becaplermin)濃縮物、貝他色隆(Betaseron) (干擾素 $\beta$ -1b)、玻拓克斯(BOTOX) (肉毒毒素A型)、Elitek (來斯布利酶(Rasburicase))、約爾史巴(elspar)(天冬醯胺酶)、Epogen (艾波亭(Epoetin) alfa)、恩布瑞爾(Enbrel) (恩塔臬西伯(Etanercept))、Fabrazyme (Agalsidase $\beta$ )、干擾原(Infergen) (干擾素alfacon-1)、因特隆(Intron) A (干擾素 $\alpha$ -2a)、Kineret (安那金拉(Anakinra))、MYOBLOC (肉毒毒素B型)、紐拉斯塔(Neulasta) (佩非葛拉亭(Pegfilgrastim))、Neumega (歐普瑞維金(Oprelvekin))、紐波真(Neupogen) (非葛拉亭(Filgrastim))、歐塔克(Ontak) (丹尼白血球素待弗提托斯(Denileukin diftitox))、PEGASYS (PEG干擾素-2a)、前白血球素(阿迪斯白血球素(Aldesleukin))、普莫吉美(Pulmozyme) (鏈道酶alfa)、Rebif (干擾素 $\beta$ -1a)、瑞革蘭尼(Regranex) (貝卡列明(Becaplermin))、瑞塔威斯(Retavase) (瑞替普酶(Reteplase))、Roferon-A (干擾素 $\alpha$ -2)、TNKase (腱激酶)與Xigris (Drotrecogin alfa)、Arcalyst (Riloncept)、NPlate (Romiplostim)、Mircera (甲氧基聚乙二醇-艾波亭(epoetin) $\beta$ )、Cinryze (C1酯酶抑制劑)、Elaprase (idursulfase)、Myozyme (阿葡萄糖苷酶(alglucosidase) alfa)、歐倫西亞(Orencia) (阿巴塔謝特(abatacept))、Naglazyme (galsulfase)、克比凡斯(Kepivance) (巴利弗明(palifermin))及Actimmune (干擾素 $\gamma$ -1b)。

於本發明中所使用之蛋白質亦可為抗體或其抗原結合片段。可使用於本發明中之抗體實例包括嵌合抗體、非人類抗體、人類抗體、人化抗體及功能部位抗體(dAb)。於一項具體實施例中，抗體或其抗原結合片段為抗-TNF $\alpha$ 及/或抗-IL-12抗體(例如其可為雙可變功能部位(DVD)抗體)。可使用於本發明方法與組合物中之抗體或其抗原結合片段之其他實例，包括但不限於1D4.7 (抗-IL-12/IL-23抗體；Abbott實驗室)、2.5(E)mg1 (抗-IL-18；Abbott實驗室)、13C5.5 (抗-IL-13抗體；Abbott



實驗室)、J695 (抗-IL-12; Abbott實驗室)、Afelimomab (Fab 2抗-TNF; Abbott實驗室)、Humira (阿達利母馬(adalimumab)) Abbott實驗室)、肯巴斯(Campath) (阿連圖馬伯(Alemtuzumab))、CEA-掃描 Arcitumomab (fab片段)、鄂比圖斯(Erbix) (些圖西馬伯(Cetuximab))、賀西伯亭(Herceptin) (搓史圖諸馬伯(Trastuzumab))、Myoscint (Imciromab Pentetate)、ProstaScint (卡普洛馬伯片迪肽(Capromab Pentetide))、瑞米卡得(Remicade) (因弗利西馬(Infliximab))、ReoPro (亞伯西瑪伯(Abciximab))、利圖散(Rituxan) (利圖西馬伯(Rituximab))、Simulect (巴西利馬伯(Basiliximab))、Synagis (柏利維充諸馬(Palivizumab))、Verluma (諾非圖莫伯(Nofetumomab))、Xolair (歐馬利祖馬(Omalizumab))、Zenapax (達可利諸伯(Daclizumab))、吉維林(Zevalin) (衣利圖莫伯提克西坦(Ibritumomab Tiuxetan))、Orthoclone OKT3 (目洛蒙那伯(Muromonab)-CD3)、Panorex (艾卓可羅伯(Edrecolomab))、米若塔革(Mylotarg) (堅圖住馬伯歐坐加霉素(Gemtuzumab ozogamicin))、古利馬伯(golimumab) (Centocor)、Cimzia (Certolizumab pegol)、Soliris (也苦利馬伯(Eculizumab))、CNTO 1275 (ustekinumab)

、Vectibix (片尼圖努馬伯(panitumumab))、貝克薩(Bexxar) (托西圖莫伯(tositumomab)與 $I^{131}$ 托西圖莫伯(tositumomab))，抗-IL-17抗體7，如在國際申請案WO 2007/149032 (Cambridge抗體技術)中所述者，其全部內容係併於本文供參考，抗-IL-13抗體CAT-354 (Cambridge抗體技術)、抗人類CD4抗體CE9y4PE (IDEC-151、clenoliximab) (Biogen IDEC/Glaxo Smith Kline)、抗人類CD4抗體IDEC CE9.1/SB-210396 (keliximab) (Biogen IDEC)、抗人類CD80抗體IDEC-114 (galiximab) (Biogen IDEC)、抗-狂犬病病毒蛋白質抗體CR4098 (foravirumab)及抗人類TNF-相關之細胞凋零-引致配位體受體2 (TRAIL-2)抗體HGS-ETR2 (lexatumumab) (人類基因組科學公司)以及阿威斯汀

(Avastin) (貝發西馬伯(bevacizumab))。

關於抗體生產之技術係提供於下文。

### *多株抗體*

多株抗體一般係指對某一抗原為專一，但會結合至該抗原上之不同抗原決定部位之抗體混合物。多株抗體通常係在動物中藉由有關聯抗原與佐劑之多次皮下(sc)或腹膜腔內(ip)注射而引起。其可用以使有關聯抗原共軛至在欲被免疫物種中為免疫原之蛋白質，例如鍵孔青貝血藍質、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑，使用雙官能性或衍化劑，例如順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基磺酸基琥珀醯亞胺酯(經過半胱胺酸殘基之共軛作用)、N-羥基琥珀醯亞胺(經過離胺酸殘基)、戊二醛、琥珀酐、 $\text{SOCl}_2$ 或 $\text{R}_1\text{NCNR}$ ，其中R與 $\text{R}_1$ 為不同烷基。製造多株抗體之方法係為此項技藝中已知，且係被描述於例如抗體：實驗室手冊, Lane與Harlow (1988)中，其係併於本文供參考。

### *單株抗體*

於本文中使用之"單株抗體"係意欲指稱雜種瘤衍生之抗體(例如藉由雜種瘤分泌之抗體，該雜種瘤係藉由雜種瘤技術，譬如標準Kohler與Milstein雜種瘤操作法製成)。例如，單株抗體可使用最初由Kohler等人, Nature, 256: 495 (1975)所述之雜種瘤方法製成，或可藉由重組DNA方法(美國專利4,816,567)製成。因此，本發明之雜種瘤衍生之雙專一性抗體仍然被稱為單株抗體，惟其具有對超過單一抗原之抗原專一性。

單株抗體係得自實質上均質抗體之個體群，意即包含該個體群之個別抗體係為相同，惟可以少量存在之可能天然生成之突變型除外。因此，修飾用語"單株"係表示抗體之特性為非分立抗體之混合物。

於進一步具體實施例中，抗體可被單離自使用McCafferty等人, Nature, 348: 552-554 (1990)中所述技術產生之抗體噬菌體庫。Clackson

等人, *Nature*, 352 : 624-628 (1991)與Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222 : 581-597 (1991)係描述個別使用噬菌體庫之老鼠與人類抗體之單離。後續刊物係描述高親和力(nM範圍)人類抗體藉由鏈滑移(Marks等人, *Bio/Technology*, 10 : 779-783 (1992)), 以及結合感染與活體內重組之生產, 作為關於建構極大噬菌體庫之策略(Waterhouse等人, *Nuc. Acids. Res.*, 21 : 2265-2266 (1993))。因此, 此等技術為關於單株抗體單離之傳統單株抗體雜種瘤技術之可實行替代方式。

抗體與抗體片段亦可利用表現庫而被單離自酵母及其他真核細胞, 如在美國專利 6,423,538 ; 6,696,251 ; 6,699,658 ; 6,300,065 ; 6,399,763 ; 及6,114,147中所述者。真核細胞可經設計, 以表現庫蛋白質, 包括得自結合抗體庫, 供顯示於細胞表面上, 允許選擇含有對於具親和力抗體之基因庫無性繁殖系之特定細胞, 以選擇標的分子。自經單離細胞回收後, 對吾人感興趣之抗體進行編碼之基因庫無性繁殖系可在高含量下表現自適當哺乳動物細胞系。

關於發展吾人感興趣抗體之其他方法包括不含細胞之篩檢, 使用核酸顯示技術, 如在美國專利 7,195,880 ; 6,951,725 ; 7,078,197 ; 7,022,479 ; 6,518,018 ; 7,125,669 ; 6,846,655 ; 6,281,344 ; 6,207,446 ; 6,214,553 ; 6,258,558 ; 6,261,804 ; 6,429,300 ; 6,489,116 ; 6,436,665 ; 6,537,749 ; 6,602,685 ; 6,623,926 ; 6,416,950 ; 6,660,473 ; 6,312,927 ; 5,922,545 ; 及6,348,315中所述者。此等方法可用以在活體外自核酸轉錄蛋白質, 其方式係致使蛋白質以物理方式締合或結合至其所源自之核酸。藉由選擇具有標的分子之經表現蛋白質, 亦選擇會對蛋白質進行編碼之核酸。在一種關於不含細胞篩檢技術之變型中, 單離自免疫系統細胞之抗體順序可被單離, 且部份隨機化之聚合酶連鎖反應致突變技術係增加抗體多樣性。然後, 此等經部份隨機化之抗體基因係被表現於不含細胞之系統中, 其中同時物理締合作用係在核酸與抗體之

間產生。

DNA亦可經改質，例如藉由取代關於人類重與輕鏈恒定功能部位之編碼順序，替代同系老鼠順序(美國專利4,816,567；Morrison等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81：6851 (1984))，或藉由以共價方式接合至免疫球蛋白編碼順序，關於非免疫球蛋白多肽之編碼順序之全部或部份。

典型上，此種非免疫球蛋白多肽係用以取代抗體之恒定功能部位，或其係用以取代抗體之一個抗原組合位置之可變功能部位，以產生嵌合雙價抗體，其包含一個具有對抗原之專一性之抗原組合位置與另一個具有對不同抗原之專一性之抗原組合位置。

嵌合或雜種抗體亦可在活體外，使用合成蛋白質化學中之已知方法製成，包括涉及交聯劑者。例如，免疫毒素可使用二硫化物-交換反應，或藉由形成硫醚鍵建構。供此項目的使用之適當試劑之實例包括亞胺基硫醇化物與4-巰基丁醯亞胺酸甲酯。

### 人化抗體

使非人類抗體人化之方法係為此項技藝中所習知。一般而言，人化抗體係具有一或多個自非人類來源被引進其中之胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘基係經常被稱為"輸入"殘基，其典型上係取自"輸入"可變功能部位。人化作用可基本上按照Winter與共同研究者之方法(Jones等人, Nature, 321：522-525 (1986)；Riechmann等人, Nature, 332：323-327 (1988)；Verhoeyen 等人, Science, 239：1534-1536 (1988))，經由以非人類(例如齧齒動物) CDR或CDR順序取代其相應之人類抗體順序而進行。因此，此種"人化"抗體為嵌合抗體(美國專利4,816,567)，其中實質上小於完整人類可變功能部位已被得自非人類物種之相應順序取代。實際上，人化抗體典型上為人類抗體，其中一些CDR殘基與可能一些骨架殘基(FR)係被得自齧齒動物抗體中之類似位置之殘基取

中此兩種鏈具有不同專一性(Millstein等人, Nature, 305 : 537-539 (1983))。由於免疫球蛋白重與輕鏈之隨機揀選,故此等雜種瘤(四重瘤)會產生10種不同抗體分子之可能混合物,其中只有一種具有正確雙專一性結構。正確分子之純化,其經常藉由親和層析步驟達成,是頗為麻煩的,且產物產率很低。類似程序係揭示於WO 93/08829與Traunecker等人, EMBO J., 10 : 3655-3659 (1991)中。

根據不同途徑,具有所要結合專一性之抗體可變功能部位(抗體-抗原組合位置)係經融合至免疫球蛋白恒定功能部位順序。

融合物較佳係具有免疫球蛋白重鏈恒定功能部位,包含鉸鏈、CH2及CH3區域之至少一部份。較佳係具有含輕鏈結合所必要位置之第一個重鏈恒定區域(CH1),存在於至少一種融合物中。使免疫球蛋白重鏈融合物編碼之DNA及若需要時之免疫球蛋白輕鏈係被插入個別表現載體中,且被共轉染至適當宿主生物體中。在構造中所使用不相等比例之三個多肽鏈提供最適宜產率時之具體實施例中,這係於調整相互比例之三種多肽片段上提供大的靈活性。但是,可在一種表現載體中插入兩個或全部三個多肽鏈之編碼順序,當呈相等比例之至少兩個多肽鏈之表現會造成高產率時,或當該比例未具有特定意義時。

於此途徑之一項較佳具體實施例中,雙專一性抗體係由在一臂中具有第一個結合專一性之雜種免疫球蛋白重鏈,與在另一臂中之雜種免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二個結合專一性)所組成。已發現此不對稱結構有助於所要雙專一性化合物自不想要之免疫球蛋白鏈組合中分離,因免疫球蛋白輕鏈存在於只有一半之雙專一性分子中,係提供一種簡易分離方法。此途徑係揭示於1994年3月3日公告之WO 94/04690中。關於產生雙專一性抗體之進一步細節,可參閱例如Suresh等人, 酶學方法, 121 : 210 (1986)。

雙專一性抗體包括交聯或"雜共軛"抗體。例如,在雜共軛物中之

抗體之一可被偶合至抗生物素蛋白，另一個至生物素。例如，此種抗體已被提出將免疫系統細胞對不想要細胞瞄靶(美國專利4,676,980)，及用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373及EP 03089)。雜共軛抗體可使用任何合宜交聯作用方法製成。適當交聯劑係為此項技藝中所習知，且係揭示於美國專利4,676,980中，伴隨著多種交聯作用技術。

自抗體片段產生雙專一性抗體之技術亦已被描述於文獻中。下述技術亦可用於生產未必為雙專一性之雙價抗體片段。例如，回收自大腸桿菌之Fab'片段可以化學方式於活體外偶合，以形成二價抗體。參閱Shalaby等人, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)。

自重組細胞培養物直接地製造與單離雙價抗體片段之各種技術亦已被描述。例如，二價異種二聚體已使用白胺酸拉鍊對被製成。Kostelny等人, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)。得自Fos與Jun蛋白質之白胺酸拉鍊肽係藉由基因融合連結至兩種不同抗體之Fab'部份。抗體同種二聚體係在鉸鏈區域上被還原，以形成單體，然後再氧化，以形成抗體異種二聚體。由Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)所描述之"雙抗體"技術已提供關於製造雙專一性/雙價抗體片段之替代機制。該片段包含藉由鏈結連接至輕鏈可變功能部位(V<sub>L</sub>)之重鏈可變功能部位(V<sub>H</sub>)，該鏈結係太短以致不允許在相同鏈上之兩個功能部位之間配對。因此，一個片段之V<sub>H</sub>與V<sub>L</sub>功能部位係被迫與另一個片段之互補V<sub>L</sub>與V<sub>H</sub>功能部位成對，於是形成兩個抗原結合位置。關於利用單鏈F<sub>v</sub> (sF<sub>v</sub>)二聚體製造雙專一性/雙價抗體片段之另一種策略亦已被報告過。參閱Gruber等人, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)。

於一項具體實施例中，本發明之調配物包含對IL-1 (包括IL-1 $\alpha$ 與IL-1 $\beta$ )為雙專一之抗體。製造雙專一性IL-1抗體之實例與方法可參閱

2006年12月29日提出申請之美國臨時申請案號60/878165。

滲濾/超過濾(於本文中亦一般性地稱為DF/UF)係選擇性地利用可透過(多孔性)薄膜濾器，以其分子大小為基礎分離溶液與懸浮液之成份。薄膜會保留大於薄膜孔隙之分子，然而可透過之較小分子，譬如鹽、溶劑及水，會自由地通過薄膜。被薄膜所保留之溶液係被稱為濃縮液或留存物。通過薄膜之溶液係被稱為濾液或滲透液。關於選擇薄膜以供濃縮之一種參數係為欲被濃縮試樣之保留特徵。一般規則是，薄膜之分子量截止值(MWCO)應為1/3至1/6欲被保留分子之分子量。此係為確保完全留存。MWCO愈接近試樣，關於在濃縮期間之一些小產物損失之風險愈大。可與本發明方法一起使用之薄膜實例包括Omega™PES薄膜(30 kDa MWCO，意即大於30 kDa之分子係被薄膜保留，而小於30 kDa之分子係被允許通過至細胞膜之濾液側)(Pall公司, Port Washington, NY)；Millex®-GV注射器驅動濾器單元，PVDF 0.22微米(Millipore公司, Billerica, MA)；Millex®-GP注射器驅動濾器單元，PES 0.22微米；Sterivex®0.22微米濾器單元(Millipore公司, Billerica, MA)；及Vivaspin濃縮器(MWCO 10 kDa, PES；MWCO 3 kDa, PES)(Sartorius公司, Edgewood, NY)。為製備本發明之低-離子性蛋白質調配物，係使蛋白質溶液(其可被溶解於經緩衝之調配物中)接受DF/UF方法，而其中水係作為DF/UF媒質使用。於一項較佳具體實施例中，DF/UF媒質包含水，且不包含任何其他賦形劑。

任何水可用於本發明之DF/UF方法中，惟較佳水為經純化或去離子水。可使用於本發明實施中之此項技藝中已知之水類型，包括注射用水(WFI) (例如HyPure WFI品質水(HyClone)、AQUA-NOVA®WFI (Aqua Nova))、UltraPure™水(Invitrogen)及蒸餾水(Invitrogen；Sigma-Aldrich)。

有兩種形式之DF/UF，包括呈不連續模式之DF/UF與呈連續模式

之DF/UF。本發明之方法可根據任一種模式進行。

連續DF/UF (亦被稱為恒定體積DF/UF)係涉及洗除在留存物(試樣或第一種蛋白質溶液)中之最初緩衝劑鹽(或其他低分子量物種)，其方式是在與濾液正被產生之相同速率下，添加水或新緩衝劑至留存物中。因此，留存物體積與產物濃度不會在DF/UF方法期間改變。所移除鹽之量係與所產生之濾液體積有關，相對於留存物體積。所產生之濾液體積係經常以"滲濾體積"為觀點指稱。單一滲濾體積(DV)為開始滲濾時之留存物體積。對於連續滲濾，液體係在與產生濾液之相同速率下添加。當所收集之濾液體積等於開始留存物體積時，1 DV已被處理。

不連續DF/UF (其實例係被提供於下文實例段落中)包括兩種不同方法，不連續之相繼DF/UF與體積減少不連續DF/UF。藉由相繼稀釋之不連續DF/UF係涉及首先將試樣(或第一種蛋白質溶液)以水稀釋至預定體積。然後，使經稀釋之試樣藉由UF濃縮回至其原先體積。藉由體積減少之不連續DF/UF係涉及首先使試樣濃縮至預定體積，然後將試樣以水或替補緩衝劑稀釋回至其原先體積。與連續DF/UF一樣，係重複此方法，直到不想要溶質例如離子性賦形劑之含量被移除為止。

DF/UF可根據此項技藝中已知之習用技術，使用水例如WFI作為DF/UF媒質進行(例如滲濾方法之工業超過濾設計與應用, Beaton & Klinkowski, J. Separ. Proc. Technol., 4(2) 1-10 (1983))。關於進行DF/UF之市購可得設備之實例包括Millipore Labscale™TFF系統(Millipore)、LV Centramate™實驗室切線流動系統(Pall公司)及UniFlux系統(GE保健)。

例如，於一項較佳具體實施例中，具有500毫升儲器之Millipore Labscale™切線流動過濾(TFF)系統係用以進行本發明之方法，以產生經滲濾之抗體溶液。DF/UF程序係以不連續方式進行，其中14個處理



步驟係用以產生在水中之高濃度抗體調配物。關於本發明特定具體實施例之其他舉例設備、溶液與水體積、處理步驟之數目及其他參數，可參閱下文實例段落。

關於緩衝劑交換之滲濾之替代方法，其中蛋白質係根據本發明再被調配至水中，係包括滲析與凝膠過濾，此兩者均為此項技藝中者已知之技術。滲析係需要充填滲析氣袋(經界定孔隙度之薄膜罩殼)、將氣袋打結及將氣袋放置在水浴中。經過擴散，鹽在氣袋中之濃度將與浴液中之濃度達成平衡，其中不能夠經過氣袋擴散之大分子例如蛋白質仍然留在氣袋中。浴液體積相對於氣袋子中之試樣體積愈大，可達成之平衡濃度愈低。一般而言，浴液水之置換係為完全移除所有鹽所需要。凝膠過濾為非吸附層析技術，其係以分子大小為基礎分離分子。在凝膠過濾中，大分子例如蛋白質可藉由尺寸排阻而與較小分子例如鹽分離。

在本發明之一項較佳具體實施例中，係使第一種蛋白質溶液接受與水之重複體積交換，以致達成基本上為水與蛋白質之含水調配物。滲濾步驟可進行任何次數，依溶液中之蛋白質而定，其中一個滲濾步驟係等於一次總體積交換。於一項具體實施例中，滲濾方法係進行1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9或至高多達被認為自第一種蛋白質溶液移除賦形劑(例如鹽)所必須之次數，以致使蛋白質係基本上被溶解於水中。當一體積之水已被添加至等於蛋白質溶液開始體積之留存物側中時，係達成滲濾之單一回合或步驟。

於一項具體實施例中，係使蛋白質溶液接受至少2次滲濾步驟。於一項具體實施例中，滲濾步驟或與水之體積交換可重複至少四次，且較佳為至少五次。於一項具體實施例中，係使第一種蛋白質溶液接受以水之滲濾，直到達成至少六倍體積交換為止。於另一項具體實施例中，係使第一種蛋白質溶液接受以水之滲濾，直到達成至少七倍體

積交換為止。上文所列舉數目之中間範圍，例如4至6或5至7，亦意欲成爲本發明之一部份。例如，使用任何上文所列舉數值之組合作爲上及/或下限之數值範圍係欲被包含在內。

於一項較佳具體實施例中，蛋白質之損失至超過濾薄膜之濾液側應被降至最低。蛋白質損失至特定薄膜之濾液側之風險會改變，與蛋白質之大小相對於薄膜孔隙大小及蛋白質濃度有關聯。隨著在蛋白質濃度上之增加，蛋白質損失至濾液之風險係增加。對於特定薄膜孔隙大小，蛋白質損失之風險對於在大小上接近薄膜MWCO之較小蛋白質，係大於對較大蛋白質。因此，當在較小蛋白質上進行DF/UF時，不可能達成在體積上之相同減少，當與使用相同薄膜，在較大蛋白質上進行作比較時，不會招致無法令人接受之蛋白質損失。換言之，當與使用相同設備與薄膜之較小蛋白質溶液之超過濾比較時，較大蛋白質之溶液可被超過濾至較小體積，具有一致較大濃度之蛋白質在溶液中。使用特定孔隙大小薄膜之DF/UF程序對較小蛋白質係比對較大蛋白質可能需要更多處理步驟；對於較大蛋白質之較大體積減少與濃度係允許加回較大體積之水，導致在蛋白質溶液中之殘留緩衝劑或賦形劑成份之較大稀釋，對該個別處理步驟而言。因此，對較大蛋白質係比對較小者可能需要較少處理步驟，以達成在溶質上之特定降低。熟諳此藝者係能夠計算以各處理步驟所可能之濃縮量，及達成在溶質上特定降低所需要之整個處理步驟之數目，在欲被使用於程序中之蛋白質大小與超過濾裝置之孔隙大小下。

由於本發明滲濾方法之結果，溶質在第一種蛋白質溶液中之濃度係於基本上包含水與蛋白質之最後含水調配物中被顯著地降低。例如，含水調配物可具有賦形劑之最後濃度爲至少95%低於第一種蛋白質溶液，且較佳爲至少99%低於第一種蛋白質溶液。例如，於一項具體實施例中，使蛋白質溶於WFI中，係爲一種產生理論最後賦形劑濃

度之方法，其係藉由恒定體積滲濾，以五份滲濾體積達成，其係等於或約等於  $C_i e^{-5} = 0.00674$ ，意即大約99.3%最高賦形劑降低。於一項具體實施例中，熟諳此藝者可在市售DF/UF之最後步驟期間，以恒定體積滲濾，進行6次體積交換，意即  $C_i$  為  $C_i e^{-6} = 0.0025$ 。此係提供大約99.75%最高理論賦形劑降低。於另一項具體實施例中，熟諳此藝者可利用8次滲濾體積交換，以獲得理論~99.9%最高賦形劑降低。

"不含賦形劑"或"無賦形劑"術語係表示調配物基本上不含賦形劑。於一項具體實施例中，不含賦形劑係表示不含緩衝劑、不含鹽、不含糖、不含胺基酸、不含界面活性劑及/或不含多元醇。於一項具體實施例中，"基本上不含賦形劑"一詞係表示溶液或調配物為至少99%不含賦形劑。

但是，應注意的是，在某些具體實施例中，調配物可包含某一特定非離子性賦形劑，例如蔗糖或甘露醇，而該調配物在其他情況下仍為不含賦形劑。例如，調配物可包含水、蛋白質及甘露醇，其中調配物在其他情況下係不含賦形劑。在另一項實例中，調配物可包含水、蛋白質及聚花楸酸酯80，其中調配物在其他情況下係不含賦形劑。於又另一項實例中，調配物可包含水、蛋白質、花楸醇及聚花楸酸酯80，其中調配物在其他情況下係不含賦形劑。

當根據本文中所述之方法將水用於滲濾第一種蛋白質溶液時，離子性賦形劑將被洗除，且因此經滲濾含水調配物之導電率係低於第一種蛋白質溶液。若水溶液會傳導電力，則其必須含有離子，正如以離子性賦形劑所發現者。因此，低導電率度量值係表示本發明之含水調配物具有顯著地降低之賦形劑，包括離子性賦形劑。

溶液之導電率係根據此項技藝中已知之方法度量。導電率儀錶與元件可用以測定含水調配物之導電率，且應在使用之前對標準溶液進行校準。可用於此項技藝中之導電率儀錶之實例包括MYRON L數值計

(Cole Parmer<sup>®</sup>)、電導計(Metrohm AG)及系列3105/3115整合導電率分析器(Kemotron)。於一項具體實施例中，含水調配物具有導電率低於3 mS/公分。於另一項具體實施例中，含水調配物具有導電率低於2 mS/公分。於又另一項具體實施例中，含水調配物具有導電率低於1 mS/公分。於本發明之一方面，含水調配物具有導電率低於0.5 mS/公分。上文所列舉數目之中間範圍，例如1至3 mS/公分，亦意欲被本發明所涵蓋。例如，使用任何上文所列舉數值之組合作為上及/或下限之數值範圍係欲被包含在內。此外，落在所列舉數目內之數值亦被包含在本發明中，例如0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0等等。

本發明之重要方面為經滲濾之蛋白質溶液(按照第一種蛋白質溶液之滲濾方法所獲得之溶液)可被濃縮。藉由按照此方法，已發現高濃度之蛋白質在水中係為安定的。在滲濾後之濃縮會造成含有水與增加之蛋白質濃度之含水調配物，相對於第一種蛋白質溶液。因此，本發明亦包括使用水作為滲濾媒質以滲濾蛋白質溶液，及接著濃縮所形成之水溶液。經滲濾蛋白質溶液之濃縮可經過此項技藝中已知之方式達成，包括離心分離。例如，在滲濾之後，使水為基礎之經滲濾蛋白質溶液接受離心分離方法，其係經由超過濾用以使蛋白質濃縮成高濃度調配物，同時保持水為基礎之溶液。經由離心分離，以超過濾薄膜及/或裝置使溶液濃縮之方式係為此項技藝中已知，例如以Vivaspin離心濃縮器(Sartorius公司, Edgewood, NY)。

本發明之方法係提供一種在極高含量下，於水中濃縮蛋白質之方式，而無需其他安定劑。蛋白質在使用本發明方法所獲得之含水調配物中之濃度可為根據所要濃度之任何量。例如，蛋白質在根據本文方法製成之水溶液中之濃度為至少約10微克/毫升；至少約1毫克/毫升；至少約10毫克/毫升；至少約20毫克/毫升；至少約50毫克/毫升；至少

約75毫克/毫升；至少約100毫克/毫升；至少約125毫克/毫升；至少約150毫克/毫升；至少約175毫克/毫升；至少約200毫克/毫升；至少約220毫克/毫升；至少約250毫克/毫升；至少約300毫克/毫升；或大於約300毫克/毫升。上文所列舉濃度之中間範圍，例如至少約113毫克/毫升，至少約214毫克/毫升，及至少約300毫克/毫升，亦意欲被本發明所涵蓋。此外，使用任何上文所列舉數值(或在上述範圍間之數值)之組合作為上及/或下限之數值範圍係欲被包含在內，例如100至125毫克/毫升，113至125毫克/毫升，及126至200毫克/毫升或更多。

本發明之方法係提供所形成調配物具有低百分比之蛋白質聚集體之優點，而不管高濃度之含水蛋白質調配物。於一項具體實施例中，包含水與高濃度蛋白質例如抗體之含水調配物係含有低於約5%蛋白質聚集體，即使於界面活性劑或其他類型賦形劑不存在下亦然。於一項具體實施例中，調配物包含不超過約7.3%聚集蛋白質；調配物包含不超過約5%聚集蛋白質；調配物包含不超過約4%聚集蛋白質；調配物包含不超過約3%聚集蛋白質；調配物包含不超過約2%聚集蛋白質；或調配物包含不超過約1%聚集蛋白質。於一項具體實施例中，調配物包含至少約92%，至少約93%，至少約94%，至少約95%，至少約96%，至少約97%，至少約98%，或至少約99%單體蛋白質。上文所列舉濃度之中間範圍，例如至少約98.6%，不超過約4.2%，亦意欲成為本發明之一部份。此外，使用任何上文所列舉數值之組合作為上及/或下限之數值範圍係欲被包含在內。

許多蛋白質為基礎之醫藥產物需要在高濃度下調配。例如，抗體為基礎之產物在其藥物產物(DP)調配物中係逐漸地傾向於超過100毫克/毫升，以達成適當功效，且符合最高~1毫升注射體積之典型病患可用性要求條件。因此，下游處理步驟，譬如滲濾至最後調配物緩衝液中或超過濾以增加蛋白質濃度，亦在較高濃度下進行。

古典熱力學係預測分子間交互作用可影響小溶質橫越滲析膜之分配作用，尤其是在較高蛋白質濃度下，且可採用描述分子間交互作用之非理想滲析平衡與作用之模型(Tanford *物理化學或巨分子*. New York, John Wiley & Sons公司, 第182頁, 1961; Tester與Modell *熱力學及其應用*, 第3版, Upper Saddle River, NJ, Prentice-Hall, 1997)。於此方法發展環境中，在詳細熱力學數據之可取用性不存在下，其係為應用此等類型之模型所必須，分子間交互作用在商用DF/UF操作之設計期間極少被納入考量。因此，DP賦形劑濃度可顯著地不同於所標識之濃度。在市售與發展產物上之此差異之數項實例係經發表，例如氯化物係至高30%低於IL-1受體拮抗劑中所標識者，組胺酸係40%低於PEG-sTNF受體中所標識者，及醋酸鹽係至高200%高於融合共軛蛋白質中所標識者(Stoner等人, *J. Pharm. Sci.*, 93, 2332-2342 (2004))。實際DP為何可與蛋白質被滲濾至其中之緩衝劑組成不同，有數個原因，包括Donnan作用(Tombs與Peacocke (1974) Oxford; Clarendon出版社)、非專一性交互作用(Arakawa與Timasheff, *Arch. Biochem. Biophys.*, 224, 169-77 (1983); Timasheff, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22, 67-97 (1993))及體積排阻作用。體積排阻包括大部份蛋白質部份比容係在0.7與0.8毫升/克之間。<sup>5</sup>因此，對於在100毫克/毫升下之球狀蛋白質，蛋白質分子係佔據總溶液體積之約7.5%。假定無顯著分子間交互作用，這會轉化成在薄膜留存物側上之溶質莫耳濃度，其係為在薄膜滲透液側上之莫耳濃度之92.5%。此係解釋為何基本上所有蛋白質溶液組成會在超過濾處理期間必然改變。例如，在40毫克/毫升下，蛋白質分子係佔據總溶液體積之約3%，且增加濃度至150毫克/毫升之超過濾步驟將必然引致莫耳賦形劑濃度改變達超過8% (因在150毫克/毫升下之蛋白質係構成總溶液體積之大於11%)。上文所列舉百分比之中間範圍亦意欲成為本發明之一部份。此外，使用任何上文所列舉數值之組合作為

上及/或下限之數值範圍係欲被包含在內。

根據本發明之方法與組合物，在DF/UF操作期間之緩衝劑組成改變可利用純水作為滲濾媒質而避開。藉由濃縮蛋白質~20%大於最後整體DS中所要之濃度，可接著例如經由高度濃縮之賦形劑儲備溶液添加賦形劑。然後，賦形劑濃度與溶液pH可被保證與所標識者相同。

本發明之含水調配物係提供一項作為起始物質之優點，因其基本上未含有賦形劑。在水中滲濾之後被添加至調配物中之任何賦形劑可經正確地計算，意即賦形劑之先前存在濃度不會干擾此計算。藥學上可接受賦形劑之實例係被描述於Remington氏醫藥科學第16版，Osol, A.編著(1980)中，併入本文供參考。因此，本發明之另一方面包括使用經過本文中所述方法獲得之含水調配物，以製備調配物，特別是具有已知賦形劑濃度之醫藥調配物，包括非離子性賦形劑或離子性賦形劑。本發明之一方面包括另一個步驟，其中賦形劑係被添加至包含水與蛋白質之含水調配物中。因此，本發明之方法係提供一種含水調配物，其係基本上不含賦形劑，且可作為起始物質使用，以製備包含水、蛋白質及特定賦形劑濃度之調配物。

於一項具體實施例中，本發明之方法可用以將非離子性賦形劑，例如糖類，或非離子性界面活性劑，譬如聚花楸酸酯與聚氧體(poloxamer)，添加至調配物中，而不會改變其特徵，例如蛋白質濃度、蛋白質之流體動力學直徑、導電率等。

使用上述方法獲得之含水調配物之其他特徵與優點係描述於下文段落III中。關於進行本發明方法之舉例擬案亦描述於下文實例中。

### III. 本發明之調配物

本發明係提供包含蛋白質與水之含水調配物，其具有許多勝過此項技藝中之習用調配物之優點，包括蛋白質在水中之安定性，而不需要其他賦形劑，增加之蛋白質濃度，而無需其他賦形劑以保持蛋白質

之溶解度，及低滲透度。本發明之調配物亦具有有利之儲存性質，因在調配物中之蛋白質會在儲存期間保持安定，例如在7°C 或冷凍/解凍條件下，以液體形式儲存超過3個月，即使在高蛋白質濃度與重複之冷凍/解凍處理步驟下亦然。於一項具體實施例中，本發明之調配物包含高濃度之蛋白質，以致含水調配物不會顯示顯著乳白色、聚集或沉澱作用。

本發明之含水調配物並不倚賴標準賦形劑，例如滲透性改變劑、安定劑、界面活性劑、抗氧化劑、低溫保護劑、膨鬆劑、凍乾保護劑、鹼性成份及酸性成份。在本發明之其他具體實施例中，調配物含有水、一或多種蛋白質，而無離子性賦形劑(例如鹽、自由態胺基酸類)。

在某些具體實施例中，本發明之含水調配物包含蛋白質濃度為至少50毫克/毫升，與水，其中調配物具有滲透度為不超過30毫滲透度/公斤。含水調配物之滲透度之下限亦被本發明所涵蓋。於一項具體實施例中，含水調配物之滲透度為不超過15毫滲透度/公斤。本發明之含水調配物可具有滲透度低於30毫滲透度/公斤且亦具有高蛋白質濃度，例如蛋白質之濃度為至少100毫克/毫升，及可為多達200毫克/毫升或較大。上文所列舉濃度與滲透度單位之中間範圍亦意欲成為本發明之一部份。此外，使用任何上文所列舉數值之組合作為上及/或下限之數值範圍係欲被包含在內。

本發明含水調配物之濃度並未被蛋白質大小所限制，且調配物可包含任何大小範圍之蛋白質。被包含在本發明範圍內者為包含至少50毫克/毫升及多達200毫克/毫升或更多之蛋白質之含水調配物，其在大小上可涵蓋範圍從5 kDa至150 kDa或更大。在一項具體實施例中，於本發明調配物中之蛋白質在大小上為至少約15 kD，在大小上為至少約20 kD；在大小上為至少約47 kD；在大小上為至少約60 kD；在大小上為至少約80 kD；在大小上為至少約100 kD；在大小上為至少約120



kD；在大小上為至少約140 kD；在大小上為至少約160 kD；或在大小上大於約160 kD。上文所列舉大小之中間範圍亦意欲成為本發明之一部份。此外，使用任何上文所列舉數值之組合作為上及/或下限之數值範圍係欲被包含在內。

本發明之含水調配物可藉由溶液中蛋白質之流體動力學直徑( $D_h$ )作特徵鑒定。在溶液中蛋白質之流體動力學直徑可使用動態光散射(DLS)度量，其係為測定蛋白質 $D_h$ 之已建立分析方法。關於單株抗體例如IgG之典型值為約10毫微米。低-離子性調配物，例如本文中所述者，可經特徵鑒定，因蛋白質之 $D_h$ 係特別地低於包含離子性賦形劑之蛋白質調配物。已發現在使用DF/UF方法，使用純水作為交換媒質所製成之含水調配物中之抗體 $D_h$ 值，係特別地低於在習用調配物中之抗體 $D_h$ ，與蛋白質濃度無關。於一項具體實施例中，在本發明含水調配物中之抗體係具有 $D_h$ 小於4毫微米或小於3毫微米。

於一項具體實施例中，在含水調配物中之蛋白質之 $D_h$ ，相對於在緩衝溶液中之相同蛋白質之 $D_h$ 係為較小，無關於蛋白質濃度。因此，於某些具體實施例中，在根據本文中所述方法製成之含水調配物中之蛋白質，將具有 $D_h$ 為至少25%小於緩衝溶液中相同特定濃度下之蛋白質之 $D_h$ 。緩衝溶液之實例包括但不限於磷酸鹽緩衝之鹽水(PBS)。於某些具體實施例中，在本發明含水調配物中之蛋白質係具有 $D_h$ 為至少50%小於PBS中特定濃度下之蛋白質之 $D_h$ ；至少60%小於PBS中特定濃度下之蛋白質之 $D_h$ ；至少70%小於PBS中特定濃度下之蛋白質之 $D_h$ ；或超過70%小於PBS中特定濃度下之蛋白質之 $D_h$ 。上文所列舉百分比之中間範圍亦意欲成為本發明之一部份，例如55%，56%，57%，64%，68%等等。此外，使用任何上文所列舉數值之組合作為上及/或下限之數值範圍係欲被包含在內，例如50%至80%。

蛋白質聚集為蛋白質溶液中之常見問題，且經常由於增加之蛋白

質濃度所造成。本發明係提供一種達成高濃度、低蛋白質聚集調配物之方式。本發明之調配物並不倚賴緩衝系統與賦形劑，包括界面活性劑，而保持調配物中之蛋白質可溶性及免於聚集。本發明之調配物對治療目的可為有利，因其在蛋白質濃度上很高，且為水系，不倚賴其他藥劑以達成蛋白質在溶液中之高安定濃度。

大部份生物學產物(包括抗體)係易遭受到許多降解過程，其係經常源自於溶液中之非酵素反應。此等反應對於產物安定性、安全性及功效可具有長期衝擊。此等不安定性可藉由產物在低於零溫度下之儲存而被阻滯(若未被消除時)，因此以供應之彈性與有效性歷經產物壽命期觀之，對於製造者係獲致非常大之利益。雖然冷凍經常為生物製劑產物儲存之最安全且最可信賴方法，但其具有固有風險。當水結晶時，冷凍可藉由引進冰-液體界面，及藉由溶質之冷凍-濃縮(低溫濃縮(cryoconcentration))，而經過冷變性作用，在蛋白質中引致應力。

低溫濃縮為一種方法，其中平坦未經控制之移動冰正面係在冷凍期間形成，其會排除溶質分子(小分子，譬如蔗糖、鹽及典型上於蛋白質調配物中所使用之其他賦形劑，或巨分子，譬如蛋白質)，導致區帶，其中蛋白質可在相對較高濃度下，於其他溶質存在下，在可潛在地導致局部pH或離子濃度極端之濃度下被發現。對於大部份蛋白質，此等條件可導致變性作用，而在一些情況中，為蛋白質與溶質沉澱作用。由於緩衝鹽及其他溶質亦在此種條件下被濃縮，故此等成份可達到足夠高而在經冷凍團塊內之區帶中導致pH及/或氧化還原作用變化之濃度。由於在冷凍期間，於溶液中之緩衝鹽結晶化作用(例如磷酸鹽)結果所發現之pH轉變，可跨越數個pH單位，其可衝擊蛋白質安定性。

經濃縮溶質亦可導致凝固點之降低至其中溶質可完全不被冷凍之程度，且蛋白質將在此等不利條件下存在於溶液內。可經常應用快速冷卻，以降低蛋白質曝露至此等不期望條件之時期。但是，快速冷

凍可引致大面積冰水界面，然而緩慢冷卻會引致較小界面區域。例如，在一個冷凍/解凍步驟期間，六種模式蛋白質之快速冷卻，係顯示發現變性作用大於10次緩慢冷卻循環，証實疏水性冰表面所引致變性作用之大去安定化作用可能性。

本發明之含水調配物係具有有利之安定性與儲存性質。含水調配物之安定性並不依賴儲存之形式，且包括但不限於經冷凍、凍乾或噴霧乾燥之調配物。安定性可在所選定之溫度下度量，經歷所選定之時期。於本發明之一方面，在含水調配物中之蛋白質係為安定的，呈液體形式，歷經至少3個月；至少4個月；至少5個月；至少6個月；至少12個月。上文所列舉時期之中間範圍亦意欲成為本發明之一部份，例如9個月等等。此外，使用任何上文所列舉數值之組合作為上及/或下限之數值範圍係欲被包含在內。調配物較佳係在室溫(約30°C)下，或在40°C下為安定的，歷經至少1個月，及/或在約2-8°C下為安定的，歷經至少1年，或更佳係在約2-8°C下為安定的，歷經至少2年。再者，調配物較佳係在調配物之冷凍(至例如-80°C)與解凍後為安定的，於後文稱為"冷凍/解凍循環"。

蛋白質之安定性亦可被定義為仍然保持生物活性之能力。若於醫藥調配物中之蛋白質在投予病患時為生物活性，則蛋白質於醫藥調配物中係"保有其生物學活性"。例如，若於醫藥調配物中之抗體之生物學活性係在製備醫藥調配物之時間下所顯示生物學活性之約30%，約20%，或約10%內(在檢測之誤差內)(例如當在抗原結合檢測中測定時)，則抗體之生物學活性係被保留。

在含水調配物中之蛋白質安定性，亦可被定義為在調配物中之蛋白質之單體、聚集體或片段或其組合之百分比。若蛋白質於目視檢查顏色及/或透明性時，或當藉由UV光散射或藉由尺寸排阻層析度量時，實質上未顯示聚集、沉澱作用及/或變性作用之跡象，則其在調配

物中係"保有其物理安定性"。於本發明之一方面，安定含水調配物為一種調配物，具有小於約10%，且較佳為小於約5%之蛋白質以聚集體存在於調配物中。

本發明含水調配物之另一特徵係為於一些情況中，在與第一種蛋白質溶液比較下，使用水滲濾蛋白質會造成具有經改良黏度特徵之含水調配物(意即在與第一種蛋白質溶液比較下，經滲濾蛋白質溶液之黏度係被降低)。熟諳此藝者將明瞭的是，度量黏度之多種方法可在本發明之不同具體實施例中用於製備調配物。例如，動黏度數據(cSt)可使用毛細管產生。在其他具體實施例中，動態黏度數據係無論是單獨或與其他黏度數據一起陳述。動態黏度數據可經由將動黏度數據乘以密度而產生。

於一項具體實施例中，本發明亦提供一種調整某一特徵之方法，譬如滲透度及/或黏度，按需要而定，在高蛋白質濃度-水溶液中，其方式是添加非離子性賦形劑，譬如甘露醇，而不會改變其他所要之特徵，譬如非乳白色。因此，包含為水系且具有高濃度蛋白質之調配物，其中無論是在蛋白質轉移至水期間或其後，或在滲濾過程期間，添加會改良例如調配物之滲透度或黏度特徵之賦形劑，係在本發明之範圍內。因此，亦在本發明之範圍內者為此種非離子性賦形劑可在蛋白質轉移至最後低離子性調配物中之過程期間添加。可被添加至本發明之含水調配物中，以變更所要調配物特徵之不可離子化賦形劑之實例，包括但不限於甘露醇、花楸醇、非離子性界面活性劑(例如聚花楸酸酯20、聚花楸酸酯40、聚花楸酸酯60或聚花楸酸酯80)、蔗糖、海藻糖、植物蜜糖及麥芽糖。

本文之調配物亦可含有一種以上之蛋白質。關於醫藥調配物，可添加另一種不同蛋白質，按被治療之特定適應徵所需要而定，較佳為具有不會不利地影響其他蛋白質之互補活性者。例如，一般可能期望

在單一調配物中提供兩種或多種會結合至TNF或IL-12之抗體。再者，抗-TNF或抗-IL 12抗體可在一種調配物中合併。此種蛋白質係適當地以對於所意欲目的有效之量存在於組合中。

可被加入含水調配物中之蛋白質之實例包括抗體或其抗原結合片段。可使用於本發明中之不同類型抗體或其抗原結合片段之實例，包括但不限於嵌合抗體、人類抗體、人化抗體及功能部位抗體(dAd)。於一項具體實施例中，在本發明方法與組合物中所使用之抗體為抗-TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部份，或抗-IL-12抗體或其抗原結合部份。可使用於本發明中之抗體或其抗原結合片段之其他實例，包括但不限於1D4.7 (抗-IL-12 /抗-IL-23; Abbott實驗室)、2.5(E)mg1 (抗-IL-18; Abbott實驗室)、13C5.5 (抗-IL-13; Abbott實驗室)、J695 (抗-IL-12; Abbott實驗室)、Afelimomab (Fab 2抗-TNF; Abbott實驗室)、Humira (阿達利母馬(adalimumab) (D2E7); Abbott實驗室)、肯巴斯(Campath) (阿連圖馬伯(Alemtuzumab))、CEA-掃描Arcitumomab (fab片段)、鄂比圖斯(Erbitux) (些圖西馬伯(Cetuximab))、賀西伯亭(Herceptin) (搓史圖諸馬伯(Trastuzumab))、Myoscint (Imciromab Pentetate)、ProstaScint (卡普洛馬伯片迪肽(Capromab Pendetide))、瑞米卡得(Remicade) (因弗利西馬(Infliximab))、ReoPro (亞伯西瑪伯(Abciximab))、利圖散(Rituxan) (利圖西馬伯(Rituximab))、Simulect (巴西利馬伯(Basiliximab))、Synagis (柏利維充諸馬(Palivizumab))、Verluma (諾非圖莫伯(Nofetumomab))、Xolair (歐馬利祖馬(Omalizumab))、Zenapax (達可利諸伯(Daclizumab))、吉維林(Zevalin) (衣利圖莫伯提克西坦(Ibritumomab Tiuxetan))、Orthoclone OKT3 (目洛蒙那伯(Muromonab)-CD3)、Panorex (艾卓可羅伯(Edrecolomab))與米若塔革(Mylotarg) (堅圖住馬伯歐坐加霉素(Gemtuzumab ozogamicin))、古利馬伯(golimimumab) (Centocor)、Cimzia (Certolizumab pegol)、Soliris (也苦利馬伯(Eculizumab))、CNTO

1275 (ustekinumab)、Vectibix (片尼圖努馬伯(panitumumab))、貝克薩(Bexxar) (托西圖莫伯(tositumomab)與 $I^{131}$ 托西圖莫伯(tositumomab))及阿威斯汀(Avastin) (貝發西馬伯(bevacizumab))。

在一種替代方式中，蛋白質為治療蛋白質，包括但不限於普莫吉美(Pulmozyme) (鏈道酶alfa)、瑞革蘭尼(Regranex) (貝卡列明(Becaplermin))、亞克提維斯(Activase) (阿帖普酶(Alteplase))、阿度拉酶(Aldurazyme) (Laronidase)、阿美威維(Amevive) (阿列發謝特(Alefacept))、阿拉內普(Aranesp) (達貝艾波亭(Darbepoetin) alfa)、貝卡列明(Becaplermin)濃縮物、貝他色隆(Betaseron) (干擾素 $\beta$ -1b)、玻拓克斯(BOTOX) (肉毒毒素A型)、Elitek (來斯布利酶(Rasburicase))、約爾史巴(elspar)(天冬醯胺酶)、Epogen (艾波亭(Epoetin) alfa)、恩布瑞爾(Enbrel) (恩塔臬西伯(Etanercept))、Fabrazyme (Agalsidase $\beta$ )、干擾原(Infergen) (干擾素alfacon-1)、因特隆(Intron) A (干擾素 $\alpha$ -2a)、Kineret (安那金拉(Anakinra))、MYOBLOC (肉毒毒素B型)、紐拉斯塔(Neulasta) (佩非葛拉亭(Pegfilgrastim))、Neumega (歐普瑞維金(Oprelvekin))、紐波真(Neupogen) (非葛拉亭(Filgrastim))、歐塔克(Ontak) (丹尼白血球素待弗提托斯(Denileukin diftitox))、PEGASYS (PEG干擾素 $\alpha$ -2a)、前白血球素(阿迪斯白血球素(Aldesleukin))、普莫吉美(Pulmozyme) (鏈道酶alfa)、Rebif (干擾素 $\beta$ -1a)、瑞革蘭尼(Regranex) (貝卡列明(Becaplermin))、瑞塔威斯(Retavase) (瑞替普酶(Retepase))、Roferon-A (干擾素 $\alpha$ -2)、TNKase (腱激酶)與Xigris (Drotrecogin alfa)、Arcalyst (Riloncept)、NPlate (Romiplostim)、Mircera (甲氧基聚乙二醇-艾波亭(epoetin) $\beta$ )、Cinryze (C1酯酶抑制劑)、Elaprase (idursulfase)、Myozyme (阿葡萄糖苷酶(alglucosidase) alfa)、歐倫西亞(Orencia) (阿巴塔謝特(abatacept))、Naglazyme (galsulfase)、克比凡斯(Kepivance) (巴利弗明(palifermin))及Actimmune (干擾素 $\gamma$ -1b)。

可被加入本文中所述方法與組合物中之蛋白質之其他實例，包括哺乳動物蛋白質，包括其重組蛋白質，譬如生長激素，包括人類生長激素與牛生長激素；生長激素釋放因子；甲狀旁腺激素；促甲狀腺激素；脂蛋白； $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶；胰島素A-鏈；胰島素B-鏈；胰島素原；促卵泡成熟激素；降血鈣素；促黃體生成激素；胰高血糖素；塊凝因子，譬如因子VIIIc、因子IX、組織因子及von Willebrands因子；抗凝血因子，譬如蛋白質C；心房利鈉尿因子；肺部界面活性劑；血纖維蛋白溶酶原活化劑，譬如尿激酶或組織型血纖維蛋白溶酶原活化劑(t-PA)；彭巴咩(bombazine)；凝血酶；腫瘤壞死因子- $\alpha$ 與- $\beta$ 腦啡肽酶；RANTES (於正常T-細胞表現與分泌之活化作用上調節)；人類巨噬細胞炎性蛋白質(MIP-1- $\alpha$ )；血清白蛋白，譬如人類血清白蛋白；目勒氏抑制物質；弛緩素A-鏈；弛緩素B-鏈；弛緩素原；老鼠促性腺激素有關聯肽；DNase；抑制素；活性素；血管內皮生長因子(VEGF)；激素或生長因子之受體；整合素；蛋白質A或D；風濕性因子；神經營養因子，譬如骨頭衍生之神經營養因子(BDNF)、神經營養素-3, -4, -5或-6 (NT-3, NT4, NT-5或NT-6)，或神經生長因子，譬如NGF- $\beta$ ；血小板所衍生之生長因子(PDGF)；成纖維細胞生長因子，譬如aFGF與bFGF；表皮生長因子(EGF)；轉變生長因子(TGF)，譬如TGF $\alpha$ 與TGF- $\beta$ ，包括TGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  2、TGF- $\beta$  3、TGF- $\beta$  4或TGF- $\beta$  5；似胰島素生長因子-I與-II (IGF-I與IGF-II)；des(1-3)-IGF-I (腦部IGF-I)；似胰島素生長因子結合蛋白質；CD蛋白質，譬如CD3、CD4、CD8、CD19及CD20；促紅血球生成素(EPO)；血栓造血素(TPO)；骨誘發因子；免疫毒素；骨頭形態發生蛋白質(BMP)；干擾素，譬如干擾素- $\alpha$ 、- $\beta$ 及- $\gamma$ ；菌落刺激因子(CSF)，例如M-CSF、GM-CSF及G-CSF；間白血球活素(IL)，例如IL-1至IL-10；超氧化歧化酶；T-細胞受體；表面膜蛋白質；衰變加速因子(DAF)；病毒抗原，例如AIDS包膜之一部份；輸送蛋白質；導航

受體；選址素；調節蛋白質；免疫黏連素；抗體；及任何上文列示多肽之生物活性片段或變種。

#### IV. 本發明之用途

本發明之調配物可於治療上使用，意即活體內，或作為試劑用於活體外或原位目的。

##### *治療用途*

本發明之方法亦可用以製造具有對於治療用途有利之特徵之水系調配物。此含水調配物可作為醫藥調配物，用以治療病患中之病症。

本發明之調配物可用以治療該治療蛋白質係適合對其治療之任何病症。"病症"為將得利於以蛋白質治療之任何症狀。這包括慢性與急性病症或疾病，包括使哺乳動物易罹患討論中病症之病理學症狀。在抗-TNF $\alpha$ 抗體之情況中，可投予治療上有效量之抗體，以治療自身免疫疾病，譬如風濕性關節炎，腸病症，譬如克隆氏病，脊椎關節病，譬如關節黏連脊椎炎，或皮膚病症，譬如牛皮癬。在抗-IL-12抗體之情況中，可投予治療上有效量之抗體，以治療神經病症，譬如多發性硬化，或皮膚病症，譬如牛皮癬。其中本發明調配物可用以治療之病症之其他實例包括癌症，包括乳癌、白血病、淋巴瘤及結腸癌。

"病患"一詞係意欲包括有生命生物體，例如原核生物與真核生物。病患之實例包括哺乳動物，例如人類、狗、乳牛、馬、豬、綿羊、山羊、貓、老鼠、兔子、大白鼠及轉基因非人類動物。在本發明之特殊具體實施例中，病患為人類。

"治療"一詞係指治療處理與預防或阻止手段兩者。需要治療者包括已患有病症者，以及其中病症係欲被預防者。

含水調配物可根據已知投藥方法投予需要治療之哺乳動物，包括人類。投藥方法之實例包括靜脈內投藥，譬如大丸劑，或藉由連續灌注歷經一段時間，肌內、腹膜腔內、腦脊髓內、皮下、關節內、滑膜



內、鞘內、皮內、經皮、口服、局部或吸入投藥。

於一項具體實施例中，含水調配物係藉皮下投藥投予哺乳動物。對於此種目的，調配物可使用注射器，以及其他裝置，包括注射裝置(例如Inject-ease與Genject裝置)；注射筆(譬如GenPen)；無針裝置(例如MediJector與Biojectorr 2000)；及皮下貼藥傳輸系統注射。於一項具體實施例中，裝置，例如注射器、自動注射器筆，係含有具在大小上範圍為25G之規格或較小直徑之針頭。於一項具體實施例中，針頭規格於大小上範圍為25G至33G(包括其中間範圍，例如25sG, 26, 26sG, 27G, 28G, 29G, 30G, 31G, 32G及33G)。於一項較佳具體實施例中，最小針頭直徑與適當長度係根據調配物之黏度特徵及用以傳輸本發明調配物之裝置作選擇。

本發明方法/組合物之一項優點為其係在溶液中提供大濃度之蛋白質，其對於使用無針裝置投予蛋白質至病患可為理想的。此種裝置係允許蛋白質分散於整個病患組織中，而無需藉由針頭注射。無針裝置之實例包括但不限於Biojectorr 2000 (Bioject醫學技術)、Cool.Click (Bioject醫學技術)、Iject (Bioject醫學技術)、Vitajet 3 (Bioject醫學技術)、Mhi500 (醫學家庭PLC)、Injex 30 (INJEX - Equidyne系統)、Injex 50 (INJEX - Equidyne系統)、Injex 100 (INJEX - Equidyne系統)、噴射注射器(INJEX - Equidyne系統)、Jetinjector (Becton-Dickinson)、J-Tip (國家醫療裝置公司)、Medi-Jector VISION (Antares Pharma)、MED-JET (MIT Canada公司)、DermoJet (Akra Dermojet)、Sonoprep (Sontra醫療公司)、PenJet (PenJet公司)、MicroPor (Altea Therapeutics)、Zeneo (Crossject醫學技術)、Mini-Ject (Valeritas公司)、ImplaJect (Caretex醫療公司)、Intraject (Aradigm)及Serojet (Bioject醫學技術)。

亦被包含在本發明中者為收容含水調配物之傳輸裝置。此種裝置

之實例包括但不限於注射器、筆(譬如自動注射筆)、植入物、吸入裝置、無針裝置及貼藥。自動注射筆之實例係描述於2007年6月29日提出申請之美國專利申請案號11/824516中。

本發明亦包括藉吸入傳輸本發明調配物之方法，與含有該調配物供此種傳輸之吸入裝置。於一項具體實施例中，含水調配物係經由吸入，使用霧化罐或液體吸入器投予病患。一般而言，霧化罐係使用壓縮空氣以傳輸醫藥，作成供吸入用之濕氣溶膠或霧氣，因此需要藥物可溶於水中。霧化罐之類型包括噴射霧化罐(空氣噴射霧化罐與液體噴射霧化罐)與超音波霧化罐。

霧化罐之實例包括 Akita™(Activaero GmbH) (參閱 US2001037806、EP1258264)。Akita™為桌上霧化罐吸入系統(重量：7.5公斤，BxWxH：260 x 170 x 270)，以Pari之LC Star為基礎，其係提供涵蓋病患呼吸型式之完全控制。此裝置可在小於10分鐘內，以極高傳輸速率將多達500毫克在溶液中之藥物傳輸至肺臟與肺臟末梢。65%之霧化粒子係低於5微米，且質量中間值氣體動力直徑(MMAD)在1.8巴下為3.8微米。最小充填體積為2毫升，而最大體積為8毫升。吸氣流量(200毫升/秒)與霧化罐壓力(0.3-1.8巴)係藉由智慧型卡片設定。此裝置可以肺功能試驗為基礎，個別地對每一病患作調整。

可與本發明組合物一起使用之霧化罐之另一項實例包括 Aeroneb®Go/Pro/Lab霧化罐(AeroGen)。Aeroneb®霧化罐係以OnQ™技術為基礎，意即包含獨特圓頂形孔口板之電子微型泵(3/8英寸直徑與薄晶圓)，其含有超過1,000個被振動元件所圍繞之精密成形推拔狀孔洞。Aeroneb®Go為供家庭使用之可攜帶單元，然而Aeroneb®Pro為供使用於醫院與移動性診所之可再使用與可熱壓處理裝置，及Aeroneb®Lab為供使用於臨床前氣溶膠研究與吸入研究之裝置。此等系統之特徵包括氣溶膠液滴大小之最佳化與定製性；以精密地控制之液滴大小之低-

速度氣溶膠傳輸，幫助呼吸道系統內之標的藥物傳輸；服藥之彈性；含有固定體積藥物在溶液或懸浮液中之定製單一劑量安瓿瓶，或供使用於一般目的霧化罐之市購可得溶液之調整；連續呼吸促動或可程式化；及可配合寬廣範圍病患之需求作調整，包括兒童與年長者；單一或多病患使用。

Aerocurrent™(AerovertRx公司)亦可與本發明之組合物一起使用(參閱WO2006006963)。此霧化罐為可攜帶振動網片霧化罐，其特徵為用後即棄、預充填或使用者充填之藥筒。

Staccato™(Alexza Pharma)亦可與本發明之組合物一起使用(參閱WO03095012)。關於Staccato™技術之關鍵為藥物之汽化，而不會熱降解，其係藉由快速地加熱藥物之薄膜而達成。在不到半秒內，藥物係被加熱至足以使固體藥物薄膜轉化成蒸氣之溫度。吸入器包括三種核心組件：加熱受質、經塗覆於受質上之藥物薄膜及病患經過其間吸入之導氣管。吸入器係經呼吸引動，具有所傳輸之最大劑量為20-25毫克，及在1-2微米範圍內之MMAD。

AERx®(Aradigm)亦可與本發明之組合物一起使用(參閱WO9848873、US5469750、US5509404、US5522385、US5694919、US5735263、US5855564)。AERx®為手握式電池組操作之裝置，其係利用活塞機制，以將調配物自AERx®片條逐出。此裝置係監測病患吸入空氣流量，及只在達成最適宜呼吸型式時才發射。此裝置可傳輸約60%之劑量作為排放劑量，及50-70%之排放劑量進入肺臟深層中，具有<25%病患間變異性。

亦可與本發明組合物一起使用之霧化罐裝置之另一項實例包括Respimat®(Boehringer)。Respimat®為多劑量儲器系統，其係藉由扭轉裝置底座而被引動，其係藉由彈簧壓縮，且自藥筒轉移經計量體積之調配物至服藥室。當裝置被引動時，彈簧係被釋放，其會迫使微活塞

進入服藥室中，經過單一板塊推送溶液；單一板塊包括具有兩個微細出口噴嘴通道之濾器結構。藉由Respimat<sup>®</sup>產生之MMAD為2微米，且此裝置係適用於傳統上被採用以治療呼吸道病症之低劑量藥物。

本發明之組合物亦可使用 Collegium Nebulizer<sup>™</sup>(Collegium Pharma)傳輸，其係為包括經沉積在薄膜上之藥物之霧化罐系統。在以重配溶劑重配後，劑型係經過口腔或鼻吸入，使用Collegium霧化罐投予病患。

亦可與本發明組合物一起使用之霧化罐裝置之另一項實例包括 Inspiration<sup>®</sup>626 (Respironics)。626為一種壓縮機為基礎之霧化罐，供家庭護理用。626會傳輸在0.5至5微米間之粒子大小。

可與本發明組合物一起使用之霧化罐可包括 Adaptive Aerosol Delivery<sup>®</sup>技術(Respironics)，其會傳輸精確且可再現性之吸入藥物劑量至病患，而不管此種病患之年齡、大小或呼吸型式上之變異性。AAD<sup>®</sup>系統係在手機內併入電子系統與感測器，以藉由偵測吸氣與呼氣期間之壓力變化，而監控病患之呼吸型式。感測器係測定在吸氣之第一部份期間何時脈衝藥物之氣溶膠傳輸。在整個治療中，感測器係監控前三次呼吸，且配合病患之吸氣與呼氣型式作調整。由於AAD<sup>®</sup>系統僅在病患正經過吹管嘴呼吸時傳輸藥物，故此等裝置係允許病患在治療中暫停，而不會有藥物浪費。AAD<sup>®</sup>系統霧化罐之實例包括 HaloLite<sup>®</sup>AAD<sup>®</sup>、ProDose<sup>®</sup>AAD<sup>®</sup>及I-Neb<sup>®</sup>AAD<sup>®</sup>。

HaloLite<sup>®</sup> Adaptive Aerosol Delivery (AAD)<sup>®</sup>(Respironics)為藉由可攜帶壓縮機供給動力之氣動氣溶膠化系統。AAD<sup>®</sup>技術係監控病患之呼吸型式(典型上為每十毫秒)，且依被使用之系統而定，無論是釋出氣溶膠化藥物之脈衝至吸入之特定部份或計算在吸入期間自"停滯氣溶膠雲霧"所抽取之劑量(參閱EP 0910421，併入本文供參考)。

ProDos AAD<sup>®</sup>(Respironics) 為藉由 "ProDose Disc<sup>™</sup>" 系統

(Respironics)所控制之霧化系統。ProDos AAD<sup>®</sup>為藉由可攜帶壓縮機供給動力之氣動氣溶膠系統，其中欲被傳輸之劑量係藉由被插入系統中之含微晶片圓盤所控制，其特別是會指示系統關於傳輸之劑量。ProDose Disc<sup>™</sup>為含有微晶片之塑膠圓盤，其係被插入ProDose AAD<sup>®</sup>系統中，並指示其關於傳輸何種劑量、劑量之數目，其可與各種控制數據一起傳送，包括藥物批次代碼與到期日(參閱EP1245244，併入本文供參考)。Promixin<sup>®</sup>可經由ProDose AAD<sup>®</sup>傳輸，用於處理銅綠假單胞菌肺臟感染，特別是膽囊纖維變性。Promixin<sup>®</sup>係以供霧化作用之粉末供應，其係在使用之前重配。

I-neb AAD<sup>®</sup>為手握式AAD<sup>®</sup>系統，其會傳輸精確且可再現性之藥物劑量至病患之呼吸型式中，無需另一個壓縮機("I-Neb")。I-neb AAD<sup>®</sup>為小型化AAD<sup>®</sup>吸入器，以電子網片為基礎之氣溶膠化技術(Omron)與AAD<sup>®</sup>技術之組合為基礎，以控制用藥至病患之呼吸型式中。此系統為大約可移動電話之大小，且重量小於8盎司。I-neb AAD<sup>®</sup>已被使用於傳輸Ventavis<sup>®</sup>(衣洛普斯特(iloprost)) (CoTherix / Schering AG)。

可與本發明組合物一起使用之霧化罐之另一項實例為Aria<sup>™</sup>(Chrysalis)。Aria係以毛細管氣溶膠產生系統為基礎。氣溶膠係藉由泵送藥物調配物經過小的電加熱毛細管而形成。於離開毛細管時，調配物會快速地藉由環境空氣冷卻，以產生氣溶膠，具有0.5-2.0微米範圍之MMAD。

此外，TouchSpray<sup>™</sup>霧化罐(Odem)可用以傳輸本發明之組合物。TouchSpray<sup>™</sup>霧化罐為使用穿孔薄膜之手握式裝置，該薄膜會在超音波頻率下振動，與儲器流體接觸，以產生氣溶膠雲霧。振動作用會經過薄膜中之孔洞抽取流體之噴射，使此噴射破碎成藥物雲霧。液滴之大小係被孔洞之形狀/大小，以及藥物溶液之表面化學與組成所控制。此裝置已經報告會傳輸83%經計量之劑量至肺臟深層。TouchSpray<sup>™</sup>

霧化罐之細節係描述於美國專利6659364中，併入本文供參考。

可與本發明組合物一起使用之其他霧化罐包括為可攜帶單元之霧化罐，當病患吸入時，其會使氣溶膠輸出達到最大程度，及當病患使用兩個單向閥(參閱PARI霧化罐(PARI GmbH)呼出時，會使氣溶膠輸出降至最低。折流板係允許最適宜大小之粒子離開霧化罐。其結果是在可吸入範圍內之高百分比粒子，其會導致經改良之藥物傳輸至肺臟。此種霧化罐可針對特定病患個體群設計，譬如小於三歲之病患(PARI BABY™)，及供較年長病患用之霧化罐(PARI LC PLUS®與PARI LC STAR®)。

可與本發明組合物一起使用之另一種霧化罐為e-Flow®霧化罐(PARI GmbH)，其係使用振動薄膜技術，以使藥物溶液以及懸浮液或膠態分散液(TouchSpray™；ODEM (United Kingdom))氣溶膠化。e-Flow®霧化罐係能夠處理0.5毫升至5毫升之流體體積，且可產生以最短可能時間量所傳輸之具有極高密度之活性藥物、精確地界定之液滴大小及高比例之可呼吸液滴之氣溶膠。已使用e-Flow®霧化罐所傳輸之藥物包括阿姿瑞那(aztreonam)與利多卡因。關於e-Flow®霧化罐之其他細節係描述於US 6962151中，併入本文供參考。

可與本發明組合物一起使用之其他霧化罐包括Microair®電子霧化罐(Omron)與Mystic™霧化罐(Ventaira)。Microair®霧化罐為極端地小，且係使用振動網片技術，以有效地傳輸溶液藥物。Microair裝置具有7毫升容量，且會產生約5微米之藥物粒子MMAD大小。關於Microair®霧化罐之其他細節，可參閱美國專利公報案號2004045547，併入本文供參考。Mystic™霧化罐係使用強電場，以使液體破碎成幾乎單分散荷電粒子之噴霧。Mystic™系統包括圍堵單元、劑量計量系統、氣溶膠產生噴嘴及電壓轉換器，其係一起提供多劑量或單位劑量傳輸選項。Mystic™裝置係經呼吸啟動，且已與Corus 1030™(利多卡

因HCl)、Resmycin<sup>®</sup>(多克索紅菌素鹽酸鹽)、Acuair (丙酸福路替卡松(fluticasone propionate))、NCE與ViroPharm及NCE與Pfizer一起被使用。關於Mystic<sup>™</sup>霧化罐之其他細節可參閱美國專利6397838，併入本文供參考。

關於肺傳輸本發明調配物之其他方法係提供於美國專利申請案號12/217,972中，併入本文供參考。

蛋白質之適當劑量("治療上有效量")係依例如欲被治療之症狀、症狀之嚴重性與期間、蛋白質是因預防或者治療目的被投予、先前療法、病患之臨床病歷及對蛋白質之回應、所使用蛋白質之類型及負責醫師之判斷而定。蛋白質係適當地一次投予病患或歷經一系列治療，且可在從診斷起之任何時間下投予病患。蛋白質可以單獨治療或搭配可用於治療討論中症狀之其他藥物或療法一起投予。

本發明調配物係克服經常與高濃度蛋白質有關聯之蛋白質聚集之常見問題，因此提供一種高含量治療蛋白質可藉其投予病患之新方式。本發明之高濃度調配物在服藥上係提供一項優點，其中較高劑量可使用等於或低於標準治療之調配物之體積投予病患。關於治療蛋白質之標準治療係被描述於由蛋白質製造者所提供之標籤上。例如，根據由製造者所提供之標籤，因弗利西馬(infliximab)係藉由重配經凍乾蛋白質至濃度為10毫克/毫升而投予，用於治療風濕性關節炎。本發明之調配物可包含高濃度之因弗利西馬(infliximab)，其中高濃度包括高於標準10毫克/毫升之濃度。在另一項實例中，根據由製造者所提供之標籤，Xolair (歐馬利祖馬(omalizumab))係藉由重配經凍乾蛋白質至濃度為125毫克/毫升而投予，用於治療氣喘。在此情況中，本發明之高濃度調配物包含大於標準125毫克/毫升之濃度之抗體歐馬利祖馬(omalizumab)。

因此，於一項具體實施例中，本發明之調配物包含高濃度，其係

至少約10%，至少約20%，至少約30%，至少約40%，至少約50%，至少約60%，至少約70%，至少約80%，至少約90%，至少約100%，至少約110%，至少約120%，至少約130%，至少約140%，至少約150%，至少約175%，至少約200%，至少約225%，至少約250%，至少約275%，至少約300%，至少約325%，至少約350%，至少約375%，至少約400%等等大於已知標準調配物中之治療蛋白質濃度。

於另一項具體實施例中，本發明之調配物包含高濃度，其係至少約2倍大於，至少約3倍大於，至少約4倍大於，至少約5倍大於，至少約6倍大於，至少約7倍大於，至少約8倍大於，至少約9倍大於，至少約10倍等等大於已知標準調配物中之治療蛋白質濃度。

含水調配物之特徵可經改良，以供治療用途。例如，抗體調配物之黏度可經改良，其方式是使抗體蛋白質溶液接受滲濾，使用未具有賦形劑之水作為滲濾媒質。如上文段落II中所述，賦形劑，譬如會改良黏度者，可被加回含水調配物中，以致賦形劑之最後濃度為已知，且調配物之特定特徵係經改良，以供所指定之用途。例如，熟諳此藝者將明瞭的是，所要之醫藥調配物黏度係視調配物正藉其傳輸之模式而定，例如注射、吸入、皮膚吸收等等。所要之黏度經常會平衡病患在接受調配物時之舒適性，及為具有治療作用所需要之調配物中之蛋白質劑量。例如，關於被注射調配物之一般可接受之黏度程度為黏度程度低於約100 mPas，較佳係低於75 mPas，又更較佳係低於50 mPas。因此，含水調配物之黏度可為治療用途所接受，或可能需要添加賦形劑，以改良所要之特徵。

於一項具體實施例中，本發明係提供一種含水調配物，其包含水與人類TNF $\alpha$ 抗體或其抗原結合部份，其中調配物係不含賦形劑，其中調配物係具有使得其有利於作為治療劑使用之黏度，例如當蛋白質濃度為約175毫克/毫升時，在8°C下低於40cP，及在25°C下低於25cP之低



黏度。於一項具體實施例中，抗體或其抗原結合部份在具有經改良黏度之調配物中之濃度為至少約50毫克/毫升。於一項具體實施例中，本發明之調配物係具有範圍為約1與約2 mPas間之黏度。

### 非治療用途

本發明之含水調配物亦可用於非治療用途，意即活體外目的。

本文中所述之含水調配物可在醫藥與生物技術中用於診斷或實驗方法，包括但不限於使用於基因組、蛋白質組、生物資訊、細胞培養、植物生物學及細胞生物學。例如，本文中所述之含水調配物可用以提供在標識與偵測方法中作為分子探測物所需要之蛋白質。關於本文中所述調配物之另一種用途，係為對細胞培養試劑提供補充物，包括針對製造目的之細胞生長與蛋白質生產。

本文中所述之含水調配物可被使用於具有減少關切之擬案中，關於調配物中之賦形劑如何可與實驗環境反應，例如干擾被使用於擬案中之另一種試劑。在另一項實例中，含有高濃度蛋白質之含水調配物可作為針對實驗室用途之試劑使用。蛋白質之此種高度濃縮形式會擴大實驗室實驗之目前範圍。

關於本發明調配物之另一種替代用途係為對食品產物提供添加劑。由於本發明之含水調配物係基本上包含水與蛋白質，故調配物可用以傳輸高濃度之所要蛋白質，譬如營養補充物，至食品項目。本發明之含水調配物係提供高濃度之蛋白質於水中，而無需顧慮安定性/溶解度所需要之賦形劑，其可能不適合人類消耗。例如，乳清-與大豆-衍生之蛋白質會對食品增添多變性，因為此等蛋白質具有模擬脂肪口感與質地之能力。因此，乳清-與大豆-衍生之蛋白質可被添加至食品中，以降低整體脂肪含量，而不會犧牲滿足感。因此，包含適當量之乳清-與大豆-衍生蛋白質之含水調配物可經調配，及用以補充食品產物。

## 製造物件

於本發明之另一項具體實施例中，係提供一種製造物件，其含有本發明之含水調配物，且提供其使用之說明書。製造物件包含容器。適當容器包括例如瓶子、小玻瓶(例如雙室小玻瓶)、注射器(譬如雙室注射器)、含有注射器之自動注射筆及試管。容器可製自多種材料，譬如玻璃、塑膠或聚碳酸酯。容器係容納含水調配物，且在容器上或與其結合之標籤可顯示使用指示。例如，標籤可顯示調配物可用於或欲供皮下投藥。容納此調配物之容器可為多次使用之小玻瓶，其係允許含水調配物之重複投藥(例如2-6次投藥)。製造物件可進一步包含第二個容器。製造物件可進一步包含從商業與使用者觀點為所期望之其他物料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、濾器、針頭、注射器及具有使用說明書之包裝插圖。

在整個本申請案中引用之所有參考資料、專利及已公告之專利申請案之內容均併於本文供參考。

本發明係藉下述實例進一步說明，其不應被解釋為限制。

### 【圖式簡單說明】

圖1顯示阿達利母馬參考標準物AFP04C (底線)，於DF/UF處理前(中線)與後(頂線)之阿達利母馬DS藥物之SEC層析圖。

圖2顯示在添加賦形劑化合物至經DF/UF-處理之阿達利母馬單體中時，花楸醇(不可離子化之賦形劑)與NaCl (可離子化之賦形劑)濃度對於阿達利母馬單體之流體動力學直徑(Dh)之衝擊。

圖3顯示J695參考標準物(下圖)與J695 DS (pH經調整至pH 4.4) (上圖)之IEC分佈形態。

圖4顯示使用Milli-Q水之DF/UF後之J695 (pH 4.7) (上圖)，與DF/UF前之J695 DS (pH經調整至pH 4.4) (底部曲線)之IEC分佈形態。

圖5係以圖形方式描繪阿達利母馬(已溶於WFI中)之流體動力學

直徑(z-平均)與濃度之關聯性。X：以使用1.1 mPas作為假定試樣黏度之SOP所測得。y：以使用1.9 mPas作為假定試樣黏度之SOP所測得。

圖6係以圖形方式描繪阿達利母馬(已溶於WFI中)之流體動力學直徑(吸收峰單體)與濃度之關聯性。X：以使用1.1 mPas作為假定試樣黏度之SOP所測得。y：以使用1.9 mPas作為假定試樣黏度之SOP所測得。

圖7係以圖形方式描繪J695 (已溶於WFI中)之流體動力學直徑(z-平均)與濃度之關聯性。X：以使用1.1 mPas作為假定試樣黏度之SOP所測得。y：以使用1.9 mPas作為假定試樣黏度之SOP所測得。

圖8係以圖形方式描繪J695 (已溶於WFI中)之流體動力學直徑(吸收峰單體)與濃度之關聯性。X：以使用1.1 mPas作為假定試樣黏度之SOP所測得。y：以使用1.9 mPas作為假定試樣黏度之SOP所測得。

圖9顯示阿達利母馬之離胺酸0、1及2之總和[%]係依賴在注射用水中之阿達利母馬濃度。

圖10顯示J695之吸收峰1至7之總和[%]係依賴在注射用水中之J695濃度。

圖11顯示J695之酸性吸收峰之總和[%]係依賴在注射用水中之J695濃度。

圖12顯示J695之鹼性吸收峰之總和[%]係依賴在注射用水中之J695濃度。

圖13顯示在實例12中所進行滲析之效率，以負責調配物之滲透度與導電率之成份降低為觀點(BDS，74毫克/毫升，10毫升試樣體積，SpectraPor7 MWCO10k)。

圖14顯示在經滲析阿達利母馬整體溶液中之pH程度安定性。顯示對著去離子水滲析(1:1,000,000)前後之pH程度(BDS，74毫克/毫升，10毫升試樣體積，SpectraPor7 MWCO10k)

圖15顯示在冷凍解凍後，關於250毫克/毫升與200毫克/毫升低-離子性阿達利母馬溶液之瓶子定圖譜密度數據。

圖16顯示在冷凍解凍後，關於250毫克/毫升與200毫克/毫升低-離子性阿達利母馬溶液之瓶子定圖譜pH數據。

圖17顯示在冷凍解凍後，關於250毫克/毫升與200毫克/毫升低-離子性阿達利母馬溶液之瓶子定圖譜濃度數據。

圖18顯示在冷凍解凍後，關於250毫克/毫升與200毫克/毫升低-離子性阿達利母馬溶液之瓶子定圖譜滲透度數據。

圖19顯示在冷凍解凍後，關於250毫克/毫升與200毫克/毫升低-離子性阿達利母馬溶液之瓶子定圖譜導電率數據。

圖20顯示低-離子性阿達利母馬(於圖20中被稱為D2E7)溶液之SEC分析，其無論是在DF/UF後於2-8°C下儲存8.5個月(底部曲線)，或在DF/UF後於-80°C下儲存4.5個月(頂部曲線)。

圖21顯示於冷凍-解凍程序之前(T0)及於各四次冷凍-解凍之後(T1、T2、T3及T4)，經調配在各種溶液中及在水中之單株抗體1D4.7之安定性。

圖22顯示於冷凍-解凍程序之前(T0)及於各四次冷凍-解凍之後(T1、T2、T3及T4)經調配在水中及以各種緩衝劑調配之單株抗體13C5.5之安定性。空白試驗= WFI對照試樣。

圖23顯示於冷凍-解凍程序之前(T0)及於各四次冷凍-解凍之後(T1、T2、T3及T4)，經調配在水中及以各種所添加賦形劑調配之單株抗體13C5.5之安定性。空白試驗= WFI對照試樣。

圖24顯示阿達利母馬(WFI調配物)之濃度與溶液pH對於溶液黏度之衝擊。

圖25顯示關於不同濃度與pH值之阿達利母馬溶液(WFI調配物)之混濁度數據。

圖26顯示關於在不同pH值與濃度下之阿達利母馬溶液(WFI調配物)之流體動力學直徑(Dh)數據。

圖27顯示關於在不同濃度下，於水溶液pH 5中之阿達利母馬，藉由強度之大小分佈圖表(Dh度量)。

圖28顯示關於在不同pH程度下，於水中之100毫克/毫升阿達利母馬，藉由強度之大小分佈。

圖29亦顯示關於在不同pH程度下，於水中之100毫克/毫升阿達利母馬，藉由強度大小之分佈。

圖30顯示關於在水中之阿達利母馬之單體含量(SEC)。

圖31顯示關於在水中之阿達利母馬之聚集體含量(SEC)。

圖32顯示兩種J695溶液(WFI調配物)之黏度作為溶液溫度之函數。

圖33係以圖形方式描繪當藉由亞可見粒子(> 1微米)度量時，在重複冷凍/解凍(f/t)循環期間，對於許多不同調配物之1D4.7抗體安定性。

圖34係以圖形方式描繪當藉由亞可見粒子(> 10微米)度量時，在重複冷凍/解凍(f/t)循環期間，對於許多不同調配物之13C5.5抗體安定性。

圖35係以圖形方式描繪當藉由亞可見粒子(>1微米)度量時，在重複冷凍/解凍(f/t)循環期間，對於許多不同調配物之13C5.5抗體安定性。

圖36係以圖形方式描繪當藉由亞可見粒子(>1微米)度量時，在重複冷凍/解凍(f/t)循環期間，對於許多不同調配物之7C6抗體安定性。

### 【實施方式】

#### 實例

下述實例係描述關於包含水作為溶液媒質之含水調配物之實驗。應注意的是，在一些情況中，十進位置係使用歐洲十進符號表示法表示。例如，在表31中，數目"0,296"係與"0.296"同義。

#### 實例1：使用阿達利母馬(Adalimumab)與J695之滲濾/超過濾

## 物料與方法

將阿達利母馬(adalimumab)與J695使用純水滲濾。與純水之至少5-倍體積交換後，將蛋白質溶液超過濾到至少150毫克/毫升之最後標的濃度。進行滲透度、目視檢查及蛋白質濃度量(OD280)，以在DF/UF處理期間監控蛋白質之狀態。

尺寸排阻層析與離子交換層析法係用以特徵鑒定各最後DF/UF產物中之蛋白質安定性，當與起始調配物比較時，例如藥物(DS)起始物質與蛋白質標準物。藥物或"DS"一般係指在常用整體溶液中之治療蛋白質。

- 阿達利母馬(Adalimumab)藥物(阿達利母馬消光係數280毫微米：1.39毫升/毫克公分)。藥物未含有聚花楸酸酯80。DS組合物：5.57 mM單鹽基性磷酸鈉，8.69 mM二鹽基性磷酸鈉，106.69 mM氯化鈉，1.07 mM檸檬酸鈉，6.45 mM檸檬酸，66.68 mM甘露醇。
- 阿達利母馬溶液，用於動態光散射(DLS)度量：將使用純水作為交換媒質所滲濾之阿達利母馬溶液調整至1毫克/毫升濃度，其方式是將阿達利母馬溶液個別以Milli-Q水與賦形劑儲備溶液(已溶於Milli-Q水中之賦形劑)稀釋。
- J695藥物(J695消光係數280毫微米：1.42毫升/毫克公分)。DS組合物：組胺酸，甲硫胺酸，甘露醇，pH 5.8及聚花楸酸酯80。
- Millipore Labscale™切線流動過濾(TFF)系統，裝有500毫升儲器。Labscale TFF系統係在環境溫度下，根據Millipore操作說明書，以不連續模式操作。攪拌器速度係被設定為約1.5，且泵送速度係被設定為大約3。標的入口與出口壓力個別為15毫米psig、大約50毫米psig。
- Minimate™切線流動過濾膠囊，裝有Omega™PES薄膜，30

kDa截止值。將膠囊以0.1N NaOH沖洗30分鐘，並以Milli-Q水歷經另外30分鐘。

- 780 pH計，Metrohm，裝有pH探測物Pt1000，編號6.0258.010，以緩衝劑校準溶液VWR校準，pH 4.00緩衝溶液紅色，目錄編號34170-127，及pH 7.00緩衝溶液黃色，目錄編號34170-130。
- Varian 50 Bio UV可見分光光度計，AI 9655，其中經固定Cary 50細胞係用於蛋白質濃度度量(280毫微米波長)。將100微升蛋白質試樣以水(供HPLC用之Milli-Q水)稀釋至最後體積為50.00毫升，供DF/UF後之所有J695試樣與阿達利母馬溶液之蛋白質濃度度量。經由將40微升試樣溶液以1960微升Milli-Q水稀釋，監測所有其他阿達利母馬試樣之濃度。用後即棄之UV比色杯，1.5毫升，半微量分析，聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)，係用於濃度度量，Milli-Q水係作為OD 280空白試驗使用。
- HPLC級之Milli-Q水係作為DF/UF媒質使用。
- Malvern Zetasizer Nano ZS，儀器編號AI 9494，係用於DLS度量。
- Hellma精密元件，suprasil，型號105.251-QS，光路徑3毫米，中心8.5，係用於DLS度量(充填75微升試樣，Malvern Mastersizer Nano ZS，項目編號AI9494)。
- Knauer自動滲透壓計，儀器編號83963 (Berlin, Germany)，係用於滲透度度量(以400毫滲透度/公斤NaCl校準溶液校準，物件編號Y1241, Herbert Knauer GmbH, Berlin, Germany)。
- 250毫升Corning細胞培養燒瓶，75平方公分，聚苯乙烯，無菌，Corning, NY, USA，係用於DF/UF操作後之蛋白質溶液儲存。

- 氯化鈉：J.T. Baker係用於製備2M NaCl儲備溶液。儲備溶液係用以在純水中，以不同濃度之NaCl (10、20、30及50 mM) 製備1毫克/毫升阿達利母馬溶液。
- D-花楸醇，Sigma化學公司, St. Louis, MO 63178，係用於製備200毫克/毫升花楸醇儲備溶液。儲備溶液係用以在純水中，以不同濃度之花楸醇(10、20、30及40毫克/毫升)製備1毫克/毫升阿達利母馬溶液。

### HPLC方法

- 阿達利母馬(Adalimumab)，SEC分析：交聯葡聚糖(Sephadex) 200管柱(Pharmacia目錄編號175175-01，S/N 0504057)。流動相20 mM磷酸鈉, 150 mM氯化鈉, pH 7.5，0.5毫升/分鐘流率，環境溫度，偵測UV 214毫微米與280毫微米。將各試樣以Milli-Q水稀釋至1.0毫克/毫升，注射試樣裝填量50微克(重複注射)。
- 阿達利母馬(Adalimumab)，IEC分析：Dionex，Propac WCX-10管柱(p/n 054993)，伴隨著相應之防護管柱(p/n 054994)。分離條件：流動相A：10 mM磷酸鈉, pH 7.5；流動相B 10 mM磷酸鈉, 500 mM氯化鈉, pH 5.5。1.0毫升/分鐘流率，環境溫度。將各試樣以Milli-Q水稀釋至1.0毫克/毫升，注射試樣裝填量100微克，重複注射。
- J695，SEC分析：Tosoh Bioscience G3000swxl，7.8毫米x 30公分，5微米(目錄編號08541)。流動相211 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/92 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0。0.3毫升/分鐘流率，環境溫度，偵測UV 214毫微米與280毫微米。將各試樣以Milli-Q水稀釋至2.5毫克/毫升，注射試樣裝填量50微克(重複注射)。
- J695，IEC分析：Dionex，Propac WCX-10管柱(p/n 054993)，



伴隨著相應之防護管柱(p/n 054994)。分離條件：流動相A：10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.0；流動相B 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 6.0。1.0毫升/分鐘流率，35°C溫度。將各試樣以Milli-Q水稀釋至1.0毫克/毫升，注射試樣裝填量100微克。J695參考標準29001BF係以一式三份操作，作為比較，並以Milli-Q水稀釋至1毫克/毫升，以得自分析證明書之濃度為基礎。

### 蛋白質濃度之計算

計算式：

$$E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\varepsilon \times d}$$

$\varepsilon$  - 吸收係數

$c$  - 濃度

$d$  - 光線必須通過之比色杯長度

$E$  - 吸光率

$I_0$  - 最初光強度

$I$  - 通過試樣後之光強度

$$\varepsilon_{\text{阿達利母馬}} = 1.39 \frac{\text{毫升}}{\text{毫克} \times \text{公分}} \\ (\text{Adalimumab})$$

$$\varepsilon_{\text{J695}} = 1.42 \frac{\text{毫升}}{\text{毫克} \times \text{公分}}$$

$$\varepsilon_{\text{HSA}} = 1.042 \frac{\text{毫升}}{\text{毫克} \times \text{公分}}$$

#### 1.1：阿達利母馬(Adalimumab)之DF/UF處理

DF/UF實驗係按照DF/UF設備製造者之標準操作程序進行。例如，Millipore Labscale™TFF系統係裝有500毫升儲器，且系統係於環境溫度下，根據Millipore操作說明書，以不連續模式操作。攪拌器速度係被設定為大約1.5，且泵送速度係被設定為大約3。標的入口與出口壓力個別為15毫米psig與大約50毫米psig，並監控標的壓力，以確保其未被超過。

使用裝有Omega™PES薄膜(Pall公司, Port Washington, NY) 30 kDa MWCO之Minimate™切線流動過濾膠囊。在使用之前，將膠囊以0.1 N NaOH沖洗30分鐘，並以Milli-Q水歷經另外30分鐘。

將大約500毫升阿達利母馬溶液置入TFF儲器中，且DF/UF處理係以不連續模式開始。表1係提供關於表現DF/UF方法特徵之進行中控制(IPC)數據之細節。

表1：關於阿達利母馬DF/UF處理之概論

處理步驟	所添加 Milli-Q 水之體積(毫升)	在留存物中之阿達利母馬溶液之大約體積(毫升)	留存物之阿達利母馬濃度(毫克/毫升)	滲透度(毫滲透度/公斤)	滲透液之阿達利母馬濃度(毫克/毫升)
1		500	54.66	305	-
2		400	68.33	297	3.15
3		300	-	-	-
4	250	550	43.73	169	1.39
5		300			4.45
6	250	550	47.27	93	2.58
7		250	-	-	-
8	250	500	-	-	-
9		250	-	-	-
10	250	500	-	-	-
11		250	-	-	-
12	250	500	52.24	9	1.24
13		300	90.27	7.5	-
14		130	213.87	-	4.08

填上“-”之區域表示在該步驟下未抽取IPC試樣。

DF/UF處理係於大約5-倍體積交換後停止(1次體積交換構成約250毫升滲濾媒質)。假定理想100%賦形劑薄膜滲透性，藉由所應用實驗參數達成之理論最後賦形劑濃度為 $C_i(250/500)^5 = 0.03125 * C_i$ ，其中 $C_i$ 為起始濃度。因此，最高賦形劑降低為96.875% (若恒定體積滲濾已被使用，則使用5個滲濾體積之理論賦形劑降低係為 $C_i e^{-5} = 0.00674$ ，意即大約99.3%最高賦形劑降低)。將阿達利母馬溶液自TFF系統排放至250毫升細胞培養燒瓶(TFF系統之低體積沖洗係使用WFI進行，產生175.05毫克/毫升濃度；未沖洗之情況下，留存物濃度為213.87毫克/毫

升)。抽取試樣，以供pH、滲透度及阿達利母馬濃度之測定。此外，抽取試樣，以藉由SEC與IEC作特徵鑒定。於DF/UF處理前後之阿達利母馬溶液之特徵參數係個別列示於表2中。

表2：DF/UF處理對於阿達利母馬溶液之衝擊

參數	DF/UF前之溶液	DF/UF後之溶液
pH	5.19	5.22
濃度(毫克/毫升)	54.66	175.05
滲透度(毫滲透度/公斤)	305	24
*SEC數據(%聚集體, 單體, 片段)	0.26 99.74 0.00	00.50 99.50 0.00
*IEC數據(酸性區域 lys 0, lys 1, lys 2, %)	13.89 62.05 19.14 4.83	14.07 61.97 18.51 4.73

\*在經由SEC與IEC分析之前，使試樣接受一個冷凍/解凍步驟(-80°C/25°C)

在DF/UF處理之過程中，阿達利母馬濃度係超過210毫克/毫升。在整個實驗中，蛋白質溶液仍然保持透明，且未發現溶液混濁或蛋白質沉澱作用，其係表示阿達利母馬溶解度限制。與最初阿達利母馬DS溶液(~55毫克/毫升)比較，利用純水作為DF/UF交換媒質所滲濾之阿達利母馬溶液係顯現出較低乳白色，儘管在蛋白質濃度上超過3-倍增加(~175毫克/毫升)。

### 1.2：經由層析之阿達利母馬特徵鑒定

圖1顯示阿達利母馬參考標準物之SEC層析圖(阿達利母馬標準物(底線))，與DF/UF處理程序之前(中線)及之後(頂線)之阿達利母馬藥物標準溶液比較。應注意的是，在分析之前，將所有試樣於-80°C下冷凍。

表3亦含有IEC層析圖數據(注意在分析之前，將所有試樣於-80°C下冷凍)。

表3：各種阿達利母馬試樣之IEC數據

試樣名稱	%酸性區域1	%酸性區域2	% 0 Lys	% 1 Lys	% 2 Lys
參考標準物	2.69	11.66	60.77	19.42	5.40
阿達利母馬DS	2.51	11.38	62.05	19.14	4.83
阿達利母馬， 於DF/UF之後	2.26	11.81	61.97	18.51	4.73

### 1.3：賦形劑對於阿達利母馬流體動力學直徑( $D_h$ )之衝擊

先前已測定出當將J695調配至純水中時，J695之流體動力學直徑會顯著地降低，當藉動態光散射(DLS)度量測定時。在WFI中之J695具有 $D_h$ 為~3毫微米，遠低於對免疫球蛋白所預期之數值。在添加低量之可離子化NaCl時， $D_h$ 值會增加至~10毫微米(與NaCl濃度無關)。添加不可離子化之甘露醇會增加J695溶液滲透度，但對J695  $D_h$ 無作用。

為評估賦形劑對於已根據上述DF/UF程序被處理之阿達利母馬流體動力學直徑之衝擊，係使用得自DF/UF實驗之阿達利母馬溶液，以將阿達利母馬溶液調配於純水中，但個別使用不同含量之NaCl (0-50 mM)與花楸醇(0-40毫克/毫升)。花楸醇(不可離子化之賦形劑)與NaCl (可離子化之賦形劑)濃度對於阿達利母馬單體之 $D_h$ 之衝擊係顯示於圖2中。

在純水中之阿達利母馬單體之流體動力學直徑為2.65毫微米。對鹽與非離子性賦形劑之阿達利母馬 $D_h$ 回應係與先前所觀察之J695回應相同。阿達利母馬 $D_h$ 實質上並不受花楸醇之存在所衝擊。低濃度之NaCl會引致單體流體動力學直徑增加至~11毫微米之預期含量。此等發現証實當藉由動態光散射度量時，蛋白質流體動力學直徑係決定性地受可離子化賦形劑之存在所衝擊。可離子化賦形劑之不存在亦被連結至溶液黏度。

此等發現具有關於高濃縮蛋白質溶液之關聯性：流體動力學直徑愈低，蛋白質佔據之空間體積愈低。在高濃度情節中，利用水作為DF/UF交換媒質所製成蛋白質溶液之黏度係實質上低於含有相當大量可離子化緩衝劑賦形劑之傳統蛋白質調配物之黏度。阿達利母馬數據係確認此情況，因發現在注射用水中之200毫克/毫升阿達利母馬溶液之黏度係遠低於50 mPas，與pH (例如pH 4、pH 5及pH 6)無關。關於pH對於 $D_h$ 作用之更多數據可參閱下文實例17。

整體而言，此等發現可用於高濃度蛋白質調配物活性中，

其中黏度相關之製造與服藥/傳輸問題係為習知。再者，此等發現顯示最後藥物產物之滲透度值可以不可離子化之賦形劑調整，譬如糖類或糖醇類，按需要而定，而不會個別地引致蛋白質Dh與溶液黏度上之增加。

#### 1.4：J695 (抗-IL 12抗體)之DF/UF處理

將大約200毫升J695溶液以1 M磷酸調整至pH 4.4，並填入TFF儲器中(施行pH值調整以確保J695單體之正 $\zeta$ -電位，且因此避免未荷電蛋白質單體對於數據之可能衝擊)。然後，將300毫升Milli-Q水添加至TFF儲器中，且DF/UF處理係以不連續模式開始。於250毫升儲器體積中添加250毫升Milli-Q水，並再一次開始DF/UF處理。DF/UF處理係於進行總共5個體積交換步驟之後停止(1次體積交換構成約250毫升)。

假定理想100%賦形劑薄膜滲透性，藉由所應用實驗參數達成之理論最後賦形劑濃度為 $C_i (250/500)^5 = 0.03125 * C_i$ ，其中 $C_i$ 為起始濃度。因此，最高賦形劑降低為96.875% (若恒定體積滲濾已被使用，則使用5個滲濾體積之理論賦形劑降低為 $C_i e^{-5} = 0.00674$ ，意即約99.3%最高賦形劑降低)。將J695溶液自TFF系統排放至250毫升細胞培養燒瓶(未進行TFF系統之沖洗)。抽取試樣，以供pH、滲透度及J695濃度之測定。此外，抽取試樣，以藉由SEC與IEC作特徵鑒定。於DF/UF處理前後之J695溶液之特徵參數係個別列示於表4中。

表4：DF/UF處理對於J695溶液之衝擊

參數	在DF/UF前之溶液	在DF/UF後之溶液
pH	4.40	4.70
濃度(毫克/毫升)	122.9	192.8
滲透度(毫滲透度/公斤)	265	40
SEC數據(%聚集體, 單體, 片段)	0.41 98.42 1.18	0.69 98.11 1.21
IEC數據(異構重組物, 酸性物種, 鹼性物種之總和, %)	92.00 5.17 2.83	92.11 5.30 2.59

與阿達利母馬一樣，在J695上之DF/UF實驗証實在DF/UF操作中，利用純水作為交換媒質處理與調配J695之主要可能性。當在環境溫度下，使用Milli-Q水作為滲濾媒質，DF/UF處理，歷經整個1.5天之期間時(程序中斷過夜)，SEC與IEC數據兩者均指出對於J695安定性無實質上衝擊。在整個實驗中，蛋白質溶液仍然保持透明，表示無潛在之J695溶解度限制。

### 1.5：J695特徵鑒定

表5係描述當藉SEC層析圖測定時，關於三種溶液之聚集體、單體及片段含量之百分比。

表5：得自SEC層析圖之數據

試樣名稱	%聚集體含量	%單體含量	%片段含量
參考標準物	0.45	98.00	1.56
DF/UF前之J695	0.41	98.42	1.18
DF/UF後之J695	0.69	98.11	1.21

圖3顯示J695參考標準物(下圖)與J695 DS (pH經調整至pH 4.4) (上圖)之IEC分佈形態。

在DF/UF處理後之J695試樣中，僅發現聚集體含量上之小增加。

圖4顯示使用Milli-Q水之DF/UF後之J695 (pH 4.7) (上圖)，與DF/UF前之J695 DS (pH經調整至pH 4.4) (底部曲線)之IEC分佈形態。如圖4中所描繪，當藉由IEC監測時，DF/UF步驟對於J695安定性無顯著衝擊。在兩種J695參考標準物間之差異(參考圖3)可歸因於3000升與6000升 DS活動間之製程上之差異。表6係醒目顯示關於IEC數據之更多細節。

表6：各種J695試樣之IEC數據

試樣名稱	0 glu (1)	其他異構重組物	酸性	鹼性
參考標準物	43.57	50.06	4.47	1.90
J695	35.74	56.26	5.17	2.83
DF/UF後之 J695	36.59	55.52	5.30	2.59

### 1.6：結論

上文實例係提供滲濾/超過濾(DF/UF)實驗，其中水(供HPLC用之Milli-Q水)係作為單株抗體阿達利母馬(Adalimumab)與J695之滲濾媒質使用。

使阿達利母馬接受DF/UF處理，利用純水作為DF/UF交換媒質，並在pH 5.2下，於高濃度(>200毫克/毫升)下調配，而不會引致溶液混濁、嚴重乳白色或混濁度形成。於一個後續冷凍/解凍步驟後，SEC與IEC數據指出在經由DF/UF處理而被調配於水中之阿達利母馬溶液與最初阿達利母馬DS之間並無顯著差異。

亦使J695接受DF/UF處理，利用純水作為DF/UF交換媒質，並在pH 4.7下調配，而不會衝擊J695安定性(目視檢查，SEC，IEC)。

當使用此種DF/UF處理調配時，阿達利母馬單體之流體動力學直徑(Dh)為約2.65毫微米。非離子性賦形劑譬如花楸醇以至高40毫克/毫升濃度之存在，係顯示對於Dh數據未具有衝擊，然而已經呈低濃度之離子性賦形劑譬如NaCl係證實會引致阿達利母馬單體Dh增加至約11毫微米(此種Dh數據一般係針對IgG作監測)。早期關於J695有類似發現。

總而言之，使用純水作為DF/UF交換媒質處理與調配蛋白質係為可行。假定理想100%賦形劑薄膜滲透性，藉由恒定體積滲濾，以5個滲濾體積達成之理論最後賦形劑濃度為 $C_i e^{-5} = 0.00674$ ，意即約99.3%最高賦形劑降低。使用6次滲濾體積交換，會造成理論~99.98%最高賦



形劑降低。

實例2至5係描述關於被濃縮至含水調配物中之三種不同蛋白質之實驗實施例，而實例6至11係描述各含水調配物之分析。

#### 關於實例2-11之物料與方法

- 在注射用水中之阿達利母馬(Adalimumab)蛋白質溶液(10毫克/毫升)，蛋白質藥物(DS)物質(49.68毫克/毫升)，DS含有Tween 80、阿達利母馬、阿達利母馬藥物產物(DP) (40毫克，注射用溶液，得自商業化生產之經過濾溶液)。蛋白質吸收係數280毫微米：1.39。
- 在注射用水中之J695蛋白質溶液(10毫克/毫升)，蛋白質藥物(DS) (54毫克/毫升)，DS含有Tween 80。吸收係數280毫微米：1.42
- 在注射用水中之HSA蛋白質溶液(10毫克/毫升)，未具有Tween 80之DP，Grifols人類血清白蛋白Grifols<sup>®</sup>，20%，50毫升。吸收係數280毫微米：1.042
- 6R小玻瓶與10R小玻瓶
- 小玻瓶製備：將小玻瓶洗滌，並熱壓處理
- 塞子，19毫米，West，4110/40/灰色
- 試樣容器(例如Eppendorf試樣容器，安全鎖或簡易按扣接合，1-2毫升)
- 單次使用注射器，無菌20毫升；NormJect，10毫升
- 單次使用濾器單元(濾器Millex<sup>®</sup>-GV，注射器驅動濾器單元，PVDF 0.22微米；Millex<sup>®</sup>-GP，注射器驅動濾器單元，PES 0.22微米，Sterivex<sup>®</sup>0.22微米濾器單元)
- Vivaspin濃縮器(截止值10 kDa，PES；截止值3 kDa，PES)
- 吸量管(例如Eppendorf，最大：1000微升)

- 注射用水
- 離心機(Eppendorf)及離心機編號1 (經溫度控制)
- 滲濾設備：Millipore Labscale™TFF系統，Millipore滲濾薄膜：阿達利母馬(Adalimumab)：聚醚砜；J695：聚醚砜；HSA：再生纖維素
- pH探測物(Metrohm pH計，蛋白質-適當探測物，biotrode 46)
- 層狀空氣流動工作台，Steag LF-Werkbank，Mp.-編號12.5
- NaCl；甘露醇
- Gemini 150 Peltier板流變計，Malvern
- 流變計 MCR 301 [溫度控制之 P-PTD 200 (具有 Peltier tempering 之板)]與圓錐體/板度量系統CP50/0.5°Ti，以及CP50/°(不銹鋼)；Anton Paar
- 毛細管黏度計，Schott，毛細管：類型537 20，類型537 10，類型537 13
- 1 M鹽酸(J.T. Baker)

### 分析

- UV/VIS分光光度測定法(OD 280毫微米)；光子相關光譜學(PCS)：對大約10毫克/毫升與大約20毫克/毫升：  
1.1 mPas，3次操作，30秒，一次度量，25°C，從大約30毫克/毫升及以上：1.9 mPas，30秒，3次操作，一次度量，25°C
- 尺寸排阻層析(SEC)與離子交換層析法(IEC)，如下文所述。
- 黏度度量：使用具有個別與不同設定之不同黏度計

### 蛋白質濃度之計算

計算式：

$$E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\varepsilon \times d}$$

- $\epsilon$  - 吸收係數  
 $c$  - 濃度  
 $d$  - 光線必須通過之比色杯長度  
 $E$  - 吸光率  
 $I_0$  - 最初光強度  
 $I$  - 通過試樣後之光強度

$$\epsilon_{\text{阿達利母馬}} = 1.39 \frac{\text{毫升}}{\text{毫克} \times \text{公分}} \quad (\text{Adalimumab})$$

$$\epsilon_{\text{J695}} = 1.42 \frac{\text{毫升}}{\text{毫克} \times \text{公分}}$$

$$\epsilon_{\text{HSA}} = 1.042 \frac{\text{毫升}}{\text{毫克} \times \text{公分}}$$

### 關於阿達利母馬之黏度數據與計算

阿達利母馬市售調配物(大約194毫克/毫升)密度：

$$\rho = 1,05475 \frac{\text{克}}{\text{立方公分}}$$

阿達利母馬市售調配物(大約194毫克/毫升)動黏度：

$K$  - 毛細管之常數

$t$  - 溶液通過毛細管所必須之時間[s]

$\nu$  - 動黏度

$$\nu = K \times t = 0,03159 \frac{\text{平方毫米}}{\text{s}^2} \times 279,36\text{s} = 8,825 \frac{\text{平方毫米}}{\text{s}}$$

阿達利母馬市售調配物(大約194毫克/毫升)動態黏度：

$\eta$  - 動態黏度

$\rho$  - 密度

$$\eta = \nu \times \rho = 8,825 \frac{\text{平方毫米}}{\text{s}} \times 1,05475 \frac{\text{克}}{\text{立方公分}} = \underline{9,308\text{mPas}}$$

### 關於人類血清白蛋白之黏度數據與計算

HSA市售調配物(大約200毫克/毫升)密度：

$$\rho = 1,05833 \frac{\text{克}}{\text{立方公分}}$$

HSA市售調配物(大約200毫克/毫升)動黏度：

K -毛細管之常數

t -溶液通過毛細管所必須之時間[s]

v-動黏度

$$v = K \times t = 0,01024 \frac{\text{平方毫米}}{s^2} \times 337,69s = 3,46 \frac{\text{平方毫米}}{s}$$

HSA市售調配物(大約200毫克/毫升)動態黏度：

$\eta$ -動態黏度

$\rho$ -密度

$$\eta = v \times \rho = 3,46 \frac{\text{平方毫米}}{s} \times 1,05833 \frac{\text{克}}{\text{立方公分}} = \underline{3,662mPas}$$

在WFI中之HSA (大約180毫克/毫升)密度：

$$\rho = 1,07905 \frac{\text{克}}{\text{立方公分}}$$

在WFI中之HSA (大約180毫克/毫升)動黏度：

K -毛細管之常數

t -溶液通過毛細管所必須之時間[s]

v-動黏度

$$v = K \times t = 0,09573 \frac{\text{平方毫米}}{s^2} \times 185,3s = 17,72 \frac{\text{平方毫米}}{s}$$

在WFI中之HSA (大約180毫克/毫升)動態黏度：

$\eta$ -動態黏度

$\rho$ -密度

$$\eta = v \times \rho = 17,72 \frac{\text{平方毫米}}{s} \times 1,07905 \frac{\text{克}}{\text{立方公分}} = \underline{19,121mPas}$$

### 關於達到高濃度調配物之一般實驗實施例

一般而言，關於達到高濃度、不含鹽之蛋白質調配物之本發明方法，係包括最初藥物物質之滲濾，接著為增加藥物在溶液中濃度之程序。這可以個別程序達成，或可在相同程序內以個別或一致步驟達成。

### 滲濾

使足量之藥物(DS)物質(依DS之蛋白質濃度而定)接受滲濾。在滲

濾之前，將DS物質以注射用水稀釋~10毫克/毫升。應注意的是，對於實驗係需要總計大約540毫升之10毫克/毫升溶液。

注射用水係作為滲濾媒質使用。所進行之滲濾步驟數目為5至7 (一次滲濾步驟等於一次總體積交換)。在滲濾之前與滲濾步驟之後抽取進行中控制(IPC)試樣(對於滲透度為200微升，對於SEC為120微升)。

使用TFF設備之滲濾係藉由應用下列參數進行：

- 攪拌器：位置2
- 泵：位置2
- 壓力上游/入口：最大20-30 psi
- 壓力下游/出口：最大10 psi

(於此實驗中所使用之參數係導自於製造者之建議。熟諳此藝者係能夠變更設備操作之參數，以順應特定蛋白質或在設備、調配物、黏度及其他變數上之變異)。

在滲濾之後，蛋白質濃度係利用OD280評估。若蛋白質濃度為>10毫克/毫升，則將蛋白質濃度藉由以注射用水適當地稀釋該溶液而調整至10毫克/毫升。

### *濃縮*

將20毫升經滲濾之蛋白質溶液(例如阿達利母馬、J695、HSA)放入Vivaspin 20濃縮器中。將濃縮器閉合，並放入離心機中。使蛋白質溶液在最高速度(5000 rpm)下離心。

### *試樣抽取*

經濃縮溶液之試樣係在以下抽取：10毫克/毫升，然後每10毫克/毫升(20、30、40毫克/毫升等)，或直到蛋白質可見及地聚集，且試樣係按下述分析：

- 使蛋白質溶液在Vivaspin濃縮器中均化，並充填於適當小玻璃瓶中。

- 光學外觀係在小玻瓶中直接檢查。
- 300微升係用於UV光譜學，160微升用於PCS，120微升用於SEC，及300微升用於IEX。
- 將SEC與IEX之試樣儲存於-80°C下。

### 動態光散射(DLS)擬案

進行動態光散射，使用裝有Hellma精密元件(Plainview, NY)之Zetasizer Nano ZS (Malvern儀器, Southborough, MA)，suprasil石英，類型105.251-QS，光路徑3毫米，中心Z8.5毫米，使用至少60微升試樣充填，以本身使用蛋白質試樣，並直接地放置在度量元件中。在度量之前，檢查元件窗口，以確認溶液不含可能衝擊DLS度量之氣泡或粒子/灰塵/其他污染物。度量值係在標準操作程序下取得("一般目的"模式，25°C，折射率設定為1.45，度量模式設定為"手動"，每度量1次操作，各包括各30秒之3次度量，度量之類型設定為"大小")。使用分散液技術軟體，4.10b1版，Malvern儀器，以分析數據。將約70微升試樣溶液充填在精密元件中，供流體動力學直徑(Dh)之分析。預設試樣黏度對於低濃縮蛋白質溶液(例如<5毫克/毫升)係被設定為1.1 mPas。從屬度量原理之結論是在欲被度量試樣溶液之實際黏度值與預設黏度之使用間之最小差異，不會實質上衝擊DLS數據示值讀數。此係藉由進行低蛋白質濃度溶液(<5毫克/毫升)之DLS度量而被確認，其中係測得溶液黏度，且納入後續DLS度量中之考量。對於具有較高蛋白質濃度之所有試樣，在DLS度量期間係測得黏度，且納入考量。

### 實例2：包含高TNF $\alpha$ 抗體濃度之調配物

#### 2.1：滲濾

在滲濾之前，將阿達利母馬(49.68毫克/毫升)以注射用水稀釋至大約15毫克/毫升之濃度。因此，將140.8毫升阿達利母馬溶液(49.68毫克/毫升)充填在500毫升量瓶中。將燒瓶以注射用水充填達到校準記號。

將量瓶閉合，並溫和振盪，以供溶液之均化。將TFF實驗室規模系統以水沖洗。然後，修改薄膜(PES)，並亦以1升蒸餾水沖洗。接著，將TFF實驗室規模系統與薄膜以大約300毫升注射用水沖洗。然後，將經稀釋之阿達利母馬溶液充填在TFF之儲器中。抽取供滲透度度量(300微升)、UV分光光度測定法(500微升)之試樣，及供SEC分析之試樣(120微升)。將系統閉合，並開始滲濾。DF/UF (滲濾/超過濾)係在5次體積交換之後，及在達到滲透度值為3毫滲透度/公斤之後完成。滲濾後之阿達利母馬溶液之pH-值為pH 5.25。

使用TFF設備之滲濾係藉由應用下列參數進行：

- 攪拌器：位置2
- 泵：位置2
- 壓力上游/入口：最大20-30 psi
- 壓力下游/出口：最大10 psi

在滲濾之後，蛋白質濃度係利用OD280評估。測得濃度為13.29毫克/毫升。

將阿達利母馬溶液殺菌過濾。

將TFF與薄膜以大約1升蒸餾水，然後以500毫升0.1M NaOH沖洗。將薄膜儲存於0.1M NaOH中，將TFF以大約500毫升蒸餾水再一次沖洗。

## 2.2：蛋白質濃縮

在濃縮抗體之前，蛋白質濃度係利用OD280再一次評估。測得阿達利母馬濃度為13.3毫克/毫升。然後，將阿達利母馬溶液稀釋至10毫克/毫升。將375.94毫升阿達利母馬溶液(13.3毫克/毫升)充填在500毫升量瓶中，並將燒瓶以注射用水(WFI)充填達到校準記號。亦將75.19毫升阿達利母馬溶液(13.3毫克/毫升)充填在100毫升量瓶中，並以純水，意即注射用水(WFI)，充填達到校準記號。使兩個燒瓶溫和振盪，以供

均化。將得自兩個燒瓶之溶液放置在1升PETG瓶中。使瓶子溫和振盪，以供均化。

使用四個Vivaspin 20濃縮器(10 kDa)。在三個Vivaspins中，充填20毫升阿達利母馬溶液(10毫克/毫升) (於各個中)。在第四個Vivaspin裝置中，充填水，作為當離心時之平衡重量。將濃縮器閉合，並放入離心機中。使阿達利母馬溶液離心，施加4500x克離心分離力(在向外擺動旋轉機中)。

### 2.3：試樣抽取

抽取經濃縮阿達利母馬溶液之試樣，當其達到濃度為10毫克/毫升時，及在各後續10毫克/毫升濃度增量增加下(在20毫克/毫升，30毫克/毫升，40毫克/毫升等下，直到大約200毫克/毫升為止)。於40分鐘間隔下，將濃縮器取出離心機，使溶液均化，並使溶液與離心機接頭在冰上冷卻大約10分鐘。於各10毫克/毫升濃縮增量後，使濃縮器中之溶液均化，檢查光學外觀，並抽取試樣，以經由UV (300微升)、PCS (160微升)、SEC (120微升)及IEC (300微升)分析。於試樣抽取後，將濃縮器以阿達利母馬溶液(10毫克/毫升)充填至高達大約20毫升。蛋白質沉澱作用之目視檢查與PCS分析係用以測定阿達利母馬蛋白質(意即異構重組物)在溶液中之溶解度極限。

在大約80毫克/毫升之濃度下，變得顯而易見的是阿達利母馬溶液不再為乳白色，乳白色為具有高量片段之阿達利母馬溶液之已知特徵。因此，懷疑斷裂或許已在實驗實施期間發生。關於進一步分析，阿達利母馬溶液(大約80毫克/毫升)之試樣係藉由SEC分析。將各Vivaspin中之溶液之其餘部份，以及阿達利母馬溶液(10毫克/毫升)之其餘部份移除至50毫升falcon管件，並儲存於-80°C下。SEC分析顯示純度為99.6%單體。

使溶液於25°C下，在水浴中解凍，並殺菌過濾。然後，將得自3



個falcon管件之溶液放置在各Vivaspin中。將濃縮器充填至大約20毫升，並持續濃縮。當達到大約200毫克/毫升之濃度時，實驗係完成。

將所有SEC與IEC試樣儲存於-80°C下，直到進一步分析為止。UV與PCS係在試樣抽取後直接度量。將經濃縮之阿達利母馬溶液之其餘部份放置在Eppendorf容器中，並儲存於-80°C下。

下文所示之表7係描述欲被再充填至濃縮器中而同時使阿達利母馬溶液濃縮之蛋白質溶液體積之計算。此綱要係在實驗實施之前計算，以界定必須被抽取試樣之體積。離心分離之延續時間係示於表8中。

表7：離心分離綱要

	步驟	體積[毫升]	濃度 [毫克/毫 升]	體積 10毫克/毫升 蛋白質溶液
	0	20	10	
濃縮	1	10	20	
取樣	2	9	20	
充填	3	20	14.5	11
濃縮	4	9.66	30	
取樣	5	8.66	30	
充填	6	20	18.66	11.34
濃縮	7	9.33	40	
取樣	8	8.33	40	
充填	9	20	22.49	11.67
濃縮	10	8.99	50	
取樣	11	7.99	50	
充填	12	20	25.98	12.01
濃縮	13	8.66	60	
取樣	14	7.66	60	
充填	15	20	29.15	12.34
濃縮	16	8.32	70	
取樣	17	7.32	70	
充填	18	20	31.96	12.68
濃縮	19	7.99	80	
取樣	20	6.99	80	
充填	21	20	34.46	13.01
濃縮	22	7.65	90	

取樣	23	6.65	90	
充填	24	20	36.6	13.35
濃縮	25	7.32	100	
取樣	26	6.32	100	
充填	27	20	38.44	13.68
濃縮	28	6.98	110	
取樣	29	5.98	110	
充填	30	20	39.9	14.02
濃縮	31	6.65	120	
取樣	32	5.65	120	
充填	33	20	41.07	14.35
濃縮	34	6.31	130	
取樣	35	5.31	130	
充填	36	20	41.86	14.69
濃縮	37	5.98	140	
取樣	38	4.98	140	
濃縮	39	4.64	150	154.14
				174.14

表8：使阿達利母馬溶液濃縮所需要之離心分離時間

濃度[從->至] [毫克/毫升]	時間[分鐘]
10至20	15
20至30	20
30至40	27
40至50	30
50至60	40
60至70	50
70至80	60
80至90	67
90至100	80
100至110	100
110至200	206

得自阿達利母馬濃縮之結果亦示於下表12中。

#### 2.4：黏度度量

包含無論是在WFI中之50毫克/毫升或在WFI中之200毫克/毫升之阿達利母馬溶液係經度量關於黏度。在WFI中之50毫克/毫升與200毫克/毫升係使用Gemini 150 Peltier板流變計，Malvern度量，而在WFI溶液

中之200毫克/毫升亦經由流變計MCR 301 [溫度控制之P-PTD 200 (具有Peltier回火之板)]與錐/板度量系統CP50/1 (不銹鋼)；Anton Paar)度量。

使容器管中之阿達利母馬溶液(200毫克/毫升)解凍，並在6R小玻瓶中均化。將1毫升阿達利母馬(200毫克/毫升)以3毫升WFI稀釋，以獲得經稀釋之溶液(對於50毫克/毫升阿達利母馬溶液)。

對於流變計Gemini 150，係需要大約2毫升，而對於MCR 301，係需要小於1毫升以供度量。

在市售調配物中之阿達利母馬(大約194毫克/毫升)係利用Vivaspin管件獲得。將管件以市售緩衝劑中之阿達利母馬溶液充填，並施加離心分離，直到達成194毫克/毫升濃度為止。黏度係以毛細管黏度計Schott度量。

## 2.5：摘述

總而言之，使阿達利母馬在Vivaspin 20管件中，於四個不同管件中從50毫克/毫升濃縮至大約194毫克/毫升。在開始時，20毫升阿達利母馬溶液(50毫克/毫升)係在每個管件(四個管件)中。在濃縮結束時，5毫升阿達利母馬溶液(大約194毫克/毫升)係在每個管件中。濃縮步驟係在5000 rpm (大約4500克)下進行。於每小時後，使Vivaspin管中之長圓形燒杯與蛋白質溶液，在碎冰中冷卻大約10至15分鐘。密度係以密度度量裝置DMA 4500, Anton Paar度量。高阿達利母馬濃度調配物之進一步分析係被提供於實例5至11中。

## 實例3：包含高濃度IL-12抗體之調配物

### 3.1：滲濾

在滲濾之前，將IL-12抗體J695 (54毫克/毫升)以注射用水稀釋至大約15毫克/毫升之濃度。此係藉由將150毫升J695溶液(54毫克/毫升)放置在500毫升量瓶中，並將燒瓶以注射用水充填至校準記號而達成。

將量瓶閉合，並溫和振盪，以供溶液之均化。將TFF實驗室規模系統以水沖洗。接著，修改聚醚砜薄膜(PES)，並亦以1升蒸餾水沖洗。然後，將TFF實驗室規模系統與薄膜以大約300毫升注射用水沖洗。接著，將經稀釋之J695溶液放置在TFF之儲器中。抽取供滲透度度量(300微升)、UV分光光度測定法(500微升)之試樣，及供SEC分析之試樣(120微升)。將系統閉合，並開始滲濾。在處理DF體積200毫升之後，停止滲濾，並抽取供UV度量之另一份試樣。在1800毫升滲濾體積(大約為因數3.5體積交換)，達到滲透度值為4毫滲透度/公斤之後，停止DF/UF。滲濾後之J695溶液之pH-值為pH 6.48。

使用TFF設備之滲濾係藉由應用下列參數進行：

- 攪拌器：位置2
- 泵：位置2
- 壓力上游/入口：最大20-30 psi
- 壓力下游/出口：最大10 psi

在滲濾之後，蛋白質濃度係利用OD280評估。測得濃度為16.63毫克/毫升。

將J695溶液殺菌過濾。

將TFF儀器與薄膜以大約1升蒸餾水，然後以500毫升0.1M NaOH沖洗。將薄膜儲存於0.1M NaOH中，並將TFF以大約500毫升蒸餾水再一次沖洗。

### 3.2：濃縮

在濃縮之前，將J695溶液稀釋至10毫克/毫升：將316毫升J695溶液(16.63毫克/毫升)放置在500毫升量瓶中，並將燒瓶以注射用水(WFI)充填至校準記號。此外，將64毫升J695溶液(16.63毫克/毫升)放置在100毫升量瓶中，並以WFI充填至校準記號。使兩個燒瓶溫和振盪，以供均化。將得自兩個燒瓶之溶液放置在1升PETG瓶中。使瓶子溫和振盪，以供

均化。

使用四個Vivaspin 20濃縮器(10 kDa截止值)。將20毫升J695溶液(10毫克/毫升)放置在三個Vivaspins之每一個中。在第四個Vivaspin濃縮器裝置中，充填水，作為當離心時之平衡重量。將濃縮器閉合，並放入離心機中。使J695溶液離心，施加4500 x克離心分離力(在向外擺動旋轉機中)。

### 3.3：試樣抽取

抽取經濃縮J695溶液之試樣，當其達到濃度為10毫克/毫升時，及在各後續10毫克/毫升濃度增量增加下(在20毫克/毫升，30毫克/毫升，40毫克/毫升等下，直到200毫克/毫升為止)。於每40分鐘後，將濃縮器取出離心機，使溶液均化，並使溶液與離心機接頭在冰上冷卻大約10分鐘。於每10毫克/毫升濃度增加後，使濃縮器中之溶液均化，檢查光學外觀，並抽取試樣，以供UV (300微升)、PCS (160微升)、SEC (120微升)及IEC (300微升)分析。於試樣抽取之後，將濃縮器以J695溶液(10毫克/毫升)充填至高達大約20毫升。

目視檢查與PCS分析係用以測定J695之溶解度(意即檢查可能之沉澱作用)與安定性。

在實驗結束時，達到大約200毫克/毫升之濃度。

將所有SEC與IEC試樣儲存於-80°C下，供進一步分析(參閱下文)。UV分光光度測定法與PCS度量值係於各試樣抽取後直接取得。將經濃縮J695溶液之其餘部份放置在Eppendorf容器中，並儲存於-80°C下。

關於離心分離綱要之細節係提供於上表7中。J695離心分離之延續時間係提供於表9中。

表9：用以使J695溶液濃縮之離心分離時間

濃度[從->至][毫克/毫升]	時間[分鐘]
10至20	13
20至30	22
30至40	27
40至50	38
50至60	45
60至70	80
70至80	90
80至90	105
90至100	165
100至200	270

### 3.4：賦形劑對於J695之流體動力學直徑之衝擊

在此實驗中，氯化鈉與甘露醇個別地對於J695之流體動力學直徑之衝擊係經分析。對此項目的而言，係製備氯化鈉(12毫克/毫升)與甘露醇(120毫克/毫升)之儲備溶液。將1.2克NaCl在燒杯中稱量，將其以大約70毫升WFI充填，並將12.002克甘露醇在燒杯中稱量，將其以大約70毫升WFI充填。將兩種溶液攪拌，以供均化。將各溶液放置在量瓶中，將其以WFI充填至校準記號。使燒瓶溫和振盪，以供均化。

使大約8毫升J695溶液(大約200毫克/毫升)在37°C下解凍。將溶液充填於10R小玻瓶中，並均化。將七個2R小玻瓶各以500微升J695溶液(大約200毫克/毫升)充填。充填綱要係描述於下表10中。

表10：關於製備含有不同濃度NaCl或甘露醇之J695溶液之充填綱要

賦形劑	濃度賦形劑	體積ABT-874 (200毫克/毫升) [微升]	體積NaCl 儲備溶液 (12毫克/毫升) [微升]	體積甘露醇 儲備溶液 (12毫克/毫升) [微升]	體積WFI [微升]
-	-	500	-	-	500
NaCl	2毫克/毫升	500	167	-	333
NaCl	4毫克/毫升	500	333	-	167
NaCl	6毫克/毫升	500	500	-	-
甘露醇	20毫克/毫升	500	-	167	333
甘露醇	40毫克/毫升	500	-	333	167
甘露醇	60毫克/毫升	500	-	500	-

使2R小玻瓶經由振盪溫和地均化。然後，取得不同J695溶液(100毫克/毫升)之PCS與滲透度度量值。

為製備PCS分析之試樣，首先將比色杯以50微升試樣沖洗。接著，度量值係使用100微升試樣取得。

高J695濃度調配物之進一步分析係提供於實例5至11中。

#### 實例4：高濃度人類血清白蛋白(HSA)調配物

##### 4.1：滲濾

在滲濾之前，將HSA溶液(200毫克/毫升，市售調配物)以注射用水稀釋至15.29毫克/毫升之濃度。為達成此情況，係將38毫升HSA (200毫克/毫升)充填在500毫升量瓶中。將燒瓶以注射用水充填至校準記號。將量瓶閉合，並溫和振盪，以供溶液之均化。將TFF實驗室規模系統以水沖洗。接著，修改薄膜(再生纖維素)，且亦以1升蒸餾水沖洗。然後，將TFF實驗室規模系統與薄膜以大約300毫升注射用水沖洗。接著，將經稀釋之HSA溶液充填在TFF之儲器中。抽取供滲透度度量(300微升)、UV分光光度測定法(500微升)之試樣，及供SEC分析之試樣(120

微升)。將系統閉合，並開始滲濾。於大約300毫升體積之滲濾後，取得滲透液之UV度量值。滲透液係顯現出2.74毫克/毫升之濃度，表示蛋白質通過薄膜。在大約500毫升DF之後，停止滲濾，並抽取供UV度量之另一份試樣(HSA濃度11.03毫克/毫升)。DF/UF係在950毫升滲濾體積(大約2次體積交換)之後，及在達到滲透度值為4毫滲透度/公斤之後完成。滲濾後之HSA溶液之pH-值為pH 7.13。

滲透液之UV分光光度測定度量係進行三次(n=3)。

使用TFF設備之滲濾係藉由應用下列參數進行：

- 攪拌器：位置2
- 泵：位置2
- 壓力上游/入口：最大20-30 psi
- 壓力下游/出口：最大10 psi

在滲濾之後，蛋白質濃度係利用OD280評估。測得濃度為9.41毫克/毫升。

將HSA溶液殺菌過濾。將TFF與薄膜以大約1升蒸餾水沖洗。然後，進行完整性試驗(參閱操作說明書Labscale™TFF系統，第5-3至5-5頁，1997)。體積流量為1.2毫升/分鐘，因此通過完整性試驗(可接受之最大極限3毫升/分鐘)。將薄膜以500毫升蒸餾水，接著以500毫升0.05M NaOH再一次沖洗。將薄膜儲存於0.05M NaOH中，將TFF以大約500毫升蒸餾水再一次沖洗。

#### 4.2：濃縮程序

在使HSA蛋白質溶液濃縮之前，濃度係利用OD280評估，且測得為9.52毫克/毫升。使用四個Vivaspin 20濃縮器(10 kDa)。將20毫升HSA溶液(9.52毫克/毫升)放置在3個Vivaspin濃縮器之每一個中。在第四個Vivaspin中，充填水，作為當離心時之平衡重量。將濃縮器閉合，並放入離心機中。使HSA溶液離心，施加4500 x克離心分離力(在向外擺動



旋轉機中)。

#### 4.3：試樣抽取

抽取經濃縮HSA溶液之試樣，當濃度達到10毫克/毫升時，及接著在每10毫克/毫升濃度增量增加後(在20毫克/毫升，30毫克/毫升，40毫克/毫升等下，直到大約180毫克/毫升為止)。每40分鐘，將濃縮器取出離心機，使溶液均化，並將溶液與離心機接頭在冰上冷卻大約10分鐘。於每10毫克/毫升濃度增量增加後，使濃縮器中之溶液均化，檢查光學外觀，並抽取試樣，以經由UV (300微升)、PCS (160微升)、SEC (120微升)及IEC (300微升)分析。於試樣抽取後，將HSA溶液(9.52毫克/毫升)添加至濃縮器中，至高達大約20毫升。

當濃縮器中之HSA溶液之投射濃度達到大約20毫克/毫升時，滲透液係經由OD280度量，顯現出0.5964毫克/毫升之濃度。HSA溶液之濃度僅為15.99毫克/毫升，其係低於所預期。在WFI中之經濃縮HSA之試樣(10毫克/毫升)係經由SEC分析，以細查可能之斷裂。將Vivaspins中之HSA溶液(15.99毫克/毫升)放置在falcon管件中，並儲存於-80°C下。將用以充填濃縮器之最初HSA溶液(9.52毫克/毫升)之其餘部份亦儲存於-80°C下。

進行SEC分析，以測定HSA蛋白質是否經歷降解，產生可通過薄膜之小片段。但是，對於10毫克/毫升在WFI中之HSA，SEC分析係顯現出單體量為92.45%，實質上無片段。

使儲存於-80°C下之溶液在25°C下解凍，並殺菌過濾。將於falcon管件中之溶液各轉移在一個Vivaspin 20濃縮器中(3 kDa截止值)。將Vivaspins以HSA溶液(9.52毫克/毫升)充填，並離心(參考上述3.2濃縮程序)。

目視檢查與PCS分析係用以測定HSA之溶解度極限。

在實驗完成時，達到大約180毫克/毫升HSA之濃度。

使所有SEC與IEC試樣儲存於-80°C下，直到進一步分析為止。UV與PCS度量係在試樣抽取後直接進行。將經濃縮HSA溶液之其餘部份放置在Eppendorf容器中，並儲存於-80°C下。

離心分離綱要之概論係描述於上表7中。用以使HSA濃縮之離心分離之延續時間係描述於表11中。

表11：使HSA溶液濃縮所必須之離心分離時間

濃度[從->至] [毫克/毫升]	時間[分鐘]
10至20	9
20至30	30
30至40	40
40至50	50
50至60	80
60至70	90
70至80	110
80至90	130
90至100	170
100至180	360

#### 4.4：pH值對於HSA之流體動力學直徑之衝擊

進行下述實驗部份，以評估當蛋白質被溶於WFI中時，pH對於HSA之流體動力學直徑之可能衝擊。將四個6R小玻瓶以5.09毫升HSA溶液(9.83毫克/毫升)充填，且從3至6之pH值係以1M HCl設立(實際pH：3.04、3.99、5.05、6.01)。將此等溶液各轉移至個別10毫升量瓶。然後，將燒瓶充填至校準記號，並溫和振盪，以供均化。

將HCl溶液放置在10R小玻瓶中，並經由PCS分析。將溶液殺菌過濾，並經由PCS再一次度量。亦將5.09毫升HSA溶液(9.83毫克/毫升)轉移至10毫升量瓶中，並將其以WFI充填至校準記號。使燒瓶溫和振盪，以供均化，接著將溶液殺菌過濾，並經由PCS度量。

供PCS度量之試樣製備：

將比色杯以50微升試樣沖洗。度量係以100微升試樣體積進行。

#### 4.5：黏度度量

對於在市售調配物中之HSA (200毫克/毫升)及對於在WFI中之HSA (大約180毫克/毫升)，黏度係以毛細管黏度計(Schott, MP.-編號33.2)度量。

15毫升液份係抽取自市售調配物HSA之50毫升瓶子。使WFI中之HSA在大約20°C下解凍，並取得大約9毫升之液份於Falcon管件中。密度係以密度度量裝置DMA 4500, Anton Paar度量。

高HSA濃縮調配物之進一步分析係提供於實例5至11中。

#### 實例5：高蛋白質調配物之分析-光學外觀

與市售調配物中之阿達利母馬成對比，在WFI中之阿達利母馬不會顯現出乳白色。當被溶於WFI中時，J695亦不會顯現出任何乳白色現象。儘管阿達利母馬之蛋白質濃度在WFI中為80毫克/毫升與200毫克/毫升之事實，實質上仍無乳白色被發現。對照上而言，包含50毫克/毫升阿達利母馬之市售調配物係在市售調配物中顯現出顯著乳白色。因此，使用純水意即WFI作為溶解媒質係具有對於蛋白質溶液乳白色之正面作用。

令人驚訝之發現是(除了在此種高蛋白質濃度下完全為可溶性以外)於WFI中之阿達利母馬係顯示具有低黏度，即使在較高濃度譬如200毫克/毫升下亦然。

依濃度而定，HSA溶液之光學特徵/顏色係自透明與微黃色(10毫克/毫升，在WFI中)改變成透明與黃色(大約180毫克/毫升，在WFI中)。

在濃縮程序期間，關於阿達利母馬溶液與HSA溶液未發現沉澱作用。沉澱作用已為溶解度限制之指標。溶液係保持透明，直到完成實驗為止。應強調的是，實驗並未完成，因接近可能溶解度極限及沉澱作用發生，但因留在濃縮器中之溶液體積不足以進行濃縮而被完成(意即缺少物質)。顯示極可能情況是阿達利母馬、J695及HSA之溶解度極限係遠超過220毫克/毫升。

當將高濃縮溶液在2-8°C下，於濃縮器中儲存過夜時(大約120毫克/毫升)，在J695溶液中發現晶體狀沉澱物。當將溶液儲存於環境溫度下時，晶體狀沉澱物會於大約3-5分鐘後再溶解。因此，經由使J695在高濃度下溶解於純水中所產生之環境，係提供其中蛋白質結晶化作用可藉單單溫度循環而進行之條件(例如自環境溫度至2-8°C)。

#### 實例6：高蛋白質調配物之分析-蛋白質濃度

蛋白質濃度之計算係被提供於上文物料與方法段落中。

阿達利母馬、J695及HSA之濃縮至純水、高蛋白質調配物中之概論係提供於下表12-14中：

表12：當在濃縮程序期間經由OD280評估時之阿達利母馬之濃度

試樣名稱	吸光率	平均值	稀釋	濃度
在WFI中之阿達利母馬10毫克/毫升	0.680	0.650	20	9.35
	0.695			
	0.575			

試樣名稱	吸光率	平均值	稀釋	濃度
在WFI中之阿達利母馬20毫克/毫升1	1.064	0.813	40	23.40
	0.688			
	0.687			
在WFI中之阿達利母馬20毫克/毫升2	0.781	0.788	40	22.68
	0.793			
	0.791			
在WFI中之阿達利母馬20毫克/毫升3	0.870	0.824	40	23.71
	0.883			
	0.719			
在WFI中之阿達利母馬30毫克/毫升1	0.817	0.807	60	34.84
	0.812			
	0.793			
在WFI中之阿達利母馬30毫克/毫升2	0.839	0.827	60	35.69
	0.813			
	0.829			
在WFI中之阿達利母馬30毫克/毫升3	0.770	0.744	60	32.10
	0.729			
	0.732			
在WFI中之阿達利母馬40毫克/毫升1	0.494	0.491	100	35.35
	0.493			

	0.488			
在WFI中之阿達利母馬40毫克/毫升2	0.499	0.501	100	36.06
	0.516			
	0.489			
在WFI中之阿達利母馬40毫克/毫升3	0.495	0.512	100	36.81
	0.523			
	0.517			
在WFI中之阿達利母馬50毫克/毫升1	0.574	0.585	100	42.11
	0.579			
	0.603			
試樣名稱	吸光率	平均值	稀釋	濃度
在WFI中之阿達利母馬50毫克/毫升2	0.671	0.634	100	45.63
	0.630			
	0.601			
在WFI中之阿達利母馬50毫克/毫升3	0.579	0.574	100	41.27
	0.574			
	0.568			
在WFI中之阿達利母馬60毫克/毫升1	0.838	0.837	100	60.21
	0.833			
	0.840			
在WFI中之阿達利母馬60毫克/毫升2	0.793	0.777	100	55.89
	0.767			
	0.770			
在WFI中之阿達利母馬60毫克/毫升3	0.802	0.780	100	56.10
	0.759			
	0.779			
在WFI中之阿達利母馬70毫克/毫升1	0.911	0.878	100	63.15
	0.866			
	0.857			
在WFI中之阿達利母馬70毫克/毫升2	1.012	0.996	100	71.68
	0.976			
	1.001			
在WFI中之阿達利母馬70毫克/毫升3	0.879	0.871	100	62.66
	0.874			
	0.861			
在WFI中之阿達利母馬80毫克/毫升1	0.512	0.510	200	73.45
	0.489			
	0.531			
在WFI中之阿達利母馬80毫克/毫升2	0.542	0.526	200	75.64
	0.519			
	0.517			

試樣名稱	吸光率	平均值	稀釋	濃度
在WFI中之阿達利母馬80毫克/毫升3	0.551	0.531	200	76.42

	0.511			
	0.531			
在WFI中之阿達利母馬90毫克/毫升1	0.550	0.547	200	78.64
	0.550			
	0.539			
在WFI中之阿達利母馬90毫克/毫升2	0.549	0.548	200	78.80
	0.551			
	0.543			
在WFI中之阿達利母馬90毫克/毫升3	0.532	0.534	200	76.81
	0.533			
	0.537			
在WFI中之阿達利母馬100毫克/毫升1	0.640	0.628	200	90.36
	0.621			
	0.623			
在WFI中之阿達利母馬100毫克/毫升2	0.748	0.747	200	107.41
	0.735			
	0.757			
在WFI中之阿達利母馬100毫克/毫升3	0.625	0.621	200	89.39
	0.616			
	0.623			
在WFI中之阿達利母馬110毫克/毫升1	0.674	0.669	200	96.19
	0.671			
	0.660			
在WFI中之阿達利母馬110毫克/毫升2	0.693	0.668	200	96.05
	0.690			
	0.620			
在WFI中之阿達利母馬110毫克/毫升3	0.604	0.640	200	92.05
	0.664			
	0.652			
試樣名稱	吸光率	平均值	稀釋	濃度
在WFI中之阿達利母馬200毫克/毫升1	0.863	0.698	400	201.00
	0.612			
	0.621			
在WFI中之阿達利母馬200毫克/毫升2	1.055	0.791	400	227.53
	0.658			
	0.659			
在WFI中之阿達利母馬200毫克/毫升3	0.732	0.665	400	191.44
	0.648			
	0.615			

表13：當在濃縮程序期間經由OD280評估時之J695濃度

試樣名稱	吸光率	平均值	稀釋	濃度
在WFI中之ABT-874 10毫克/毫升	0.715	0.703	20	9.90
	0.708			

	0.705			
在WFI中之ABT-874 20毫克/毫升1	0.686	-	40	19.31
在WFI中之ABT-874 20毫克/毫升2	0.684	-	40	19.26
在WFI中之ABT-874 20毫克/毫升3	0.685	-	40	19.29
在WFI中之ABT-874 30毫克/毫升1	0.700	-	60	29.59
在WFI中之ABT-874 30毫克/毫升2	0.703	-	60	29.70
在WFI中之ABT-874 30毫克/毫升3	0.684	-	60	28.91
在WFI中之ABT-874 40毫克/毫升1	0.539	-	100	37.97
在WFI中之ABT-874 40毫克/毫升2	0.540	-	100	38.02
在WFI中之ABT-874 40毫克/毫升3	0.520	-	100	36.65
在WFI中之ABT-874 50毫克/毫升1	0.698	-	100	49.15
在WFI中之ABT-874 50毫克/毫升2	0.653	-	100	45.95
在WFI中之ABT-874 50毫克/毫升3	0.623	-	100	43.87
在WFI中之ABT-874 60毫克/毫升1	0.834	-	100	58.75
在WFI中之ABT-874 60毫克/毫升2	0.781	-	100	55.02
在WFI中之ABT-874 60毫克/毫升3	0.778	-	100	54.76
在WFI中之ABT-874 70毫克/毫升1	1.103	-	100	77.69
在WFI中之ABT-874 70毫克/毫升2	1.102	-	100	77.62
在WFI中之ABT-874 70毫克/毫升3	1.110	-	100	78.13
在WFI中之ABT-874 80毫克/毫升1	0.671	-	200	94.45
在WFI中之ABT-874 80毫克/毫升2	0.746	-	200	105.06
在WFI中之ABT-874 80毫克/毫升3	0.664	-	200	93.45
在WFI中之ABT-874 90毫克/毫升1	0.826	-	200	116.37
在WFI中之ABT-874 90毫克/毫升2	0.809	-	200	113.92
在WFI中之ABT-874 90毫克/毫升3	0.804	-	200	113.27
在WFI中之ABT-874 100毫克/毫升1	0.861	-	200	121.21
在WFI中之ABT-874 100毫克/毫升2	0.993	-	200	139.80
在WFI中之ABT-874 100毫克/毫升3	0.985	-	200	138.73
在WFI中之ABT-874 200毫克/毫升1	0.681	0.805	400	226.67
	0.864			
	0.869			
在WFI中之ABT-874 200毫克/毫升2	0.690	0.767	400	216.10
	0.828			
	0.784			
在WFI中之ABT-874 200毫克/毫升3	0.708	0.745	400	209.83
	0.789			
	0.738			

表 14a與 14b：當在濃縮程序期間經由OD280評估時之HSA濃度

表 14a.

試樣名稱	吸光率	稀釋	濃度
在 WFI 中之 HAS 10 毫克/毫升	0.515	20	9.88
在 WFI 中之 HSA 30 毫克/毫升 1	0.398	60	22.94
在 WFI 中之 HSA 30 毫克/毫升 2	0.395	60	22.73
在 WFI 中之 HAS 30 毫克/毫升 3	0.400	60	23.00
在 WFI 中之 HSA 40 毫克/毫升 1	0.383	100	36.78
在 WFI 中之 HSA 40 毫克/毫升 2	0.389	100	37.33
在 WFI 中之 HSA 40 毫克/毫升 3	0.368	100	35.29
在 WFI 中之 HAS 50 毫克/毫升 1	0.479	100	45.97
在 WFI 中之 HAS 50 毫克/毫升 2	0.496	100	47.61
在 WFI 中之 HAS 50 毫克/毫升 3	0.465	100	44.61
在 WFI 中之 HAS 60 毫克/毫升 1	0.609	100	58.47
在 WFI 中之 HAS 60 毫克/毫升 2	0.653	100	62.69
在 WFI 中之 HAS 60 毫克/毫升 3	0.568	100	54.52
在 WFI 中之 HAS 70 毫克/毫升 1	0.645	100	61.89
在 WFI 中之 HAS 70 毫克/毫升 2	0.623	100	59.76
在 WFI 中之 HAS 70 毫克/毫升 3	0.618	100	59.28
在 WFI 中之 HAS 80 毫克/毫升 1	0.393	200	75.37
在 WFI 中之 HAS 80 毫克/毫升 2	0.436	200	83.69
在 WFI 中之 HAS 80 毫克/毫升 3	0.363	200	69.67
在 WFI 中之 HAS 90 毫克/毫升 1	0.484	200	92.90
在 WFI 中之 HAS 90 毫克/毫升 2	0.439	200	84.22
在 WFI 中之 HAS 90 毫克/毫升 3	0.419	200	80.50
在 WFI 中之 HSA 100 毫克/毫升 1	0.604	200	115.93
在 WFI 中之 HAS 100 毫克/毫升 2	0.573	200	110.00
在 WFI 中之 HAS 100 毫克/毫升 3	0.585	200	112.30

表 14b.

試樣名稱	吸光率	平均值	稀釋	濃度
在 WFI 中之 HSA 180 毫克/毫升 1	0.946	0.952	200	182.79
	0.950			
	0.961			
在 WFI 中之 HSA 180 毫克/毫升 2	0.994	0.929	200	178.24
	0.906			
	0.886			
在 WFI 中之 HSA 180 毫克/毫升 3	0.843	0.896	200	172.05
	0.963			
	0.884			

所評估之全部三種蛋白質在所評估之濃度範圍內仍然保持可溶性(意即對於阿達利母馬與 J695 為 >200 毫克/毫升, 對於 HSA 為 >175 毫克



/毫升)。未發現不溶性之指徵，例如發生在溶液中之渾濁現象或沉澱作用。對於阿達利母馬，此等結果表示，涵蓋所評估之濃度範圍，所有阿達利母馬異構重組物(意即離胺酸變種)仍然保持可溶性，因完全未發生沉澱作用。此觀察亦與實例11中所述之離子交換層析法數據一致，其係描述離胺酸變種之總和係保持實質上一致，而不管阿達利母馬濃度為何。

## 實例7：高蛋白質調配物之分析-黏度

### 7.1：阿達利母馬黏度

測得阿達利母馬(大約50毫克/毫升)在注射用水中之黏度為約1.5-2 mPas。對於WFI中之阿達利母馬(大約200毫克/毫升)，係測得兩種數值。以得自Malvern (Gemini 150)之錐/板流變計所測得之一種數值為大約6-6.5 mPas，然而另一種數值(以得自Anton Paar, MCR 301之錐/板流變計度量)為大約12 mPas。

阿達利母馬市售調配物(大約194毫克/毫升)黏度：

K -毛細管之常數

t -溶液通過毛細管所必須之時間[s]

v-動黏度

$\eta$ -動態黏度

$\rho$ -密度

時間[s]	K [平方毫米/平方秒]	v[平方毫米/秒]	$\rho$ [克/立方公分]	$\eta$ [mPas]
279.36	0.03159	8.825	1.05475	9.31

以得自Anton Paar之黏度計測得阿達利母馬在WFI (大約200毫克/毫升)中之黏度為大約12 mPas，及以得自Malvern之黏度計測得為大約6 mPas。對照上而言，阿達利母馬在市售調配物(大約194毫克/毫升)中之黏度為較高，在9.308 mPas下(以得自Schott之毛細管黏度計度量)。

### 7.2：人類血清白蛋白黏度

HSA市售調配物(大約200毫克/毫升)黏度：

K -毛細管之常數

t -為穿過毛細管溶液需要之時間[s]

v-動黏度

$\eta$ -動態黏度

$\rho$ -密度

時間[s]	K [平方毫米/平方秒]	v[平方毫米/秒]	$\rho$ [克/立方公分]	$\eta$ [mPas]
337.69	0.01024	3.46	1.05475	3.66

HSA在WFI (大約180毫克/毫升)中黏度：

K -毛細管之常數

t -為穿過毛細管溶液需要之時間[s]

v-動黏度

$\eta$ -動態黏度

$\rho$ -密度

時間[s]	K [平方毫米/平方秒]	v[平方毫米/秒]	$\rho$ [克/立方公分]	$\eta$ [mPas]
185.3	0.09573	17.72	1.07905	19.12

測得HSA在WFI (大約180毫克/毫升)中之黏度為大約19.121 mPas。測得HSA在市售調配物(大約194毫克/毫升)中之黏度為9.308 mPas (以得自Schott之毛細管黏度計度量)。

### 7.3：阿達利母馬與HSA之黏度分析

阿達利母馬50毫克/毫升在WFI中之動態黏度係個別低於阿達利母馬200毫克/毫升在WFI中及在市購緩衝劑中之黏度。對於HSA，在WFI中之濃度180毫克/毫升之動態黏度係約六倍高於在市購緩衝劑中之濃度200毫克/毫升。因此，似乎是由於藉純水作為溶解媒質所傳達之作用所致之黏度改變之強度(意即個別增加及減少)可依個別蛋白質而定。

## 實例8：高蛋白質調配物之流體動力學直徑之分析-光子相關光譜學 (PCS)

下述實例係提供在使用本發明DF/UF方法所獲得含水調配物中之各種蛋白質流體動力學直徑( $D_h$ ) (平均流體動力學分子直徑之z-平均)之分析。

### 8.1：阿達利母馬流體動力學直徑

如圖5與6中所示，可發現其中流體動力學直徑( $D_h$ )係隨著漸增阿達利母馬濃度而增加之趨勢。圖5顯示在WFI中之阿達利母馬之流體動力學直徑(z-平均)與濃度間之關聯性。圖6顯示在WFI中之阿達利母馬之流體動力學直徑(吸收峰單體)與濃度間之關聯性。

自23.27毫克/毫升試樣所測得之 $D_h$ ，與34.20毫克/毫升試樣比較，其間之差異係存在，因為在關於流體動力學直徑度量之標準操作程序(SOP)中所作之假設。對於具有 $\leq 23.27$ 毫克/毫升濃度之阿達利母馬試樣，PCS度量係以假定關於試樣黏度之1.1 mPas值之SOP進行。對於具有 $\geq 34.20$  mPas之阿達利母馬試樣，係使用假定1.9 mPas試樣黏度之SOP。已知PCS數據係強烈地被試樣溶液之特定黏度所影響，因PCS數據係以試樣之隨機布朗運動為基礎，其係受試樣黏度所衝擊。因此，可解釋隨著漸增蛋白質濃度之流體動力學直徑上之增加，因漸增蛋白質濃度會提升溶液之黏度(較高黏度會導致較低布朗運動與較高所計算之 $D_h$ 數據)。蛋白質分子係經歷較低隨機布朗運動，且因此對於特定黏度，試樣之流體動力學直徑係經計算為較高。整體而言，z-平均為基礎之 $D_h$ 值與單體之 $D_h$ 值係良好地符合。此外，隨著漸增濃度，未發現關於蛋白質不溶性之 $D_h$ 指標上之增加(意即高分子量聚集體與沉澱物(若存在時)會引致實質增加 $D_h$ )。

### 8.2：J695流體動力學直徑

圖7與8顯示J695之流體動力學直徑係相對地與蛋白質濃度無關，

直到達成114.52毫克/毫升濃度為止。將J695濃度自114.52毫克/毫升增加至133.25毫克/毫升，係引致 $D_h$ 上之快速增加。在217.53毫克/毫升濃度下之流體動力學直徑係高於在114.52毫克/毫升下。此項發現並不令人驚訝，因兩種蛋白質溶液係使用相同SOP (假定1.9 mPas之相同黏度) 度量，事實上，當蛋白質濃度增加時，黏度係增加。因此，自114.52毫克/毫升之強增加至133.25毫克/毫升可被解釋為人為產物。

### 8.3：人類血清白蛋白流體動力學直徑

已發現當濃度自9.88毫克/毫升上升至112.74毫克/毫升時，在WFI中之HSA之流體動力學直徑會降低。但是，自112.74毫克/毫升至177.69毫克/毫升，發現流體動力學直徑會增加。

HSA顯示隨著漸增蛋白質濃度而增加流體動力學直徑(吸收峰單體)之一般傾向，其係與從屬之理論原理一致。自9.88毫克/毫升至22.89毫克/毫升之 $D_h$ 降低係因度量SOP上之改變所造成(從假定黏度1.1 mPas轉換至假定黏度1.9 mPas)。

描述上文之數字資料係提供於附錄A中。

### 實例9：J695：流體動力學直徑之賦形劑衝擊

已發現以下令人驚訝之結果，蛋白質可以高濃度被溶於純水中，典型上使用於非經腸調配物中之可離子化與不可離子化賦形劑對於流體動力學直徑之衝擊係經評估。J695係作為模式蛋白質使用。

表15顯示溶液滲透度係直接正比於氯化鈉之濃度。在蛋白質溶液中之滲透度係伴隨著NaCl濃度上升(幾乎線性相關)。令人感興趣的是，J695蛋白質之流體動力學直徑係隨著漸增鹽濃度而增加。NaCl為離子性賦形劑，且被解離成帶正電荷鈉離子與帶負電荷氯離子，其可在蛋白質之表面上吸附。無鹽存在之情況下，J695之流體動力學直徑係顯著地低於正常情況下關於J695所預期者(經常測得約10毫微米之數值)。

如表15中所示，滲透度係隨著甘露醇在蛋白質溶液中之濃度增加而線性地增加。對照上而言，流體動力學直徑並未顯示對於甘露醇濃度之依賴性。甘露醇為非離子性糖醇/多元醇。甘露醇或多元醇係在非經腸調配物發展期間及在最後調配物中作為安定劑使用。甘露醇係藉由優先排阻而使蛋白質安定化。作為其他滲透劑，甘露醇係優先地自蛋白質表面排除，且其係在蛋白質之水合物殼層之外側。因此，蛋白質之經折疊狀態係被安定化，因為具有較大表面之未折疊狀態會變得熱力學上較不有利(Forster, T.M., *低分子量尿酸激酶在熱處理期間之熱不安定性. III. 鹽, 糖類及Tween 80之作用*, 134國際製藥學期刊193 (1996); Singh, S.與Singh, J., *多元醇對於模式蛋白質溶菌酶之構形安定性與生物學活性之作用*, 4 AAPS PharmSciTech, 論文42 (2003))。但是，令人感興趣的是，滲透度可基本上按需要而調整-其係為本文中所述蛋白質發現之一項重要特徵-不會衝擊蛋白質之 $D_h$ 。此等發現可用於高濃度蛋白質調配物中，其中可能存在黏度相關之製造與服藥問題，因以甘露醇之滲透度調整並未藉由蛋白質 $D_h$ 上之增加反映出(意謂預期黏度仍然保持恒定)。

表15：賦形劑對於J695滲透度與Z-平均之衝擊

NaCl濃度 [毫克/毫升]	滲透度 [毫滲透度/公 斤]	z-平均 [毫微米]
0	16	4.19
2	92	12.2
4	158	16.2
6	230	17

甘露醇濃度 [毫克/毫升]	滲透度 [毫滲透度/公 斤]	z-平均 [毫微米]
0	16	4.19
20	148	5.49
40	276	3.22
60	432	3.54

### 實例10：高蛋白質調配物以尺寸排阻層析(SEC)之分析

關於SEC分析，係在注射之前，將阿達利母馬、J695及HSA之試樣稀釋至2毫克/毫升。關於阿達利母馬之注射體積為20微升。關於J695與HAS，係使用10微升注射體積。

#### 10.1：阿達利母馬之SEC分析

阿達利母馬之單體量係傾向於稍微地自99.4%減少至98.8%，同時自9.35毫克/毫升濃縮至206.63毫克/毫升。該單體減少係個別與0.4%至1.1%之阿達利母馬溶液中聚集體量上之增加有關聯，同時自23.27毫克/毫升濃縮至206.62毫克/毫升。片段量仍然保持恒定在0.1%下，與蛋白質濃度無關(參閱附錄B中之表)。因此，阿達利母馬在WFI中係為安定的。

整體而言，隨著漸增蛋白質濃度之蛋白質聚集上之增加係被認為僅只是少許。當任一種蛋白質經調配在緩衝系統中時，及當另外添加界面活性劑時，預期在單體減少上之類似趨勢。當經調配在純水中時，阿達利母馬蛋白質顯示令人驚訝地安定。

#### 10.2：J695之SEC分析

J695單體之量係隨著9.99毫克/毫升至217.53毫克/毫升之漸增蛋白質濃度而稍微地自99.4%減少至98.6%。單體之減少係與約0.4%至約1.2%之聚集體增加有關聯，伴隨著9.99毫克/毫升至217.53毫克/毫升之漸增蛋白質濃度。與蛋白質濃度無關，片段量係隨著9.99毫克/毫升至217.53毫克/毫升之漸增蛋白質濃度，而幾乎為恒定具有0.17%至0.23%。

整體而言，隨著漸增蛋白質濃度之蛋白質聚集上之增加係被認為僅只是少許。當蛋白質經調配在緩衝系統中時，及當添加其他界面活性劑時，預期在單體減少上之類似趨勢。因此，當經調配在純水中時，J695蛋白質顯示令人驚訝地安定。

### 10.3：HSA之SEC分析

單體HSA之量係自95.9%減少至92.75%，同時自9.88毫克/毫升濃縮至112.74毫克/毫升。對於具有177.69毫克/毫升之試樣，測得單體上之增加至高達94.5%。單體量之減少係伴隨著4.1%至7.25%之蛋白質聚集體上之增加，同時自9.88毫克/毫升濃縮至112.74毫克/毫升。因此，當經調配在純水中時，HSA蛋白質亦顯示為安定。

描述上文所提及SEC實驗之數字資料係提供於附錄B中。

### 實例11：高蛋白質調配物之分析-離子交換層析(IEC)

關於IEC分析，係在注射之前，將阿達利母馬、J695及HSA之試樣稀釋至1毫克/毫升。關於所有蛋白質之注射體積均為100微升。

#### 11.1：阿達利母馬之IEC分析

如圖9中所示，阿達利母馬在WFI中係為安定的。圖9顯示一種輕微趨勢，其可被解釋為表示離胺酸變種(離胺酸0、1及2)之總和係隨著阿達利母馬在WFI中之濃度增加而降低。但是，整體而言，離胺酸變種之百分比係改變低於0.25%。

#### 11.2：J695之IEC分析

圖10顯示J695吸收峰1至7之總和係隨著漸增J695濃度而稍微地降低。隨著吸收峰1-7上之降低，酸性與鹼性吸收峰之總和係稍微地增加，其中酸性吸收峰上之增加係稍微較顯著(參閱圖11與12)。個別地，酸性吸收峰之總和係稍微地自大約10.2%增加至10.6%，而鹼性吸收峰之總和自0.52%增加至0.59%。

整體而言，可述及的是，經由IEC未發現在純水中之J695調配物之主要不安定性作用或不溶性作用。

描述上文IEC實驗之數字資料係提供於附錄C中。

#### *在實例2-11中之發現之摘述*

首先認為將蛋白質譬如抗體轉移至WFI中可能會因使蛋白質濃縮

超過其在純水中之溶解度極限而引致蛋白質沉澱作用。上述研究証實蛋白質，包括抗體，不僅可在較低濃度下被轉移至純WFI中，而不會遭遇任何沉澱現象與溶解度限制，而且令人驚訝的是，阿達利母馬(以及另兩種試驗蛋白質)可使用UF/DF與離心分離技術(例如TFF設備、Vivaspin裝置)，在純水中濃縮至超過200毫克/毫升之超高濃度。此外，令人意外地發現，當蛋白質經調配在WFI中時，阿達利母馬乳白色會實質上降低。滲透度係經監測，以確保阿達利母馬緩衝劑媒質完全被純、不含鹽之水(意即WFI)交換。再者，冷凍-解凍處理係在試樣製備期間進行，以供分析，且以SEC與IEC分析實質上未發現不安定性現象。

在高濃度下，於WFI中調配蛋白質例如阿達利母馬之途徑，係顯示降低黏度現象之可能性，其係經常在高蛋白質濃度下阻礙直接藥物產物發展。

最後，發現阿達利母馬之流體動力學直徑(經由光子相關光譜學PCS所測得)在WFI中係比在市售緩衝劑中顯著地較低(較低黏度傾向之指標)。

整體而言，結論是抗體與球形模式蛋白質HSA可以超高濃度溶於純水中之發現，具有提供新洞察基本蛋白質服用法，及潛在地在蛋白質藥物調配與製造中提供新穎途徑之潛力，例如以下述方式：

- 降低高濃縮蛋白質調配物之乳白色
- 降低高濃縮蛋白質調配物之黏度
- 使得能夠按需要調整蛋白質-WFI溶液中之滲透度，其方式是添加非離子性賦形劑，譬如甘露醇，而不會改變譬如黏度與非乳白色之特徵(已証實對於J695，當添加甘露醇時，流體動力學直徑與乳白色不會改變，但當添加NaCl時，會急驟地增加)
- 在藥物調配與處理中提供新範例，因已証實可使蛋白質接受



操作，譬如DF/UF，以濃縮WFI中之蛋白質至超高濃度，及冷凍與解凍，而無實質安定性關聯性。在習知於DF/UF期間，蛋白質調配物之組成，尤其是在處理至高濃度期間，必然會改變(Stoner, M.等人, *蛋白質-溶質交互作用會影響超過濾/滲濾操作之結果*, 93 J. Pharm. Sci. 2332 (2004))之背景下，此等新發現可以下述方式有利地應用，無論是藉由在純水中之蛋白質之DF/UF調整藥物濃度，並接著在高DS濃度下添加賦形劑(藉此避免在製程單元操作期間DS調配物改變之風險)。或者，賦形劑可在最後藥物產物充填完工期間被添加至藥物中。

#### 實例12：在水調配物中之阿達利母馬之製備

下述實例係說明按比例擴大DF/UF程序，造成阿達利母馬在水中之大規模生產。

##### 12.1：製程參數之評估

滲析製程評估研究係在實驗室規模下進行，以界定關於整體阿達利母馬藥物溶液滲析之適當參數，該溶液係經調配在含有其他賦形劑例如甘露醇與氯化鈉之磷酸鹽/檸檬酸鹽緩衝系統中(圖13與14)。

導電率度量值可以適合蛋白質溶液中之導電率分析之任何市購可得電導率計取得，例如電導率計SevenMulti型，具有寬廣pH範圍之擴大容量(Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)。此儀器係根據製造者說明書操作(例如若電導感測器在Mettler Toledo儀器中改變，則必須再一次進行校準，因各感測器具有不同元件常數；參考SevenMulti型電導率計之操作說明書)。若按照說明書，則導電率度量值可經由將度量探測物直接浸沒至試樣溶液中而取得。

圖13顯示滲析程序之效率，以負責含有74毫克/毫升下阿達利母馬之調配物滲透度與導電率之成份降低為觀點。在降低抗體溶液中之溶質達100之因數後，滲透度與導電率度量主要係在遠低於得自市售調配

物之此等參數之最初度量值之程度下被安定化。

圖14顯示在經滲析阿達利母馬整體溶液中之pH安定性。

對著去離子水滲析(1:1,000,000)前後之pH程度係顯示關於具有不同最初pH讀數範圍之阿達利母馬溶液。於滲析前後，pH程度在留存物中仍然保持幾乎相同。

### 12.2：在水整體藥物溶液中之高濃縮阿達利母馬之生產

在第一個步驟中，係使經調配之整體藥物溶液(含有其他賦形劑例如甘露醇與氯化鈉之磷酸鹽/檸檬酸鹽緩衝系統)藉由超過濾/滲濾向上濃縮至大約100毫克/毫升之濃度(12升規模，Millipore Pellicon 2 Mini Bio-A MWCO 10k管柱)。在第二個步驟中，使經向上濃縮之溶液對著去離子水滲析(SpectraPor7 MWCO10k，稀釋因子1:100,000)。作為第三個步驟，係使經滲析之溶液使用Millipore Pellicon 2 Mini Bio-A MWCO 10k管柱，藉由超過濾/滲濾向上濃縮至大約250毫克/毫升之濃度。

表16a顯示在程序步驟3後於水(經DF/UF處理)整體藥物溶液中之高度濃縮阿達利母馬之分析結果。

表16a：關於DF/UF整體-處理之阿達利母馬之滲透度與導電率數據

滲透度 毫滲透度/公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方公分	阿達利母馬 濃度毫克/毫升
62	0.95	5.28	1.0764	277.8

### 12.3：模擬製造條件之冷凍/解凍(F/T)程序

冷凍係使用超低溫度冷凍庫(Revco Ultima II, 20立方呎)進行，具有製造規模負載47公斤之欲在低於-50°C(典型上為-70°C至-80°C)之溫度下被冷凍之液體。將液體包裝在1.6公斤填充重量之個別瓶子中(例如Nalgene 2升PETG方形媒質)。冷凍係於48小時後完成。解凍係在循環水浴(例如Lindergh/藍色)中進行，具有製造規模負載24公斤，在20°C與40°C間之溫度下，典型上為30°C，直到此物質完全解凍為止。

### 12.4：在冷凍與解凍期間之瓶子定圖譜

單離與分析在瓶子體積中之個別水平溶液層。在250毫克/毫升與200毫克/毫升之蛋白質濃度下，於阿達利母馬水溶液中僅檢出最低梯度液形成，如在圖15至19中所見及者。但是，在250毫克/毫升與200毫克/毫升下冷凍與解凍經調配之阿達利母馬溶液(具有含其他賦形劑例如甘露醇與氯化鈉之磷酸鹽/檸檬酸鹽緩衝系統之溶液)會導致沉澱物之形成於瓶子之底部上。

### 12.5：在阿達利母馬之市售與低-離子性調配物中之梯度液形成

比較梯度液在阿達利母馬之市售與低-離子性(水)調配物中藉由冷凍解凍程序之形成。表16b顯示f/t步驟後之不同濃度市售阿達利母馬溶液之目視檢查結果。沉澱物之形成顯示不安定性係在溶液中藉由f/t程序產生。高於100毫克/毫升，發現顯著沉澱物形成。表17顯示冷凍-解凍實驗前之兩種50毫克/毫升溶液與一種100毫克/毫升低-離子性調配物之分析數據。

表16b：在F/T之後，於市售阿達利母馬溶液中所發現之沉澱作用

	250毫克/毫升	220毫克/毫升	200毫克/毫升	150毫克/毫升	120毫克/毫升	100毫克/毫升	60毫克/毫升
市售冷凍方法在超低溫度冷凍庫中： -70°C/23°C	沉澱物	沉澱物	沉澱物	沉澱物	部份沉澱物	透明	透明

表17：在冷凍-解凍前之溶液分析數據

	調配物	pH	密度 (克/立方公分)	滲透度 (毫滲透度/公斤)	蛋白質濃度 (毫克/毫升)
E167 130 01 CL 50毫克/毫升 在水中	低-離子性	5.18	1.0121	5	49.3
E167 140 01 CL 50毫克/毫升 在緩衝劑中	市售調配物	5.20	1.0224	280	48.7
100毫克/毫升 在水中	低-離子性	5.32	1.0262	12	99.8

將約1600毫升(50毫克/毫升溶液)或800毫升(100毫克/毫升溶液)之各調配物置入PETG瓶中，並使其接受習用冷凍(-80°C)解凍(23°C，水浴)程序。然後，自PETG瓶之頂部、中央及底部抽取試樣，並分析關於pH、密度、滲透度及蛋白質濃度。分析結果係示於表18中。

表18：得自冷凍/解凍溶液之瓶子-定圖譜層之分析

試樣	pH	密度 克/立方公分	滲透度 毫滲透度/公斤	蛋白質含量 (體積計量) 毫克/毫升
50毫克/毫升在水中				
頂部	5.20	1.0119	6	48.72
中間	5.19	1.0120	8	49.35
底部	5.17	1.0120	6	49.76
市售調配物				
頂部	5.16	1.0165	236	37.9
中間	5.13	1.0221	306	45.58
底部	5.12	1.0257	368	55.48
100毫克/毫升在水中				
頂部	5.29	1.0259	13	98.7
中間	5.3	1.0262	16	99.9
底部	5.28	1.0262	14	101.2

阿達利母馬之市售調配物在冷凍/解凍時係顯現出顯著梯度液，關於密度(表示蛋白質與賦形劑之非均質性/梯度液)、滲透度(表示賦形劑梯度液)及蛋白質含量。對照上而言，在冷凍/解凍時，於50毫克/毫升低-離子性阿達利母馬調配物中未發現梯度液。

在較高蛋白質濃度下，有時可預期梯度液形成會變得較差。但是，在冷凍/解凍時，於100毫克/毫升低-離子性阿達利母馬調配物中未發現梯度液，關於pH、密度、滲透度及蛋白質濃度。

#### 實例13：DF/UF後之J695之安定性

下述實例係提供關於根據本發明方法，在DF/UF處理後之J695安定性之數據。

得自正常DS緩衝劑中之J695之蛋白質試樣係經分析，無論是在pH值調整後或在滲濾後。將pH值以0.1M磷酸調整至pH 4.4，蛋白質濃度

112毫克/毫升。對於在WFI中之經濃縮試樣，使蛋白質試樣於環境溫度下對著水滲濾(DF/UF)，歷經大約1.5天，使用裝有30 kDa RC薄膜之TFF。測得DF/UF後之蛋白質濃度為約192毫克/毫升pH 4.7。

### 13.1：尺寸排阻分析(SEC)實驗程序

尺寸排阻方法係針對J695之純度評估而發展。尺寸排阻層析(SEC)係根據分子量分離巨分子。樹脂係充作篩選劑，保留較小分子在樹脂之孔隙中，及允許較大分子通過管柱。

滯留時間與解析度為經選擇樹脂之孔隙大小之函數。

將各試樣以純水(Milli-Q)稀釋至2.5毫克/毫升，以所述濃度為基礎。將50微克各試樣重複注射在管柱上。Tosoh Bioscience G3000swxl，7.8毫米x 30公分，5微米(目錄#08541) SEC管柱係用於分離。關於緩衝劑A，係使用211 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ 92 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0。偵測係在280毫微米與214毫微米下進行。管柱係被保持在室溫下，使用0.3毫升/分鐘之流率。

此層析係利用恒定組成梯度液，使用100%流動相A溶劑，歷經50分鐘延續時間。

### 13.2：SEC數據

表19係描述得自尺寸排阻層析實驗之數據。

表19：關於J695參考標準物、DS及DF/UF後(在水中)之SEC分析數據

ABT-874					
	負載	HM	單體	片段	
BF參考標準物	50u	0.49	97.9	1.28	0.26
BF參考標準物重複	50u	0.41	98.0	1.29	0.27
BF參考標準物平均		0.45	98.0	1.29	0.27
標準物		0.06	0.05	0.01	0.01
%RS		12.5	0.05	0.55	2.67
在緩衝劑中之DS pH 4.4	50u	0.42	98.3	1.04	0.16
在緩衝劑中之DS pH 4.4重複	50u	0.40	98.4	1.01	0.13
在緩衝劑中之DS pH 4.4平均		0.41	98.4	1.03	0.15
標準物		0.01	0.06	0.02	0.02
%RS		3.45	0.06	2.07	14.6
在水中之DS UF/DF pH 4.7	50u	0.69	98.1	1.04	0.14
在水中之UF/DF pH 4.7重複	50u	0.69	98.0	1.07	0.16
在水中之DS UF/DF pH 4.7平均		0.69	98.1	1.06	0.15
標準物		0.00	0.04	0.02	0.01
%RS		0.00	0.04	2.01	9.43

### 13.3：SEC分析結論

在表19中之數據顯示J695之市售調配物(DS PFS, pH = 4.4)具有如J695參考標準物之可比較含量之片段與聚集體。在市售調配物J695對照組與在水中已進行DF/UF之J695 (在H<sub>2</sub>O中之DS, pH=4.7, 192毫克/毫升)間之聚集體量中發現有差異：見及在聚集上之0.4%至0.7%之增加。這並非顯著之增加，且可歸因於UF/DF期間，在室溫下所消耗之時間。對於片段沒有改變。

### 13.4：IEC (WCX-10)實驗程序

陽離子交換方法係針對J695之異質性之評估而發展，使用Dionex WCX-10管柱。一般而言，陽離子交換層析係根據表觀pI及與樹脂之表面電荷交互作用分離蛋白質異構重組物。吾人感興趣之蛋白質係在特

定低鹽開始條件下結合至管柱，並藉由經過梯度液增加鹽濃度而自管柱溶離。具有較低表觀pI之蛋白質係較不緊密地結合至陽離子交換管柱，並為溶離之第一種，而具有較高表觀pI之蛋白質係較緊密結合，並為溶離之最後一種。

使用WCX-10之陽離子交換層析係用於品質控制上，作為批料釋出檢測。檢測條件係經修改，以改良已知J695異構重組物之分離。

將試樣以純水(Milli-Q)稀釋至1.0毫克/毫升。參考標準物係以一式三份操作，作為比較，並在純水(Milli-Q)中稀釋至1毫克/毫升。

Dionex Propac WCX-10管柱(p/n 054993)，伴隨著相應之防護管柱(p/n 054994)，係用於分離。於程序中所使用之緩衝劑包括緩衝劑A (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH=6.0)與緩衝劑B (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH=6.0)。柱溫係被保持在35°C下，且管柱流率為1毫升/分鐘。對於100微克裝填量，注射體積為100微升，且偵測係在280毫微米下進行。歷經層析分離過程之緩衝劑梯度液係提供於表20中。

表20：於J695之IEC分析中所使用之緩衝劑梯度液

時間(分鐘)	%MPA	%MPB
0	75	25
3	60	40
33	40	60
36	0	100
41	0	100
43	75	25
48	75	25

### 13.5：IEC數據

表21係提供得自將J695參考標準物與市售緩衝劑中之J695 (DS pH=4.4)比較之實驗結果，以及市售緩衝劑調配物與DF/UF後之J695 (DF/UF H<sub>2</sub>O, pH=4.7)之比較。

表21：關於J695參考標準物、市售調配物(DS)及DF/UF後(在水中)之IEC數據

	0 glu (1)	0 glu (2+2a)	1 glu (3)	1 glu (4)	1 glu (5) + (5a)	2 glu (6)	2 glu (7)	酸性	鹼性
參考標準物	43.77	7.55	8.00	21.87	4.28	4.82	3.75	4.05	1.92
參考標準物重複	43.49	7.49	7.98	21.70	4.26	4.81	3.75	4.61	1.90
參考標準物重複	43.44	7.49	8.00	21.65	4.24	4.81	3.74	4.75	1.89
參考標準物平均	43.57	7.51	7.99	21.74	4.26	4.81	3.75	4.47	1.90
SD	0.20	0.04	0.01	0.12	0.01	0.01	0.00	0.40	0.01
%RS D	0.45	0.56	0.18	0.55	0.33	0.15	0.00	8.86	0.74

	0 glu (1)	0 glu (2+2a)	1 glu (3)	1 glu (4)	1 glu (5) + (5a)	2 glu (6)	2 glu (7)	酸性	鹼性
ABT-874 DS pH=4.4	35.65	14.74	7.26	18.06	6.76	5.32	3.98	5.55	2.70
ABT-874 DS pH=4.4重複	35.82	14.73	7.29	18.14	6.82	5.39	4.06	4.79	2.95
ABT-874 DS pH=4.4平均	35.74	14.74	7.28	18.10	6.79	5.36	4.02	5.17	2.83
SD	0.12	0.01	0.02	0.06	0.04	0.05	0.06	0.54	0.18
%RS D	0.34	0.05	0.29	0.31	0.62	0.92	1.41	10.39	6.26

	0 glu (1)	0 glu (2+2a)	1 glu (3)	1 glu (4)	1 glu (5) + (5a)	2 glu (6)	2 glu (7)	酸性	鹼性
ABT-874 DF/UF H <sub>2</sub> O pH=4.7	36.57	14.51	7.26	18.09	6.57	5.22	3.91	5.28	2.61
ABT-874 DF/UF H <sub>2</sub> O pH=4.7重複	36.60	14.43	7.25	18.02	6.66	5.18	4.00	5.31	2.56
ABT-874 DF/UF H <sub>2</sub> O pH=4.7	36.59	14.47	7.26	18.06	6.62	5.20	3.96	5.30	2.59
SD	0.02	0.06	0.01	0.05	0.06	0.03	0.06	0.02	0.04
%RS D	0.06	0.39	0.10	0.27	0.96	0.54	1.61	0.40	1.37

### 13.6：IEC分析結論

在J695參考標準物與市售調配物(DS, pH 4.4)之間發現有一些差異。此等差異係在DS工程操作試樣之最初操作中發現，且係歸因於3000升與6000升活動間之製程上差異。在DS, pH 4.4對照組與H<sub>2</sub>O中之J695 pH=4.7, 192毫克/毫升試樣之間無顯著差異。

#### 實例14：在DF/UF後及長期儲存於2-8°C下之阿達利母馬之安定性

下述實例係提供數據，顯示在根據本發明方法之含水調配物中，於2-8°C下22.5個月儲存後，阿達利母馬之安定性。

使關於SEC與WCX-10分析之阿達利母馬試樣對著水滲濾，並濃縮至約177毫克/毫升。儲存試樣，並在不同時間點下分析關於安定性。



在市售Humira緩衝劑中之標準阿達利母馬溶液(DS, pH約5.2)係作為於水中產生濃縮溶液之起始物質使用。使蛋白質溶液試樣於環境溫度下對著水滲濾(DF/UF)大約1.5天，使用裝有30 kDa RC薄膜之TFF。測得DF/UF後之蛋白質濃度為大約177毫克/毫升，pH 5.2。在分析之前，將試樣於2-8°C下儲存22.5個月。

#### 14.1：SEC實驗程序

尺寸排阻方法係於先前經發展，以檢查抗體片段與聚集體之存在。尺寸排阻層析(SEC)係根據分子量分離巨分子。樹脂係充作篩選劑，保留較小分子在樹脂之孔隙中，及允許較大分子通過管柱。滯留時間與解析度為經選擇樹脂之孔隙大小之函數。

將各試樣以milli Q水稀釋至1.0毫克/毫升，並將50微克各試樣注射至管柱上。對於SE-HPLC，係使用交聯葡聚糖(Sephadex) 200管柱(Pharmacia目錄#175175-01，S/N 0504057)或TSK凝膠G3000SW (目錄#08541；用於22.5個月試樣之分析)。管柱之流動相包含20 mM磷酸鈉與150 mM氯化鈉，pH 7.5。偵測係在280毫微米與214毫微米下進行。管柱係被保持在環境溫度下，且流率為0.5毫升/分鐘(Sephadex管柱)或0.3毫升/分鐘(TSK管柱)。

#### 14.2：SEC數據

圖20與表22含有在2-8°C下以液體儲存8.5個月之低-離子性阿達利母馬溶液與在-80°C下儲存之相同溶液比較之分析結果。表23含有在2-8°C下儲存22.5個月之低-離子性阿達利母馬溶液與阿達利母馬之參考標準試樣比較之分析數據。

表22：比較得自冷凍儲存之阿達利母馬對得自長期冷凍儲存之阿達利母馬之SEC分析數據

試樣	負載	%HMW	%單體	%LMW
DF/UF對著水, 177毫克/毫升, 4.5個月, 在-80°C下	50微克	0.1	99.6	0.3
DF/UF對著水, 177毫克/毫升, 9個月, 在2-8°C下	50微克	0.2	99.5	0.3

表23：比較阿達利母馬參考標準物對著得自長期冷凍儲存之阿達利母馬之SEC分析數據

試樣	負載	%HMW	%單體	%LMW
參考標準物阿達利母馬	50微克	0.31	98.85	0.84
DF/UF對著水, 177毫克/毫升, 22.5個月, 在2-8°C下	50微克	1.42	97.59	0.98

正如在表22中可見及者，SEC分析顯示在水中之阿達利母馬為安定的，即使是在2-8°C下9個月或在-80°C下歷經4.5個月之後，因百分比聚集體(%HMW)與百分比片段(%LMW)隨著時間為最低。

### 14.3：SEC分析結論

在2-8°C下8.5個月儲存後，阿達利母馬溶液(DF/UF對著水)顯現出一小部份高分子量(HMW)物種(0.2%)與一小部份片段(0.3%)。在-80°C下儲存4.5個月，與後續解凍(水浴，23°C)，不會衝擊阿達利母馬安定性(0.1%聚集體，0.3%片段)。

在2-8°C下儲存22.5個月之試樣分析亦顯示對阿達利母馬參考標準物之可比較片段含量(表23)。但是，在22.5個月安定性試樣中檢出之聚集體含量(1.66%)係稍微高於參考標準物中檢出之聚集體含量。

已知抗體之自體締合係高度地依賴抗體濃度，意即非共價聚集體與締合複合物之形成在高蛋白質濃度下係為最顯著。此自體締合為可逆，且以緩衝溶液稀釋會造成降低之自體締合傾向(Liu, J.等人，可逆自體締合會增加濃縮單株抗體在水溶液中之黏度，94醫藥科學期刊

1928 (2004))。

因此，可能情況是，在試樣製備中之差異及在阿達利母馬溶液稀釋(自177毫克/毫升至1毫克/毫升)與藉由SEC之後續試樣分析間之不同落後時間，為8.5個月與9個月安定性試樣之聚集體含量上差異之原因。

#### 14.4：IEC實驗程序

陽離子交換方法係針對抗體裝料異質性之評估而發展，使用Dionex WCX-10管柱。陽離子交換層析係根據表觀pI及與樹脂之表面電荷交互作用分離蛋白質異構重組物。吾人感興趣之蛋白質係在特定低鹽開始條件下結合至管柱，並藉由經過梯度液增加鹽濃度而自管柱溶離。具有較低表觀pI之蛋白質係較不緊密地結合至陽離子交換管柱，並為溶離之第一種，而具有較高表觀pI之蛋白質係較緊密結合，並為溶離之最後一種。

在程序之前，係將試樣以milli Q水稀釋至1.0毫克/毫升。Dionex Propac WCX-10管柱(p/n 054993)，伴隨著相應之防護管柱(p/n 05499)，係用於分離。製備兩種流動相緩衝劑，10 mM磷酸鈉，pH 7.5 (緩衝劑A)與10 mM磷酸鈉，500 mM氯化鈉，pH 5.5 (緩衝劑B)。管柱係被保持在環境溫度下，且流率為1.0毫升/分鐘。對於100微克裝填量，注射體積為100微升，且偵測係在280毫微米下進行。歷經層析分離過程之緩衝劑梯度液係提供於表24中。

表24：於阿達利母馬之IEC分析中所使用之緩衝劑梯度液

時間(分鐘)	%MPA	%MPB
0.05	94	6
20	84	16
22	0	100
26	0	100
28	94	6
34	94	6
35	94	6

#### 14.5：離子交換數據

表25顯示關於儲存前之阿達利母馬參考標準物、市售調配物(150毫克/毫升)及DF/UF後低-離子性溶液之離子交換層析數據。表26顯示關於參考標準物與在2-8°C下22.5個月儲存後之低-離子性溶液比較之數據。

表25：阿達利母馬參考標準物、DS/市售調配物及DF/UF後(在水中)之IEC分析數據

試樣名稱	%酸性區域1	%酸性區域2	% 0 Lys	% 1 Lys	% 2 Lys
阿達利母馬參考標準物	2.69	11.66	60.77	19.42	5.40
阿達利母馬DS 150毫克/毫升	2.51	11.38	62.05	19.14	4.83
阿達利母馬對著水滲濾, 177毫克/毫升	2.26	11.81	61.97	18.51	4.73

表26：比較參考標準物與得自長期冷凍儲存之DF/UF試樣之IEC分析數據

試樣名稱	%酸性區域1	%酸性區域2	% 0 Lys	% 1 Lys	% 2 Lys
阿達利母馬參考標準物	2.1	10.9	63.8	18.4	4.6
阿達利母馬DF/UF對著水, 177毫克/毫升, 22.5個月, 在2-8°C下	2.7	13.4	62	16.7	4.1

#### 14.6：離子交換分析結論

關於T0試樣，數據顯示在參考標準物阿達利母馬、市售調配物阿達利母馬(作為DS使用，以藉由DF/UF將阿達利母馬調配至水中)及對著水滲濾且濃縮至177毫克/毫升之阿達利母馬間之酸性區域1、2、0 Lys、1 Lys或2 Lys之百分比上無顯著差異(意即裝料異質性)(表25)。

而且，在水中之177毫克/毫升阿達利母馬試樣之22.5個月儲存後，當與阿達利母馬參考標準物比較時，僅可見及在0 Lys、1 Lys及2 Lys

離份上之細微差異。概略言之，當阿達利母馬藉由DF/UF處理被調配至水中，並在177毫克/毫升之濃度下，於2-8°C下儲存22.5個月時，未發現顯著化學不安定性傾向。

#### 實例15：低-離子性1D4.7溶液之冷凍/解凍安定性

1D4.7蛋白質(免疫球蛋白G1)抗-IL 12/抗-IL 23係藉由滲析(使用slide-a-lyzer卡匣，根據製造者Pierce, Rockford, IL之操作說明書使用)而被調配在水中，証實於2毫克/毫升濃度，pH 6下，在重複冷凍/解凍(f/t)處理(-80°C /25°C 水浴)期間為安定的。將數據與例行調配物(2毫克/毫升，pH 6)比較，並發現經調配在水中之1D4.7安定性係超過經調配在例行性地經篩濾緩衝系統(例如20 mM組胺酸、20 mM甘胺酸、10 mM磷酸鹽、10 mM檸檬酸鹽)中之1D4.7安定性，且甚至超過具有多種常用於蛋白質調配物中之賦形劑，例如10毫克/毫升甘露醇、10毫克/毫升花楸醇、10毫克/毫升蔗糖、0.01%聚花楸酸酯80、20 mM NaCl，以一般性緩衝劑(10 mM磷酸鹽、10 mM檸檬酸鹽)為基礎之1D4.7調配物之安定性。

進行SEC、DLS及粒子計數，以監測蛋白質安定性，且粒子計數係利用具有1-200微米度量範圍之粒子計數系統(例如粒子計數器注射器型, Markus Klotz GmbH, Bad Liebenzell, Germany)進行。實驗細節如下：

- 將經調配在水中之1D4.7與上文列示之調配物比較
- 應用4次冷凍/解凍循環
- 30毫升PETG容器，約25毫升充填，2毫克/毫升，pH 6
- 在T0、T1 (意即一個f/t步驟之後)、T2、T3及T4下取樣
- 分析：目視檢查、SEC、DLS、亞可見粒子度量

圖21顯示在重複f/t循環(-80°C /25°C)期間之1D4.7安定性，藉由>1微米之亞可見粒子之形成反映出。1D4.7係被調配在一般性緩衝劑(10

mM檸檬酸鹽、10 mM磷酸鹽)中，然後測試下列賦形劑變異：花楸醇(10毫克/毫升)、甘露醇(10毫克/毫升)、蔗糖(10毫克/毫升)、NaCl (100 mM)及聚花楸酸酯80 (0.01%)。1D4.7亦被經調配在水中(藉由滲析)，完全未添加賦形劑。亦使注射用水接受f/t循環與亞可見粒子測試，以評估物質處理、f/t及試樣抽取對於粒子負載之可能衝擊。

於f/t時經調配在水中之1D4.7安定性係超過以典型上使用於蛋白質調配物中之賦形劑所調配之1D4.7溶液安定性。已知甘露醇、蔗糖及花楸醇係充作凍乾保護劑及/或低溫保護劑，且聚花楸酸酯80為普遍地已知會在個別曝露至疏水性-親水性界面譬如空氣-水與冰-水時增加蛋白質之物理安定性之非離子性賦形劑。

當以所應用之其他操作法(例如SEC、目視檢查等)分析時，經調配在水中之1D4.7溶液係顯示為安定的。

#### **實例16：低-離子性13C5.5抗體溶液之冷凍/解凍安定性**

已証實經調配在水中之13C5.5抗IL-13蛋白質於2毫克/毫升濃度，pH 6下，在重複冷凍/解凍處理(-80°C/25°C水浴)期間為安定的。將數據與例行調配物(2毫克/毫升，pH 6)比較，並發現經調配在水中之13C5.5安定性係超過經調配在例行性地經篩濾緩衝系統(例如20 mM組胺酸、20 mM甘胺酸、10 mM磷酸鹽、10 mM檸檬酸鹽)中之13C5.5安定性，且甚至超過具有多種常用於蛋白質調配物中之賦形劑(例如10毫克/毫升甘露醇、10毫克/毫升花楸醇、10毫克/毫升蔗糖、0.01%聚花楸酸酯80、20 mM NaCl、200 mM NaCl)，以一般性緩衝劑(10 mM磷酸鹽、10 mM檸檬酸鹽)為基礎之13C5.5調配物之安定性。

試樣製備、實驗處理、試樣抽取及試樣分析係以如實例15中關於1D4.7之相同方式進行。

- 將經調配在水中之13C5.5與上文列示之調配物比較

- 應用4次冷凍/解凍循環
- 30毫升PETG容器
- 2毫克/毫升，pH 6
- 在T0、T1、T2、T3及T4下取樣
- 分析：目視檢查、SEC、DLS、亞可見粒子度量

圖22顯示在重複 f/t 循環(-80°C /25°C)期間之13C5.5安定性，藉由>10微米之亞可見粒子之形成反映出。13C5.5係被調配在無論是10 mM磷酸鹽緩衝劑、10 mM檸檬酸鹽緩衝劑、20 mM甘胺酸緩衝劑及20 mM組胺酸緩衝劑中。13C5.5亦被調配在水中(藉由滲析)，完全未添加賦形劑。亦使注射用水接受 f/t 循環與亞可見粒子測試，以評估物質處理、f/t及試樣抽取對於粒子負載之可能衝擊(空白試驗)。

於 f/t 時經調配在水中之13C5.5安定性係超過經調配在典型上使用於蛋白質調配物之緩衝劑中之13C5.5溶液安定性。以所應用之其他分析操作法(例如SEC、目視檢查等)，尚未發現經調配在水中之13C5.5溶液之不安定性。

圖23顯示在重複 f/t 循環(-80°C /25°C)期間之13C5.5安定性，藉由>1微米之亞可見粒子之形成反映出。13C5.5係被調配在一般性緩衝劑(10 mM檸檬酸鹽、10 mM磷酸鹽)中，然後測試下列賦形劑變異：花楸醇(10毫克/毫升)、甘露醇(10毫克/毫升)、蔗糖(10毫克/毫升)、NaCl (200 mM)、NaCl (20 mM)及聚花楸酸酯80 (0.01%)。13C5.5亦被調配在水中(藉由滲析)，完全未添加賦形劑，以供比較(純水)。亦使注射用水接受 f/t 循環與亞可見粒子測試，以評估物質處理、f/t及試樣抽取對於粒子負載之可能衝擊。

於 f/t 時經調配在水中之13C5.5安定性係超過以典型上使用於蛋白質調配物中之賦形劑所調配之13C5.5溶液安定性。已知甘露醇、蔗糖及花楸醇係充作凍乾保護劑及/或低溫保護劑，且聚花楸酸酯80為普遍

地已知會在個別曝露至疏水性-親水性界面譬如空氣-水與冰-水時增加蛋白質之物理安定性之非離子性賦形劑。

以所應用之其他分析操作法(例如SEC、目視檢查等)，尚未發現經調配在水中之13C5.5溶液之不安定性。

於f/t程序後之13C5.5溶液之DLS分析係按上述進行。在只有1個f/t步驟後，具有0.01% Tween-80之13C5.5溶液含有顯著高分子量(HMW)聚集體形式，然而在水中之13C5.5未含有HMW聚集體形式，即使在3個f/t步驟後亦然。

#### 實例17：溶液pH對於WFI中之阿達利母馬之衝擊

進行下述實驗，以測定溶液pH對於經調配在WFI中之高度濃縮阿達利母馬之物理-化學特徵之衝擊。測試下列濃度：2毫克/毫升，50毫克/毫升，100毫克/毫升，150毫克/毫升，200毫克/毫升，及250毫克/毫升。

#### 物料

- 阿達利母馬藥物(DS)，市售物質
- 用於解凍之25°C水浴(循環)
- 滲濾設備：Sartorius Sartocon Slice，薄膜：PES 50 kD，1000平方公分
- 滲濾設備：Millipore Labscale™TFF系統，薄膜：PLCTK 30 kD，再生纖維素，大小：50平方公分
- Eppendorf離心機5810 R
- Amicon Ultra-15容器，用於離心分離，Ultracel-30k，再生纖維素30,000 MWCO
- Millex GV 0.22微米，Millipore，用於試樣之無菌過濾
- 試樣容器(Eppendorf試樣容器1.5毫升，Roth低溫小玻瓶5毫升，PETG瓶子125毫升)



分析：

- pH度量，使用Biothrode
- 密度度量
- 滲透度量
- UV/VIS分光光度計，供蛋白質濃度量
- 光子相關光譜學(PCS)
- 黏度量
- 混濁度量
- 尺寸排阻層析(SEC)
- Fourier變換中紅外線光譜學(FT-M-IR)

#### 17.1關於阿達利母馬市售調配物之DF/UF製備之概論

將阿達利母馬DS溶液(120毫克/毫升)區分成7個體積部份，將其個別以0.25N NaOH與0.25N HCl調整至pH3、pH4、pH5、pH6、pH7、pH8、pH9。然後，將試樣以個別pH之阿達利母馬緩衝劑稀釋至100毫克/毫升。溶液顯現出會於無菌過濾(0.22微米，PVDF無菌濾器)後消失之輕微混濁。於稀釋後，再一次監測pH值(參閱下表27)。

自各溶液抽取下列100毫克/毫升溶液之試樣：

- 4毫升，用於混濁度與後續 $\zeta$ 電位度量
- 1毫升，用於黏度量(使用落球黏度計)
- 0.15毫升，用於滲透度量
- 2毫升，用於密度度量
- 0.15毫升，用於PCS (將試樣黏度納入考量，用於度量)
- 1毫升，用於FT-M-IR
- 2毫升，用於黏度與靜態光散射度量

使關於 $\zeta$ 電位、黏度及靜態光散射度量之試樣冷凍(-80°C)。使pH 4、pH 5、pH 6、pH 7及pH 8溶液之其餘體積接受連續模式滲濾，使用

注射用水作為交換媒質。首先使試樣在-80°C下冷凍。在DF/UF前，使試樣於25°C下，在Julabo水浴中解凍。

## 17.2 DF/UF與濃縮程序

使在市售調配物中之阿達利母馬溶液，其具有100毫克/毫升之濃度，具有4、5、6、7及8之pH程度，接受DF/UF處理，及進一步接受在離心機中使用UF之濃縮程序。此段落係描述pH 6阿達利母馬溶液之處理，作為一項實例。關於其他溶液之處理係以類似方式達成。

使阿達利母馬溶液(100毫克/毫升，pH 6)於25°C下，在水浴中解凍，然後均化。接著，使溶液接受滲濾，使用注射用水作為交換媒質，以TFF設備M.P. 33.4，藉由應用下列參數：

- 攪拌器：速度2
- 泵：速度1
- 壓力上游/入口：2-2.4巴
- 壓力下游/出口：0.6-0.8巴
- 薄膜：再生纖維素，截止值30 kD
- 連續模式DF/UF
- 在DF/UF操作期間施加約6-倍體積交換

於應用6體積交換步驟後，阿達利母馬之濃度係利用OD280、光度計M.P. 9.7測定。檢查滲透液與留存物之滲透度。

濃度：125.1毫克/毫升

滲透液之滲透度：57毫滲透度/公斤

留存物之滲透度：12毫滲透度/公斤

將DF後在水中之阿達利母馬溶液以注射用水稀釋至100毫克/毫升，並殺菌過濾。自DF/UF方法後之100毫克/毫升溶液抽取下列試樣：

- 4毫升，用於混濁度與後續 $\zeta$ 電位度量
- 1毫升，用於黏度度量

- 0.15毫升，用於滲透度度量
- 2毫升，用於密度度量
- 0.15毫升，用於PCS (在度量期間將黏度納入考量)
- 0.15毫升，用於SEC
- pH-度量
- 1毫升，用於FT-M-IR
- 2毫升，用於黏度與靜態光散射度量

將100毫克/毫升阿達利母馬溶液之一部份以注射用水稀釋，以產生50毫克/毫升與2毫克/毫升溶液。自兩種溶液抽取下列試樣：

- 4毫升，用於混濁度與後續 $\zeta$ 電位度量
- 2毫升，用於黏度度量
- 0.15毫升，用於滲透度度量
- 2毫升，用於密度度量
- 0.15毫升，用於PCS (將黏度納入考量)
- pH-度量

使在水中之阿達利母馬溶液(pH 6, 100毫克/毫升)接受使用離心分離之濃度實驗。離心分離係以Eppendorf離心機(5810R M.P. 33.57)進行。各離心步驟均在4000 rpm下應用，歷經15分鐘。然後，試樣溶液在離心機濃縮裝置中之均化係藉由溫和倒置旋轉進行，以使溶液均化，藉以避免在緊鄰薄膜之區域中之凝膠形成。於濃縮期間之溫度為15°C。進行離心分離至約250毫克/毫升。濃度係利用度量OD280、光度計M.P. 9.7測定。接著，將阿達利母馬溶液稀釋至250毫克/毫升、200毫克/毫升及150毫克/毫升之濃度。

於濃縮程序後及於稀釋之各個別步驟後，抽取下列試樣。自250毫克/毫升與150毫克/毫升溶液抽取之試樣體積為：

- 2毫升，用於黏度-度量

- 0.15毫升，用於PCS (將黏度納入考量)
- 0.15毫升，用於滲透度度量
- 0.15毫升，用於SEC
- pH-度量

自200毫克/毫升溶液抽取之試樣體積為：

- 4毫升，用於混濁度與後續 $\zeta$ 電位度量
- 1毫升，用於黏度度量
- 0.15毫升，用於滲透度度量
- 2毫升，用於密度度量
- 0.15毫升，用於PCS (將黏度納入考量)
- 0.15毫升，用於SEC
- pH-度量
- 2毫升，用於欲在ABC下進行之分析工作(黏度與靜態光散射度量)

在水中之阿達利母馬溶液之濃縮處理係在各pH值下，於大約250毫克/毫升下停止，因為阿達利母馬溶液在水中之黏度，於較高濃度下，且尤其是在接近pI之pH值下(對於阿達利母馬為約pH 8.5)，係急驟地增加(接近凝膠形成之黏度)。

### 17.3阿達利母馬溶液之目視檢查

在DF/UF與濃縮至250毫克/毫升後，於不同pH下，在水中之阿達利母馬溶液係顯示比在緩衝劑中之阿達利母馬溶液(市售調配物)較不乳白色。所有在水中之阿達利母馬溶液均顯示如在各pH值下之透明溶液。於稀釋後，阿達利母馬溶液均未顯現出乳白色。整體而言，在濃縮與稀釋程序期間，於水中之阿達利母馬溶液內未發現沉澱作用。

### 17.4黏度

黏度度量係在各個別濃度下進行，將pH 5阿達利母馬溶液之密度

納入考量。使用落球黏度計。高於200 mPa\*s之黏度係使用毛細管黏度計度量。

圖24係提供在水中之阿達利母馬溶液之黏度數據概論，具有範圍為4至8之pH，於不同濃度(2毫克/毫升至250毫克/毫升，於50毫克/毫升濃縮步驟中)下。在溶液pH、濃度及黏度之間有清楚關聯性。黏度係隨著蛋白質濃度之增加而增加，與溶液pH無關。在接近阿達利母馬pI之溶液pH值(意即pH 7與pH 8)下，於溶液黏度上之增加為最顯著，尤其是在較高蛋白質濃度(意即200毫克/毫升，250毫克/毫升)下。

### 17.5混濁度

正如在圖25中所見及者，關於混濁度數據已發現相同趨勢(意即混濁度係隨著漸增濃度及隨著漸增pH而增加)。於混濁度度量前，將所有試樣殺菌過濾(0.22微米)。

### 17.6流體動力學直徑(PCS)

PCS度量係在各濃度下，及在各pH值下進行，將關於各試樣之黏度納入考量。度量在200毫克/毫升與250毫克/毫升下之溶液，但在Zetasizer nano系列(Malvern儀器)設備之測試參數範圍外，且因此得自此等度量之數據未經分析。

在與被調配至市售調配物中之阿達利母馬(Dh約7毫微米)比較下，已發現當阿達利母馬被調配在水中時(Dh約2毫微米，在50毫克/毫升下，pH 5)，流體動力學直徑(Dh)會顯著地降低。圖26係說明PCS數據(亦參閱表39)。相應之數據表係示於下文部份17.11中。

如圖26中所示，對於在4、5及6之pH值下之溶液，阿達利母馬單體之Dh會不斷地隨著增加之蛋白質濃度而降低。對照上而言，當濃度自2毫克/毫升增加至50毫克/毫升時，具有更接近阿達利母馬pI之pH值(意即在pH 7與pH 8下)之溶液，係顯示在Dh上之相當可觀增加。但是，當在pH 7與8溶液中濃度上升超過50毫克/毫升時，Dh係降低。在150

毫克/毫升之濃度下，所有溶液均具有比在2毫克/毫升下之相應pH溶液較低之Dh值。圖27顯示關於不同濃度之pH 5溶液之Dh大小分佈。圖28顯示關於被調配在水中之五種阿達利母馬溶液之Dh大小分佈，各具有100毫克/毫升蛋白質濃度與不同pH值。圖29顯示類似圖28中數據之數據，惟該五種阿達利母馬溶液係被調配在緩衝劑中。

### 17.7 pH-度量

於使用水之DF/UF前後，溶液pH之度量係在100毫克/毫升下進行(意即個別在經調配於緩衝劑與水中之阿達利母馬上進行)。表27係顯示其結果。於DF/UF前後，pH值係保持恒定在pH 5、pH 6及pH 7下。溶液pH不會因為媒質改變而改變。於使用水之DF/UF後，在pH 4下之pH值會稍微地增加，而在pH 8下會稍微地降低。

表27：於使用水之DF/UF前後之pH值

	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
在緩衝劑中之阿達利母馬100毫克/毫升	4.00	4.99	6.00	7.03	8.00
在水中之阿達利母馬100毫克/毫升	4.29	4.98	5.98	7.02	7.67

### 17.8滲透度度量

於pH 5溶液試樣之DF/UF期間，溶液滲透度係在各體積交換步驟後(意即在100毫升滲透液、200毫升滲透液等之後)度量，以檢查5倍體積交換是否足以降低滲透度至低於15毫滲透度/公斤之值。表28係顯示其結果。

表28：在使用水之DF/UF期間之滲透度改變，pH 5溶液

體積交換步驟， 以毫升表示	留存物 毫滲透度/公斤	滲透液 毫滲透度/公斤
100	96	166
200	28	115
300	29	89
400	12	67
500	15	49

於pH 4、pH 6、pH 7及pH 8下，滲透度僅在DF/UF方法結束時度量。表29顯示各pH之滲透度結果(以毫滲透度/公斤單位表示)。

表29：在使用水之DF/UF前後之不同pH值下之滲透度

	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
在緩衝劑中之阿達利母馬100毫克/毫升	287	298	297	286	279
在水中之阿達利母馬100毫克/毫升	40	13	11	5	5

滲透度度量係以凝固點黏度計進行。

### 17.9 斷裂(SEC)

SEC數據顯示在pH 4溶液中之蛋白質之相對顯著斷裂，涵蓋全部濃度範圍(100-250毫克/毫升)，然而在範圍為5至8之pH下，涵蓋相同濃度範圍，幾乎未檢出斷裂。因此，pH 4溶液之單體含量係據此減少(圖30)。已發現聚集值會隨著漸增pH值(自pH 4至pH 8)而增加，與濃度無關(圖31)。

### 17.10 結論

此實驗係經設計，以檢驗溶液pH與蛋白質濃度對於藉由DF/UF處理經調配在水中之阿達利母馬溶液之黏度與Dh (流體動力學直徑)之衝擊。此種溶液係被稱為低-離子性溶液。4-8之pH值範圍係經評估，且所測試之蛋白質濃度係在2與250毫克/毫升間之範圍內。

關於黏度(段落17.4)，已發現低-離子性阿達利母馬溶液具有如於離子(意即離子性賦形劑，譬如有機緩衝劑成份或鹽)存在下經調配之阿達利母馬溶液之相同特徵：

- 蛋白質濃度愈高，溶液黏度愈高。此濃度-黏度關聯性對於具有接近阿達利母馬pI之pH值(意即pH 7與pH 8)之溶液係為較顯著。反之，對於在恒定濃度下之溶液，黏度係與溶液pH值之接近阿達利母馬pI有關聯。

關於DLS數據(段落17.6)，可得出下述結論：

- 已發現藉由低離子性阿達利母馬溶液之DLS所測得之阿達利母馬Dh值，係低於阿達利母馬市售調配物中所度量之Dh值，尤其是在極低溶液pH下。

- 溶液pH愈低，藉由DLS所測得之Dh值愈低。
- 蛋白質濃度愈高，在特定pH之低-離子性阿達利母馬溶液中之Dh值愈低。

關於此行為之解釋為在蛋白質溶液中之離子強度(意即離子與可離子化賦形劑之存在)對於蛋白質-蛋白質交互作用之程度係具決定性。尤其是在較低溶液pH下，電荷-電荷排斥在低離子性阿達利母馬溶液中係較顯著。當蛋白質在DF/UF處理中利用水作為交換媒質被調配在水中時，可組成Helmholtz層與Gouy-Chapman層兩者之所存在可離子化抗衡離子之量係顯著地被降低。因此，分子間電荷-電荷交互作用(由於存在於蛋白質表面上之胺基酸殘基之電荷所致)可比在其中可離子化抗衡離子(例如可離子化賦形劑)為很多之環境中更顯著，且在蛋白質單體間之電荷-電荷排斥(在電荷-電荷排斥之情況下會導致分子運動)與隨機布朗運動係有助於藉由DLS所度量蛋白質分子之移動性/運動。在DLS實驗中，較大分子移動性係被轉化成較大分子擴散係數，其係通常經由使用史托克斯-愛因斯坦方程式而被指定至具有較小流體動力學大小之分子。這可解釋蛋白質之流體動力學直徑為何在低-離子性調配物中被降低。

在抗體分子間之電荷-電荷交互作用可為排斥性(在較低溶液pH下)與吸引力(在接近蛋白質pI之較高溶液pH下)。

### 17.11數據表

表30：

在DF前於緩衝劑中之阿達利母馬100毫克/毫升對水							
	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
混濁度(NTU)	9.9	15.4	28.5	36.3	45.0	48.4	46.5
黏度(mPa*s)	2.5197	2.7935	3.2062	3.1512	3.5116	3.5494	3.5844
黏度(平方毫米/秒)	2.4366	2.6991	3.0969	3.0444	3.3893	3.4261	3.4589
密度(克/立方公分)	1.0341	1.0350	1.0353	1.0351	1.0361	1.0360	1.0363
滲透度(毫滲透度/公斤)	293	287	298	297	286	279	285
Z-Ave d (毫微米) PCS	4.3	4.3	6.0	7.3	7.7	8.0	7.8
pH		4.00	4.99	6.00	7.03	8.00	9.03



表31：

在DF後之阿達利母馬對水，在濃縮，以水稀釋至以下之前			
	pH4 2毫克/毫升	pH4 50毫克/毫升	pH4 100.5毫克/毫升
混濁度(NTU)	0.296	1.46	3.30
黏度(mPa*s)	0.9653	1.4471	2.2411
黏度(平方毫米/秒)	0.9665	1.4298	2.1834
密度(克/立方公分)			
滲透度(毫滲透度/公斤)			40
Z-Ave d (毫微米) PCS	3.37	2.24	1.81
pH			4.29
在濃縮及以水稀釋至以下後之阿達利母馬			
	pH4 150.5毫克/毫升	pH4 219.0毫克/毫升	pH4 251.8毫克/毫升
混濁度(NTU)		3.56	
黏度(mPa*s)	4.0283	13.304	48.642
黏度(平方毫米/秒)	3.8712	12.614	45.567
密度(克/立方公分)			
滲透度(毫滲透度/公斤)	64	96	141
Z-Ave d (毫微米) PCS	1.32	0.458	0.162
pH	4.32		4.54
在DF後之阿達利母馬對水，在濃縮，以水稀釋至以下之前			
	pH5 2毫克/毫升	pH5 50毫克/毫升	pH5 97.5毫克/毫升
混濁度(NTU)	0.02	1.66	3.54
黏度(mPa*s)	1.0563	1.6664	2.8661
黏度(平方毫米/秒)	1.0576	1.6465	2.7924
密度(克/立方公分)	0.9988	1.0121	1.0264
滲透度(毫滲透度/公斤)			13
Z-Ave d (毫微米) PCS	157	32.4	1.3
pH	4.55	4.83	4.98
在濃縮及以水稀釋至以下後之阿達利母馬			
	pH5 150.7毫克/毫升	pH5 200.2毫克/毫升	pH5 253.0毫克/毫升
混濁度(NTU)		7.24	
黏度(mPa*s)	7.0866	19.539	79.272
黏度(平方毫米/秒)	6.8102	18.525	74.26
密度(克/立方公分)	1.0406	1.0547	1.0675
滲透度(毫滲透度/公斤)	78	80	96
Z-Ave d (毫微米) PCS	0.727	0.335	0.255
pH	5.03	5.05	5.08

表 32 :

在DF後之阿達利母馬對水, 在濃縮, 以水稀釋至以下之前			
	pH6 2毫克/毫升	pH6 50毫克/毫升	pH6 100毫克/毫升
混濁度(NTU)	0.458	2.24	2.95
黏度(mPa*s)	1.0696	1.8003	3.1147
黏度(平方毫米/秒)	1.0708	1.7789	3.0385
密度(克/立方公分)	0.9989	1.012	1.0251
滲透度(毫滲透度/公斤)	3+11=14:2=7	27	11
Z-Ave d (毫微米) PCS	30.8	2.78	2.48
pH	5.72	5.95	5.98

表 33 :

在濃縮及以水稀釋至以下後之阿達利母馬			
	pH6 146.6毫克/毫升	pH6 201.8毫克/毫升	pH6 248.5毫克/毫升
混濁度(NTU)		9.29	
黏度(mPa*s)	9.0193	32.352	126.06
黏度(平方毫米/秒)	8.6775	30.709	118.07
密度(克/立方公分)	1.0394	1.0535	1.0677
滲透度(毫滲透度/公斤)	37	58	95
Z-Ave d (毫微米) PCS	0.989	0.355	0.108
pH	5.92	6.05	6.03

表 34 :

在DF後之阿達利母馬對水, 在濃縮, 以水稀釋至以下之前			
	pH7 2毫克/毫升	pH7 50毫克/毫升	pH7 103.2毫克/毫升
混濁度(NTU)	0.1	7.13	14.9
黏度(mPa*s)	1.1252	1.6898	4.2257
黏度(平方毫米/秒)	1.1268	1.6688	4.1146
密度(克/立方公分)	0.9986	1.0126	1.027
滲透度(毫滲透度/公斤)	0	2	5
Z-Ave d (毫微米) PCS	3.31	4.16	2.89
pH	6.63	6.93	7.02

表 35 :

在濃縮及以水稀釋至以下後之阿達利母馬			
	pH7 143.0毫克/毫升	pH7 203.4毫克/毫升	pH7 251.7毫克/毫升
混濁度(NTU)		19.3	
黏度(mPa*s)	14.024	74.987	343.881
黏度(平方毫米/秒)	13.492	70.928	321.144
密度(克/立方公分)		1.0571	1.0708
滲透度(毫滲透度/公斤)	65	106	160
Z-Ave d (毫微米) PCS	1.27	0.346	0.0876
pH	6.9	7.01	7.2

表 36

在DF後之阿達利母馬對水，在濃縮，以水稀釋至以下之前			
	pH8 2毫克/毫升	pH8 50毫克/毫升	pH8 96.1毫克/毫升
混濁度(NTU)	0.41	12.10	28.300
黏度(mPa*s)	1.261	1.8444	4.3486
黏度(平方毫米/秒)	1.2625	1.8224	4.2368
密度(克/立方公分)			
滲透度(毫滲透度/公斤)			5
Z-Ave d (毫微米) PCS	5.59	5.62	4.28
pH			7.67

表 37 :

在濃縮及以水稀釋至以下後之阿達利母馬			
	pH8 148.5毫克/毫升	pH8 200.6毫克/毫升	pH8 230.7毫克/毫升
混濁度(NTU)		32.5	
黏度(mPa*s)	20.102	85.5	233.14
黏度(平方毫米/秒)	19.318	81.066	218.04
密度(克/立方公分)			
滲透度(毫滲透度/公斤)			
Z-Ave d (毫微米) PCS	1.42	0.398	0.168
pH		7.6	

表 38 :

PCS數據：在緩衝劑中之阿達利母馬									
	Z-Ave d.毫微米	PDI	Pk1 d.毫微米	Pk1 面積%	Pk2 d.毫微米	Pk2 面積%	Pk3 d.毫微米	Pk3 面積%	
pH 3 100毫克/毫升	4.23	0.283	4.43	86.4	54.1	13.6	0	0	
pH 4 100毫克/毫升	4.3	0.101	4.81	100	0	0	0	0	
pH 5 100毫克/毫升	6.01	0.065	6.5	100	0	0	0	0	
pH 6 100毫克/毫升	7.25	0.063	7.82	100	0	0	0	0	
pH 7 100毫克/毫升	7.64	0.094	8.53	100	0	0	0	0	
pH 8 100毫克/毫升	7.95	0.099	8.88	100	0	0	0	0	
pH 9 100毫克/毫升	7.7	0.133	8.98	100	0	0	0	0	

表 39 :

PCS數據：在水中之阿達利母馬									
	Z-Ave d.毫微米	PDI	Pk1 d.毫微米	Pk1 面積%	Pk2 d.毫微米	Pk2 面積%	Pk3 d.毫微米	Pk3 面積%	
pH 4 2毫克/毫升	3.37	0.219	3.39	88.8	73.3	11.2	0	0	
pH 4 50毫克/毫升	2.24	0.194	2.65	97.7	3300	2.3	0	0	
pH 4 100.5毫克/毫升	1.81	0.172	2.02	97.4	3390	2.6	0	0	
pH 4 150.5毫克/毫升	1.32	0.181	1.64	100	0	0	0	0	
pH 4 219.0毫克/毫升	0.458	0.217	4070	62	0.621	38	0	0	
pH 4 251.8毫克/毫升	0.162	0.263	0	0	0	0	0	0	

pH 5 2毫克/毫升	157	0.468	1.88	84.3	181	10.7	17	5	
pH 5 50毫克/毫升	32.4	0.17	1.6	87.7	15.5	4.8	186	4.7	
pH 5 97.4毫克/毫升	1.32	0.183	1.52	97.4	3290	2.6	0	0	
pH 5 150.7毫克/毫升	0.931	0.209	1.36	98.7	3710	1.3	0	0	
pH 5 200.2毫克/毫升	0.335	0.203	0	0	0	0	0	0	
pH 5 253.0毫克/毫升	0.107	0.255	0	0	0	0	0	0	

pH 6 2毫克/毫升	30.8	0.382	2.78	60.9	273	30.2	5070	5	
pH 6 50毫克/毫升	2.78	0.247	2.68	86.4	1600	7.8	114	5.8	
pH 6 100毫克/毫升	2.01	0.171	2.48	100	0	0	0	0	
pH 6 146.6毫克/毫升	0.989	0.219	1.32	96.9	3770	301	0	0	
pH 6 201.8毫克/毫升	0.355	0.231	0	0	0	0	0	0	
pH 6 248.5毫克/毫升	0.108	0.301	0	0	0	0	0	0	

pH 7 2毫克/毫升	3.31	0.211	3.58	93.9	1250	6.1	0	0	
pH 7 50毫克/毫升	4.16	0.132	4.84	100	0	0	0	0	
pH 7 103.2毫克/毫升	2.89	0.141	3.39	100	0	0	0	0	
pH 7 143.3毫克/毫升	1.27	0.212	1.68	100	0	0	0	0	
pH 7 203.4毫克/毫升	0.346	0.306	0	0	0	0	0	0	
pH 7 251.7毫克/毫升	0.0876	0.497	0	0	0	0	0	0	

pH 8 2毫克/毫升	5.59	0.365	3.15	67.4	244	30.2	26.5	2.4	
pH 8 50毫克/毫升	5.62	0.174	7	100	0	0	0	0	
pH 8 96.1毫克/毫升	4.28	0.192	4.81	96.9	3640	3.1	0	0	
pH 8 148.5毫克/毫升	1.43	0.253	1.68	93.9	2910	6.1	0	0	
pH 8 200.6毫克/毫升	0.398	0.246	4920	100	0	0	0	0	
pH 8 230.7毫克/毫升	0.168	0.3	0	0	0	0	0	0	

表40：SEC數據

pH	濃度毫克/毫升	%聚集體	%單體	%片段	面積(mVs)
4	100	0.28	67.95	31.76	45195.348
4	150	0.26	66.07	33.68	44492.803
4	200	0.30	64.59	35.11	52558.050
4	250	0.29	64.40	35.31	48491.299
5	100	1.46	98.44	0.11	48127.249
5	150	1.33	98.56	0.11	43226.397
5	200	1.39	98.50	0.11	43634.282
5	250	1.38	98.52	0.11	41643.062
6	100	2.00	97.90	0.10	44338.373
6	150	2.52	97.37	0.11	41899.182
6	200	2.52	97.37	0.11	43869.183
6	250	2.39	97.50	0.11	34969.456
7	100	2.78	97.12	0.10	46194.824
7	150	4.24	95.65	0.11	47443.014
7	200	3.61	96.29	0.10	41916.220
7	250	3.39	96.50	0.11	38185.208
8	100	3.24	96.65	0.12	42334.491
8	150	3.64	96.18	0.18	40305.890
8	200	3.63	96.25	0.13	40280.342
8	250	3.76	96.05	0.19	32067.297

**實例18：pH對於J695黏度之衝擊**

黏度數據係對J695在使用水作為交換媒質之DF/UF處理後產生。使J695 DS (參閱實例1)對著水滲濾，應用至少5個DF/UF步驟。然後，黏度係在不同溫度下，使用平板-平板黏度計，100 rpm剪切速率，150微米間隙，60毫米板直徑(設備：Bohlin Geminim黏度計(Malvern儀器 Southborough, MA)，評估之溫度範圍8-25°C)測定。

正如在圖32中所見及者，個別在179毫克/毫升與192毫克/毫升之濃度下，J695溶液黏度在12°C下係低於70 cP，在20°C下低於40 cP，及在25°C下低於30 cP。

**實例19：在純水中之抗體之藥物動力學(PK)**

此項研究之目標係為評估調配物參數(意即含有水之低離子性蛋白質調配物對使用離子性賦形劑譬如緩衝劑與鹽之習用蛋白質調配物)對於皮下(s.c)服用阿非利莫馬(Afelimomab)後之局部耐藥性與PK之可能衝擊。此外，調配物之系統毒性與毒性動力學數據係經研究。

所使用之蛋白質濃度範圍為50毫克/毫升至200毫克/毫升，且離子強度範圍為3 mOsm/公斤至300 mOsm/公斤。

單一(s.c)劑量可行性研究係在雄性史泊格多利(Sprague-Dawley)大白鼠中，以阿非利莫馬(Afelimomab)(MAK195F-老鼠抗人類TNF F(ab')<sub>2</sub> (Abbott實驗室))進行，以在皮下投予50與200毫克/公斤下之液體調配物後之大白鼠中評估阿非利莫馬(Afelimomab)之局部耐藥性與毒性。單一皮下劑量係接著為觀察/恢復期。進行有限血液取樣，以度量循環之阿非利莫馬含量，且評估吸收與半生期。所投予之劑量體積為1毫升/公斤體重。實驗組包括下列：

#### 實驗組

- 01 對照組(媒劑)
- 02 50毫克/毫升阿非利莫馬，液體，標準調配物
- 07 200毫克/毫升阿非利莫馬，液體，LOS-調配物

組群A 觀察期2天

組群B 觀察期7天

組群C 觀察期14天

#### 分類與大白鼠確認(每組N=1)

組群	動物數目		
	組群A	組群B	組群C
01	1	2	3
02	4	5	6
07	19	20	21

在第1天，於投藥過後15分鐘、1, 3, 5及24小時下，及然後每日至少一次重複觀察動物關於臨床跡象與死亡率。體重係在服藥(第1天)與檢驗屍體(個別在第3、15或21天)之日子及每週兩次度量，若可應用時。供藥物分析之血液試樣係在第1天(投藥過後4小時)，以及在第2、3、5、8及15天收集，按可應用情況而定。於檢驗屍體之前，收集血液，

並評估血液學與臨床化學參數。於檢驗屍體之前，製備每隻動物之血液塗片。在檢驗屍體時，進行體腔之大體檢查。器官重量度量係在肝臟、腎臟、胸腺、脾臟及淋巴節上進行。初步組織病理學係在注射位置上，以及在肝臟、腎臟、胸腺、脾臟及淋巴節上進行。

全部動物均存活於研究中，直到預定之檢驗屍體為止。被投予水調配物之大白鼠於第14至15天顯示在頸區域中之結硬疤。未發現對於體重之試驗項目相關之作用。血液學與臨床化學值為可改變。無明顯地試驗項目相關之改變在血液學或臨床化學中被確認。在尿分析法中未發現試驗項目相關之改變。器官重量之度量會造成器官重量中之高變異性，及無明顯地試驗項目相關之改變。

於總體觀察時，在注射區域上之皮下組織紅腫係於第3天，在接受水調配物之大白鼠中發現。所有其他改變均歸屬於此品種與年齡之史泊格多利(Sprague-Dawley)大白鼠中一般所見及之自然發現之範圍。

微觀發現如下述：

- 在組群01、02中沒有發現
- 在組群07中之最低擴散皮下發炎
- 在組群07中，關於總病理學，與紅腫有關聯之病灶皮下出血(第3天)，被認為是投藥相關
- 泛-T、抑制劑/細胞毒性T細胞/天然殺傷細胞、泛-B細胞及泛-巨噬細胞標記物對於局部反應之初步免疫組織化學結果主要顯示巨噬細胞與天然殺傷細胞涉及皮下發炎/浸潤。因此，至目前為止，對於所使用調配物之局部致免疫回應沒有暗示。

所有其他改變均歸屬於此品種與年齡之史泊格多利(Sprague-Dawley)大白鼠中一般所見及之自然發現之範圍。

在皮下投予阿非利莫馬(Afelimomab)之後，吸收顯示為快速，其中於注射後0.2-3天達到最高血清含量。在所測試全部試樣中，阿非利

莫馬(Afelimomab)之絕對含量很低。於試樣之間發現大變異性，可能是因有限取樣頻率與所使用之低動物數。在大部份試樣中，於5-8天後，無阿非利莫馬(Afelimomab)可在血清中檢出。於血清含量上之此降低可能是由於F(ab')<sub>2</sub>之高清除率所致。關於大部份試樣所發現之T<sub>1/2</sub>係在1-2天之範圍內，與先前觀察一致。低-離子性調配物之較長半生期(7.8天)可反映試樣之延長吸收。數據係於表41與42中提出。

表41：MAK195F之血漿曝露含量

	時間(天)	濃度(微克/毫升)			平均 (微克/毫升)	STD
		大白鼠4	大白鼠5	大白鼠6		
50毫克/公斤 液體標準調配物	0.167	1.40	1.17	1.38	1.32	0.13
	2	0.76	0.97	0.66	0.80	0.16
	3	0.45	0.67	0.47	0.53	0.12
	5		LLOQ	LLOQ	LLOQ	
	8		LLOQ	LLOQ	LLOQ	
	15			LLOQ	LLOQ	

	時間(天)	濃度(微克/毫升)			平均 (微克/毫升)	STD
		大白鼠19	大白鼠20	大白鼠21		
200毫克/公斤 水調配物	0.167	1.27	3.01	3.17	2.48	1.05
	2	0.17	1.57	1.53	1.09	0.80
	3	LLOQ	1.54	1.56	1.55	0.02
	5		0.64	0.66	0.65	0.02
	8		0.40	0.37	0.38	0.02
	15			0.25	0.25	0.00

LLOQ = 低於定量極限

關於液體沒有聚集狀態發現，既非阿非利莫馬亦非對照組物質。

對於低-離子強度調配物，發現最低擴散皮下注射位置發炎。發炎，無論是最低至輕微，或輕微至中等，係被發現伴隨著增加之蛋白質濃度(個別為50毫克/毫升與200毫克/毫升)。發現一些局部皮下出血，與總病理學上之紅腫有關聯；此係被認為是在注射期間血管穿刺之結果。關於水調配物，在第3天發現於注射位置上之一些皮下紅腫，但不被認為是有害。整體而言，該調配物於局部上為容許的。

在下表42中，提出習用液體調配物對水調配物之PK數據。



表42：在不同調配物中，於皮下服藥後之MAK 195F之藥物動力學參數

劑量 (毫克/ 公斤)	調配物	半生期 (天)	Tmax (天)	Cmax (微克/ 毫升)	AUC (天*微克/ 毫升)	平均 滯留時間 (天)	最後 可偵測 濃度之 時間(天)	最後 可偵測 之濃度 (微克/毫升)
50	液體	0.5	0.2	1.32	3.3	1.5	3	0.53
200	水調配物	5.9	0.2	2.48	11.8	7.5	15	0.25

以低離子性調配物(意即經調配在水中之阿非利莫馬(Afelimomab))見及可偵測血清含量於延續時間上之增加，如在表42中所見及者。

於此項研究中，在低離子性溶液(水)中之MAK195F之所發現絕對含量係提供較佳曝露、較長可偵測血清含量及"半生期"，勝過在習用MAK 195F液體調配物中。

阿非利莫馬半生期於標準調配物中係在1-2天之範圍內，與關於F(ab')<sub>2</sub>分子之先前觀察一致。但是，關於低-離子性調配物發現表面上較長半生期(7.8天)。因此，與所測試之標準調配物比較，在此調配物中之MAK 195F之平均滯留時間顯示為較長。

#### 實例20：2.5(E)mg1 (抗IL-18抗體)之DF/UF

進行2.5(E)mg1整體溶液(59.6毫克/毫升)之滲濾/超過濾(連續模式)，應用約4-倍體積交換，使用注射用水(於下文中稱為"水")。DF/UF操作係藉由監測留存物之混濁度、蛋白質濃度(OD280)、pH及溶質度與DLS度量而加以控制。在DF/UF期間，滲透液溶質度亦經監測，以控制2.5(E)mg1整體溶液之賦形劑降低。

#### 物料與方法

- 2.5(E)mg1整體藥物(甲硫胺酸、組胺酸、不含聚花楸酸酯80)(Abbott Bioresearch Center, Worcester MA)：具有總共589.12克溶液之2個PETG瓶，溶液濃度59.6毫克/毫升。

- Ampuwa (注射用水) (Fresenius醫療照顧, Waltham, MA)。
- Millipore實驗室規模TFF DF/UF單元，包括2 x Pellicon XL過濾卡匣，Millipore，PLCTK 30 kDa薄膜，再生纖維素
- UV/VIS分光光度計，Specord 50，使用280毫微米波長
- Metrohm pH計，類型744，具有Biotrode探測物編號57
- 滲透壓計：Knauer，K-7400
- 密度度量，使用Paar之設備，DMA 4100
- 層狀空氣流動箱Hereaus
- 混濁度量：Hach，2100AN
- 黏度計：Paar，AMVn
- 規模：Mettler Toledo、AT261及33.45
- 濾器：Millex AP 20 (玻璃纖維)與Minisart高流動性濾器(纖維素醋酸酯)，0.20微米孔隙大小。

## 20.1實驗程序

2.5(E)mg1 DS試樣之解凍：使含有冷凍DS之2升PETG瓶於23°C下，使用循環水浴，在2小時內解凍。經解凍之DS為透明、微乳白色及不含可見粒子。

DS藉由DF/UF之濃縮：由於530毫升之DF/UF單元儲器體積限制，故使2.5(E)mg1 DS濃縮至最後體積為525毫升。

使用水之DF/UF (緩衝劑交換)：使DS (甲硫胺酸、組胺酸、2.5(E)mg1)接受DF/UF，應用4-倍體積交換。表43係給予在整個實驗中使用之水量，而表44係提供實驗參數。

表43：DF/UF水體積交換

體積交換	所使用水之體積 (累積)
1-倍	576毫升
2-倍	1152毫升
3-倍	1728毫升
4-倍(實驗結束)	2304毫升

表44：DF/UF程序參數

實驗室規模TFF DF	設定
泵送速度	1.5-2
泵送壓力	20-30 psi
攪拌速度	~3
實驗延續時間	8小時

滲透液之溶質度度量係在所處理之約每200毫升滲透液下進行。

在對著水之DF/UF後，2.5(E)mg/l溶液之體積為450毫升，且蛋白質濃度為76.6毫克/毫升。然後，使含有基本上溶解於水中之2.5(E)mg/l之此溶液濃縮。

表45：關於溶液濃縮之DF/UF製程參數

實驗室規模TFF UF	設定
泵送速度	1.5-2
泵送壓力	最大30 psi
攪拌速度	~3
實驗延續時間	51分鐘
溶液之最後重量：	257.83克

使經濃縮之溶液(~130毫克/毫升)接受0.2微米過濾。使溶液冷卻至2-8°C，然後儲存於-80°C下。

20.2在2.5(E)mg/l之DF/UF期間所收集之數據

表46：進行中對照組數據

DF步驟	體積 [毫升]	時間	溫度溶液/ 室溫[°C]	混濁度 [NTU]	pH	滲透度 [毫滲透度/ 公斤]	濃度 [毫克/ 毫升]
2.5(E)mg/l				14.5	5.91	150	59.6
0 <sup>1</sup>	0	08:00	19.0/24.1	N/A	5.91	125	65.2
1	575	10:02	24.4/24.4	10.1	5.92	50	70.1
2	1150	11:50	24.3/24.7	6.67	5.94	16	72.8
3	1730	13:50	25.0/24.8	6.55	5.97	6	74.6
約4	2200	15:35	25.8/25.5	10.1	5.97	5	76.7

表47：滲透液之滲透度(在處理期間分級分離與度量)

試樣 編號	時間	溫度溶液/ 室溫[°C]	滲透液 [毫升]	累積滲透液 [毫升]	DF/UF 步驟之數目	滲透度 [毫滲透度/ 公斤]
0 <sup>3</sup>	07:35	N/A	90	N/A	N/A	125
1	08:00	19.0/24.1	200	200	0.3	124
2	08:50	23.0/24.1	200	400	0.7	82
3	09:27	24.0/24.2	200	600	1.0	53
4	10:12	24.4/24.4	200	800	1.4	37
5	10:50	24.5/24.3	200	1000	1.7	25
6	11:25	24.6/24.3	200	1200	2.1	16
7	12:10	24.7/24.3	230	1430	2.5	7
8	12:55	24.7/24.4	170	1600	2.8	4
9	13:25	24.8/24.4	200	1800	3.1	2
10	14:15	25.1/24.8	200	2000	3.5	0
11	14:55	25.8/25.5	200	2200	3.8	1

表48：在緩衝劑交換後之2.5(E)mg/l溶液之濃度

時間	溶液溫度 [°C]	在儲器中之體積 (意即留存物)[毫升]	pH
15:54	25.9	450	5.94
16:02	26.1	400	5.96
16:07	26.1	375	5.96
16:20	26.2	350	5.96
16:28	26.3	300	5.98
16:35	26.5	275	5.98
16:45	26.5	250	5.99

表49：經濃縮2.5(E)mg/l溶液(0.2微米過濾前後)之分析特徵鑒定：

參數	批料	
	在過濾前	在過濾後
混濁度[NTU]	15.4	9.58
滲透度[毫滲透度/公斤]	6	N/A
密度[克/毫升]	1.0346	N/A
pH	5.99	N/A
動態黏度(25°C) [mPas]	N/A	7.9998

表50：在DF/UF期間之動態光散射數據(存在於溶液中之所有試樣之單體Dh與Dh=Dh之z-平均值之測定)

DLS數據	試樣抽取					
	DV 1-倍	DV 2-倍	DV 3-倍	DV 4-倍	在濃縮後	在過濾後
吸收峰1 直徑單體 強度[%] Z-平均[毫微米] Pdl	4.32 100.0 3.95 0.077	3.68 100.0 3.28 0.106	3.54 100.0 3.20 0.094	3.48 89.6 3.53 0.245	2.03 87.0 2.12 0.287	2.13 100.0 1.89 0.113
吸收峰2 直徑[毫微米] 強度[%]	N/A	N/A	N/A	984 10.4	411 11.8	N/A
吸收峰3 直徑[毫微米] 強度[%]	N/A	N/A	N/A	N/A	4260 1.2	N/A

### 20.3 討論

實驗証實2.5(E)mg/l (在甲硫胺酸、組胺酸中經緩衝)可基本上於較高濃度下被調配在水中(於130毫克/毫升下未發現溶解度限制)。使用水3次體積交換後，滲透液與留存物之滲透度係低於10毫滲透度/公斤，証實緩衝劑賦形劑已被有效地降低。2.5(E)mg/l溶液之乳白色係在使用水之DF/UF期間被降低(最適宜外觀)，亦藉由DS起始溶液14.5、3-倍體積交換之後6.55、4-倍體積交換之後10.5之降低混濁度值(濁度測定混濁度單位(NTU)反映出。

如以其他抗體所見及，當藉DLS測定時，流體動力學直徑係降低，此係由於賦形劑降低所致(分子間電荷-電荷排斥增加至隨機布朗運動，而造成較高分子移動性，係轉化成所計算之較低Dh值)。2.5(E)mg/l 溶液之pH值基本上係與DF/UF操作之前(pH 5.94)與之後(pH 5.99)相同。

如藉由DLS監測所証實，2.5(E)mg/l在DF/UF操作期間仍然保持安定。未檢出在高分子量試樣上之實質增加。

#### 實例21：經調配在水中之阿達利母馬之製備及其安定性研究

下述實例係描述包含源自上文實例中所述方法之阿達利母馬之調配物安定性，意即阿達利母馬係成功地被滲析至水中。

##### 物料與方法

使3323.6克阿達利母馬溶液(71.3毫克/毫升)使用純水滲濾。與純水7-倍體積交換後(理論賦形劑降低，99.9%)，將蛋白質溶液個別稀釋/超過濾至220與63毫克/毫升之最後標的濃度。進行PH、滲透度、黏度、導電率、PCS、目視檢查及蛋白質濃度量(OD280)，以監測DF/UF處理後之蛋白質狀態。

於DF/UF處理後，將蛋白質溶液殺菌過濾(0.22微米Millipak-60與Millipak-200薄膜濾器)，並接著填入裝有27.5G RNS針頭與無菌BD HyPak BSCF 4432/50塞子之BD HyPak SCF™1毫升長注射器中。充填體積為每注射器約0.825毫升。

於充填後，將注射器個別儲存於2-8°C、25°C及40°C下，並按下文描述之試樣抽取綱要中所指示進行分析。

- 阿達利母馬藥物(阿達利母馬消光係數280毫微米：1.39毫升/毫克公分)：藥物未含有聚花楸酸酯80。DS緩衝劑，pH 5.38。
- Sortorius Sartocoon Slice滲濾系統，裝有Ultrasert PES薄膜卡匣(50 kDa與30 kDa截止值)。Sartocoon Slice系統係根據Sortorius

操作說明書，於環境溫度下，以連續模式操作。

- pH電極
- PerkinElmer UV可見分光光度計， $\lambda 35$ ，係用於蛋白質濃度度量(280毫微米波長)。用後即棄UV比色杯，1.5毫升，半微量分析，聚(甲基丙烯酸甲酯) (PMMA)，係用於濃度度量。
- 經滅菌之注射用水歐洲藥典/美國藥典係作為DF/UF媒質使用。
- Vogel滲透壓計OM815係用於滲透度度量(以400毫滲透度/公斤NaCl校準溶液校準，物件編號Y1241, Herbert Knauer GmbH, Berlin, Germany)。
- Anton Paar微黏度計，類型AWVn，係根據Anton Paar操作說明書，用於蛋白質溶液之黏度評估。黏度係於20°C下評估。
- InoLab Cond Level2 WTW裝置係用於經正規化至25°C之導電率度量。
- Malvern儀器Zetasizer nano ZS係應用標準方法，用於測定Z-平均值。度量係於25°C下，使用藉由落球黏度測定法(Anton Paar微黏度計，類型AWVn，於25°C下)所獲得之黏度數據進行。

### *HPLC方法*

- 阿達利母馬，SEC分析：交聯葡聚糖(Sephadex) 200管柱(Pharmacia目錄編號175175-01)。流動相20 mM磷酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 7.5，0.5毫升/分鐘流率，環境溫度，偵測UV 214毫微米與280毫微米。將各試樣以Milli-Q水稀釋至1.0毫克/毫升，注射試樣裝填量50微克(重複注射)。
- 阿達利母馬，IEC分析：Dionex，Propac WCX-10管柱(p/n 054993)，伴隨著相應之防護管柱(p/n 054994)。分離條件：流動相A：10 mM磷酸鈉，pH 7.5；流動相B 10 mM磷酸鈉，500 mM氯化鈉，pH 5.5。1.0毫升/分鐘流率，環境溫度。將各試樣

以Milli-Q水稀釋至1.0毫克/毫升，注射試樣裝填量100微克，  
重複注射。

### 蛋白質濃度之計算

計算式：

$$E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\varepsilon \times d}$$

- $\varepsilon$  - 吸收係數  
 $c$  - 濃度  
 $d$  - 光線必須通過之比色杯長度  
 $E$  - 吸光率  
 $I_0$  - 最初光強度  
 $I$  - 通過試樣後之光強度

$$\varepsilon_{\text{阿達利母馬}} = 1.39 \frac{\text{毫升}}{\text{毫克} \times \text{公分}}$$

(Adalimumab)

### 試樣抽取綱要

將所製成溶液之試樣儲存於下文列示之溫度下，並在研究開始之後，於所指示之時間點下抽取(x)。

溫度	T0	1 m	3 m
5°C	-	x	x
25°C	x	x	x
40°C	-	x	x

試驗參數	試驗方法
可見粒子	類似DAC (EA 4.43)
亞可見粒子	類似歐洲藥典/美國藥典EA 4.44
混濁度	類似歐洲藥典(EA 4.42)
顏色(目視)	歐洲藥典(EA 4.50)
pH	歐洲藥典(EA 4.24)
尺寸排阻HPLC	描述於上述內文中
陽離子交換HPLC	描述於上述內文中



## 阿達利母馬之DF/UF處理

表51係描述滲濾後之阿達利母馬特徵。

**表51**

試樣	蛋白質濃度 [毫克/毫升]	pH	滲透度 [毫滲透度/ 公斤]	黏度 [cP]	目視檢查	導電率 [ $\mu$ S/ 公分]	PCS [Z-平均/ d.毫微米]
高濃度	220	5.57	26	27.9	微乳白色, 基本上不含 可見粒子	1167	0.34
低濃度	63	5.44	5	1.8	微乳白色, 基本上不含 可見粒子	522	1.85

在不同溫度程度下，於儲存時之阿達利母馬特徵鑒定，包括透明性與乳白色、液體之顯色程度、SEC，係描述於附錄D中。

### 結論

上文實例係提供滲濾/超過濾(DF/UF)實驗，其中水(經滅菌之注射用水歐洲藥典/美國藥典)係作為單株抗體阿達利母馬之滲濾媒質使用。

使阿達利母馬接受DF/UF處理，利用純水作為DF/UF交換媒質，並在pH 5.57下，於高濃度(220毫克/毫升)下，及在pH 5.44下，於較低濃度(63毫克/毫升)下調配，而不會引致溶液混濁、嚴重乳白色或混濁度形成。

將得自DF/UF實驗之阿達利母馬在2-8°C、25°C及40°C下，於SCF注射器中儲存3個月。所獲得之數據係指向蛋白質之有利整體安定性。

總而言之，使用純水作為DF/UF交換媒質處理與調配蛋白質係為可行。假定理想100%賦形劑薄膜滲透性，約99.9%最高賦形劑降低可經估計。

**實例22：使用非離子性賦形劑之經調配在水中之阿達利母馬之安定性研究**

下述實例係描述調配物之安定性研究，該調配物含有抗體，意即阿達利母馬，在水中，伴隨著其他非離子性賦形劑。

### 物料與方法

阿達利母馬物質係與實例21 (DF/UF處理)中相同。於DF/UF處理後，蛋白質溶液係按表52中所表示經調配。甘露醇係選自糖醇類之組群，例如甘露醇、花楸醇等作為實例。蔗糖係選自糖類之組群，例如蔗糖、海藻糖、植物蜜糖、麥芽糖等作為實例。聚花楸酸酯80係選自非離子性界面活性劑之組群，例如聚花楸酸酯80、聚花楸酸酯20、普洛尼克(pluronic) F68等，作為實例。對於任何調配物，係製備~10.7毫升。在製備後，對任何調配物進行滲透度、黏度及PCS度量。

表 52

最後蛋白質濃度	甘露醇 (毫克/毫升)	蔗糖(毫克/毫升)	聚花楸酸酯80 (% w/w)	試樣名稱
50毫克/毫升	50	---	---	LI50/01
50毫克/毫升	---	80	---	LI50/02
50毫克/毫升	50	---	0.01	LI50/03
50毫克/毫升	---	80	0.01	LI50/04
50毫克/毫升	50	---	0.1	LI50/05
50毫克/毫升	---	80	0.1	LI50/06
50毫克/毫升	---	---	0.01	LI50/07
50毫克/毫升	---	---	0.1	LI50/08
200毫克/毫升	50	---	---	LI200/01
200毫克/毫升	---	80	---	LI200/02
200毫克/毫升	50	---	0.01	LI200/03
200毫克/毫升	---	80	0.01	LI200/04
200毫克/毫升	50	---	0.1	LI200/05
200毫克/毫升	---	80	0.1	LI200/06
200毫克/毫升	---	---	0.01	LI200/07
200毫克/毫升	---	---	0.1	LI200/08

- 在注射用無菌水中之聚花楸酸酯80儲備溶液0.5%與5%：以1:50比例添加(210微升對10.5毫升阿達利母馬溶液，添加210微升注射用水至經調配而未使用界面活性劑之試樣中，以確保在所有試樣中之相等蛋白質濃度)

- 以固體形式添加甘露醇/蔗糖(個別為525毫克/840毫克)。

將製劑殺菌過濾(Millex GV, Millipore, 0.22微米, Ø33毫米, 物件SLGV033RS), 並接著填入裝有27.5G RNS針頭與無菌BD HyPak BSCF 4432/50塞子之BD HyPak SCF™1毫升長注射器中。充填體積為每注射器約0.6毫升。

於充填後, 將注射器個別儲存於2-8°C、25°C及40°C下, 並按下文描述之試樣抽取綱要中所指示進行分析。

- 阿達利母馬藥物(阿達利母馬消光係數280毫微米: 1.39毫升/毫克公分): 藥物未含有聚花楸酸酯80。DS緩衝劑, pH 5.38。
- pH電極
- 經滅菌之注射用水歐洲藥典/美國藥典係作為DF/UF媒質使用。
- 甘露醇、聚花楸酸酯80及蔗糖, 全部均符合歐洲藥典品質
- Vogel滲透壓計OM815係用於滲透度度量(以400毫滲透度/公斤NaCl校準溶液校準, 物件編號Y1241, Herbert Knauer GmbH, Berlin, Germany)。
- Anton Paar微黏度計, 類型AWVn, 係根據Anton Paar操作說明書, 用於蛋白質溶液之黏度評估。黏度係於20°C下評估。
- Fluostar Optima, BMG Labtech (吸收度量, 在344毫微米下, 於井板中, 混濁度之評估)
- Malvern儀器Zetasizer nano ZS係應用標準方法, 用於測定Z-平均值。度量係於25°C下, 使用藉由落球黏度測定法(Anton Paar微黏度計, 類型AWVn, 於25°C下)所獲得之黏度數據進行。

### HPLC方法

- 阿達利母馬, SEC分析: 交聯葡聚糖(Sephadex) 200管柱

(Pharmacia目錄編號175175-01)。流動相20 mM磷酸鈉, 150 mM氯化鈉, pH 7.5, 0.5毫升/分鐘流率, 環境溫度, 偵測UV 214毫微米與280毫微米。

將各試樣以Milli-Q水稀釋至1.0毫克/毫升, 注射試樣裝填量50微克(重複注射)。

阿達利母馬, IEC分析: Dionex, Propac WCX-10管柱, 伴隨著相應之防護管柱。分離條件: 流動相A: 10 mM磷酸鈉, pH 7.5; 流動相B 10 mM磷酸鈉, 500 mM氯化鈉, pH 5.5。1.0毫升/分鐘流率, 環境溫度。將各試樣以Milli-Q水稀釋至1.0毫克/毫升, 注射試樣裝填量100微克, 重複注射。

#### 試樣抽取綱要

將所製成溶液之試樣儲存於5°C、25°C及40°C下, 並在研究開始之後, 於無論是1分鐘(5°C與40°C)下, 或於T0與1分鐘(25°C)下抽取。試驗參數係根據適當方法度量, 例如顏色係以目視方式測定, 混濁度係在344毫微米之吸收下測定。

#### 最初調配物特徵鑒定

表53係描述最初調配物滲透度與黏度。

表53

批號	化合物	溶質度 [毫滲透度]	黏度 [mPas]
LI 50 / 01	50毫克/毫升甘露醇	309	1.9796
LI 50 / 02	80毫克/毫升蔗糖	272	2.1284
LI 50 / 03	50毫克/毫升甘露醇; 0.01% Tween 80	307	1.9843
LI 50 / 04	80毫克/毫升蔗糖; 0.01% Tween 80	269	2.1194
LI 50 / 05	50毫克/毫升甘露醇; 0.1% Tween 80	307	1.9980
LI 50 / 06	80毫克/毫升蔗糖; 0.1% Tween 80	272	2.1235
LI 50 / 07	0.01% Tween 80	8	1.7335
LI 50 / 08	0.1% Tween 80	8	1.8162
LI 200 / 01	50毫克/毫升甘露醇	396	21.395
LI 200 / 02	80毫克/毫升蔗糖	351	21.744

LI 200 / 03	50毫克/毫升甘露醇；0.01% Tween 80	387	21.233
LI 200 / 04	80毫克/毫升蔗糖；0.01% Tween 80	350	21.701
LI 200 / 05	50毫克/毫升甘露醇；0.1% Tween 80	387	21.592
LI 200 / 06	80毫克/毫升蔗糖；0.1% Tween 80	355	21.943
LI 200 / 07	0.01% Tween 80	27	21.296
LI 200 / 08	0.1% Tween 80	28	21.889

一種濃度之所有調配物均展現相等黏度。此等含有蔗糖之調配物係稍微較高。在與水中之高度濃縮調配物(實例A，黏度27.9cP)比較下，高度濃縮調配物之降低黏度係藉由以聚花楸酸酯80儲備溶液或未加糖水之試樣稀釋解釋，導致在實例21中之最後濃度為~215毫克/毫升對220毫克/毫升。

表54係描述關於各試樣所測得之PCS數據。

表54

試樣	PCS [Z-平均/ d.毫微米]
LI50/01	2.58
LI50/02	2.22
LI50/03	2.13
LI50/04	2.22
LI50/05	2.25
LI50/06	2.55
LI50/07	2.87
LI50/08	1.94
LI200/01	0.50
LI200/02	0.43
LI200/03	0.36
LI200/04	0.38
LI200/05	0.37
LI200/06	0.41
LI200/07	0.35
LI200/08	0.36

在表54中所提供之數據係顯示z-平均值不會顯著地與得自不含非離子性賦形劑系統中之阿達利母馬溶液之數值(63毫克/毫升，1.85 d.毫微米，220毫克/毫升，0.34 d.毫微米，實例21)不同。

於儲存時之阿達利母馬特徵鑒定

附錄E係提供關於儲存時之阿達利母馬安定性之數據。

### 安慰劑溶液之導電率

表55係描述非離子性賦形劑對於各種阿達利母馬調配物之導電率之影響。所有安慰劑溶液均使用經滅菌之注射用水歐洲藥典/美國藥典製備。

表55

甘露醇(毫克/毫升)	蔗糖(毫克/毫升)	聚花楸酸酯80 (% w/w)	導電率 (μS/公分)
---	---	---	1.1
50	---	---	1.2
---	80	---	2.2
50	---	0.01	2.3
---	80	0.01	1.4
50	---	0.1	2.6
---	80	0.1	3.6
---	---	0.01	1.2
---	---	0.1	2.6

### 結論

將製劑在2-8°C、25°C及40°C下，於SCF注射器中儲存1個月。得自儲存研究之數據係顯示在所測試全部調配物中有蛋白質之整體安定性。安定性數據可與得自實例21之試樣安定性比較。含有非離子性賦形劑之安慰劑溶液之導電率度量，係証實關於一些賦形劑之導電率之最低限度增加，在某μS/公分之範圍內。PCS度量係証實在與不含非離子性賦形劑之系統比較下，於流體動力學直徑上無顯著增加。

總而言之，使用純水作為DF/UF交換媒質處理蛋白質，及以非離子性賦形劑調配係為可行。阿達利母馬亦在下列組成之緩衝劑中，藉由PCS評估：10 mM磷酸鹽緩衝劑，100 mM氯化鈉，10 mM檸檬酸鹽緩衝劑，12毫克/毫升甘露醇，0.1%聚花楸酸酯80，pH 5.2。阿達利母馬濃度個別為50毫克/毫升與200毫克/毫升。z-平均值個別對於50毫克/毫升調配物為11.9 d.毫微米，及對於200毫克/毫升調配物為1.01 d.毫微米。

因此，明顯地証實在特定蛋白質濃度下之流體動力學直徑係依賴離子強度(在含有鹽之緩衝劑中之明顯較高直徑)。

### 實例23：以非離子性賦形劑之經調配在水中之J695之製備

下述實例係描述一種調配物之製備，該調配物含有在水中之抗體，意即阿達利母馬，伴隨著其他非離子性賦形劑。實例亦描述以其他非離子性賦形劑，經調配在水中之J695之安定性(當例如藉由SE-HPLC與IEC度量時)。

#### 物料與方法

使在不同pH下之2 x 30毫升J695溶液(~125毫克/毫升)使用純水，應用Slide-a-Lyzer滲析卡匣滲析。試樣之滲析係個別對著3升純水進行3次(理論賦形劑降低，1:1,000,000)。將蛋白質溶液利用Vivaspin 20濃縮器超過濾至200毫克/毫升之最後標的濃度。進行PH、滲透度、黏度、導電率、PCS、目視檢查、HPLC及蛋白質濃度量(OD280)，以監測在處理期間與其後之蛋白質狀態。

於處理後，蛋白質溶液係按下文中所表示進行調配。甘露醇係選自糖醇類之組群，例如甘露醇、花楸醇等，作為使用之實例。蔗糖係選自糖類之組群，例如蔗糖、海藻糖、植物蜜糖、麥芽糖等，作為使用之實例。聚花楸酸酯80係選自非離子性界面活性劑之組群，例如聚花楸酸酯80、聚花楸酸酯20、普洛尼克(pluronic) F68等，作為使用之實例。對於各此等調配物，係製備0.5毫升之體積。進行PH、滲透度、目視檢查及HPLC分析，以監測試樣製備後之蛋白質狀態。

表 56：各種 J695 調配物之描述

最後蛋白質濃度	甘露醇 (毫克/毫升)	蔗糖 (毫克/毫升)	聚花楸酸酯80 (% w/w)	試樣名稱*
200毫克/毫升	50	---	---	LI200/01/5
200毫克/毫升	---	80	---	LI200/02/5
200毫克/毫升	50	---	0.01	LI200/03/5
200毫克/毫升	---	80	0.01	LI200/04/5
200毫克/毫升	50	---	0.1	LI200/05/5
200毫克/毫升	---	80	0.1	LI200/06/5
200毫克/毫升	---	---	0.01	LI200/07/5
200毫克/毫升	---	---	0.1	LI200/08/5
200毫克/毫升	50	---	---	LI200/01/6
200毫克/毫升	---	80	---	LI200/02/6
200毫克/毫升	50	---	0.01	LI200/03/6
200毫克/毫升	---	80	0.01	LI200/04/6
200毫克/毫升	50	---	0.1	LI200/05/6
200毫克/毫升	---	80	0.1	LI200/06/6
200毫克/毫升	---	---	0.01	LI200/07/6
200毫克/毫升	---	---	0.1	LI200/08/6

\* "/5"或"/6"術語係被加至任何試樣名稱中，以在pH 5與6下之試樣之間加以區分。

- 在注射用無菌水中之聚花楸酸酯80儲備溶液0.5%與5%：以1:50比例添加(10微升對0.5毫升J695溶液，添加10微升注射用水至未使用界面活性劑之經調配試樣中，以確保所有試樣中之相等蛋白質濃度)
- 以固體形式添加甘露醇/蔗糖(個別為25毫克/40毫克)。
- J695藥物(J695消光係數280毫微米：1.42毫升/毫克公分)：藥物未含有聚花楸酸酯80。DS緩衝劑，pH 6.29。
- pH電極
- 經脫礦質與殺菌過濾之水係作為滲析媒質使用。
- 甘露醇、聚花楸酸酯80及蔗糖，全部均符合歐洲藥典品質
- Vogel滲透壓計OM815係用於滲透度度量(以400毫滲透度/公斤NaCl校準溶液校準，物件編號Y1241，Herbert Knauer GmbH, Berlin, Germany)。
- Anton Paar微黏度計，類型AWVn，係根據Anton Paar操作說明



書，用於蛋白質溶液之黏度評估。黏度係於20°C下評估。

- Fluostar Optima, BMG Labtech (吸收度量，在344毫微米下，於井板中，混濁度之評估)
- Eppendorf離心機5810 R
- Slide-a-Lyzer滲析卡匣，Pierce生物技術(目錄編號66830)
- Vivaspin 20濃縮器，10 KDa PES薄膜(Vivascience，產物編號VS2001)，係根據標準操作說明書使用
- PerkinElmer UV可見分光光度計，λ35，係用於蛋白質濃度量(280毫微米波長)。用後即棄UV比色杯，1.5毫升，半微量分析，聚(甲基丙烯酸甲酯) (PMMA)，係用於濃度量。
- InoLab Cond Level2 WTW裝置係用於經正規化至25°C之導電率度量。
- Malvern儀器Zetasizer nano ZS係應用標準方法，用於測定Z-平均值。度量係於25°C下，使用藉由落球黏度測定法(Anton Paar微黏度計，類型AWVn，於25°C下)所獲得之黏度數據進行。

### HPLC方法

- J695，SEC分析：Tosoh Bioscience G3000swxl，7.8毫米x 30公分，5微米(目錄編號08541)。流動相211 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/92 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，pH 7.0。0.25毫升/分鐘流率，環境溫度，偵測UV 214毫微米與280毫微米。將各試樣以Milli-Q水稀釋至2.0毫克/毫升，注射試樣裝填量20微克(重複注射)。
- J695，IEC分析：Dionex，Propac WCX-10管柱(p/n 054993)，伴隨著相應之防護管柱(p/n 054994)。分離條件：流動相A：10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，pH 6.0；流動相B 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，500 mM NaCl，pH 6.0。1.0毫升/分鐘流率，35°C溫度。將各試樣以Milli-Q水稀釋至1.0毫克/毫升，注射試樣裝填量100微克。

## 蛋白質濃度之計算

計算式：

$$E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\varepsilon \times d}$$

- $\varepsilon$  - 吸收係數  
 $c$  - 濃度  
 $d$  - 光線必須通過之比色杯長度  
 $e$  - 吸光率  
 $I_0$  - 最初光強度  
 $I$  - 通過試樣後之光強度  
 $\varepsilon_{\text{阿達利母馬}} = 1.42 \frac{\text{毫升}}{\text{毫克} \times \text{公分}}$   
 (Adalimumab)

## J695之處理

在水中之J695係在添加任何非離子性賦形劑之前作特徵鑒定。表57係提供在滲析/超過濾期間之J695特徵鑒定之細節。

表57

試樣	蛋白質濃度 [毫克/毫升]	PH	滲透度 [毫滲透度/ 公斤]	黏度[cP]	目視檢查	導電率 [ $\mu$ S/公分]	PCS [Z-平均/ d.毫微米]
起始物質	~125 毫克/毫升	6.29 (關於低pH試樣, 係以0.01M鹽酸 調整至4.77)	N/A	N/A	微乳白色, 基本上不含 可見粒子	N/A	N/A
在滲析後, 低pH	42.5 毫克/毫升	5.21	7	1.60	微乳白色, 基本上不含 可見粒子	602	1.5
在滲析後, 高pH	56.9 毫克/毫升	6.30	6	2.11	微乳白色, 基本上不含 可見粒子	500	2.7
在濃縮後, 低pH	206 毫克/毫升	5.40	50	39.35	微乳白色, 基本上不含 可見粒子	1676	0.21
在濃縮後, 高pH	182 毫克/毫升	6.46	39	47.76	微乳白色, 基本上不含 可見粒子	1088	0.21

## 具有非離子性賦形劑之調配物之特徵鑒定

於添加各種非離子性賦形劑至ABT-847調配物(參閱在表56中之描

述)中之後，分析各調配物。得自滲透度與目視檢查及pH之結果係描述於下表58中。

表58

試樣	pH	滲透度 [毫滲透度/公斤]	目視檢查
LI200/01/5	5.39	473	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/02/5	5.38	402	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/03/5	5.37	466	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/04/5	5.37	397	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/05/5	5.37	458	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/06/5	5.37	396	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/07/5	5.36	50	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/08/5	5.36	48	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/01/6	6.43	428	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/02/6	6.42	405	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/03/6	6.43	348	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/04/6	6.43	383	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/05/6	6.42	432	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/06/6	6.42	402	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/07/6	6.43	38	微乳白色, 基本上不含可見粒子
LI200/08/6	6.43	39	微乳白色, 基本上不含可見粒子

### HPLC 數據

含有非離子性賦形劑之各J695調配物亦使用SE-HPLC與IEX檢視。得自此等分析之數據係提供於表59與60中，且提供在處理與調配期間之J695安定性之概論。

表59：各種J695調配物之SE-HPLC結果

試樣名稱	總和聚集體 [%]	單體 [%]	總和片段 [%]
pH 5	0.608	98.619	0.773
125毫克/毫升 起始物質	0.619	98.598	0.783
	0.614	98.608	0.778
pH 6	0.427	98.809	0.764
125毫克/毫升 起始物質	0.392	99.005	0.603
	0.409	98.907	0.683

pH 5	0.654	98.604	0.742
42.5毫克/毫升 於滲析後	0.677	98.560	0.763
	0.666	98.582	0.753
pH 6	0.748	98.541	0.711
56.9毫克/毫升	0.739	98.597	0.665

於滲析後	0.743	98.569	0.688
pH 5	0.913	98.416	0.671
206毫克/毫升	0.923	98.356	0.721
在水中	0.918	98.386	0.696
pH 5	0.928	98.312	0.760
50毫克/毫升甘露醇	0.926	98.339	0.736
LI 200 / 01 / 5	0.927	98.325	0.748
pH 5	0.925	98.319	0.755
80毫克/毫升蔗糖	0.929	98.332	0.738
LI 200 / 02 / 5	0.927	98.326	0.747
pH 5, 50毫克甘露醇	0.942	98.326	0.732
0.01% Tween 80	0.942	98.300	0.758
LI 200 / 03 / 5	0.942	98.313	0.745
pH 5, 80毫克蔗糖	0.944	98.315	0.741
0.01% Tween 80	0.944	98.339	0.717
LI 200 / 04 / 5	0.944	98.327	0.729
pH 5, 50毫克甘露醇	0.941	98.348	0.711
0.1% Tween 80	0.967	98.299	0.734
LI 200 / 05 / 5	0.954	98.323	0.722
pH 5, 50毫克甘露醇	0.944	98.346	0.710
0.1% Tween 80	0.948	98.340	0.712
LI 200 / 06 / 5	0.946	98.343	0.711
pH 5, 50毫克甘露醇	0.946	98.348	0.706
0.1% Tween 80	0.953	98.328	0.719
LI 200 / 07 / 5	0.949	98.338	0.713
pH 5, 50毫克甘露醇	0.987	98.313	0.701
0.1% Tween 80	0.994	98.283	0.723
LI 200 / 08 / 5	0.991	98.298	0.712
pH 6	1.091	98.169	0.739
182毫克/毫升	1.075	98.221	0.703
在水中	1.083	98.195	0.721
pH 6	0.998	98.350	0.652
50毫克/毫升甘露醇	1.002	98.364	0.634
LI 200 / 01 / 6	1.000	98.357	0.643
pH 6	1.028	98.243	0.729
80毫克/毫升蔗糖	0.983	98.355	0.662
LI 200 / 02 / 6	1.006	98.299	0.695
pH 6, 50毫克甘露醇	1.005	98.322	0.673
0.01% Tween 80	1.008	98.317	0.676
LI 200 / 03 / 6	1.006	98.319	0.674
pH 6, 80毫克蔗糖	0.987	98.363	0.649
0.01% Tween 80	0.987	98.321	0.692
LI 200 / 04 / 6	0.987	98.342	0.671

pH 6, 50毫克甘露醇	0.996	98.326	0.678
0.1% Tween 80	0.996	98.338	0.666
LI 200 / 05 / 6	0.996	98.332	0.672
pH 6, 80毫克蔗糖	0.998	98.305	0.697
01% Tween 80	0.984	98.345	0.671
LI 200 / 06 / 6	0.991	98.325	0.684
pH 6	1.000	98.325	0.675
001% Tween 80	0.994	98.347	0.659
LI 200 / 07 / 6	0.997	98.336	0.667
pH 6	1.003	98.314	0.682
0.01% Tween 80	0.998	98.338	0.664
LI 200 / 08 / 6	1.001	98.326	0.673

表60：各種J695調配物之 IEX 結果

試樣名稱	總和酸性吸收峰 [%]	總和麩醯胺 [%]	總和鹼性吸收峰 [%]
pH 5	4.598		3.303
125毫克/毫升	4.599		3.177
起始物質	4.599	92.162	3.240
pH 6	4.597		3.159
125毫克/毫升	4.629		3.156
起始物質	4.613	92.229	3.168
pH 5	4.706		3.177
42.5毫克/毫升	4.725		3.205
於滲析後	4.715	92.094	3.191
pH 6	4.739		3.182
56.9毫克/毫升	4.752		3.167
於滲析後	4.746	92.080	3.174
pH 5	4.655		3.167
206毫克/毫升	4.676		3.210
在水中	4.666	92.146	3.189
pH 5	4.721		3.321
50毫克/毫升甘露醇	4.733		3.356
LI 200 / 01 / 5	4.727	91.936	3.338
pH 5	4.715		3.299
80毫克/毫升蔗糖	4.687		3.338
LI 200 / 02 / 5	4.701	91.981	3.318
pH 5, 50毫克甘露醇	4.767		3.246
0.01% Tween 80	4.736		3.253
LI 200 / 03 / 5	4.752	91.999	3.250
pH 5, 80毫克蔗糖	4.751		3.257
0.01% Tween 80	4.742		3.229
LI 200 / 04 / 5	4.746	92.011	3.243
pH 5, 50毫克甘露醇	4.780		3.420
0.1% Tween 80	4.720		3.394
LI 200 / 05 / 5	4.750	91.843	3.407
pH 5, 80毫克蔗糖	4.756		3.421
0.1% Tween 80	4.894		3.375
LI 200 / 06 / 5	4.826	91.777	3.398

pH 5 0.01% Tween 80 LI 200 / 07 / 5	4.813		3.425
	4.757		3.413
	4.785	91.796	3.419
pH 5 0.1% Tween 80 LI 200 / 08 / 5	4.769		3.361
	4.842		3.335
	4.806	91.846	3.348
pH 6 182毫克/毫升 在水中	4.882		3.452
	4.886		3.451
	4.884	91.664	3.451
pH 6 50毫克/毫升甘露醇 LI 200 / 01 / 6	4.843		3.456
	4.833		3.393
	4.838	91.737	3.425
pH 6 80毫克/毫升蔗糖 LI 200 / 02 / 6	4.923		3.407
	4.896		3.491
	4.909	91.642	3.449
pH 6, 50毫克甘露醇 0.01% Tween 80 LI 200 / 03 / 6	4.864		3.423
	4.899		3.392
	4.882	91.711	3.408
pH 6, 80毫克蔗糖 0.01% Tween 80 LI 200 / 04 / 6	4.870		3.320
	4.928		3.369
	4.899	91.766	3.345
pH 6, 50毫克甘露醇 0.1% Tween 80 LI 200 / 05 / 6	4.905		3.385
	4.922		3.489
	4.914	91.649	3.437
pH 6, 80毫克蔗糖 0.1% Tween 80 LI 200 / 06 / 6	4.973		3.443
	4.962		3.335
	4.968	91.644	3.389
pH 6 0.01% Tween 80 LI 200 / 07 / 6	4.934		3.413
	4.899		3.392
	4.916	91.681	3.402
pH 6 0.1% Tween 80 LI 200 / 08 / 6	4.884		3.410
	4.934		3.366
	4.909	91.703	3.388

## 結論

上文實例係提供一種實驗，其中水(經脫礦質與殺菌過濾之水)係作為單株抗體J695之滲析媒質使用。

使J695接受滲析與濃縮處理，利用純水作為交換媒質，並在pH 5.40以及6.46下，於高濃度(個別為206與182毫克/毫升)下調配，而不會引致溶液混濁、嚴重乳白色或混濁度形成。

得自處理實驗之J695係經特徵鑒定，並以各種非離子性賦形劑調配。所獲得之數據係指向所測試調配物中蛋白質之有利整體安定性。

總而言之，使用純水作為交換媒質處理蛋白質，及以非離子性賦

形劑調配係為可行。假定理想100%賦形劑薄膜滲透性，可估計約99.9%最高賦形劑降低。

#### 實例24：經調配在水中之阿達利母馬之可注射性

使得自實例21之調配物(63與220毫克/毫升阿達利母馬)於注射器排空時接受力度量。將220毫克/毫升之阿達利母馬試樣個別稀釋至200毫克/毫升、150毫克/毫升及100毫克/毫升，且亦經評估。Zwick Z2.5/TN1S係在80毫米/分鐘之恒定進料下使用。最後，調配物之黏度數據係使用Anton Paar微黏度計，類型AWVn，於20°C下評估。下述數據收集係指出針頭與注射器直徑兩者於注射器排空時，均具有對於滑動力之顯著作用。令人驚訝的是，在220毫克/毫升下之高度濃縮溶液(黏度27.9 cP，於20°C下)可藉由施加與在63毫克/毫升下之較低濃縮調配物(黏度1.8 cP，於20°C下)一樣之相等排空力傳輸。

表61：關於在不同包裝系統中之阿達利母馬溶液所獲得之滑動力值

阿達利母馬 濃度(黏度)	BD HyPak SCF™ 1毫升長注射 器, 裝有 27.5G RNS針 頭BD HyPak BSCF 4432/50 塞子	D HyPak SCF™1毫升長注射器, 裝有			1毫升 Soft-Ject® Tuberkulin 注射器(比BD HyPak注射器 較小直徑), 裝有27G x 1/2"針頭 (Sterican)
		25G x 5/8" 針頭(Sterican) BD HyPak BSCF 4432/50 塞子	26G x 1/2" 針頭(Sterican) BD HyPak BSCF 4432/50 塞子	27G x 1/2" 針頭(Sterican) BD HyPak BSCF 4432/50 塞子	
63毫克/毫升 (1.8 cP)	3.9 N	-	-	-	-
100毫克/毫升 (2.9 cP)	3.30 N	1.02 N	1.33 N	1.69 N	1.00 N
150毫克/毫升 (7.4 cP)	4.63 N	1.16 N	1.58 N	2.93 N	1.33 N
200毫克/毫升 (15.7 cP)	7.25 N	2.16 N	3.24 N	6.25 N	2.55 N
220毫克/毫升 (27.9 cP)	14.5 N	2.99 N	3.97 N	9.96 N	3.16 N

上文指出即使具有高濃度之蛋白質，此種調配物亦有助於使用注射器之投藥，例如皮下。

### 實例25-28

實例25-28係描述含有經調配在水中之抗體之各種抗體調配物(於實例26-28中稱為低-離子強度蛋白質調配物)之冷凍/解凍安定性實驗。許多抗體之冷凍解凍行為係藉由在冷凍狀態與液態之間循環各種蛋白質調配物至高4次而進行評估。冷凍係利用溫度控制之-80°C冷凍庫進行，而解凍係利用25°C溫度控制之水浴進行。將約25毫升抗體溶液各充填在30毫升PETG容器中，供此等實驗系列用。

亞可見粒子之形成係在醫藥蛋白質調配物中提出一項主要安全性顧慮。亞可見蛋白質粒子係被認為是具有負面地衝擊臨床性能至比其他降解產物同樣或較大程度之可能性，該其他降解產物譬如可溶性聚集體及以化學方式改質之物種，其係經評估與定量作為產物特徵鑒定與品質保證計劃之一部份(Carpenter, JF等人評論：俯視治療蛋白質產物中之亞可見粒子：可危害到產物品質之baps. *J. Pharm. Sci.*, 2008)。如下文列示之實例中所証實，許多抗體為令人驚訝地安定-尤其是關於亞可見粒子形成-當經調配在本發明之調配物中時。

**實例25：**經調配在水中且具有非離子性賦形劑之阿達利母馬之冷凍/解凍安定性

下述實例係描述在水調配物中及在其中非離子性賦形劑已被添加之水調配物中之抗體(例如阿達利母馬)之安定性。使得自實例21與22之試樣之液份接受冷凍/解凍實驗，並藉由SE-HPLC分析。將數據與衍生自冷凍/解凍實驗之SE-HPLC結果比較，使用在下列組成之緩衝劑中之阿達利母馬：10 mM磷酸鹽緩衝劑，100 mM氯化鈉，10 mM檸檬酸鹽緩衝劑，12毫克/毫升甘露醇，0.1%聚花楸酸酯80，pH 5.2。於此後述緩衝劑中之阿達利母馬係個別在50毫克/毫升與200毫克/毫升下被使用。冷凍/解凍循環係在Eppendorf罩蓋中進行，其方式是冷凍至-80°C，並在冷凍庫中儲存8小時，接著於室溫下解凍1小時，及後續試樣抽取。



使各調配物接受5次循環，意即下表中所述之循環0、1、2、3、4及5。

### HPLC方法

阿達利母馬，SEC分析：交聯葡聚糖(Sephadex) 200管柱(Pharmacia 目錄編號175175-01)。流動相20 mM磷酸鈉, 150 mM氯化鈉, pH 7.5，0.5毫升/分鐘流率，環境溫度，偵測UV 214毫微米與280毫微米。將各試樣以Milli-Q水稀釋至1.0毫克/毫升，注射試樣裝填量50微克(重複注射)。

### 於冷凍/解凍循環時之阿達利母馬特徵鑒定

表62係描述在冷凍/解凍實驗期間之阿達利母馬純度。關於試樣組成，參考實例21與22。

表 62：

#### 冷凍/解凍-低離子性阿達利母馬- 50毫克/毫升

循環	單體分率[%]							
	LI 50 / 01	LI 50 / 02	LI 50 / 03	LI 50 / 04	LI 50 / 05	LI 50 / 06	LI 50 / 07	LI 50 / 08
0	99.605	99.629	99.632	99.626	99.619	99.626	99.653	99.655
1	99.743	99.768	99.739	99.759	99.731	99.725	99.686	99.669
2	99.715	99.726	99.571	99.661	99.721	99.721	99.601	99.619
4	99.668	99.689	99.632	99.678	99.523	99.724	99.491	99.542
5	99.627	99.771	99.539	99.772	99.525	99.773	99.357	99.445
循環	聚集體分率[%]							
	LI 50 / 01	LI 50 / 02	LI 50 / 03	LI 50 / 04	LI 50 / 05	LI 50 / 06	LI 50 / 07	LI 50 / 08
0	0.106	0.104	0.119	0.136	0.139	0.145	0.158	0.159
1	0.149	0.134	0.153	0.150	0.149	0.166	0.206	0.201
2	0.192	0.178	0.320	0.242	0.178	0.184	0.319	0.261
4	0.213	0.185	0.239	0.187	0.357	0.170	0.393	0.353
5	0.301	0.151	0.384	0.150	0.398	0.150	0.568	0.484
循環	片段分率[%]							
	LI 50 / 01	LI 50 / 02	LI 50 / 03	LI 50 / 04	LI 50 / 05	LI 50 / 06	LI 50 / 07	LI 50 / 08
0	0.289	0.267	0.249	0.238	0.242	0.229	0.189	0.186
1	0.108	0.098	0.108	0.091	0.120	0.108	0.107	0.130
2	0.093	0.097	0.108	0.097	0.100	0.094	0.080	0.119
4	0.119	0.126	0.130	0.135	0.120	0.106	0.116	0.105
5	0.072	0.078	0.078	0.078	0.077	0.077	0.075	0.071

#### 冷凍/解凍-低離子性阿達利母馬- 200毫克/毫升

循環	單體分率[%]							
	LI 200 / 01	LI 200 / 02	LI 200 / 03	LI 200 / 04	LI 200 / 05	LI 200 / 06	LI 200 / 07	LI 200 / 08
0	99.294	99.296	99.348	99.333	99.313	99.349	99.320	99.290
1	99.286	99.267	99.259	99.256	99.120	99.254	98.999	99.126
2	99.305	99.311	99.249	99.214	99.296	99.288	99.149	99.128
4	99.303	99.272	99.261	99.301	99.296	99.283	99.004	99.061
5	99.320	99.322	99.330	99.331	99.327	99.333	98.939	98.949
循環	聚集體分率[%]							
	LI 200 / 01	LI 200 / 02	LI 200 / 03	LI 200 / 04	LI 200 / 05	LI 200 / 06	LI 200 / 07	LI 200 / 08

0	0.489	0.509	0.491	0.484	0.492	0.488	0.515	0.575
1	0.590	0.574	0.584	0.586	0.680	0.582	0.785	0.718
2	0.604	0.604	0.616	0.630	0.607	0.607	0.731	0.736
4	0.591	0.592	0.612	0.581	0.604	0.596	0.868	0.836
5	0.593	0.586	0.583	0.596	0.597	0.589	0.985	0.981
循環	片段分率[%]							
	LI 200 / 01	LI 200 / 02	LI 200 / 03	LI 200 / 04	LI 200 / 05	LI 200 / 06	LI 200 / 07	LI 200 / 08
0	0.218	0.196	0.161	0.183	0.195	0.163	0.165	0.135
1	0.124	0.159	0.157	0.159	0.200	0.164	0.216	0.157
2	0.091	0.085	0.135	0.156	0.097	0.105	0.120	0.136
4	0.106	0.136	0.127	0.118	0.100	0.121	0.128	0.103
5	0.087	0.092	0.087	0.073	0.075	0.078	0.076	0.070

### 冷凍/解凍-市售及在水中之阿達利母馬

循環	單體分率[%]			
	得自實例A, 低濃度	得自實例A, 高濃度	標準物, 50毫克/毫升	標準物, 200毫克/毫升
0	99.733	99.286	99.374	99.227
1	99.689	99.212	99.375	99.215
2	99.614	99.130	99.370	99.218
4	99.489	99.029	99.361	99.196
5	99.430	98.945	99.362	99.177
循環	單體分率[%]			
	得自實例A, 低濃度	得自實例A, 高濃度	標準物, 50毫克/毫升	標準物, 200毫克/毫升
0	0.186	0.635	0.358	0.502
1	0.226	0.706	0.359	0.516
2	0.304	0.780	0.364	0.513
4	0.428	0.888	0.372	0.535
5	0.485	0.971	0.373	0.553

循環	單體分率[%]			
	得自實例A, 低濃度	得自實例A, 高濃度	標準物, 50毫克/毫升	標準物, 200毫克/毫升
0	0.080	0.079	0.268	0.272
1	0.085	0.083	0.266	0.269
2	0.082	0.090	0.266	0.269
4	0.083	0.083	0.267	0.270
5	0.085	0.085	0.265	0.269

### 結論

上文實例係提供其中使經DF/UF處理至水(經滅菌之注射用水歐洲藥典/美國藥典)中，並以各種非離子性賦形劑調配之阿達利母馬接受冷凍/解凍循環之實驗。所獲得之數據(被描述於表62中)係顯示在所測試全部調配物中之蛋白質之有利整體安定性。於5次冷凍/解凍循環後，所有調配物均含有高於98.5%單體性物種，當循環持續時，具有最少量之聚集體或片段。

### 實例26：低-離子性1D4.7溶液之冷凍/解凍安定性

1D4.7 蛋白質 (抗 -IL 12/ 抗 -IL 23 IgG1) 係藉由滲析 (使用

slide-a-lyzer卡匣，根據製造者Pierce, Rockford, IL之操作說明書使用)而被調配在水中，且証實於2毫克/毫升濃度，pH 6下，在重複冷凍/解凍(f/t)處理(-80°C/25°C水浴)期間為安定的。將數據與各種調配物(2毫克/毫升蛋白質，pH 6)之數據比較，使用常用於非經腸蛋白質調配物發展中之緩衝劑與賦形劑。已發現經調配在水中之1D4.7安定性係超過經調配在所建立緩衝系統(例如20 mM組胺酸、20 mM甘胺酸、10 mM磷酸鹽或10 mM檸檬酸鹽)中之1D4.7安定性，且甚至超過與多種常用以使蛋白質調配物安定化之賦形劑合併，例如10毫克/毫升甘露醇、10毫克/毫升花楸醇、10毫克/毫升蔗糖、0.01%聚花楸酸酯80或20mM NaCl，以一般性緩衝劑(10 mM磷酸鹽、10 mM檸檬酸鹽)為基礎之1D4.7調配物之安定性。

應用SEC、DLS及粒子計數分析，以監測蛋白質安定性，且粒子計數係使用具有1-200微米度量範圍之粒子計數系統(粒子計數器注射器型, Markus Klotz GmbH, Bad Liebenzell, Germany)進行。實驗細節如下：

- 將經調配在水中之1D4.7與上文列示之調配物比較
- 應用4次冷凍/解凍循環
- 30毫升PETG容器，約20毫升充填，2毫克/毫升蛋白質，pH 6
- 在T0、T1 (意即一個f/t步驟之後)、T2、T3及T4下取樣
- 分析：目視檢查、SEC、DLS、亞可見粒子度量

圖33顯示在重複f/t循環(-80°C/25°C)期間之1D4.7安定性，藉由>1微米之亞可見粒子之形成反映出。1D4.7係被調配在一般性緩衝劑(10 mM檸檬酸鹽、10 mM磷酸鹽)中，然後測試下列賦形劑變型：花楸醇(10毫克/毫升)、甘露醇(10毫克/毫升)、蔗糖(10毫克/毫升)、NaCl (100 mM)及聚花楸酸酯80 (0.01%)。1D4.7亦被調配在水中(藉由滲析)，完全未添加賦形劑(在圖33中之"水")。亦使注射用水接受f/t循環與亞可見

粒子測試，以評估物質處理、f/t及試樣抽取對於粒子負載之可能衝擊。

於f/t時經調配在水中之1D4.7安定性係超過以典型上使用於蛋白質調配物中之賦形劑所調配之1D4.7溶液安定性。已知甘露醇、蔗糖及花楸醇係充作凍乾保護劑及/或低溫保護劑，且聚花楸酸酯80為普遍地已知會在個別曝露至疏水性-親水性界面譬如空氣-水與冰-水時增加蛋白質之物理安定性之非離子性賦形劑。

概略言之，當以典型上所應用，以在冷凍-解凍處理時監測醫藥蛋白質安定性之各種分析操作法(例如SEC、目視檢查、動態光散射及尤其是光昏暗)分析時，經調配在水中之1D4.7溶液係顯示為令人驚訝地安定。

#### 實例27：低-離子性13C5.5溶液之冷凍/解凍安定性

已証實經調配在水中之13C5.5 (抗IL-13 IgG1)於2毫克/毫升濃度，pH 6下，在重複冷凍/解凍處理(-80°C/25°C水浴)期間為安定的。將數據與其他調配物(2毫克/毫升蛋白質，pH 6)比較，並發現經調配在水中之13C5.5安定性係超過經調配在經常使用於非經腸蛋白質調配物之緩衝系統(例如20 mM組胺酸、20 mM甘胺酸、10 mM磷酸鹽或10 mM檸檬酸鹽)中之13C5.5安定性，且甚至超過已與多種常用於蛋白質調配物中之賦形劑(例如10毫克/毫升甘露醇、10毫克/毫升花楸醇、10毫克/毫升蔗糖、0.01%聚花楸酸酯80、20 mM NaCl、200 mM NaCl)合併，以一般性緩衝劑(10 mM磷酸鹽、10 mM檸檬酸鹽)為基礎之13C5.5調配物之安定性。

試樣製備、實驗處理、試樣抽取及試樣分析係以如上文實例中所概述之相同方式進行。

- 將經調配在水中之13C5.5與上文列示之調配物比較
- 應用4次冷凍/解凍循環
- 30毫升PETG容器

- 2毫克/毫升，pH 6
- 在T0、T1、T2、T3及T4下取樣
- 分析：目視檢查、SEC、DLS、亞可見粒子度量

圖34顯示在重複f/t循環(-80°C/25°C)期間之13C5.5安定性，藉由>10微米之亞可見粒子之形成反映出。13C5.5係被調配在無論是10 mM磷酸鹽緩衝劑、10 mM檸檬酸鹽緩衝劑、20 mM甘胺酸緩衝劑及20 mM組胺酸緩衝劑中。13C5.5亦被調配在本發明調配物中(藉由滲析)，完全未添加賦形劑。亦使注射用水接受f/t循環與亞可見粒子測試，以評估物質處理、f/t及試樣抽取對於粒子負載之可能衝擊(被稱為空白試驗)。

於f/t時經調配在水中之13C5.5安定性係超過經調配在典型上使用於蛋白質調配物之緩衝劑中之13C5.5溶液安定性。以所應用之其他分析操作法(例如SEC、目視檢查等)，尙未發現經調配在水中之13C5.5溶液之不安定性。

圖35顯示在重複f/t循環(-80°C/25°C)期間之13C5.5安定性，藉由>1微米之亞可見粒子之形成反映出。13C5.5係被調配在一般性緩衝劑(10 mM檸檬酸鹽、10 mM磷酸鹽)中，及在與下列賦形劑變型合併之一般性緩衝劑中：花楸醇(10毫克/毫升)、甘露醇(10毫克/毫升)、蔗糖(10毫克/毫升)、NaCl (200 mM)、NaCl (20 mM)及聚花楸酸酯80 (0.01%)。13C5.5亦被調配在水中(藉由滲析)，完全未添加賦形劑，以供比較(純水)。亦使注射用水接受f/t循環與亞可見粒子測試，以評估物質處理、f/t及試樣抽取對於粒子負載之可能衝擊。

於f/t時經調配在水中之13C5.5安定性係超過以典型上使用於蛋白質調配物中之賦形劑所調配之13C5.5溶液安定性。已知甘露醇、蔗糖及花楸醇係充作凍乾保護劑及/或低溫保護劑，且聚花楸酸酯80為普遍地已知會在個別曝露至疏水性-親水性界面譬如空氣-水與冰-水時增加

蛋白質之物理安定性之非離子性賦形劑。已發現在被調配成本發明調配物之13C5.5試樣中亞可見粒子之低數目係在令人驚訝地低程度下，証實此種調配物之高安全性與安定性潛力。

以所應用之其他分析操作法(例如SEC、目視檢查等)，尙未發現經調配在水中之13C5.5溶液之不安定性。

於f/t程序後之13C5.5溶液之DLS分析係按上述進行。得自DLS分析之結果顯示在只有1個f/t步驟後，具有0.01% Tween-80之13C5.5溶液含有顯著高分子量(HMW)聚集體形式，然而在水中之13C5.5未含有HMW聚集體形式，即使在所應用之3個f/t步驟後亦然。

概略言之，當以典型上所應用，以在冷凍-解凍處理時監測醫藥蛋白質安定性之各種分析操作法(例如SEC、目視檢查、動態光散射及尤其是光昏暗)分析時，經調配在水中之13C5.5溶液係顯示為令人驚訝地安定。

#### 實例28：低-離子性7C6溶液之冷凍/解凍安定性

已証實經調配在水中之7C6 (抗澱粉狀蛋白 $\beta$ IgG1)於2毫克/毫升濃度，pH 6下，在重複冷凍/解凍處理(-80°C/30°C水浴)期間為安定的。將數據與其他調配物(2毫克/毫升蛋白質，pH 6)比較，並發現經調配在水中之7C6安定性係超過經調配在經常使用於非經腸蛋白質調配物之緩衝系統中之7C6安定性，且甚至超過已與多種常用於蛋白質調配物中之賦形劑合併，以一般性緩衝劑(10 mM磷酸鹽、10 mM檸檬酸鹽)為基礎之7C6調配物之安定性。

下列溶液組成係經評估關於其在冷凍/解凍實驗期間保持7C6物理安定性之潛力：

- 磷酸鹽緩衝劑，15 mM
- 檸檬酸鹽緩衝劑，15 mM
- 琥珀酸鹽緩衝劑，15 mM

- 組胺酸緩衝劑，15 mM
- 精胺酸緩衝劑，15 mM
- 低離子性蛋白質調配物，未添加賦形劑
- 一般性緩衝劑，花楸醇(10毫克/毫升)
- 一般性緩衝劑，甘露醇(10毫克/毫升)
- 一般性緩衝劑，蔗糖(10毫克/毫升)
- 一般性緩衝劑，海藻糖(10毫克/毫升)
- 一般性緩衝劑，0.01% (w/w)聚花楸酸酯80

試樣製備、實驗處理、試樣抽取及試樣分析係以如實例26與27中所概述之極類似方式進行。

- 將經調配在水中之7C6與上文列示之調配物比較
- 應用4次冷凍/解凍循環
- 30毫升PETG容器，約20毫升充填
- 2毫克/毫升，pH 6
- 在T0、T1、T2、T3及T4下取樣
- 分析：A $\beta$ -抗體安定性係藉由下述方法評估：
  - 蛋白質溶液之目視檢查係在聚丙烯圓底管件中進行，於其中充填試樣，以供光昏暗度量。其係小心地對著黑色與白色背景兩者檢查關於顯示蛋白質物理不安定性之跡象，譬如混濁性、混濁度及粒子形成。
  - 動態光散射(eZetasizer Nano ZS，Malvern儀器，AI9494；裝有Hellma精密元件，suprasil石英，類型105.251-QS，光路徑3毫米，中心Z8.5毫米，至少60微升試樣充填，自光昏暗度量而留在PP圓底管中之蛋白質試樣係用於DLS度量)。進行自動化度量(每試樣1次度量)。
  - 光昏暗分析。將3.5毫升試樣在層狀空氣流動條件下，充填於5毫升圓底管件中，在最初0.8毫升沖洗後，度量係以n=3模式進

行(每單一度量0.8毫升)。

- 尺寸排阻層析，與UV<sub>214</sub>/UV<sub>280</sub>及多角度光散射合併。

流動相：100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0 (使49.68克無水磷酸氫二鈉與99.44克無水硫酸鈉溶於約3300毫升Milli-Q水中，將pH值使用1M磷酸調整至7.0，以Milli-Q水充填至體積為3500毫升，並使溶液經過膜濾器過濾)。SEC管柱，TSK凝膠G3000SW (目錄編號08541) 7.8毫米x 30公分，5微米，與TSK凝膠防護器(目錄編號08543) 6.0毫米x 4.0公分，7微米合併。流量0.3毫升/分鐘，注射體積20微升(相當於20微克試樣)，柱溫室溫，自動取樣器溫度2至8°C，操作時間50分鐘，恒定組成梯度液，以10%異丙醇沖洗活塞，經由UV吸光率偵測，二極體陣列偵測器：波長214毫微米，峰寬>0.1分鐘，譜帶寬度：8毫微米，參考波長360毫微米，譜帶寬度100毫微米。

圖36顯示在重複f/t循環(-80°C/25°C)期間之7C6安定性，藉由>1微米之亞可見粒子之形成反映出。對於許多調配物，於f/t時經調配在水中之7C6安定性係超過經調配在典型上使用於蛋白質調配物之緩衝劑中之7C6溶液安定性。以所應用之其他分析操作法(例如SEC、目視檢查、動態光散射)，尚未發現經調配在水中之7C6溶液之不安定性。

令人驚訝的是，於f/t時經調配在水中之7C6安定性係超過以典型上使用於蛋白質調配物中之賦形劑所調配之7C6溶液安定性。已知甘露醇、蔗糖及花楸醇係充作凍乾保護劑及/或低溫保護劑，且聚花楸酸酯80為普遍地已知會在個別曝露至疏水性-親水性界面譬如空氣-水與冰-水時增加蛋白質之物理安定性之非離子性賦形劑。已發現在被調配成本發明調配物之7C6試樣中亞可見粒子之低數目係在令人驚訝地低程度下，証實此種調配物之高安全性與安定性潛力。

概略言之，當以典型上所應用，以在冷凍-解凍處理時監測醫藥蛋白質安定性之各種分析操作法(例如SEC、目視檢查、動態光散射及尤



其是光昏暗)分析時，經調配在水中之7C6溶液係顯示為令人驚訝地安定。

## 實例29：經調配在水中之J695之製備及其安定性研究

### 物料與方法

將427.1克(80毫克/毫升) J695稀釋至40毫克/毫升，並使用純水滲濾。與純水5-倍體積交換後(理論賦形劑降低，99.3%)，將蛋白質溶液超過濾至100毫克/毫升之標的濃度。進行PH、滲透度、密度、目視檢查及蛋白質濃度度量(OD280)，以監測DF/UF處理後之蛋白質狀態。

於DF/UF處理後，將蛋白質溶液殺菌過濾(0.22微米Sterivex GV膜濾器)至60毫升PETG瓶(Nalgene)中，且接著在-80°C下儲存3個月。

於37°C下解凍後，將溶液殺菌過濾(0.22微米Sterivex GV膜濾器)，並填入無菌BD HyPak Physiolis SCF™1毫升長注射器29G，1/2英寸，5-斜角，RNS TPE中，並以無菌BD HyPak SCF™1毫升W4023/50 Flur Daikyo塞子閉合。充填體積為每注射器1.000毫升。

於充填後，將注射器個別儲存於2-8°C與40°C下，並按下文描述之試樣抽取綱要中所指示進行分析。

- J695藥物(消光係數，在280毫微米下：1.42毫升/毫克公分)：藥物，pH 6.0未含有聚花楸酸酯80。
- Sartorius Sartocon Slice滲濾系統，裝有Ultrasert PES薄膜卡匣(50kDa截止值)。Sartocon Slice系統係根據Sartorius操作說明書，於環境溫度下，以連續模式操作。
- pH電極
- Perkin Elmer UV/Vis分光光度計，λ25，係用於蛋白質濃度度量(280毫微米波長)。用後即棄UV比色杯，1.5毫升，半微量分析，係用於濃度度量。
- 經0.22微米過濾之純水係作為DF/UF媒質使用。

- Anton Paar密度計DMA 4100係用於密度度量
- Knauer滲透壓計類型ML係用於滲透度度量(以400毫滲透度/公斤NaCl校準溶液校準, 物件編號Y1241, Herbert Knauer GmbH, Berlin, Germany)。

### 分析方法

- J695, SEC分析: Superdex 200管柱(Pharmacia)。流動相92 mM二-磷酸氫鈉, 211 mM硫酸鈉, pH 7.0, 0.75毫升/分鐘流率, 環境溫度, 偵測UV 214毫微米。將各試樣以流動相稀釋至2.0毫克/毫升, 注射試樣裝填量20微克(重複注射)。
- J695, IEC分析: Dionex, Propac WCX-10管柱, 伴隨著相應之防護管柱。分離條件: 流動相A: 20 mM二-磷酸氫鈉與20 mM醋酸鈉, pH 7.0; 流動相B 20 mM二-磷酸氫鈉, 400 mM氯化鈉, pH 5.0。1.0毫升/分鐘流率, 環境溫度。將各試樣以Milli-Q水稀釋至1.0毫克/毫升, 注射試樣裝填量100微克(重複注射)。
- J695, SDS-PAGE分析: Novex丙烯醯胺平板凝膠(對於非還原條件為8-16%, 對於還原條件為12%, Invitrogen), 柯麥西(Coomassie)染色(Invitrogen)。在還原( $\beta$ -巰基乙醇)與非還原條件下分離, 使用由10x儲備溶液製成之Tris-甘胺酸緩衝劑(Invitrogen)。
- J695, 緩衝劑成份之定量:
  - 甘露醇: 經由ReproGel Ca管柱(Dr. Maisch, Germany)分離, 與RI偵測, 流動相: 去離子水, 0.6毫升/分鐘流率, 20微升注射試樣。定量係使用外部校準用標準曲線進行。
  - 組胺酸與甲硫胺酸: 胺基酸以OPA (鄰苯二醛)之螢光

標識，與經由 ReproSil ODS-3 管柱 (Dr. Maisch, Germany) 之 HPLC 分離，及在 420 毫微米下之螢光偵測 (在 330 毫微米下之消光)，流動相 A：70% 檸檬酸 (10.51 克/升) 緩衝劑，pH 6.5，30% 甲醇，流動相 B：甲醇，1.0 毫升/分鐘流率，20 微升注射試樣。定量係使用外部校準用標準曲線進行。

- J695，PCS 分析：未經稀釋，在 100 毫克/毫升下進行，於單次使用塑膠比色杯中，在 25°C 下，使用 Malvern 儀器 Zetasizer nano ZS，於 173° 角度下，假定溶液黏度為 4.3875 mPas，蛋白質之折射率為 1.450，及緩衝溶液之折射率為 1.335。20 次掃描，各 20 秒之平均結果係經報告。

### 蛋白質濃度之計算

計算式：

$$E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\varepsilon \times d}$$

- $\varepsilon$  - 吸收係數
  - $c$  - 濃度
  - $d$  - 光線必須通過之比色杯長度
  - $e$  - 吸光率
  - $I_0$  - 最初光強度
  - $I$  - 通過試樣後之光強度
- $$\varepsilon_{J695} = 1.42 \frac{\text{毫升}}{\text{毫克} \times \text{公分}}$$

### 試樣抽取綱要

將所製成溶液之試樣儲存於下文列示之溫度下，並在研究開始之後，於所指示之時間點下抽取(x) (表63)。試驗參數與方法係描述於表64中。

表63

溫度	T0	1 m	3 m	6 m
5°C	x	x	x	x
40°C		x	x	x

表64

試驗參數	試驗方法
外觀	目視檢查
可見粒子	類似DAC (EA 4.43)
次可見粒子	類似歐洲藥典/美國藥典EA 4.44
透明性	歐洲藥典(EA 4.42)
顏色(目視)	歐洲藥典(EA 4.50)
pH	歐洲藥典(EA 4.24)
尺寸排阻HPLC	參閱上文
陽離子交換HPLC	參閱上文
SDS-PAGE	參閱上文
PCS	參閱上文

**J695之DF/UF處理**

表65係提供滲濾後之J695狀態。

表65

試樣	蛋白質濃度 [毫克/毫升]	pH	滲透度 [毫滲透度/公斤]	目視檢查
在DF/UF後	107	6.4	10	微乳白色, 微黃色, 基本上不含可見粒子

在DF/UF後，開始緩衝劑成份之濃度係以定量方式監測，以評估DF有效性。已發現所有結果均低於其相應分析方法(HPLC，個別使用RI對於甘露醇，及螢光偵測對於甲硫胺酸與組胺酸，於OPA標識之後)之實際偵測極限(參閱表66)。

表66

試樣	甲硫胺酸 [毫克/毫升]	組胺酸 [毫克/毫升]	甘露醇 [毫克/毫升]
在DF/UF前	0.669	0.586	18.36
在DF/UF後	< 0.13	< 0.14	< 3.20

於儲存時之J695特徵鑒定 下表67係支持於儲存時，在100毫克/毫升下之J695 DF/UF之安定性。

試驗標準	詳細說明	測試之 延續時間[月]	儲存條件[°C/%RH]	
			+5	+40/75
外觀	溶液	最初	順應	
		1	順應	順應
		3	順應	順應
		6	順應	順應
透明性	報告結果, 與參考懸浮液 比較根據歐洲藥典	最初	≤ RSII	
		1	-	-
		3	≤ RSII	≤ RSII
		6	≤ RSII	≤ RSIII
微粒子污染 可見粒子	報告結果, 目視評分 (所測試之試樣數)	最初	2.0 (1)	
		1	2.0 (1)	3.0 (1)
		3	1.6 (5)	1.0 (5)
		6	1.1 (9)	1.6 (9)
微粒子污染亞 可見粒子	≥10微米: 每容器≤6000 個粒子 ≥25微米: 每容器≤600 個粒子	最初	290 16	
		1	-	-
		3	-	-
		6	124 1	54 3

試驗標準	詳細說明	測試之 延續時間[月]	儲存條件[°C/%RH]	
			+5	+40/75
尺寸排阻HPLC	報告結果(%), 關於聚集體(A)單體(M)片段(F)	最初	0.9	
		A	98.9	
		M	0.2	
		F		
		1	0.8	2.3
		A	99.0	97.1
		M	0.1	0.6
		F		
		3	0.0	3.4
		A	98.8	95.1
		M	0.1	1.4
		F		
		6	0.4	5.5
		A	98.4	85.6
		M	0.1	8.9
		F		
SDS-PAGE (非還原條件)	主要形成帶狀型式可與參 考標準物比較	最初	順應	
		1	順應	順應
		3	順應	順應
		6	順應	順應
SDS-PAGE (還原條件)	主要形成帶狀型式可與參 考標準物比較	最初	順應	
		1	順應	順應
		3	順應	順應
		6	順應	順應
PCS	關於z-平均[毫微米]與 PDI之報告結果	最初	0.9	
			0.23	
		1	0.9	0.0
			0.23	0.23
		3	0.9	0.1
			0.23	0.24
		6	0.9	0.3
			0.23	0.29

試驗標準	詳細說明	測試之 延續時間[月]	儲存條件[°C/%RH]	
			+5	+40/75
陽離子交換HPLC	關於酸性物種(A) 主要異構重組物(M) 鹼性物種(B) 之報告結果(%)	最初	5.9 91.5 2.5	
		A		
		M		
		B	5.6      10.6 92.0      98.9 2.4      0.5	
		1		
		A		
		M	5.7      14.4 92.1      85.0 2.1      0.6	
		B		
		3		
		A	6.0      29.6 91.6      69.4 2.3      1.0	
		M		
		B		
		6		
		A		
		M		
		B		

### 結論

上文實例係提供滲濾/超過濾(DF/UF)實驗，其中水(經0.22微米過濾之純水)係作為單株抗體J695之滲濾媒質使用。

使J695接受DF/UF處理，使用純水作為DF/UF交換媒質，並在約pH 6.4下，於高濃度(100毫克/毫升)下調配，而不會引致溶液混濁、嚴重乳白色或混濁度形成。

將得自DF/UF實驗之J695在2-8°C與40°C下，於SCF注射器中儲存至高6個月。所獲得之數據係指向蛋白質之有利整體安定性。

總而言之，使用純水作為DF/UF交換媒質處理與調配蛋白質係為可行。假定理想100%賦形劑薄膜滲透性，可估計約99.3%最高賦形劑降低。藉由特定方法所獲得之證據指出，在DF/UF後賦形劑濃度係低於實際偵測極限。

**實例30：高濃度阿達利母馬水溶液之冷凍/解凍特徵及安定性測試-均一性與物理安定性**

### 低-離子性阿達利母馬溶液之製備

使2升PETG瓶中之1.6升藥物(DS)物質於25°C下，在水浴中解凍，均化，並使其接受DF/UF，使用注射用水作為滲濾交換媒質。滲濾係以連續模式，使用Sartorius Sartocoon Slice設備，藉由應用下列參數進行：

- 泵送輸出：8%
- 壓力入口：最大1巴(0.8巴)
- 薄膜：2 x PES，截止值50 kD

在滲濾期間，5-倍體積交換係足以降低滲透度至8毫滲透度/公斤。

在滲濾之前(SEC、利用OD280之蛋白質濃度、pH、滲透度及密度)與滲濾之後(利用OD280之蛋白質濃度、pH、滲透度及密度)，抽取進行中控制(IPC)試樣。IPC-試樣不為無菌。

於滲濾後，將經調配在水中之~70毫克/毫升阿達利母馬以注射用水稀釋至50毫克/毫升，並將pH值調整至5.2。

將經調配在水pH 5.2中之1.6升阿達利母馬50毫克/毫升再充填於2升PETG瓶中。使阿達利母馬溶液之其餘體積接受DF/UF，以增加濃度至100毫克/毫升。

將經調配在水pH 5.3中之阿達利母馬100毫克/毫升殺菌過濾，並將其中之0.8升充填於1升PETG瓶中。

### 分析

- 尺寸排阻層析(SEC)
- pH-度量
- 滲透度度量
- 密度度量
- 利用OD280之蛋白質濃度
- 光學外觀
- 離子交換層析法(IEC)



### 阿達利母馬之冷凍/解凍實驗1升容器

使1升PETG容器中之經調配在水中之阿達利母馬100毫克/毫升預冷卻至2-8°C，然後在-80°C下冷凍，冷凍循環> 12小時。使在1升PETG瓶中之冷凍試樣於25°C下，在水浴中連續地解凍。於解凍期間，將冷凍溶液之瓶子浸泡在水浴中達到液位。就在解凍，未均化之後，及在均化之後，藉由15與30次上下翻轉抽取下列試樣。

表68：試樣抽取綱要：

	各瓶子之翻轉數	試樣	分析試驗
1	0	5毫升頂部	蛋白質含量、滲透度、pH、密度、SEC
2	0	5毫升中間	
3	0	5毫升底部	
4	15	5毫升頂部	蛋白質含量、滲透度、pH、密度、SEC
5	15	5毫升中間	
6	15	5毫升底部	
7	30	5毫升頂部	蛋白質含量、滲透度、pH、密度、SEC及亞可見粒子
8	30	5毫升中間	
9	30	5毫升底部	

### 阿達利母馬溶液之特徵鑒定

於溫和移動後，經調配在水中之阿達利母馬50毫克/毫升與100毫克/毫升係每次顯現明顯淡黃色，非乳白色，及未具有波狀圖案。

而且，於冷凍與解凍後，經調配在水中之阿達利母馬並未改變外觀(就在解凍後以及在15與30次上下翻轉後)。

輕微波狀圖案係於瓶子之溫和移動後見及，正好在將針頭解凍與浸泡至溶液中之後，於試樣抽取期間，就在解凍後。

與使用市售緩衝劑中之阿達利母馬之類似實驗成對比，在水中之阿達利母馬溶液50毫克/毫升並未顯示蛋白質濃度、密度及滲透度之任何梯度液。

阿達利母馬溶液100毫克/毫升亦未顯示蛋白質濃度、密度、滲透度之任何梯度液。

安定性係個別於-30°C與-80°C下6個月儲存後評估。

在下文中，概述個別分析數據：

表69：阿達利母馬50與100毫克/毫升，於冷凍/解凍處理前

	pH	密度 克/立方公分	滲透度 毫滲透度/ 公斤	蛋白質含量 (重量分析) 毫克/毫升	亞可見粒子		
					1毫升 >=1微米	1毫升 >=10微米	1毫升 >=25微米
在水中之 50毫克/毫升	5.18	1.0121	5	49.3	7953	5	0
在水中之 100 毫克/毫升	5.32	1.0262	12	99.8	154	4	2

表70：經調配在水中之阿達利母馬50毫克/毫升，pH 5.2，於冷凍/解凍處理後

翻轉	試樣	pH	密度 克/立方 公分	滲透度 毫滲 透度/ 公斤	蛋白質 含量 毫克/ 毫升	純度(SEC) %	亞可見粒子		
							1毫升>=1 微米	1毫升 >=10微米	1毫升>=25 微米
0	頂部	5.20	1.0119	6	48.7	99.597	-	-	-
0	中間	5.19	1.0120	8	49.4	99.576	-	-	-
0	底部	5.17	1.0120	6	49.8	99.649	-	-	-
15	頂部	5.20	1.0120	4	49.7	99.649	-	-	-
15	中間	5.18	1.0120	5	49.2	99.678	-	-	-
15	底部	5.17	1.0120	4	49.1	99.637	-	-	-
30	頂部	5.19	1.0120	5	49.7	99.647	1280	4	0
30	中間	5.17	1.0120	3	50.4	99.637	2055	13	0
30	底部	5.18	1.0120	6	48.9	99.611	3889	37	11

表71：經調配在水中之阿達利母馬100毫克/毫升，pH 5.2，於冷凍/解凍處理後

翻轉	亞可見 粒子 試樣	pH	密度 克/ 立方 公分	滲透度 毫滲 透度/ 公斤	蛋白質 含量 毫克/ 毫 升	純度 (SEC) %	1毫升 >=1微米	1毫升>=10 微米	1毫升>=25 微米
0	頂部	5.29	1.0259	13	98.7	99.424	-	-	-
0	中間	5.3	1.0262	16	99.9	99.468	-	-	-
0	底部	5.28	1.0262	14	101.2	99.48	-	-	-
15	頂部	5.27	1.0261	13	98.9	99.511	-	-	-

15	中間	5.27	1.0261	16	97.7	99.466	-	-	-
-	底部	5.28	1.0261	15	97.0	99.483	-	-	-
30	頂部	5.29	1.0261	16	96.6	99.439	231	58	49
30	中間	5.28	1.0261	16	97.0	99.467	169	21	9
30	底部	5.28	1.0261	16	99.3	99.476	131	3	1

表72：經調配在水中之阿達利母馬100毫克/毫升，pH 5.2，於儲存後之安定性

測試時間點	SEC聚集體單體片段	離胺酸異構重組物之IEC總和	目視外觀	亞可見粒子(1毫升)		
				>=1微米	>=10微米	>=25微米
T 0	0.55 99.40 0.05	85.523	透明, 無特定物質	155	3	1
T 6個月, -80°C	0.47 99.39 0.14	82.124	透明, 無特定物質	210	8	5
T 6個月, -30°C	1.28 98.58 0.14	81.61	透明, 無特定物質	171	71	51

### 結論

以所應用之分析操作法，尚未發現在50與100毫克/毫升下，於冷凍/解凍處理後，及於-30°C或-80°C下儲存至高6個月後，經調配在水中之阿達利母馬之顯著不安定性。

**實例31：**在低-離子性調配物中之阿達利母馬之冷凍與解凍方法-包括蛋白質含量之製程設計空間

### 溶液之製備

使阿達利母馬BDS (整體藥物)在23°C循環水浴中解凍。使用超過濾/滲濾(UF/DF)方法(Pellicon "小型" 2)，使溶液向上濃縮至100毫克/毫升之標的濃度，以達成體積減少之目的。將具有Biomax 10K聚醚砜之Millipore Pellicon 2切線流動小型卡匣之兩個卡匣安裝在Pellicon 2單元中。於方法開始時，流率係在60毫升/分鐘下度量，且進料壓力為21 psi。此方法係在111.3毫克/毫升蛋白質濃度下停止。

Spectra/Por分子多孔性薄膜管件係用於滲析(直徑48毫米，18毫升/公分體積，75公分長度)。將在pH 5.2下之阿達利母馬100毫克/毫升之8升體積轉移至8個滲析管件。將各管件以1升阿達利母馬100毫克/毫升充填。將等於4升溶液之四個管件放置在具有36升注射用水之容器中，意即達成1:10之溶液交換因子。在體積對著新鮮注射用水交換之前，使溶液達到平衡。溶液交換係重複5次，直到達成1:100,000之總溶液交換因子為止。

於溶液藉由滲析被完全交換後，使其藉由第二個UF/DF步驟向上濃縮。進行第二個UF/DF步驟，就像第一個步驟一樣。達成在低-離子性調配物中之247.5毫克/毫升阿達利母馬之最後濃度。UF/DF係以已含有聚花楸酸酯80之起始物質進行。可預期在最後蛋白質溶液中所累積之聚花楸酸酯80會造成較高聚花楸酸酯含量超過0.1%。

使經向上濃縮之247.5毫克/毫升阿達利母馬之整體溶液以WFI稀釋至較低蛋白質濃度含量，按需要而定- 200毫克/毫升，175毫克/毫升，150毫克/毫升，140毫克/毫升，130毫克/毫升，120毫克/毫升，100毫克/毫升，80毫克/毫升，50毫克/毫升，40毫克/毫升，及25毫克/毫升。對於所有實驗，瓶子充填體積為1600毫升。

#### 冷凍程序

一系列漸增冷凍速率係用於此評估中：超低溫度冷凍庫底部貯架<超低溫度冷凍庫中間貯架<超低溫度冷凍庫頂部貯架<<乾冰。

< -70°C 冷凍庫係用於實驗中(容量：20.2立方呎(572升))。使用三個貯架。將每一個裝填九個2升PETG瓶。將瓶子儲存於室溫下，然後放置在冷凍庫中。冷凍係持續至少48小時。對於設計空間評估，係選擇具有漸增冷凍速率之三個位置。在底部貯架上之前方位置係用於最慢冷凍速率。較快速冷凍速率係在中間貯架上之中央位置處達成。在冷凍庫中之最快速冷凍速率係在頂部貯架上之後方/右邊位置

處進行。

關於藉由乾冰冷凍，一個瓶子係被乾冰完全地圍繞，歷經至少8小時。於苯乙烯泡棉箱中，將底部以一層乾冰(約3至5公分厚)覆蓋。將一個瓶子放置站立於上方乾冰層上。因此，將瓶子與苯乙烯泡棉箱內壁間之空間以乾冰充填，直到全部表面，除蓋子之外，均被覆蓋為止。於冷凍時間後，將瓶子移除，並立即解凍，或放置在-70°C冷凍庫中，供儲存。

#### *解凍程序*

一系列解凍速率係用於此評估中：於4°C下之冷卻空氣 << 水浴 23°C < 水浴 37°C。

#### *分析*

進行下列分析，以特徵鑒定試樣：

- 滲透度
- 導電率
- pH
- 密度
- 藉由直接UV (280毫微米)之蛋白質濃度

關於濃度試驗，將試樣以水稀釋，直到達成吸光率 < 1.2 為止。使用 1.39 之在 280 毫微米下之阿達利母馬分子之吸光率係數。

#### *阿達利母馬溶液之特徵鑒定*

瓶子定圖譜研究係顯示在瓶子體積中朝向梯度液形成之輕微傾向。尤其是對於較緩慢冷凍與解凍速率，較高蛋白質濃度係在接近瓶子底部處檢出。此現象亦反映在導電率、密度及滲透度數據中。pH 顯現實際上恒定於所有測試條件中。

在超低溫度冷凍庫中，關於以瓶子為基礎系統之冷凍與解凍設計空間之先前研究中，已發現沉降作用之出現係為測定可容許操作範

圍邊界之主要破壞模式。在此項研究中，未發現此邊界，惟經研究之設計空間係涵蓋極寬廣範圍。此產物之獨特行爲亦被反映在此冷凍與解凍方法期間形成濃度梯度液之極低傾向中。在先前之研究中，結論是產物與製程固有梯度液形成係爲在某些處理條件下沉澱物出現之原因。因此，從製程觀點，測得此系統可適用於低-離子性調配物pH 5中之阿達利母馬達到247.5毫克/毫升之整體藥物濃度。在與其他所測試之阿達利母馬調配物比較下，所研究之阿達利母馬水調配物係令人驚訝地展現優越性能。

表73：在含有低離子性調配物之瓶子中，於剛解凍(23°C 水浴) 100毫克/毫升阿達利母馬中之蛋白質濃度、導電率、溶質度、密度及pH之分佈  
冷凍與解凍條件：-70°C 頂部/ 23°C 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	40	11	0.61	5.43	1.021	78.0
2	210	14	0.67	5.43	1.024	92.2
3	225	15	0.70	5.43	1.0253	98.1
4	200	17	0.72	5.46	1.0259	103.9
5	175	18	0.73	5.43	1.0268	100.2
6	180	18	0.74	5.43	1.0275	100.9
7	230	20	0.80	5.46	1.0284	109.1
8	180	22	0.81	5.45	1.0294	111.2
9	150	21	0.82	5.44	1.0307	118.0

冷凍與解凍條件：-70°C 中間/ 23°C 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	30	8	0.54	5.43	1.0174	65.3
2	175	18	0.68	5.44	1.0235	91.3
3	200	17	0.70	5.44	1.0245	92.1
4	185	17	0.72	5.44	1.0249	102.9
5	200	18	0.71	5.43	1.0248	95.6
6	200	20	0.73	5.44	1.0262	96.6
7	175	20	0.74	5.44	1.0283	107.5
8	180	20	0.77	5.45	1.0306	116.1
9	200	26	0.82	5.44	1.0346	131.1

冷凍與解凍條件：-70°C 底部/ 23°C 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	35	9	0.60	5.41	1.0195	73.2
2	200	13	0.68	5.41	1.0231	89.6
3	225	16	0.70	5.41	1.0241	93.2
4	180	15	0.71	5.41	1.0246	96.8
5	200	15	0.72	5.40	1.0249	95.7
6	200	19	0.73	5.41	1.0259	96.4
7	185	21	0.75	5.42	1.0272	102.6
8	200	26	0.79	5.41	1.0309	116.8
9	175	31	0.85	5.42	1.0372	141.5

表74：在含有低離子性調配物之瓶子中，於剛解凍(23°C 水浴) 140毫克/  
毫升阿達利母馬中之蛋白質濃度、導電率、溶質度、密度及pH之分佈

冷凍與解凍條件：-70°C 頂部/ 23°C 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	50	36	0.87	5.43	1.0338	130.0
2	215	42	0.90	5.43	1.0354	139.9
3	170	54	0.91	5.43	1.0362	144.9
4	210	41	0.84	5.44	1.0365	141.5
5	200	40	0.93	5.43	1.0364	157.7
6	200	41	0.92	5.43	1.0364	140.0
7	190	41	0.92	5.43	1.0363	143.4
8	180	44	0.82	5.43	1.037	150.1
9	140	45	0.95	5.41	1.038	148.3

冷凍與解凍條件：-70°C 中間/ 23°C 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	25	32	0.81	5.45	1.0284	112.0
2	175	34	0.84	5.44	1.0307	122.4
3	175	36	0.88	5.44	1.033	133.9
4	200	40	0.90	5.43	1.0342	134.6
5	220	40	0.92	5.43	1.0351	140.9
6	185	45	0.94	5.43	1.0369	143.6
7	210	47	0.97	5.43	1.0384	149.8
8	175	47	0.99	5.43	1.0399	160.3
9	190	48	1.01	5.43	1.0435	168.3

冷凍與解凍條件：-70℃ 底部/ 23℃ 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	75	28	0.75	5.45	1.0257	88.7
2	180	34	0.82	5.46	1.029	111.6
3	175	34	0.84	5.44	1.0313	123.5
4	220	37	0.86	5.44	1.0322	118.8
5	165	38	0.89	5.45	1.0337	126.3
6	215	44	0.95	5.45	1.0374	137.6
7	210	49	1.00	5.45	1.0407	149.6
8	150	53	1.03	5.43	1.0429	154.9
9	180	60	1.06	5.44	1.0501	183.2

表75：在含有低離子性調配物之瓶子中，於剛解凍(37℃ 水浴) 200毫克/  
毫升阿達利母馬中之蛋白質濃度、導電率、溶質度、密度及pH之分佈

冷凍與解凍條件：-70℃ 頂部/ 37℃ 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	40	37	0.89	5.26	1.0573	197.5
2	210	35	0.96	5.24	1.0573	195.3
3	175	34	0.96	5.22	1.0578	200.3
4	210	36	0.88	5.27	1.0579	193.9
5	210	39	0.89	5.24	1.058	210.6
6	190	39	0.84	5.27	1.058	213.8
7	200	41	0.88	5.27	1.058	206.7
8	170	41	0.88	5.24	1.0581	196.6
9	160	39	0.89	5.29	1.0595	201.9

冷凍與解凍條件：-70℃ 中央/ 37℃ 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	10	31	0.85	5.29	1.0485	170.2
2	185	35	0.89	5.31	1.0505	189.3
3	215	37	0.90	5.33	1.0518	191.7
4	185	38	0.89	5.27	1.0519	191.8
5	200	36	0.90	5.32	1.0528	196.3
6	200	48	0.90	5.28	1.0533	189.3
7	170	37	0.90	5.23	1.0536	193.1
8	215	39	0.91	5.33	1.0552	202.1
9	180	48	0.92	5.31	1.0613	225.5



冷凍與解凍條件：-70℃ 底部/ 37℃ 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	50	22	0.96	5.27	1.0361	107.1
2	185	29	0.83	5.26	1.0422	163.0
3	180	38	0.88	5.27	1.0522	201.2
4	185	41	0.90	5.24	1.0535	198.9
5	180	44	0.92	5.28	1.0552	201.4
6	195	40	0.91	5.32	1.0558	201.7
7	180	40	0.91	5.32	1.0560	199.6
8	175	41	0.85	5.26	1.0568	206.2
9	190	48	0.91	5.3	1.0619	229.3

表 76：在含有低離子性調配物之瓶子中，於剛解凍(23℃ 水浴) 247.5 毫克/  
毫升阿達利母馬中之蛋白質濃度、導電率、溶質度、密度及 pH 之分佈

冷凍與解凍條件：-70℃ 頂部/23℃ 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	65	46	0.98	5.28	1.0755	260.9
2	190	72	0.97	5.28	1.0751	270.8
3	190	56	0.97	5.28	1.0751	314.7
4	200	49	0.96	5.27	1.0751	274.8
5	200	58	0.96	5.27	1.0752	278.4
6	210	57	0.97	5.28	1.0752	275.0
7	210	76	0.96	5.28	1.0748	276.5
8	175	75	0.96	5.27	1.0754	274.5
9	150	62	0.97	5.28	1.0763	276.3

冷凍與解凍條件：-70℃ 中間/ 23℃ 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	80	37	0.95	5.29	1.0671	250.0
2	200	59	0.95	5.32	1.0704	251.3
3	175	51	0.97	5.31	1.0722	262.7
4	215	56	0.98	5.31	1.073	327.1
5	200	48	0.99	5.31	1.0739	267.7
6	200	67	0.98	5.31	1.0744	270.6
7	230	59	0.95	5.32	1.0753	273.2
8	175	70	0.96	5.32	1.0771	273.3
9	175	83	0.96	5.32	1.0825	289.6

冷凍與解凍條件：-70℃ 底部/ 23℃ 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	50	32	0.92	5.24	1.0632	215.3
2	220	59	0.95	5.27	1.069	221.7
3	175	72	0.96	5.27	1.0708	268.1
4	180	58	0.06	5.27	1.0725	260.7
5	210	63	0.96	5.27	1.0729	266.8
6	150	69	0.96	5.28	1.0744	280.3
7	225	50	0.96	5.29	1.0762	280.3
8	200	68	0.95	5.28	1.0789	288.6
9	180	70	0.95	5.29	1.0846	293.0

表 77：於乾冰冷凍後，在含有低離子性調配物之瓶子中，於剛解凍 (23℃ 水浴) 247.5 毫克/毫升阿達利母馬中之蛋白質濃度、導電率、溶質度、密度及 pH 之分佈

冷凍與解凍條件：乾冰冷凍/ 23℃ 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	50	51	0.94	5.28	1.0643	258.9
2	210	68	0.94	5.29	1.0683	261.9
3	180	50	0.95	5.29	1.0702	251.7
4	190	69	0.95	5.29	1.0732	262.2
5	210	72	0.96	5.31	1.0738	274.4
6	225	63	0.95	5.3	1.0746	265.7
7	160	57	0.95	5.3	1.0747	261.9
8	190	63	0.95	5.31	1.0749	270.9
9	200	50	0.95	5.31	1.075	271.4

冷凍與解凍條件：乾冰冷凍/ 2-8℃ 解凍

試樣名稱	體積毫升	溶質度 毫溶質度/ 公斤	導電率 mS/公分	pH	密度 克/立方 公分	阿達利母馬 濃度毫克/ 毫升
1	50	44	0.96	5.29	1.0665	263.1
2	190	53	0.96	5.31	1.0684	258.1
3	200	56	0.96	5.30	1.0691	247.6
4	200	58	0.96	5.30	1.0693	262.2
5	190	64	0.95	5.31	1.0695	243.2
6	200	61	0.95	5.3	1.0695	266.8
7	175	49	0.96	5.32	1.0697	256.2
8	200	50	0.95	5.31	1.0697	261.2
9	175	48	0.96	5.32	1.0704	247.1

## 附錄 A：PCS 數據

## 阿達利母馬

濃度 [毫克/毫升]	濃度 [毫克/毫升] 平均值	z-平均 [毫微米]	z-平均平均值 [毫微米]	吸收峰單體 [毫微米]	吸收峰單體 平均值 [毫微米]
9.35	9.35	2.08	2.08	2.55	2.55
23.40	23.27	2.30	2.47	2.81	2.87
22.70		2.77		3.01	
23.70		2.36		2.78	
34.80	34.20	1.56	1.55	1.85	1.87
35.70		1.54		1.82	
32.10		1.56		1.93	
35.40	36.10	1.61	1.63	1.92	1.92
36.10		1.64		1.93	
36.80		1.63		1.92	
42.10	43.00	1.75	1.75	2.12	2.12
45.60		1.78		2.15	
41.30		1.74		2.10	
60.20	57.40	2.06	2.02	2.27	2.37
55.90		2.04		2.45	
56.10		1.98		2.39	
63.20	65.87	2.11	2.24	2.52	2.67
71.70		2.49		2.89	
62.70		2.13		2.61	
73.40	75.13	2.38	2.41	2.83	2.89
75.60		2.51		3.01	
76.40		2.35		2.82	
78.60	78.07	2.53	2.55	2.99	2.99
78.80		2.62		3.01	
76.80		2.50		2.96	
90.40	95.73	2.80	2.85	3.35	3.41
107.40		2.99		3.55	
89.40		2.76		3.33	
96.20	94.77	2.88	2.86	3.50	3.50
96.00		2.91		3.61	
92.10		2.80		3.38	
201.00	206.63	4.52	4.82	5.22	5.74
227.50		5.04		6.12	
191.40		4.89		5.89	

## J695

濃度 [毫克/毫升]	濃度 [毫克/毫升] 平均值	z-平均 [毫微米]	z-平均平均值 [毫微米]	吸收峰單體 [毫微米]	吸收峰單體 平均值 [毫微米]
9.99	9.99	2.28	2.28	1.66	1.66
19.31	19.29	2.05	2.12	1.81	1.81
19.26		2.30		1.79	
19.29		2.02		1.84	
29.59	29.40	1.78	1.62	1.10	1.16
29.7		1.51		1.15	
28.91		1.56		1.22	
37.97	37.55	1.51	1.56	1.22	1.23
38.02		1.67		1.22	
36.65		1.49		1.24	
49.15	46.32	1.64	1.58	1.31	1.29
45.95		1.57		1.30	
43.87		1.53		1.26	
58.75	56.18	1.60	1.61	1.49	1.47
55.02		1.71		1.38	
54.76		1.53		1.53	
77.69	77.81	2.64	2.43	2.73	2.61
77.62		2.31		2.57	
78.13		2.35		2.52	
94.45	97.65	2.11	2.07	2.05	2.05
105.06		2.14		2.05	
93.45		1.97		2.04	
116.37	114.52	3.69	2.69	1.95	2.00
113.92		2.25		2.06	
113.27		2.13		1.99	
121.21	133.25	9.78	9.49	11.50	11.00
139.8		9.63		11.10	
138.73		9.06		10.40	
226.67	217.53	4.94	5.34	4.72	4.84
216.1		6.01		5.25	
209.83		5.06		4.55	

## 人類血清白蛋白

濃度 [毫克/毫升]	濃度 [毫克/毫升] 平均值	z-平均 [毫微米]	z-平均平均值 [毫微米]	吸收峰單體 [毫微米]	吸收峰單體 平均值 [毫微米]
9.88	9.88	14.90	14.90	2.32	2.32
22.94	22.89	8.26	8.29	1.2	1.18
22.73		8.28		1.18	
23.00		8.33		1.17	
36.78	36.47	7.40	7.44	1.22	1.23
37.33		7.80		1.24	
35.29		7.12		1.22	
45.97	46.06	7.09	6.92	1.27	1.25
47.61		6.54		1.24	
44.61		7.13		1.25	
58.47	58.56	5.94	6.13	1.3	1.31
62.69		6.04		1.31	
54.52		6.41		1.32	
61.89	60.31	5.83	6.14	1.33	1.32
59.76		6.57		1.34	
59.28		6.01		1.29	
75.37	76.24	5.58	5.46	1.4	1.40
83.69		5.14		1.45	
69.67		5.67		1.36	
92.90	85.87	5.30	5.14	1.49	1.47
84.22		5.05		1.49	
80.50		5.08		1.43	
115.93	112.74	4.78	4.94	1.68	1.61
110.00		5.04		1.58	
112.30		4.99		1.57	
182.79	177.69	9.85	9.13	2.27	2.19
178.24		9.29		2.21	
172.05		8.26		2.08	

## 附錄 B：SEC 數據

## 阿達利母馬

濃度 [毫克/毫升]	平均濃度 [毫克/毫升]	單體[%]	平均單體 [%]	聚集體[%]	平均聚集體 [%]	片段[%]	平均片段 [%]
9.35	9.35	99.40	99.40	0.50	0.50	0.10	0.10
23.40	23.27	99.60	99.57	0.40	0.40	0.10	0.10
22.70		99.50		0.40		0.10	
23.70		99.60		0.40		0.10	
34.80	34.20	99.50	99.47	0.50	0.47	0.10	0.10
35.70		99.40		0.50		0.10	
32.10		99.50		0.40		0.10	
35.40	36.10	99.40	99.40	0.60	0.53	0.10	0.10
36.10		99.40		0.50		0.10	
36.80		99.40		0.50		0.10	
42.10	43.00	99.40	99.33	0.50	0.57	0.10	0.10
45.60		99.30		0.60		0.10	
41.30		99.30		0.60		0.10	
60.20	57.40	99.30	99.30	0.60	0.60	0.10	0.10
55.90		99.30		0.60		0.10	
56.10		99.30		0.60		0.10	
63.20	65.87	99.30	99.27	0.60	0.67	0.10	0.10
71.70		99.20		0.70		0.10	
62.70		99.30		0.70		0.10	
73.40	75.13	99.20	99.23	0.70	0.70	0.10	0.10
75.60		99.20		0.70		0.10	
76.40		99.30		0.70		0.10	
78.60	78.07	99.30	99.30	0.60	0.60	0.10	0.10
78.80		99.30		0.60		0.10	
76.80		99.30		0.60		0.10	
90.40	95.73	99.20	99.13	0.80	0.80	0.10	0.10
107.40		99.10		0.80		0.10	
89.40		99.10		0.80		0.10	
96.20	94.77	99.10	99.03	0.80	0.87	0.10	0.10
96.00		99.00		0.90		0.10	
92.10		99.00		0.90		0.10	
201.00	206.63	98.80	98.80	1.10	1.10	0.10	0.10
227.50		98.80		1.10		0.10	
191.40		98.80		1.10		0.10	

## J695

濃度 [毫克/毫升]	平均濃度 [毫克/毫升]	單體[%]	平均單體 [%]	聚集體[%]	平均聚集體 [%]	片段[%]	平均片段 [%]
9.99	9.99	99.39	99.39	0.44	0.44	0.17	0.17
19.31	19.29	99.38	99.38	0.44	0.44	0.18	0.19
19.26		99.37		0.44		0.20	
19.29		99.38		0.44		0.18	
29.59	29.40	99.31	99.33	0.51	0.50	0.18	0.18
29.70		99.32		0.50		0.18	
28.91		99.35		0.48		0.17	
37.97	37.55	99.31	99.29	0.52	0.52	0.17	0.19
38.02		99.27		0.52		0.21	
36.65		99.30		0.51		0.19	
49.15	46.32	99.19	99.20	0.60	0.60	0.21	0.20
45.95		99.20		0.60		0.20	
43.87		99.20		0.61		0.19	
58.75	56.18	99.16	99.16	0.64	0.64	0.21	0.21
55.02		99.17		0.64		0.20	
54.76		99.15		0.63		0.22	
77.69	77.81	99.11	99.10	0.70	0.70	0.19	0.20
77.62		99.09		0.69		0.22	
78.13		99.10		0.70		0.20	
94.45	97.65	99.05	99.06	0.72	0.71	0.23	0.22
105.06		99.06		0.72		0.21	
93.45		99.07		0.70		0.23	
116.37	114.52	98.94	98.91	0.85	0.88	0.21	0.22
113.92		98.91		0.88		0.22	
113.27		98.89		0.90		0.22	
121.21	133.25	98.87	98.89	0.91	0.90	0.22	0.22
139.80		98.89		0.89		0.22	
138.73		98.90		0.89		0.21	
226.67	217.53	98.58	98.57	1.19	1.21	0.24	0.23
216.10		98.58		1.18		0.24	
209.83		98.54		1.25		0.21	

## 人類血清白蛋白

試樣	吸收峰1		吸收峰2		吸收峰3		吸收峰4 (HSA)	
	面積 [mVs]	面積 [%]	面積 [mVs]	面積 [%]	面積 [mVs]	面積 [%]	面積 [mVs]	面積 [%]
試樣1 c= 9.88毫克/毫升	59.710	2.312	2.975	0.115	43.159	1.671	2477.282	95.902
試樣2 c= 22.94毫克/毫升	102.785	2.685	7.859	0.205	73.588	1.923	3643.350	95.187
試樣3 c= 22.73毫克/毫升	124.226	3.071	11.038	0.273	83.310	2.059	3826.908	94.597
試樣4 c= 23.00毫克/毫升	138.353	3.266	14.525	0.343	88.429	2.087	3994.990	94.304
試樣5 c= 36.78毫克/毫升	147.465	3.459	14.537	0.341	91.304	2.141	4010.385	94.059
試樣6 c= 37.33毫克/毫升	153.956	3.552	14.707	0.339	94.093	2.171	4071.680	93.938
試樣7 c= 35.29毫克/毫升	171.478	3.608	16.064	0.338	105.244	2.214	4459.830	93.839
試樣8 c= 45.97毫克/毫升	180.027	3.675	17.392	0.355	109.717	2.239	4592.102	93.731
試樣9 c= 47.61毫克/毫升	193.325	3.719	19.206	0.370	116.474	2.241	4868.705	93.670
試樣10 c= 44.61毫克/毫升	191.512	3.799	19.167	0.380	112.261	2.227	4718.554	93.594
試樣11 c= 58.47毫克/毫升	215.044	4.026	17.870	0.335	118.481	2.218	4989.978	93.421
試樣12 c= 62.69毫克/毫升	218.072	4.037	20.088	0.372	122.251	2.263	5041.542	93.328
試樣13 c= 54.52毫克/毫升	228.014	4.053	19.957	0.355	126.583	2.250	5251.513	93.343
試樣14 c= 61.89毫克/毫升	231.235	4.085	22.518	0.398	127.330	2.250	5279.038	93.267
試樣15 c= 59.76毫克/毫升	237.894	4.100	22.939	0.395	130.352	2.246	5411.384	93.258
試樣16 c= 59.28毫克/毫升	202.103	4.139	17.178	0.352	108.780	2.228	4554.912	93.282
試樣17 c= 75.37毫克/毫升	230.552	4.196	18.565	0.338	123.207	2.242	5122.467	93.224
試樣18 c= 83.69毫克/毫升	215.365	4.162	18.136	0.351	110.152	2.129	4830.372	93.358

試樣	吸收峰1		吸收峰2		吸收峰3		吸收峰4 (HSA)	
	面積 [mVs]	面積 [%]	面積 [mVs]	面積 [%]	面積 [mVs]	面積 [%]	面積 [mVs]	面積 [%]
試樣21 c= 84.22毫克/毫升	233.866	4.316	21.951	0.405	116.325	2.147	5046.183	93.132
試樣22 c= 80.50毫克/毫升	221.816	4.461	18.940	0.381	111.006	2.232	4620.655	92.926
試樣23 c= 115.93毫克/毫升	223.187	4.783	16.684	0.358	104.116	2.231	4322.732	92.629
試樣24 c= 110.00毫克/毫升	209.281	4.718	18.745	0.423	96.430	2.174	4111.363	92.686
試樣25 c= 112.30毫克/毫升	172.657	4.537	15.457	0.406	80.850	2.125	3536.192	92.932
試樣26 c= 182.79毫克/毫升	178.208	4.950	15.254	0.424	80.906	2.247	3325.648	92.379
試樣27 c= 178.24毫克/毫升	194.516	4.814	17.323	0.429	90.433	2.238	3738.717	95.520
試樣28 c= 172.05毫克/毫升	79.605	2.103	12.876	0.340	74.965	1.981	3617.238	95.576



## 附錄 C：IEC 數據

## 阿達利母馬

濃度 [毫克/毫升]	平均濃度 [毫克/毫升]	總和離胺酸 [%]	平均總和 [%]
9.35	9.35	86.09	86.09
23.40	23.27	86.15	86.13
22.70		86.12	
23.70		86.13	
34.80	34.20	86.15	86.11
35.70		86.11	
32.10		86.06	
35.40	36.10	86.03	86.04
36.10		86.06	
36.80		86.03	
42.10	43.00	85.98	85.96
45.60		85.95	
41.30		85.95	
60.20	57.40	85.97	85.96
55.90		85.94	
56.10		85.97	
63.20	65.87	85.96	85.94
71.70		85.97	
62.70		85.90	
73.40	75.13	85.99	85.97
75.60		85.98	
76.40		85.95	
78.60	78.07	86.00	85.97
78.80		85.97	
76.80		85.94	
90.40	95.73	85.96	85.92
107.40		85.97	
89.40		85.83	
96.20	94.77	85.93	85.88
96.00		85.87	
92.10		85.84	
201.00	206.63	85.88	85.90
227.50		85.97	
191.40		85.84	

## J695

濃度 [毫克/毫升]	平均濃度 [毫克/毫升]	總和吸收峰 1-7 [%]	平均總和 吸收峰 1-7 [%]	總和酸性 吸收峰[%]	平均總和 酸性吸收峰 [%]	總和鹼性 吸收峰[%]	平均總和 鹼性吸收峰 [%]
9.99	9.99	89.24	89.24	10.24	10.24	0.52	0.52
19.31	19.29	89.32	89.28	10.19	10.21	0.50	0.51
19.26		89.23		10.26		0.52	
19.29		89.30		10.19		0.51	
29.59	29.40	89.33	89.30	10.14	10.17	0.54	0.53
29.70		89.26		10.20		0.54	
28.91		89.32		10.16		0.52	
37.97	37.55	89.32	89.30	10.13	10.15	0.56	0.55
38.02		89.27		10.18		0.55	
36.65		89.31		10.15		0.55	
49.15	46.32	89.07	89.10	10.40	10.37	0.53	0.53
45.95		89.12		10.34		0.54	
43.87		89.12		10.36		0.53	
58.75	56.18	89.13	89.17	10.36	10.31	0.52	0.53
55.02		89.21		10.27		0.52	
54.76		89.18		10.29		0.54	
77.69	77.81	89.22	89.17	10.25	10.29	0.53	0.54
77.62		89.09		10.36		0.55	
78.13		89.20		10.26		0.55	
94.45	97.65	89.20	89.16	10.28	10.30	0.52	0.54
105.06		89.12		10.33		0.55	
93.45		89.16		10.29		0.55	
116.37	114.52	89.03	89.08	10.41	10.36	0.56	0.55
113.92		89.15		10.31		0.54	
113.27		89.06		10.37		0.56	
121.21	133.25	89.26	89.13	10.20	10.33	0.54	0.55
139.80		89.07		10.38		0.56	
138.73		89.05		10.40		0.55	
226.67	217.53	88.72	88.78	10.69	10.63	0.59	0.59
216.10		88.82		10.60		0.58	
209.83		88.81		10.60		0.59	

## 附錄 D

試驗項目	成份	測試之 延續時間	63毫克/毫升	220毫克/毫升
			5°C	5°C
透明性與乳白色	混濁度	最初	3.6	8.0
		1個月	3.5	8.0
		3個月	3.5	7.4
液體之顯色程度	B尺度	最初	< B9	=B9
		1個月	< B9	< B8
		3個月	< B9	< B7
pH	單一值	最初	5.3	5.4
		1個月	5.3	5.4
		3個月	5.3	5.4
微粒子污染：可見粒子	目視評分	最初	2.2	0.2
		1個月	2.2	0.4
		3個月	2.1	0.2
微粒子污染：亞可見粒子	粒子 $\geq$ 10微米 [/容器]	最初	181	357
		1個月	423	290
		3個月	216	1762
	粒子 $\geq$ 25微米 [/容器]	最初	15	3
		1個月	11	18
		3個月	2	50
尺寸排阻層析(SE-HPLC)	主要吸收峰 (聚集體) [%]	最初	0.2	0.5
		1個月	0.2	0.6
		3個月	0.2	0.7
	主要吸收峰 (單體) [%]	最初	99.8	99.4
		1個月	99.7	99.3
		3個月	99.7	99.2
	主要吸收峰 (片段) [%]	最初	0.1	0.1
		1個月	0.1	0.1
		3個月	0.0	0.0
陽離子交換 HPLC (CEX-HPLC)	第1個酸性區域 [%]	最初	2.2	2.2
		1個月	2.2	2.2
		3個月	2.1	2.0
	第2個酸性區域 [%]	最初	10.4	10.3
		1個月	10.2	10.0
		3個月	10.4	10.2
	離胺酸變型 之總和[%]	最初	86.0	86.1
		1個月	85.9	85.9
		3個月	86.2	86.1
	在離胺酸1與 離胺酸2間 之吸收峰[%]	最初	0.8	0.8
		1個月	1.0	1.0
		3個月	0.8	0.8
	在離胺酸2後 之吸收峰[%]	最初	0.5	0.6
		1個月	0.7	0.9
		3個月	0.5	0.8

試驗項目	成份	測試之 延續時間	63毫克/毫升	220毫克/毫升
			25°C/ 60% R.H.	25°C/60% R.H.
透明性與乳白色	混濁度	最初	-	-
		1個月	3.51	8.55
		3個月	3.70	7.56
液體之顯色程度	B尺度	最初	-	-
		1個月	< B9	< B8
		3個月	< B9	< B7
pH	單一值	最初	-	-
		1個月	5.4	5.4
		3個月	5.3	5.4
微粒子污染：可見粒子	目視評分	最初	-	-
		1個月	2.5	0.7
		3個月	3.4	0.0
微粒子污染：亞可見粒子	粒子 $\geq$ 10微米 [/容器]	最初	-	-
		1個月	412	490
		3個月	277	4516
	粒子 $\geq$ 25微米 [/容器]	最初	-	-
		1個月	10	14
		3個月	7	128
尺寸排阻層析(SE-HPLC)	主要吸收峰 (聚集體) [%]	最初	-	-
		1個月	0.3	0.8
		3個月	0.4	1.1
	主要吸收峰 (單體) [%]	最初	-	-
		1個月	99.6	99.0
		3個月	99.4	98.6
	主要吸收峰 (片段) [%]	最初	-	-
		1個月	0.2	0.2
		3個月	0.2	0.2
陽離子交換 HPLC (CEX-HPLC)	第1個酸性區域 [%]	最初	-	-
		1個月	2.5	2.4
		3個月	3.4	3.2
	第2個酸性區域 [%]	最初	-	-
		1個月	11.7	11.4
		3個月	15.3	14.9
	離胺酸變型 之總和[%]	最初	-	-
		1個月	83.6	83.8
		3個月	79.2	79.2
	在離胺酸1 與離胺酸2間 之吸收峰[%]	最初	-	-
		1個月	1.2	1.3
		3個月	1.3	1.3
	在離胺酸2後之 吸收峰[%]	最初	-	-
		1個月	0.9	1.1
		3個月	0.8	1.4

試驗項目	成份	測試之 延續時間	63毫克/毫升	220毫克/毫升
			40°C/75% R.H.	40°C/75% R.H.
透明性與乳白色	混濁度	最初	-	-
		1個月	3.93	7.80
		3個月	3.70	8.10
液體之顯色程度	B尺度	最初	-	-
		1個月	=B9	=B8
		3個月	< B8	< B7
pH	單一值	最初	-	-
		1個月	5.3	5.4
		3個月	5.3	5.4
微粒子污染：可見粒子	目視評分	最初	-	-
		1個月	6.7	0.5
		3個月	17.5	0.4
微粒子污染：亞可見粒子	粒子 $\geq$ 10微米 [/容器]	最初	-	-
		1個月	1088	518
		3個月	166	612
	粒子 $\geq$ 25微米 [/容器]	最初	-	-
		1個月	16	14
		3個月	11	30
尺寸排阻層析(SE-HPLC)	主要吸收峰 (聚集體) [%]	最初	-	-
		1個月	0.4	1.4
		3個月	0.8	2.5
	主要吸收峰 (單體) [%]	最初	-	-
		1個月	99.0	98.0
		3個月	97.8	96.0
	主要吸收峰 (片段) [%]	最初	-	-
		1個月	0.6	0.6
		3個月	1.4	1.5
陽離子交換 HPLC (CEX-HPLC)	第1個酸性區域 [%]	最初	-	-
		1個月	6.7	6.8
		3個月	17.5	17.4
	第2個酸性區域 [%]	最初	-	-
		1個月	25.1	23.6
		3個月	40.9	38.6
	離胺酸變型 之總和[%]	最初	-	-
		1個月	64.5	62.0
		3個月	36.0	36.0
	在離胺酸1 與離胺酸2間 之吸收峰[%]	最初	-	-
		1個月	2.2	2.5
		3個月	2.9	3.1
	在離胺酸2後 之吸收峰[%]	最初	-	-
		1個月	1.5	5.2
		3個月	1.7	4.8

附錄 E

2-8°C

試驗對象	成分	測試之 足跡時間	透明且無色															
			U 50 01 <sup>2</sup>	U 50 02 <sup>2</sup>	U 50 03 <sup>2</sup>	U 50 04 <sup>2</sup>	U 50 05 <sup>2</sup>	U 50 06 <sup>2</sup>	U 50 07 <sup>2</sup>	U 50 08 <sup>2</sup>	U 200 01 <sup>7</sup>	U 200 02 <sup>7</sup>	U 200 03 <sup>7</sup>	U 200 04 <sup>7</sup>	U 200 05 <sup>7</sup>	U 200 06 <sup>7</sup>	U 200 07 <sup>7</sup>	U 200 08 <sup>7</sup>
透明性與乳白色	吸收 (340毫微米)	最初	0.096	0.096	0.095	0.100	0.104	0.105	0.099	0.107	0.181	0.187	0.182	0.182	0.184	0.197	0.191	0.199
		1個月	0.102	0.102	0.093	0.094	0.099	0.101	0.097	0.100	0.181	0.185	0.189	0.181	0.190	0.180	0.192	0.192
顏色程度	目視	最初	透明且無色															
		1個月	透明且無色															
pH	單一值	最初	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5	5.6	5.5
		1個月	5.4	5.5	5.5	5.4	5.5	5.4	5.5	5.5	5.5	5.6	5.6	5.5	5.5	5.6	5.5	5.6
尺寸排阻層析 (SE-HPLC)	主要吸收峰 (聚苯醌) [%] 主要吸收峰 (單體) [%] 主要吸收峰 (片段) [%] 第1個酸性區域 [%] 第2個酸性區域 [%]	最初	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6
		1個月	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1.7	0.2	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7
陽離子交換 HPLC (CEX-HPLC)	在磺胺型之總和 在磺胺1與磺胺2 間之吸收峰 [%] 在磺胺2後之吸收峰 [%]	最初	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.7	99.7	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3
		1個月	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.3	99.3	99.2	99.3	99.3	99.2	99.2	99.2
精離子交換 HPLC (CEX-HPLC)	第1個酸性區域 [%] 第2個酸性區域 [%] 磺胺型之總和 [%] 磺胺1與磺胺2 間之吸收峰 [%] 在磺胺2後之吸收峰 [%]	最初	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
		1個月	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
精離子交換 HPLC (CEX-HPLC)	第1個酸性區域 [%] 第2個酸性區域 [%] 磺胺型之總和 [%] 磺胺1與磺胺2 間之吸收峰 [%] 在磺胺2後之吸收峰 [%]	最初	3.8	3.7	3.7	3.7	3.7	3.9	3.8	3.8	3.7	3.8	3.6	3.6	3.9	2.7	2.7	2.8
		1個月	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.5	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
精離子交換 HPLC (CEX-HPLC)	第1個酸性區域 [%] 第2個酸性區域 [%] 磺胺型之總和 [%] 磺胺1與磺胺2 間之吸收峰 [%] 在磺胺2後之吸收峰 [%]	最初	10.9	10.7	10.4	10.5	10.4	10.1	10.3	10.2	10.4	10.2	9.8	10.1	9.5	11.6	11.5	11.3
		1個月	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.3	9.1	9.0	9.1	9.1	9.0	9.1	9.1
精離子交換 HPLC (CEX-HPLC)	第1個酸性區域 [%] 第2個酸性區域 [%] 磺胺型之總和 [%] 磺胺1與磺胺2 間之吸收峰 [%] 在磺胺2後之吸收峰 [%]	最初	83.8	84.2	84.4	84.3	84.4	84.6	84.4	84.6	84.4	84.6	83.9	85.2	84.4	84.3	84.5	84.5
		1個月	86.0	86.0	86.0	86.0	86.0	85.9	86.1	86.0	86.3	86.1	86.1	86.2	86.0	86.0	86.1	86.1
精離子交換 HPLC (CEX-HPLC)	第1個酸性區域 [%] 第2個酸性區域 [%] 磺胺型之總和 [%] 磺胺1與磺胺2 間之吸收峰 [%] 在磺胺2後之吸收峰 [%]	最初	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
		1個月	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.6
精離子交換 HPLC (CEX-HPLC)	第1個酸性區域 [%] 第2個酸性區域 [%] 磺胺型之總和 [%] 磺胺1與磺胺2 間之吸收峰 [%] 在磺胺2後之吸收峰 [%]	最初	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
		1個月	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7

25°C

試驗對象	成分	測試之 延遲時間	透明白色															
			U 50 01 <sup>2</sup>	U 50 02 <sup>2</sup>	U 50 03 <sup>2</sup>	U 50 04 <sup>2</sup>	U 50 05 <sup>2</sup>	U 50 06 <sup>2</sup>	U 50 07 <sup>2</sup>	U 50 08 <sup>2</sup>	U 200 01 <sup>2</sup>	U 200 02 <sup>2</sup>	U 200 03 <sup>2</sup>	U 200 04 <sup>2</sup>	U 200 05 <sup>2</sup>	U 200 06 <sup>2</sup>	U 200 07 <sup>2</sup>	U 200 08 <sup>2</sup>
透明性與乳白色	吸收(340毫微米)	最初	0.096	0.096	0.095	0.100	0.104	0.105	0.099	0.107	0.181	0.187	0.192	0.184	0.197	0.181	0.189	
		1個月	0.106	0.103	0.098	0.099	0.104	0.096	0.104	0.096	0.178	0.177	0.188	0.189	0.200	0.194	0.194	0.172
顯色程度	目視	最初	透明白色															
		1個月	透明白色															
pH	單一值	最初	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5
		1個月	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.5	5.6	5.6	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
尺寸排阻層析 (SE-HPLC)	主要吸收峰 (空氣層) [%]	最初	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6
		1個月	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	?	0.2	0.2	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	0.9
	主要吸收峰 (單體) [%]	最初	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.7	99.7	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3
		1個月	99.9	99.6	99.6	99.6	99.6	7	99.5	99.5	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.9
	主要吸收峰 (片段) [%]	最初	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
		1個月	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
層析子交換 HPLC (CEX-HPLC)	第1個酸性區域 [%]	最初	3.8	3.7	3.7	3.7	3.7	3.9	3.8	3.8	3.7	3.8	3.6	4.5	3.8	2.7	2.7	2.8
		1個月	4.1	4.2	4.1	4.1	4.2	4.2	4.1	4.2	4.0	4.0	4.1	4.1	4.0	4.1	4.1	4.0
	第2個酸性區域 [%]	最初	10.9	10.7	10.4	10.5	10.4	10.1	10.3	10.2	10.4	10.2	9.8	10.1	9.5	11.6	11.5	11.3
		1個月	10.9	10.9	11.0	10.9	11.0	11.0	11.0	11.1	10.6	10.7	10.7	10.7	10.7	10.7	10.7	10.9
	離胺雙型之總和 [%]	最初	83.8	84.2	84.4	84.3	84.4	84.6	84.4	84.6	84.6	84.6	85.2	83.9	85.2	84.4	84.3	84.5
		1個月	83.3	83.4	83.3	83.3	83.2	83.2	83.3	83.1	83.4	83.6	83.4	83.6	83.6	83.5	83.3	83.4
	在離胺1與離胺2 間之吸收率 [%]	最初	0.9	0.9	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
		1個月	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8	0.9	0.8
	在離胺2後之吸收率 [%]	最初	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
		1個月	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9

40°C

試驗對象	成分	測試之 延續時間	U 50		U 200		U 200		U 200		U 200		U 200		U 200				
			01 <sup>7</sup>	02 <sup>7</sup>	03 <sup>7</sup>	04 <sup>7</sup>	05 <sup>7</sup>	06 <sup>7</sup>	07 <sup>7</sup>	08 <sup>7</sup>	01 <sup>7</sup>	02 <sup>7</sup>	03 <sup>7</sup>	04 <sup>7</sup>	05 <sup>7</sup>	06 <sup>7</sup>	07 <sup>7</sup>	08 <sup>7</sup>	
透明性與 乳白色	吸收(340毫微米)	最初	0.096	0.096	0.100	0.104	0.105	0.099	0.107	0.181	0.187	0.182	0.182	0.184	0.197	0.191	0.198		
		1個月	0.100	0.110	0.099	0.101	0.111	0.116	0.105	0.113	0.204	0.202	0.188	0.205	0.189	0.216	0.209	0.224	
顏色程度	目視	最初	透明且無色																
		1個月	透明且無色																
pH	單一值	最初	5.40	5.41	5.41	5.40	5.40	5.41	5.41	5.41	5.57	5.56	5.55	5.56	5.55	5.54	5.55	5.52	
		1個月	5.42	5.43	5.43	5.44	5.43	5.44	5.44	5.44	5.54	5.55	5.55	5.55	5.55	5.55	5.55	5.53	5.54
		最初	0.106	0.104	0.119	0.136	0.139	0.145	0.158	0.159	0.489	0.509	0.491	0.484	0.492	0.488	0.515	0.575	
		1個月	0.324	0.338	0.322	0.334	0.347	0.349	0.411	0.444	1.308	1.343	1.331	1.340	1.341	1.374	1.453	1.521	
		最初	99.605	99.629	99.632	99.628	99.619	99.626	99.653	99.655	99.284	99.298	99.348	99.333	99.313	99.349	99.320	99.280	
		1個月	98.924	98.914	98.931	98.914	98.895	98.894	98.845	98.782	97.920	97.876	97.892	97.901	97.898	97.861	97.752	97.701	
		最初	0.289	0.267	0.248	0.238	0.242	0.229	0.189	0.186	0.218	0.198	0.161	0.183	0.195	0.163	0.165	0.135	
		1個月	0.752	0.751	0.747	0.752	0.758	0.757	0.744	0.773	0.773	0.781	0.777	0.759	0.762	0.765	0.784	0.778	
		最初	3.8	3.7	3.7	3.7	3.7	3.8	3.8	3.8	3.8	3.7	3.8	3.6	4.5	3.9	2.7	2.7	2.8
		1個月	5.4	5.8	5.3	5.8	5.4	5.8	5.4	5.5	5.3	5.6	5.3	5.6	5.3	5.6	5.3	5.4	5.4
陽離子交換 HPLC (CEX-HPLC)	第1個酸性區域 第2個酸性區域	最初	10.9	10.7	10.4	10.5	10.4	10.1	10.3	10.2	10.4	10.2	9.8	10.1	9.5	11.6	11.5	11.3	
		1個月	29.8	29.8	29.7	29.7	29.8	29.8	30.2	30.7	28.6	28.9	28.5	28.7	28.8	28.8	28.9	29.2	
		最初	83.8	84.2	84.4	84.3	84.4	84.6	84.4	84.6	84.4	84.6	85.2	83.9	85.2	84.4	84.3	84.5	
		1個月	61.2	61.0	61.3	61.0	61.2	60.9	60.9	60.5	62.0	61.7	62.0	61.8	62.0	61.8	61.5	61.4	
		最初	0.9	8.3	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	
		1個月	2.3	2.1	2.3	2.2	2.2	2.2	2.1	2.0	2.2	2.0	2.2	2.0	2.2	2.0	2.0	2.0	
		最初	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.6	
		1個月	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.3	1.4	1.4	1.4	1.9	1.9	2.0	1.9	1.9	1.9	2.0	
		最初	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.3	1.4	1.4	1.4	1.9	1.9	2.0	1.9	1.9	1.9	2.0	
		1個月	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.3	1.4	1.4	1.4	1.9	1.9	2.0	1.9	1.9	1.9	2.0	



## 等效事物

熟諳此藝者將明瞭，或能夠使用不超過例行實驗術，以確定對本文中所述之本發明特殊具體實施例之許多等效事物。此種等效事物係意欲被下述請求項所涵蓋。在整個本申請案中引用之所有參考資料、專利及已公告之專利申請案均併於本文供參考。

## 發明摘要

※ 申請案號：102119838(由097146498分割)

※ 申請日：097/11/28

※IPC 分類：A61K 38/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)

## 【發明名稱】

蛋白質調配物及製造其之方法

PROTEIN FORMULATIONS AND METHODS OF MAKING SAME

## 【中文】

本發明係提供包含水與蛋白質之含水調配物，及其製造方法。本發明之含水調配物可為高蛋白質調配物，及/或可具有由於低含量離子性賦形劑所造成之低程度導電率。亦被包含在本發明中者為包含水與具有低滲透度蛋白質之調配物。

## 【英文】

The invention provides an aqueous formulation comprising water and a protein, and methods of making the same. The aqueous formulation of the invention may be a high protein formulation and/or may have low levels of conductivity resulting from the low levels of ionic excipients. Also included in the invention are formulations comprising water and proteins having low osmolality.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（13）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

（無元件符號說明）

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

（無）

代。描述人化作用方法之其他參考資料包括 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), 其每一項均併於本文供參考。

### 人類抗體

或者, 目前可產生轉基因動物(例如老鼠), 其係能夠在免疫作用時, 於內源免疫球蛋白生產不存在下, 產生人類抗體之全滿存庫。例如, 已經描述在嵌合與胚細胞系突變老鼠中抗體重鏈接合區域( $J_H$ )基因之同合子缺失會造成內源抗體生產之完全抑制。人類胚細胞系免疫球蛋白基因陣列在此種胚細胞系突變老鼠中之轉移將會造成人類抗體在抗原激發時產生。參閱, 例如 Jakobovits 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 2551 (1993) ; Jakobovits 等人, Nature, 362 : 255-258 (1993) ; Bruggermann 等人, Year in Immuno., 7 : 33 (1993)。人類抗體亦可衍生自噬菌體-顯示庫(Hoogenboom 等人, J. Mol. Biol., 227 : 381 (1991) ; J. Mol. Biol., 222 : 581-597 (1991))。

於一項具體實施例中, 本發明之調配物包含抗體或其抗原結合部份, 其會結合人類  $TNF\alpha$ , 包括例如阿達利母馬(adalimumab) (亦被稱為 Humira、阿達利母馬(adalimumab)或 D2E7 ; Abbott 實驗室)。於一項具體實施例中, 抗體或其抗原結合片段係解離自人類  $TNF\alpha$ , 具有  $K_d$  為  $1 \times 10^{-8}M$  或較低, 與  $K_{off}$  速率常數為  $1 \times 10^{-3}s^{-1}$  或較低, 兩者均藉由表面電漿激元共振測得, 且在標準活體外 L929 檢測中使人類  $TNF\alpha$  細胞毒性中和, 具有  $IC_{50}$  為  $1 \times 10^{-7}M$  或較低。製造具有對於人類  $TNF\alpha$  之高親和力之人類中和抗體(包括抗體順序)之實例與方法, 係描述於美國專利 6,090,382 中(稱為 D2E7), 併入本文供參考。

於一項具體實施例中, 本發明之調配物包含人類抗- $TNF\alpha$  抗體或其抗原結合片段, 其具有輕鏈可變區(LCVR), 其具 CDR3 區域, 該 CDR3 區域包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列, 並具有重鏈可變區(HCVR), 其具 CDR3 區域, 該 CDR3 區域包含 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列。較佳者, 該 LCVR 另具有 CDR2 區域, 該 CDR2 區域包含 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列(亦即, D2E7 VL CDR2), 且該 HCVR 另具有 CDR2 區域, 該 CDR2 區域包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序

列(亦即，D2E7 VH CDR2)。更佳者，該LCVR另具有CDR1區域，該CDR1區域包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列(亦即，D2E7 VL CDR1)，且該HCVR具有CDR1區域，該CDR1區域包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列(亦即，D2E7 VH CDR1)。

於一項具體實施例中，用於本發明之調配物之人類抗-TNF  $\alpha$  抗體或其抗原結合部份含有包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列之輕鏈可變區(LCVR)(亦即，D2E7 VL)及包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之重鏈可變區(HCVR)(亦即，D2E7 VH)。

於一項具體實施例中，本發明之調配物包含抗體或其抗原結合部份，其會結合人類IL-12，包括例如抗體J695 (Abbott實驗室) (美國專利6,914,128)。J695為經設計以將間白血球活素-12與間白血球活素-23作為標的且使其中和之完全人類單株抗體。於一項具體實施例中，抗體或其抗原結合片段係具有下述特徵：其會解離自人類IL-1 $\alpha$ ，具有 $K_D$ 為 $3 \times 10^{-7}$ M或較低；解離自人類IL-1 $\beta$ ，具有 $K_D$ 為 $5 \times 10^{-5}$ M或較低；及不會結合老鼠IL-1 $\alpha$ 或老鼠IL-1 $\beta$ 。製造具有對於人類IL-12之高親和力之人類中和抗體(包括抗體順序)之實例與方法，係描述於美國專利6,914,128中，併入本文供參考。

於一項具體實施例中，本發明之調配物包含抗體或其抗原結合部份，其會結合人類IL-18，包括例如抗體2.5(E)mg1 (Abbott Bioresearch) (參閱美國專利申請案號2005/0147610，併入本文供參考)。

於一項具體實施例中，本發明之調配物包含抗-IL-12 /抗-IL-23抗體或其抗原結合部份，其係為抗體1D4.7 (Abbott實驗室) (參閱2007年1月11日公告之WO 2007/005608 A2，併入本文供參考)。

於一項具體實施例中，本發明之調配物包含抗-IL-13抗體或其抗原結合部份，其係為抗體13C5.5 (Abbott實驗室) (參閱PCT/US2007/19660 (WO 08/127271)，併入本文供參考)。

於一項具體實施例中，本發明之調配物包含抗體或其抗原結合部份，其係為抗體7C6、抗-澱粉狀蛋白 $\beta$ 抗體(Abbott實驗室；參閱PCT公報WO 07/062852，併入本文供參考)。

### 雙專一性抗體

雙專一性抗體(BsAb)係為具有對於至少兩種不同抗原決定部位之結合專一性之抗體。此種抗體可衍生自全長抗體或抗體片段(例如F(ab')<sub>2</sub>雙專一性抗體)。

製造雙專一性抗體之方法係為此項技藝中已知。全長雙專一性抗體之傳統製造，係以兩種免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現為基礎，其

## 【序列表】

&lt;110&gt; 美商亞培公司

&lt;120&gt; 蛋白質調配物及製造其之方法

&lt;140&gt; TW 102119838

&lt;141&gt; 2008-11-28

&lt;150&gt; 61/004,992

&lt;151&gt; 2007-11-30

&lt;160&gt; 8

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 可變輕鏈

&lt;400&gt; 1

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

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 可變重鏈

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp  
                   20                    25                    30  
 Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
                   35                    40                    45  
 Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser  
                   50                    55                    60  
 Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu  
                   65                    70                    75  
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 80                    85                    90                    95  
 Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp  
                   100                    105                    110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                    120

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 變異體

<222> 9

<223> Xaa = Thr or Ala

<223> 可變輕鏈 CDR3

<400> 3

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa  
 1                    5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 變異體

<222> 12

<223> Xaa = Tyr or Asn

<223> 可變重鏈 CDR3

<400> 4

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa  
 1                    5                    10

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可變輕鏈 CDR2

<400> 5  
 Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser  
 1 5

<210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可變重鏈 CDR2

<400> 6  
 Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 1 5 10 15  
 Glu Gly

<210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可變輕鏈 CDR1

<400> 7  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可變重鏈 CDR1

<400> 8  
 Asp Tyr Ala Met His  
 1 5



## 申請專利範圍

1. 一種含水調配物，包含濃度至少約50毫克/毫升之抗體或其抗原結合片段與水，其中該調配物具有低於約2.5 mS/公分之導電率，  
其中該抗體或其抗原結合片段具有輕鏈可變區(LCVR)，其具有包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的CDR3區域，包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的CDR2區域，及包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列的CDR1區域，以及重鏈可變區(HCVR)，其具有包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的CDR3區域，包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的CDR2區域，及包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列的CDR1區域。
2. 如請求項1之調配物，其中該抗體或其抗原結合片段具有LCVR，其包含SEQ ID NO:1所示之胺基酸序列，及HCVR，其包含SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列。
3. 如請求項2之調配物，其中該抗體或其抗原結合片段為阿達利母馬(adalimumab)。
4. 如請求項1至3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50至200毫克/毫升。
5. 如請求項1至3之調配物，其進一步包含不可離子化之賦形劑。
6. 如請求項5之調配物，其中該不可離子化之賦形劑為糖或聚花楸酸酯(polysorbate)。
7. 如請求項1至3中任一項之調配物，其進一步包含甘露醇及聚花楸酸酯。
8. 如請求項7之調配物，其中該聚花楸酸酯為聚花楸酸酯80。
9. 如請求項1至3中任一項之調配物，其中該導電率係低於約2 mS/公分。
10. 如請求項1至3中任一項之調配物，其中該導電率係低於約1.5 mS/

公分。

11. 如請求項1至3中任一項之調配物，其中該導電率係低於約1 mS/公分。
12. 如請求項1至3中任一項之調配物，其中該導電率係低於約0.5 mS/公分。
13. 如請求項1之調配物，其中該抗體為阿達利母馬，濃度為50至100毫克/毫升。
14. 如請求項1之調配物，其中該抗體為阿達利母馬，濃度為100毫克/毫升。
15. 如請求項1之調配物，其中該抗體為阿達利母馬，濃度為50毫克/毫升。
16. 如請求項13至15中任一項之調配物，其中該導電率係低於約2 mS/公分。
17. 如請求項13至15中任一項之調配物，其中該導電率係低於約1.5 mS/公分。
18. 如請求項13至15中任一項之調配物，其中該導電率係低於約1 mS/公分。
19. 如請求項13至15中任一項之調配物，其中該導電率係低於約0.5 mS/公分。
20. 如請求項13至15中任一項之調配物，其進一步包含不可離子化之賦形劑。
21. 如請求項20之調配物，其中該不可離子化之賦形劑為糖或聚花楸酸酯。
22. 如請求項13至15中任一項之調配物，其進一步包含甘露醇及聚花楸酸酯。
23. 如請求項22之調配物，其中該聚花楸酸酯為聚花楸酸酯80。

24. 一種如請求項1至23中任一項之調配物之用途，其係用以製備用於治療患有可由如請求項1至23中任一項之調配物中之抗體或其抗原結合片段治療而獲益的病症之病患之藥物。
25. 一種裝置，其包含如請求項1至23中任一項之調配物。
26. 一種製造物件，其包含如請求項25之裝置。