

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 96133010

※ 申請日期： 96.9.7

※IPC 分類：A61K ³/₉ (2006.01)

A61K ⁴⁷/₁₀ (2006.01)

A61K ⁴⁷/₄ (2006.01)

A61K ⁴⁷/₃₆ (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

含有抗體而安定的冷凍乾燥醫藥製劑

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

日商麒麟醫藥股份有限公司

KIRIN PHARMA KABUSHIKI KAISHA

代表人：(中文/英文)

淺野 克彥

ASANO, KATSUHIKO

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都涉谷區神宮前六丁目26番1號

26-1, JINGUMAE 6-CHOME, SHIBUYA-KU TOKYO 150-8011, JAPAN

國 籍：(中文/英文)

日本 JAPAN

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 伊藤 剛彦
ITO, TAKAHIKO
2. 石川 智世至
ISHIKAWA, TOMOYOSHI
3. 鈴木 千種
SUZUKI, CHIGUSA

國 籍：(中文/英文)

1. 日本 JAPAN
2. 日本 JAPAN
3. 日本 JAPAN

四、聲明事項：

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

申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本；2006年09月07日；特願2006-243144

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係與抗體之醫藥製劑領域有關。詳細而言，本發明係關於一種含有抗體而安定的冷凍乾燥醫藥製劑。

【先前技術】

隨著近年來生物工程學之發展，運用重組DNA技術，可大量製造出純度優良之醫療用蛋白質。然而，與先前之化學合成分子不同的是，蛋白質之分子量較大且其三維結構亦較為複雜，因此，為了使如此之蛋白質於安定地保持之狀態下保存安定，必須有考慮其物性之特別的技術。安定地保持蛋白質之製劑，必須保護蛋白質中所含有之許多不同的官能基，又，必須保持與活性有關之多維結構；於蛋白質醫藥品之領域，開發維持蛋白質之安定性及活性之兩者的安定之製劑正成為一個大課題。

作為於醫療領域有用之蛋白質之一，有抗體，近年來，單株抗體或多株抗體係供於人臨床試驗，其於以抗腫瘤或治療自身免疫疾患、感染症等各種疾病為目的之醫藥品領域，正受到業界之關注。但是，經精製之單株抗體或多株抗體，被發現具有於溶液中易形成凝集物及粒狀不溶性微粒之性質，此情況成為抗體製劑開發中之問題。業者期望不具有如此不期望之性質的經安定化之抗體製劑。

作為使抗體安定化之方法之一，例如，如國際公開第WO98/56418號案中，揭示有如下之水性醫藥製劑：其含有事先未經冷凍乾燥且於治療方面有效之抗體、pH值維持

在 5.0 之醋酸緩衝劑、界面活性劑、及多元醇。溶液製劑對於製造者而言，容易處理且最為經濟，又，投與給患者最為容易。然而，一般而言，若為溶液製劑，則會受到化學分解(去醯胺化反應或氧化反應)及物理劣化(凝集及沈澱)的影響，因此，為保持安定性必須正確地控制儲藏條件，對於安定性低之抗體而言，會成為其商業應用上之缺點。

對此，於該技術領域已知有如下情況：將於溶液中比較不安定之生成物進行冷凍乾燥，有可能獲得安定化之生成物，因此，較溶液製劑具有更長之儲藏時間及安定性(參照非專利文獻 1)。於經乾燥之固體中，可避免分解反應，或者數年保持安定之狀態。因此，作為冷凍乾燥之已知技術，常常被應用於在水溶液中表現較差安定性之可注入之醫藥品中。該工序必須進行冷凍乾燥(Freeze-drying)，藉此使得冰自經冷凍的溶液中昇華而殘留原液之固體經乾燥之成分。該步驟，係將水性溶液以液體狀態進行加工且填充於給藥容器中，於低溫下進行乾燥，藉此排除有害的熱影響，繼而其可於更安定之乾燥狀態下進行保存，因此具有許多優點。此外，經冷凍乾燥之生成物通常可迅速地溶解，繼而可於投與給患者之前容易地再構成。

然而，為了製造出具有所期望特徵的經冷凍乾燥之生成物，必須適當地注意選擇冷凍乾燥步驟中所使用之條件及賦形劑。若無適當之賦形劑，則大部分之蛋白質製劑，會因於冷凍乾燥期間所遭遇之冷凍以及乾燥、脫水而至少有

部分產生變性。此外，應選擇保證經乾燥固體之長期安定性的賦形劑。

關於含有抗體之冷凍乾燥製劑，有以下之文獻。

專利文獻1中揭示有一種含有抗體、糖或胺基糖、胺基酸、及界面活性劑之凍乾燥製劑。但是，其並未提示包含丙胺酸與多元醇之組合的冷凍乾燥製劑為適宜者。

專利文獻2中揭示有一種僅由蛋白質、緩衝液、丙胺酸、及甘露醇構成之冷凍乾燥製劑。但是，其並未提示包含丙胺酸與非晶質多元醇之組合的冷凍乾燥製劑為適宜者。

專利文獻3中揭示有一種每1 mg人類單株抗體使用1~20 mg之D-甘露醇的安定之冷凍乾燥製劑。但是，亦未提示包含丙胺酸與非晶質多元醇之組合的冷凍乾燥製劑為適宜者，又，亦未提示抗體、丙胺酸、蔗糖之較好的混合比。

又，於蛋白質之冷凍乾燥醫藥製劑中，有大量關於賦形劑對使蛋白質安定化之效果的科學文獻。但是，關於冷凍乾燥生成物之結構與其安定性之間關係的理論，通常並不被接受。同樣，單獨使用多元醇及胺基酸或該等之組合的作用，並未依據一組普遍性質獲得揭示，依據所研究之蛋白質及所使用之賦形劑的量，發現有相反之結果。

又，於現有專利中所揭示之冷凍乾燥製劑中，會發生有異物產生、聚合物增加、氧化體增加等情況，未能發現安定之製劑。例如，如專利文獻4或專利文獻5所示，於含有作為還原糖之麥芽糖的冷凍乾燥製劑中，尤其是於保存期

間可見氧化體增加。如專利文獻2或專利文獻3中所示，含有甘露醇之冷凍乾燥製劑尤其於保存期間可見聚合物增加。

專利文獻1：國際公開第WO98/22136A2號案

專利文獻2：國際公開第WO97/17064號案

專利文獻3：日本專利特開平5-25058號公報

專利文獻4：日本專利特表平3-504605

專利文獻5：國際公開第WO89/11297號案

非專利文獻1：『Remington's Pharmaceutical Sciences』第15版，Mack Publishing Co.，費城伊斯頓，第1483-1485頁

【發明內容】

發明所欲解決之問題

本發明之目的在於提供一種含有抗體而安定的冷凍乾燥醫藥製劑。具體而言，本發明之目的在於提供一種安定的冷凍乾燥醫藥製劑，其含有治療有效之量之抗體、作為結晶性物質之丙胺酸、及為非還原性糖且為非晶質之多元醇。

解決問題之技術手段

本發明者們為獲得含有治療有效之量的抗體之安定的冷凍乾燥製劑，而進行了努力研究。其結果發現：藉由使治療有效之量的抗體中，進而含有結晶性物質，及為非還原性糖且為非晶質之多元醇，可獲得具有習知之冷凍乾燥製劑中所不具備的抑制保存期間所產生之聚合物之生成的效果的冷凍乾燥製劑，最終完成了本發明。

即，本發明係如以下者。

- [1] 一種冷凍乾燥製劑，其含有抗體，進而含有丙胺酸及多元醇作為賦形劑。
- [2] 如[1]之冷凍乾燥製劑，其中多元醇為非還原性糖且為非晶質之多元醇。
- [3] 如[1]之冷凍乾燥製劑，其中多元醇為非還原性糖且為非晶質糖。
- [4] 如[3]之冷凍乾燥製劑，其中多元醇為蔗糖或海藻糖。
- [5] 如[1]至[4]中任一項之冷凍乾燥製劑，其中相對於抗體質量1，丙胺酸及多元醇之質量為5/6~50。
- [6] 如[5]之冷凍乾燥製劑，其中多元醇質量/丙胺酸質量之比為0.5~2.5。
- [7] 如[5]或[6]之冷凍乾燥製劑，其中抗體質量/丙胺酸質量之比為0.05~3。
- [8] 如[1]至[7]中任一項之冷凍乾燥製劑，其中抗體質量與丙胺酸質量與蔗糖質量之3成分之質量比為1:0.3~20:0.5~30。
- [9] 如[1]至[8]中任一項之冷凍乾燥製劑，其進而含有緩衝液。
- [10] 如[9]之冷凍乾燥製劑，其中緩衝液為麩胺酸緩衝液。
- [11] 如[9]或[10]之冷凍乾燥製劑，其中緩衝液之濃度為10 mM。
- [12] 如[1]至[11]中任一項之冷凍乾燥製劑，其進而含有界

面活性劑。

[13] 如 [12] 之冷凍乾燥製劑，其中界面活性劑為聚山梨醇酯。

[14] 如 [1] 至 [13] 中任一項之冷凍乾燥製劑，其係含有抗體作為有效成分之醫藥製劑。

[15] 一種製造安定的冷凍乾燥製劑之方法，其包括：於抗體中添加丙胺酸及多元醇再進行冷凍乾燥。

[16] 如 [15] 之製造冷凍乾燥製劑之方法，其中多元醇為非還原性糖且為非晶質之多元醇。

[17] 如 [15] 之製造冷凍乾燥製劑之方法，其中多元醇為非還原性糖且為非晶質糖。

[18] 如 [16] 之製造冷凍乾燥製劑之方法，其中多元醇為蔗糖或海藻糖。

[19] 如 [15] 至 [18] 中任一項之製造冷凍乾燥製劑之方法，其中相對於抗體質量 1，丙胺酸及多元醇之質量為 5/6~50。

[20] 如 [19] 之製造冷凍乾燥製劑之方法，其中多元醇質量/丙胺酸質量之比為 0.5~2.5。

[21] 如 [19] 或 [20] 之製造冷凍乾燥製劑之方法，其中抗體質量/丙胺酸質量之比為 0.05~3。

[22] 如 [15] 至 [21] 中任一項之製造冷凍乾燥製劑之方法，其中抗體質量與丙胺酸質量與蔗糖質量之 3 成分之質量比為 1:0.3~20:0.5~30。

發明之效果

如實施例所示，本申請案之含有抗體之製劑，即使於25°C或40°C下保持3個月，於保存期間，抗體之聚合物、分解物、去醯胺體、及氧化體亦不會增加，其為安定，又，其抗體亦確認保持有生物學活性。本申請案之製劑，至少於低溫(2°C至8°C)下保持1年以上之安定，又，至少於25°C下保持3個月及/或於40°C下保持1個月之安定。

本說明書包含作為本申請案之優先權之基礎的日本專利申請2006-243144號說明書及/或圖式中所記載之內容。

【實施方式】

與本發明有關之揭示之說明

「安定的製劑」，係不含對投與該製劑之患者有毒性之成分，又，藉由添加除儘量不干擾患者之生理恆常性之活性成分以外之添加物，而使其中的活性成分於保存時保持化學及/或物理及/或生物學安定性者。所謂「除儘量不干擾患者之生理恆常性之活性成分以外之添加物」，係指根據過去之實際治療成果而確認有充分之安全性者、或者於過去無實際投與成果之物質中，藉由對細胞、動物之毒性評價或者利用其他方法，可充分預測其安全性者。又，所謂「保持患者之生理恆常性」，包括：除活性成分以外之添加劑不具有對患者所不容許之生物活性，及/或若有可能則為等滲(具有與人類血液本質上相同之滲透壓)等。

冷凍乾燥(lyophilization)，係於製備醫藥品中經常使用之冷凍乾燥(Freeze drying)法。製備液體組合物，繼而進行冷凍乾燥，形成乾燥之餅狀製品。該方法，一般而言，

係將已冷凍之試料於真空中進行乾燥以除去冰，以粉末或餅狀物質之形態而直接殘留非水性成分。經冷凍乾燥之生成物，可在不喪失其生物活性下長期於高溫下保存，可藉由加入適當之稀釋劑而容易地復原為不含粒狀物之溶液。適當的稀釋劑，係生物學所容許之任意液體，且係冷凍乾燥粉末可於其中完全溶解之液體。水，尤其是注射用水係合適之稀釋劑，其原因在於，其不含有對抗體之安定性產生影響之鹽或其他物質。冷凍乾燥之優點為：使水分含量(水分於長期保存中會使製品變得不安定)降低至使各種分子事件大幅降低之程度。又，冷凍乾燥製劑容易耐受輸送之物理性壓力。經復原之製品不含粒狀物，因此可不預先進行過濾而非經口投予給被試驗體，較好的是進行靜脈內或肌內或皮下投與。

冷凍乾燥製劑之重要特徵為，係製品之復原時間、或進行再水合所必需之時間。為可非常快速且完全地進行再水合，重要的是具有高多孔性結構之餅。餅結構，係包括蛋白質濃度、賦形劑之種類及濃度、及冷凍乾燥循環之製程參數在內的許多參數的函數。一般而言，若蛋白質濃度上升則復原時間上升，因此較短之復原時間，於高濃度冷凍乾燥抗體製劑之開發中，係重要之目標。較長之復原時間，因蛋白質被更長時間曝露於進一步濃縮之溶液中，故使製品之品質產生劣化。進而，從使用者之角度出發，直至製品被完全再水合之前無法進行投予。其目的在於確保製品不含粒狀物、投予正確之用量、其無菌性不受影響。

即，迅速之再水合對患者及醫生均有利。

蛋白質之安定性，係利用各種分析方法進行測定。例如，於「新蛋白質精製法理論與實際」(RK Scopes著，Springer-Verlag東京出版)中所概述者。蛋白質之安定性包括化學安定性、物理安定性及生物學安定性。「化學安定性」，可藉由檢測蛋白質之化學變化狀態而進行鑑定。化學變化，例如包括：可利用大小排斥層析或SDS-PAGE進行評價之剪切等尺寸修飾、或可利用離子交換層析進行評價之電荷狀態之變化(例如產生去醯胺之結果)以及可利用疏水層析進行評價之親水性/疏水性狀態之變化(例如產生氧化之結果)等。「物理安定性」，包括可利用顏色及/或透明性的目視檢查及/或可利用大小排斥層析進行評價之，不產生不溶性微粒子及/或混濁及/或凝集體之情形。「生物學安定性」，例如可藉由對可利用大小排斥層析或ELISA等進行評價之與抗原的結合活性進行鑑定，而進行評價。

於治療用途有用之蛋白質可包含抗體。業者正在嘗試將抗體與在細胞表面所表達之蛋白質相結合、且對細胞而言具有誘導細胞死亡或傷害的作用之抗體應用於癌症等之治療中。目前，以細胞膜上所存在之受體即CD20為靶之嵌合抗體(Rituximab)、以Her2/neu為靶之人類化抗體等單株抗體係以惡性腫瘤作為對象疾病而進行使用，並可見其治療效果。又，如國際公開第WO2003/033538號案中所公開，可認為針對作為一種II型主要組織親合性基因複合體

(MHC)分子之HLA-DR抗體的單株抗體(抗HLA-DR抗體)亦有效。抗體具有血中半衰期長、對抗原之特異性高之特徵，其作為抗腫瘤劑特別有效。例如，若係以腫瘤特異性抗原為靶之抗體，則推測所投予之抗體會聚集於腫瘤上，因而可期待免疫系統藉由補體依賴性細胞毒殺活性(CDC)或抗體依賴性細胞毒殺活性(ADCC)對癌細胞進行攻擊。又，亦可預料：藉由將放射性核種或細胞毒性物質等藥劑與其抗體結合，可高效率地將所結合之藥劑送達腫瘤部位，同時可藉由減少該藥劑到達非特異性組織之量，而減輕副作用。又，於具有對腫瘤特異性抗原誘導細胞死亡的活性之情形時，可藉由投與具有激動活性之抗體，而期待腫瘤特異性抗體之聚集，及因抗體活性而產生之腫瘤生長停止或萎縮。如上所述，抗體根據其特徵可認為可用作抗腫瘤劑。

如上所述，於適用於治療用途之大量抗體經研究、開發、實用化，而頻繁使用於醫療場所，於該現狀下，可認為含有安定性更為優異之抗體的冷凍乾燥製劑於該領域已成為必需。

本專利所含有之所謂「冷凍乾燥製劑」，係具有藥效之抗體即活性成分經冷凍乾燥之形態，且係於固體中將活性成分製成具有明確效果者之形態，且係不含有可干擾製劑所投與之患者之生理恆常性之其他成分者。此處，所謂「將活性成分製成具有明確效果者」，係指所含有之活性成分維持其活性，而不喪失藥效。

所謂「除儘量不干擾患者之生理恆常性之活性成分以外之添加劑」，係指根據過去之實際治療成果而確認有充分之安全性者，或者於過去無實際投予成果之物質中，藉由對細胞、動物之毒性評價或者利用其他方法，可充分預測其安全性者。即，本發明之冷凍乾燥醫藥製劑，可包含：作為具有藥效之抗體之活性成分，及醫藥學所容許之其他添加劑。又，所謂「保持患者的生理恆常性」，包括：除活性成分以外之添加劑不具有對患者所不容許之生物活性，及/或若有可能則為等滲(具有與人類血液本質上相同之滲透壓)等。

所謂「安定的製劑」，係指其中的活性成分於保存時保持化學及/或物理及/或生物學安定性者。較好的是，至少於低溫(2°C至8°C)下保持1年以上之安定，又，較好的是，於25°C下至少保持3個月及/或於40°C下至少保持1個月之安定，對製劑之冷凍融解、光照射及振動為安定。蛋白質之安定性，係利用各種分析方法進行測定。「化學安定性」，可藉由檢測定量蛋白質的化學變化之狀態而進行鑑定。化學變化，例如包括：可利用大小排斥層析或SDS-PAGE進行評價之剪切等尺寸修飾、可利用離子交換層析進行評價之電荷變化(例如產生去醯胺之結果)、及可利用疏水層析進行評價之親水性/疏水性狀態之變化(例如產生氧化之結果)等。「物理安定性」，包括可利用顏色及/或透明性的目視檢查及/或可利用大小排斥層析進行評價之不產生不溶性微粒子及/或混濁及/或凝集體之情形。繼而，「生物學安

定性」，例如可藉由對可藉利用大小排斥層析或ELISA等進行評價之與抗原的結合活性進行鑑定，而進行評價。於抗體經受化學或物理變化之情形時，其抗體保持生物學安定性。因此，於製劑中之抗體保持化學安定性及物理安定性之情形時，可認為其製劑為安定。即，製劑是否為安定，可藉由測定所含抗體是否產生化學及物理特性之變化而得知。安定之製劑中，抗體之聚合物、分解物、去醯胺體、氧化體等於保存中不會增加至降低製劑之藥效的程度，又，亦未發現不溶性異物或混濁。本發明之安定之製劑，即使至少於低溫(2°C至8°C)下保存1年以上、或者至少於25°C下保存3個月、或者即使於40°C下保存1個月，抗體之聚合物、分解物、去醯胺體、氧化體亦不會增加至降低製劑之藥效的程度。又，即使將製劑進行冷凍融解或者施加振動，抗體之聚合物、分解物、去醯胺體、氧化體亦不會增加至降低製劑之藥效的程度。本發明之安定之製劑中的抗體之聚合物，於保存中無增加，例如於25°C或40°C下保存1個月後，以大小排斥層析進行測定之情形時，較好的是聚合物相對於製劑中之抗體的比例較小。又，本發明之安定的製劑中之抗體分解物，於保存中無大幅增加，例如於25°C或40°C下保存1個月，較好的是分解物相對於製劑中之抗體的比例較小。又，本發明之安定之製劑中的抗體之去醯胺體的量，於保存中無大幅增加，例如於25°C或40°C下保存1個月，較好的是去醯胺體相對於製劑中之抗體的比例較小。進而，本發明之安定的製劑中之抗體之氧

化體，於保存中無大幅增加，例如於25°C或40°C下保存1個月，較好的是氧化體相對於製劑中之抗體的比例較小。本發明之冷凍乾燥製劑之特徵在於：於保存中由抗體而形成之聚合物的量並不增加。聚合物含量及分解物含量，例如可利用大小排斥層析進行測定；去醯胺體含量，例如可利用離子交換層析進行測定；氧化體含量，例如可利用疏水HPLC進行測定。

本發明之抗體之所謂「治療有效之量」，係指抗體對可有效治療之疾病之預防或治療有效的量。所謂「疾病」，係指因利用抗體進行治療而獲利之任意症狀。其包括：包括導致哺乳類動物之疾病的病理狀態在內的慢性及急性疾患或疾病。製劑中所存在之抗體之治療有效量，例如可考慮理想的用量及投與形態而確定。製劑中之例示性抗體濃度，為約1 mg/mL至約200 mg/mL，較好的是約5 mg/mL至約50 mg/mL，最好的是約10 mg/mL及/或約20 mg/mL。

本專利所含有之所謂「抗體」，係於最廣泛之意義中使用，尤其包括單株抗體、多株抗體、多重特異性抗體，或者只要保持所期望的生物活性可包括抗體片段。又，本專利所包含之抗體，只要可與所期望之抗原結合，則無特別限制，可適宜使用：小白鼠抗體、大白鼠抗體、兔抗體、綿羊抗體、駱駝抗體、雞抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體等。抗體可為多株抗體，亦可為單株抗體。

本發明係關於一種含有抗體而安定的冷凍乾燥醫藥製劑。製劑中之抗體，可使用為產生抗體而用於該領域之為

業者所周知之技術，而進行製備。至於例示性單株抗體之製備方法，可舉出：(1)作為免疫原而使用之生物體高分子之精製及/或於細胞表面過量表達抗原蛋白質之細胞的製作；(2)藉由將抗原注射入動物細胞而進行免疫，然後採集血液而檢定其抗體價，以決定摘出脾臟等之時刻，再製備抗體產生細胞之工序；(3)骨髓瘤細胞(myeloma)之製備；(4)抗體產生細胞與骨髓瘤細胞之細胞融合；(5)對產生目標抗體之融合瘤群的選擇；(6)分離成單一細胞株(選殖)；(7)視情況對用於大量製造單株抗體之融合瘤的培養、或者對移植融合瘤之動物的飼養；(8)視情況自融合瘤等抗體產生細胞中選殖編碼人類單株抗體的基因，將其重組入適當之載體中，再導入至宿主(例如哺乳類細胞細胞株、大腸桿菌、酵母細胞、昆蟲細胞、植物細胞等)中，製備利用基因重組技術所產生之重組型抗體；(9)以如此方式而獲得之抗體之精製；(10)對以如此方式所製造之單株抗體的生理活性及其識別特異性之研究、或者對作為標記藥之特性之分析等。進而，對於多株抗體，亦可同樣地利用為業者所周知的方法進行製作。

本專利所含之抗體亦包括：由於抗體之重鏈及/或輕鏈之各胺基酸序列中，有1個或數個胺基酸產生缺失、置換或者附加的胺基酸序列之重鏈及/或輕鏈所構成之抗體。對本發明之抗體之胺基酸序列中之，如前述之胺基酸的部分改變(缺失、置換、插入、附加)，可藉由對編碼此胺基酸序列之鹼基序列進行部分改變而導入。該鹼基序列之部

分改變，可利用已知的部位特異性變異導入法 (site specific mutagenesis) 且利用通用方法進行導入 (Proc Natl Acad Sci USA., 1984, 第181卷: 5662)。本專利所含有之抗體中，亦包括任意之免疫球蛋白類及具有同型之抗體。抗體亦包括重組入亞型之改型抗體、或者進而改變重鏈固定區域之改型抗體。進而，亦包括使其與碘、釷、銻、鎳 (technetium) 等放射性核種 (J. W. Goding, Monoclonal Antibodies: principles and practice, 1993 Academic Press)，如綠膿桿菌毒素、白喉毒素 (diphtheria toxin)、蓖麻毒素 (ricin) 之細菌毒素，以及滅殺除癌 (methotrexate)、絲裂黴素、卡奇黴素 (Calicheamicin) 等化學療法劑 (D.J.King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T.J.International Ltd.; M.L.Grossbard., Monoclonal Antibody-Base Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc)，進而與 Maytansinoid 等前驅藥 (Chari et al, Cancer Res., 1992 Vol. 52: 127; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996 Vol. 93: 8681) 等結合，藉此進一步增強對癌等疾病之治療效果者。

又，本專利所包含之抗體，亦包括抗體之功能性片段。所謂該「功能性片段」，係指抗體之一部分(部分片段)，意指保持1個以上之抗體對抗原之作用者，具體可舉出： $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、二硫化物鍵結 Fv 、單鏈 $Fv(scFv)$ 、雙功能抗體、以及該等之聚合物等 (D. J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies.,

1998 T. J. International Ltd)。

本專利所包含之抗體，係多株抗體或/及單株抗體，較好的是人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。該抗體較好的是IgG，IgG之亞型較好的是IgG1、IgG2、IgG4中之任一者。又，IgG，亦可為藉由對固定區域之胺基酸序列的一部分進行基因改變，而經胺基酸缺失及/或置換及/或插入之IgG。

又，更好的是，國際公開第WO2003/033538號案中所記載之抗HLA-DR人類單株抗體即HD3、HD4、HD6、HD7、HD8、HD10、HD4G1、HD4G2Ser、HD4G4、HD8G1、HD8G1Ser、HD8G2、HD8G2Ser、HD8G4。其中，產生HD4、HD6、HD8及HD10之融合瘤，分別係以FERM BP-7771、FERM BP-7772、FERM BP-7773、FERM BP-7774之編號，於2001年10月11日，國際寄託於獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄託中心(日本國茨城縣築波市東1丁目1番地1 中央第6)。又，產生HD3及HD7之融合瘤，係分別以FERM BP-08534、FERM BP-08536之編號，於2003年10月31日，國際寄託於相同之中心。進而，本專利亦包含針對CD40之人類單株抗體，較好的是國際公開第WO2002/088186號案中所記載之抗CD40拮抗抗體即KM281-1-10、KM281-2-10-1-2、KM283-5、KM225-2-56、KM292-1-24、KM341-6-9、4D11、5H10、11E1、5G3、3811、3411、3417、F4-465，以及抗CD40激動抗體即KM302-1、KM341-1-19、KM643-4-11、2053、2105、

3821、3822、285、110、115、F1-102、F2-103、F5-77、F5-157。其中融合瘤株KM302-1、KM281-1-10、KM281-2-10-1-2，係於2001年5月9日分別以FERM BP-7578、FERM BP-7579、FERM BP-7580之編號，株KM341-1-19及4D11係於2001年9月27日分別以FERM BP-7759、FERM BP-7758之編號，株2105係於2002年4月17日以FERM BP-8024之編號，基於布達佩斯條約而國際寄託於獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄託中心(茨城縣築波市東1丁目1番地1中央第6)。進而，具有F2-103、F5-77及F5-157的重鏈及輕鏈的可變區域之質體，係於2001年4月19日分別以ATCC PTA-3302 (F2-103重鏈)、ATCC PTA-3303 (F2-103輕鏈)、ATCC PTA-3304 (F5-77重鏈)、ATCC PTA-3305 (F5-77輕鏈)、ATCC PTC-3306 (F5-157重鏈)、及ATCC PTA-3307 (F5-157輕鏈)之編號，融合瘤株F1-102及F4-465係於2001年4月24日分別以ATCC PTA-3337及ATCC PTA-3338之編號，基於布達佩斯條約而國際寄託於(American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia, USA)(美國國立細菌培養收集所，美國維吉尼亞州20110-2209馬那薩斯 10801 University Boulevard)。本發明之冷凍乾燥製劑，於使用上述任意抗體時均為安定。

本發明之冷凍乾燥製劑，可藉由製備含有上述抗體及各種添加劑作為有效成分之溶液製劑，其後將該溶液進行冷凍乾燥，而製備。

根據本發明之較佳實施形態，冷凍乾燥製劑，除抗體

外，亦含有多元醇、結晶性物質，進而含有緩衝劑及界面活性劑。

「冷凍乾燥」「經冷凍乾燥(lyophilized)」及「經冷凍乾燥(Freeze-dried)」，意指首先將應乾燥之物質加以冷凍，其次使冰或冷凍溶劑於真空環境中昇華而將其除去之工序。為了增強保存中之冷凍乾燥品之安定性，於冷凍乾燥前之製劑中亦可含有賦形劑。冷凍乾燥工序可藉由眾所周知之方法實施。

本發明所包含之所謂「添加劑」，包括除活性成分以外之冷凍乾燥製劑中所包含之全部成分，例如包括：緩衝劑、pH值調節劑、等滲劑、賦形劑、安定化劑、界面活性劑、防腐劑等。又，亦包括一種添加劑成分顯示二種以上效果者。

「緩衝劑」，係指利用酸鹼共軛成分之作用使pH值變化變得穩定的添加劑。緩衝劑濃度，根據其緩衝能力及/或所期望之滲透壓，約為1 mmol/L至約50 mmol/L，較好的是5 mmol/L至20 mmol/L，最好的是約10 mmol/L。較好的緩衝劑，包括麩胺酸鹽(例如麩胺酸鈉)、或檸檬酸及其他有機酸緩衝液。最好的是麩胺酸鹽。

「多元醇」係具有多個羥基之物質，於冷凍乾燥製劑中亦用作為賦形劑。「多元醇」包括：糖(還原及非還原性糖)、糖醇、及糖酸。此處，較好的多元醇，具有約小於600 KD(例如約120 KD至約400 KD之範圍)之分子量。「還原糖」，係可減少金屬離子、或具有可與蛋白質中之離胺

酸及其他胺基進行共有反應之半縮醛基者；「非還原性糖」，係不具有還原糖之該等性質者。至於還原糖之例，有果糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖、及葡萄糖。至於非還原性糖之例，有蔗糖、海藻糖、山梨糖、蜜三糖、及棉籽糖等。至於糖醇之例，為甘露醇、木糖醇、赤藻糖醇、蘇糖醇、山梨糖醇、及甘油糖等。糖酸包括L-葡萄糖酸及其金屬鹽。將還原糖使用於冷凍乾燥製劑，因會促進氧化體之生成，故不佳。又，於針對冷凍、乾燥所伴隨之壓力而保護蛋白質之目的下，使用多元醇之情形時，較好是於進行冷凍及乾燥時形成非晶質(amorphous)結構者。至於進行冷凍時形成非晶質結構之多元醇之例示性者，有蔗糖、海藻糖、山梨糖醇等。本發明之多元醇，較好的是非還原性糖且為非晶質之多元醇、或者為非還原性糖且為非晶質之糖或糖醇等之多元醇。更好的是蔗糖、海藻糖、山梨糖、蜜三糖、及棉籽糖等為非還原性糖且為非晶質之多元醇，最好的是蔗糖及海藻糖。又，本發明之冷凍乾燥製劑亦可含有多種多元醇。

所謂「結晶性物質」，若係於進行冷凍時成為結晶結構者即可，包括丙胺酸、甘胺酸等結晶性胺基酸等。尤其好的是丙胺酸，其可含有5~40 mg/mL、較好的是10~30 mg/mL、更好的是15~25 mg/mL、尤其好的是20 mg/mL。

多元醇及結晶性物質，可發揮作為賦形劑或等滲劑之作用。於本發明中，所謂「賦形劑」，係具有指維持冷凍乾

燥製劑之餅形狀之功能及/或針對冷凍、乾燥所伴隨之壓力而保護蛋白質之功能的物質。除多元醇及結晶性物質以外，作為用作賦形劑之普通例，有乳糖。賦形劑於增強長期保存時之蛋白質安定性之方面，可提供有用之性質。又，該等物質亦可發揮等滲劑之作用。「等滲劑」，係指調整滲透壓以使對象製劑具有與人血液本質上相同之滲透壓者。等滲製劑具有約250至350 mOsm/kg之滲透壓，較理想的是，將生理食鹽水之滲透壓設為1之滲透壓比約為1。於本發明中，用作賦形劑之丙胺酸起維持餅狀之作用，多元醇起針對冷凍、乾燥所伴隨之壓力而保護蛋白質之作用。

於本發明中，如蔗糖之多元醇，亦發揮作為針對抗體凝集之安定化劑的作用，其就縮短於無粒狀物之溶液中之冷凍乾燥製劑的復原時間而言，係發揮重要之作用。多元醇，係以根據製劑所期望的滲透壓而變化之量，而加入至製劑中。較好的是，復原後之冷凍乾燥製劑為等滲，但亦可為高滲或低滲。

「界面活性劑」包括如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20、80等)或POLOXAMER(例如POLOXAMER 188)之非離子性界面活性劑。所添加之界面活性劑的量，係降低經製劑化之抗體的凝集、及/或使製劑中之粒子形成最小化、及/或減少蛋白質於容器上之吸附的量。於本發明中，較好的是含有聚山梨醇酯、最好的是含有聚山梨醇酯80作為界面活性劑。界面活性劑，較好的是以0.02 mg/mL至0.1 mg/mL、最好的是以約0.05 mg/mL之量存在於製劑中。

作為冷凍乾燥前之組合物的例子，係包含約1 mg/mL至60 mg/mL之IgG抗體、約10 mmol/L至20 mmol/L之麩胺酸鈉(pH 5.5)、約0.05 mg/mL之聚山梨醇酯80、以及作為賦形劑之20 mg/mL之丙胺酸及5 mg/mL至50 mg/mL之蔗糖的製劑。上述冷凍乾燥前之製劑，經冷凍乾燥而成為乾燥安定的粉末，其可容易地復原成適於投予給人類之不含粒狀物之溶液。

本發明係於抗體中添加結晶性物質(最好的是丙胺酸)，與為非還原性糖及非晶質之多元醇(最好的是蔗糖及海藻糖)作為賦形劑，進行冷凍乾燥，藉此提供安定的冷凍乾燥製劑。實質上，可藉由包含結晶性物質結晶相而維持餅狀結構，且藉由包含抗體與非還原性糖及/或非晶質之多元醇(最好的是蔗糖及海藻糖)的非晶相而自冷凍及乾燥中之壓力下保護蛋白質，藉此而獲得安定的冷凍乾燥製劑。

本發明所使用之賦形劑之丙胺酸與蔗糖之調配比及調配量，可根據作為活性成分之抗體的濃度進行適當調整。

於將R設為冷凍乾燥製劑中所存在之蔗糖與丙胺酸的質量比(蔗糖質量/丙胺酸質量)或濃度比(蔗糖濃度/丙胺酸濃度)時，安定性良好之R為0.25以上，較好的是0.5至2.5，更好的是1至2，最好的是1.5。

又，於將Q設為冷凍乾燥製劑中所存在之抗體與丙胺酸的質量比(抗體質量/丙胺酸質量)或濃度比(抗體濃度/丙胺酸濃度)時，以R=1.5之比率含有蔗糖/丙胺酸之冷凍乾燥製劑中，安定性良好之Q為0.05至3，較好的是0.05至1.5。

以上述R與Q之組合包含抗體、丙胺酸、及蔗糖的安定的冷凍乾燥性劑，其抗體質量與丙胺酸質量與蔗糖質量之3成分的質量比為1:0.3~20:0.5~30。又，抗體質量相對於丙胺酸與蔗糖之合計的比為1:5/6~50。

本發明之冷凍乾燥製劑，係將其復原後使用。

所謂「復原」，係指於溶液中將冷凍乾燥製劑進行再水合，而形成無粒子之澄清化溶液；「復原時間」為其所必需之時間。冷凍乾燥製劑之重要特徵為，製品之復原時間或再水合所必要之時間，要求為短時間。為了可非常快速且完全地進行再水合，重要的是具有高多孔性結構之餅。餅結構，係包括蛋白質濃度、賦形劑之種類及濃度、及冷凍乾燥循環之製程參數在內的許多參數的函數。一般而言，若蛋白質濃度上升則復原時間上升。因此，於復原時間為長時間之情形時，因蛋白質被更長時間曝露於經進一步濃縮之溶液中，故使製品品質產生劣化。進而，從使用者之角度出發，直至將製品完全再水合後方可投與。其目的在於藉由使其完全地再水合，而確保製品不含粒狀物、投與正確之用量、無菌性不受影響。即，迅速之再水合對患者與醫生均有利。

溶液製劑，可使用適當之乾燥參數進行冷凍乾燥。冷凍乾燥製劑，可保持抗體生物活性之安定性，且保護以投與給人類被試驗體為目的之抗體，使其不會於最終製品中產生物理性及化學分解。

冷凍乾燥製劑，於使用時以稀釋劑(例如注射用水)將其

進行再水合，而提供不含粒狀物之溶液。經復原之抗體溶液，即使於環境溫度下將冷凍乾燥餅長期保存後，亦不會有粒狀物。經復原之溶液，可非經口投與，較好的是靜脈內或肌內或皮下投與給被試驗體。

本發明之組合物，可確保使含有免疫球蛋白之試藥中的蛋白質凝集物及粒狀物之形成最小化，且即使時間推移溶液中的抗體亦維持其免疫活性。組合物包括：於具有中性或酸性pH值之緩衝液中包含抗體、丙胺酸、多元醇及界面活性劑之，由水性冷凍乾燥前之製劑所製備之無菌之藥劑學所容許的冷凍乾燥製劑。本發明之組合物，亦可進一步含有丙胺酸及多元醇以外之賦形劑及/或等滲劑。

製劑可對必須使用抗體進行治療之哺乳動物，較好的是人，以已知方法，例如作為球劑，或者於一定時間內連續注入之靜脈內投與、肌內、腹腔內、大腦內、皮下、關節內、滑液包內、蛛網膜下腔內、經口、局部、或者經由吸入途徑進行投與。於較好的實施樣態中，製劑可藉由靜脈內投與而投與給哺乳動物。為達成如此目的，例如使用注射器或者經由點滴靜注管而將製劑注入。

實施例

利用以下實施例更詳細地說明本發明。若參照以下實施例，則可充分理解本發明。但是，該等實施例並非限制發明之範圍者。基於本發明之記載，業者可進行各種變更、修飾，該等變更、修飾亦包含於本發明中。

實施例1 丙胺酸與各種賦形劑之組合

使用國際公開第 WO2003/033538 號案中 so 記載之針對 HLA-DR 之抗體 (抗 HLA-DR 抗體、IgG1) 作為抗體，製備冷凍乾燥製劑。

於本實施例中，製備表 1 中所示之製劑，並對與丙胺酸組合之合適的賦形劑進行詳細研究。

[表 1]

供於本實施例之製劑一覽

	抗體濃度	緩衝劑	賦形劑		界面活性劑	pH 值	
1	10 mg/mL 抗 HLA-DR 抗體	10 mmol/L 麩胺酸	20 mg/mL 丙胺酸			0.05 mg/mL 聚山梨醇酯 80	5.5
2				30 mg/mL	海藻糖		
3					蔗糖		
4					氯化鈉		

(1) 製劑樣品之製備

本研究中所使用之試藥，係使用抗 HLA-DR 抗體 (約 20mg/mL，依國際公開第 WO2003/0033538 號案中 so 記載之方法於日本麒麟啤酒公司醫藥生產技術研究所 (2007 年 7 月 1 日以後，於日本麒麟醫藥股份有限公司生產技術研究所) 製備)、L-麩胺酸鈉一水合物 (日本藥局方外醫藥品規格)、丙胺酸 (Ala，日本藥局方)、海藻糖 (Tor，日本藥局方)、蔗糖 (Suc，日本藥局方)、氯化鈉 (NaCl，日本藥局方)、鹽酸 (日本藥局方)、聚山梨醇酯 80 (日本藥局方)、注射用水 (日本藥局方)。各製劑樣品，係藉由預先製作不含原藥之偽藥溶液，使用 NAP 管柱 (Pharmacia Biotech 公司製) 將抗 HLA-DR 抗體溶液與製劑偽藥溶液進行置換，而製備。又，蛋白質濃度係利用 OD280 nm 吸光度係數 $\epsilon=1.4$ 進行換

算，而調整其濃度。

於無菌無塵工作臺 (Clean Bench) 內使用 0.22 μm 濾膜 (Millipore 公司製) 對各製劑樣品進行無菌過濾，再將每 1 mL 濾液填充於 5 mL 玻璃小瓶 (適合日本藥局方) 中。於充填後，以橡膠塞進行半加蓋，使用日本真空技術公司製造之冷凍乾燥機進行冷凍乾燥。又，於無菌無塵工作臺中使用 0.22 μm 瓶蓋過濾器 (Nalgene 公司)，將用於稀釋分析樣品及分析之空白對照的不含抗 HLA-DR 抗體之溶液 (偽藥劑) 進行無菌過濾。

(2) 試驗條件

於本實施例中，為了進行安定性評價，而依照以下條件對各製劑樣品施加壓力。

熱安定性試驗：於溫度控制在 40°C 或 25°C 之培養箱 (TABAI ESPEC 公司製) 中，保存 1 個月及 3 個月。又，自進行熱壓力負荷後至分析開始，將各樣品保存於溫度控制在 4°C 之低溫庫中。

(3) 分析方法

目測外觀：於螢光燈下，以肉眼觀察餅形狀，且記述外觀圖。

關於以下之分析，係於外觀目視後，用注射器加入 1 mL 注射用水進行再溶解，再進行分析。

不溶性異物及混濁：於白色光源正下方，於約 5000 lux 之亮度的位置，以肉眼觀查有無不溶性異物及混濁。

大小排斥 HPLC 鑑定 (SEC)：聚合物含量及分解物含量，

係利用大小排斥高速液體層析法而算出。根據需要將樣品稀釋成1 mg/mL，於環境溫度下注入20 μ L。分離係使用TSK gel G3000 SWXL 30 cm \times 7.8 mm (TOSOH公司製)管柱，使用20 mmol/L磷酸鈉、500 mmol/L氯化鈉pH 7.0作為移動相，於0.5 mL/分之流量、分析時間為30分之條件下，於215 nm處進行檢測。再者，將於主峰前溶出者定義為聚合物，將於主峰後溶出者定義為分解物。

陽離子交換HPLC鑑定(IEC)：去醯胺體含量係利用陽離子交換高速液體層析法而算出。注入60 μ L適當稀釋成5 mg/mL之樣品。使用TSK gel BIO Assist S (TOSOH公司製)作為分離柱，於280 nm處進行檢測。作為移動相，對於A相係使用20 mM酒石酸pH 4.5，對於B相係使用20 mM酒石酸、1 M氯化鈉pH 4.5，利用最適宜之梯度條件進行分析。再者，將於主峰前方溶出之劣化物定義為去醯胺體。

疏水HPLC鑑定(HIC)：氧化體之含量係利用疏水層析法而算出。注入20 μ L之使用樣品處理液(20 mmol/L磷酸鈉、0.984 mol/L硫酸銨、7.5 mmol/L蛋胺酸)適當稀釋成1 mg/mL的樣品。使用TSK gel Butyl-NPR (TOSOH公司製)作為分離柱，於215 nm處進行分析及檢測。移動相係使用20 mmol/L磷酸鈉、pH 6.5作為A相；使用20 mmol/L磷酸鈉、1.2 mol/L硫酸銨、pH 6.5作為B相，利用最適宜之梯度條件進行分析。再者，將於主峰前方溶出之劣化物定義為氧化體。

還原SDS-PAGE鑑定：根據需要將樣品溶液稀釋成400

$\mu\text{g/mL}$ 。於樣品溶液中加入 SDS Sample Buffer (Invitrogen 公司製)、Sample Reducing Agent (Invitrogen 製)、 H_2O ，於 95°C 下加熱 5 分鐘，製成還原樣品溶液。於泳動槽中裝滿電泳用 Tris-Glycine SDS Running buffer (Invitrogen 公司製)。將 $5 \mu\text{L}$ 試料溶液加至 4~20% Tris-Glycine Gel (Invitrogen 公司製) 中，於約 125 V 固定電壓下進行電泳，直至試料溶液中所含之溴酚藍的藍色移動至凝膠下端附近。對電泳結束後的凝膠進行銀染色且進行檢測。再者，為判定樣品及劣化體的大致分子量，對分子量標記物(包括 97 KDa、66 KDa、45 KDa、30 KDa、20 KDa、14 KDa 之蛋白質)同時進行電泳。

非還原 SDS-PAGE 鑑定：根據需要將樣品溶液稀釋成 $400 \mu\text{g/mL}$ 。於樣品溶液中加入 LDS Sample Buffer (Invitrogen 公司製)、 H_2O ，製成非還原樣品溶液。於電泳槽中加滿電泳用 Tris-Acetate SDS Running buffer (Invitrogen 公司製)。將 $5 \mu\text{L}$ 試料溶液供於 3~8% Tris-Acetate Gel (Invitrogen 公司製)，於約 125 V 固定電壓下進行電泳，直至試料溶液中所含之溴酚藍之藍色移動至凝膠之下端附近。將電泳結束後的凝膠進行銀染色，並進行檢測。再者，為判定樣品及劣化體之大致分子量，而對分子量標記物(包括 220 KDa、116 KDa、97.4 KDa、63.3 KDa、54.4 KDa、36.5 KDa 之蛋白質)同時進行電泳。

滲透壓比：使用自動滲透壓測定裝置 (Arkray 公司製 OSMO STATION OM-6050) 進行滲透壓測定，同時計算其

相對於所測定之生理食鹽之水滲透壓的比。pH值：使用自動pH值測定裝置(METTLER TOLEDO公司製MP-230等)進行pH值測定。於測定開始時使用pH值4、pH值7、pH值9之標準溶液進行校正，然後進行測定。

水分測定：使用连接有自動水分氣化裝置(平沼產業公司製LE-20SA)之微量水分測定裝置(平沼產業公司製AQ-2000)進行水分量測定，以計算含濕度。

(4) 結果及考察

圖1表示將各冷凍乾燥製劑於25℃及40℃下保存時之聚合物的變化。聚合物量係藉由大小排斥層析進行測定。於僅將丙胺酸作為賦形劑之製劑中，於40℃下保存1個月確認聚合物增加有約5%、於40℃下保存3個月確認聚合物增加有約9%。以丙胺酸及氯化鈉為賦形劑之製劑中，藉由於再溶解後以肉眼進行目測檢查，而確認異物、混濁，聚合物的增加亦多，為不安定。與海藻糖、蔗糖組合之製劑中，即使於40℃下保存3個月亦未確認聚合物之增加，為非常安定。可明確，藉由將上述所使用之多元醇(海藻糖、蔗糖)組合入丙胺酸中，而戲劇性地抑制聚合物，提示其安定性高。又，於其他分析項目(餅狀、異物、混濁、分解物、不溶性微粒子、去醯胺體、氧化體)中，丙胺酸與多元醇組合而成之製劑，於施加熱壓力負荷前後幾乎未發現有變化，為安定。

根據本實施例，可判明以作為使抗體安定化的冷凍乾燥製劑的賦形劑，較好的是丙胺酸與多元醇之組合。較好的

是使用非晶質之多元醇，更好的是使用為非還原且非晶質之多元醇，最好的是使用海藻糖、蔗糖作為多元醇。

實施例2 蔗糖/丙胺酸比

由實施例1可明瞭，作為與丙胺酸組合之多元醇，最好的是海藻糖或蔗糖。

本實施例中，使用蔗糖作為多元醇，將丙胺酸濃度設為固定，改變與丙胺酸混合之蔗糖濃度，而對抑制聚合物之最佳濃度比率R進行研究。此處，R表示冷凍乾燥生成物中所存在之蔗糖質量/丙胺酸質量。

使用國際公開第WO2003/033538號案中所記載之針對HLA-DR之抗體(抗HLA-DR抗體、IgG1)作為抗體，而製備冷凍乾燥製劑。

本實施例中，製備表2中所表示之製劑，對與丙胺酸組合之蔗糖之較好的濃度進行詳細研究。

[表2]

供於本實施例之製劑一覽

	抗體濃度	緩衝劑	賦形劑		界面活性劑	pH值	R	
1	10 mg/mL 抗HLA-DR 抗體	10 mmol/L 麩胺酸	20 mg/mL 丙胺酸	50 mg/mL	蔗糖	0.05 mg/mL 聚山梨醇酯 80	5.5	2.5
2				40 mg/mL				2
3				35 mg/ml				1.75
4				30 mg/mL				1.5
5				25 mg/mL				1.25
6				20 mg/mL				1
7				15 mg/mL				0.75
8				10 mg/mL				0.5
9				5 mg/mL				0.25
10								

(1) 材料及方法

本實施例所使用之材料及分析方法，與實施例1中所示

者相同。

(2) 試驗條件

以與實施例1所表示方法同樣之方式，於溫度控制在 25°C 或 40°C 之培養箱(TABAI ESPEC公司製)中保存1個月及3個月，實施熱安定性試驗。又，自施加熱壓力負荷後至分析開始，將各樣品保存於溫度控制在 4°C 之低溫庫中。

(3) 結果及考察

圖2表示將各冷凍乾燥製劑於 25°C 及 40°C 下保存時之聚合物之變化。聚合物量係藉由大小排斥層析進行測定。可明確，隨著所混合之蔗糖質量增加可抑制聚合物生成，且顯示出於 $R=0.25$ 至 $R=2.5$ 之範圍內為安定。進而，於SDS-PAGE分析中，亦獲得可見與以大小排斥層析而獲得之結果相同之傾向的泳動圖像。

本實施例中所研究之任一濃度下，均形成餅狀，尤其是形成 $R=1.5$ 以下之完整的餅，表現出可經受長期保存之形狀。又，於其他分析項目(異物、混濁、不溶性微粒子、去醯胺體、氧化體)中，亦幾乎未確認熱壓力負荷前後之變化，為安定。

於本實施例中，明確有與作為使抗體安定化之冷凍乾燥製劑之賦形劑的，與丙胺酸組合之最佳蔗糖質量比率 R (蔗糖質量/丙胺酸質量)。安定性良好之 R 為 0.25 以上，較好的是 0.5 至 2.5 ，更好的是 1 至 2 ，更好的是 0.75 至 2 。最好的是 1.5 。

實施例3 抗體濃度之影響研究

使用國際公開第WO2003/033538號案所記載之針對HLA-DR之抗體(抗HLA-DR抗體、IgG1)作為抗體，而製備冷凍乾燥製劑。

本實施例中，製備表3中所表示之製劑，對使實施例2中所獲得抗體安定化為最佳之蔗糖/丙胺酸處方(R=1.5)對抗體濃度不同之製劑所造成之影響進行評價。此處，將Q作為抗體質量與丙胺酸質量之比。即，Q表示冷凍乾燥製劑中之抗體質量/丙胺酸質量。

[表 3]

供於本實施例之製劑一覽

	抗體濃度	抗體種類	賦形劑		界面活性劑	pH值	Q
1	60 mg/mL	抗HLA-DR 抗體	20 mg/mL 丙胺酸	30 mg/mL 蔗糖	0.05 mg/mL 聚山梨醇酯80	5.5	3
2	30 mg/mL						1.5
3	10 mg/mL						0.5
4	1 mg/mL						0.05
5	10 mg/mL			0.5			

(1) 材料及方法

本實施例中所使用之材料及分析方法，與實施例1中所表示者相同。

(2) 試驗條件

以與實施例1中所表示方法同樣之方式，於溫度控制在25°C或40°C之培養箱(TABA1 ESPEC公司製)中保存1個月及3個月，實施熱安定性試驗。又，自施加熱壓力負荷後至分析開始，將各樣品保存於溫度控制在4°C之低溫庫中。

(3) 結果及考察

圖3表示將各冷凍乾燥製劑於25°C及40°C下保存時之聚

合物之變化。聚合物量係利用大小排斥層析進行測定。抗體濃度為最高濃度(抗體量亦最多)之 $Q=3$ 之製劑，於 40°C 下保存3個月後，聚合物約為2%。一般而言，已知有，若抗體濃度變高則聚合物生成量增加，且變得不安定。關於實施例1之抗體濃度為 10 mg/mL 、丙胺酸單獨處方之製劑，可明瞭，若考慮於 40°C 下保存3個月後之聚合物量約為9%，則可充分抑制聚合物生成。再者，關於抗體濃度為最低濃度(抗體量為最少)之 $Q=0.05$ 之製劑，幾乎未確認於施加壓力負荷前後之變化，為安定。又，於其他分析項目(異物、混濁、分解物、去醯胺體、氧化體)中，亦幾乎未發現施加壓力負荷前後之變化，為安定。

於本實施例中可明瞭，藉由含有相對於 $Q=0.05$ 至3、以 $R=1.5$ 之比率含有丙胺酸/蔗糖，而獲得安定的冷凍乾燥製劑。即，揭示有，安定的冷凍乾燥製劑，係以抗體質量與丙胺酸質量與蔗糖質量之3成分之質量比為 $1:0.3\sim 20:0.5\sim 30$ 的範圍之冷凍乾燥製劑形式而獲得。於以抗體質量相對於丙胺酸質量與蔗糖質量之合計的比來表示之情形時(將抗體質量設為1)，為 $1:5/6\sim 50$ ，較好的是 $1:1\sim 20$ ，更好的是 $1:1\sim 10$ ，尤其好的是 $1:5$ 。

實施例4 利用其他抗體之研究

本研究中，關於對使實施例2中所得抗體安定化之最佳的丙胺酸/蔗糖處方($R=1.5$)，係使用國際公報第WO0563981號案中所公開之針對CD40之重組完全人類IgG4抗體4D11(抗CD40抗體)來研究製劑之安定性。

本實施例中，製備表4中所表示之製劑，評價抗體之種類對製劑安定性造成之影響。

[表4]

供於本實施例之製劑一覽

	抗體濃度	抗體種類	賦形劑		界面活性劑	pH值
1	10 mg/mL	抗HLA-DR抗體	20 mg/mL	30 mg/mL	0.05 mg/mL	5.5
2		抗CD40抗體	丙胺酸	蔗糖	聚山梨醇酯80	

(1) 材料及方法

本實施例所使用之材料及分析方法，與實施例1中所表示者相同。R=1.5，Q=0.5，丙胺酸及蔗糖質量與抗體質量之比為1:5。

(2) 試驗條件

以與實施例1中所揭示方法同樣之方式，於溫度控制在25°C或40°C之培養箱(TABAI ESPEC公司製)中保存1個月及3個月，實施熱安定性試驗。又，自施加熱壓力負荷後至分析開始，將各樣品保存於溫度控制在4°C之低溫庫中。

(3) 結果及考察

圖4表示將各冷凍乾燥製劑於40°C下保存時之聚合物之變化(初始比：係除以冷凍乾燥前之聚合物量而獲得之值，將冷凍乾燥前之值設為1)。聚合物量係利用大小排斥HPLC進行測定。於抗CD40抗體中，於使用丙胺酸及蔗糖作為賦形劑之製劑中，確認有對保存期間之聚合物生成之抑制，與溫度及時間無關，本製劑中之抗體可安定地獲得保持。又，於其他分析項目(異物、混濁、分解物、去醯胺體、氧化體)中，亦幾乎未確認施加熱壓力負荷前後之

變化，為安定。

於本實施例中可判明：以丙胺酸及蔗糖為賦形劑之安定的冷凍乾燥製劑，無論其抗體為何種類均安定。

將本說明書中所引用之全部出版物、專利及專利申請直接作為參考而摘入本說明書中。

【圖式簡單說明】

圖1係表示於25°C或40°C下保存各冷凍乾燥製劑時聚合物量之變化之圖。聚合物量係利用大小排斥HPLC進行測定。於單獨使用丙胺酸時，顯示聚合物形成顯著，但與丙胺酸與海藻糖及/或蔗糖之組合之製劑為安定。

圖2係表示於25°C或40°C下保存各冷凍乾燥製劑時聚合物量之變化之圖。聚合物量係利用大小排斥HPLC進行測定。作為丙胺酸與所組合之蔗糖之比的R為0.25至2.5之製劑顯示為安定。

圖3係表示於25°C或40°C下保存各冷凍乾燥製劑時聚合物量之變化之圖。聚合物量係利用大小排斥HPLC進行測定。Q(抗體質量與丙胺酸質量之比)為0.05至3之製劑顯示為安定。

圖4係表示於25°C或40°C下保存各冷凍乾燥製劑時聚合物量之變化之圖。聚合物量係利用大小排斥HPLC進行測定。於抗HLA-DR抗體及抗CD40抗體中，以丙胺酸及蔗糖為賦形劑之冷凍乾燥製劑顯示為安定。

五、中文發明摘要：

本發明提供一種含有抗體而安定的冷凍乾燥醫藥製劑。
本發明係關於一種冷凍乾燥製劑，其含有抗體，進而含有結晶性物質及多元醇作為賦形劑，其中結晶性物質為丙胺酸，多元醇為蔗糖或海藻糖。

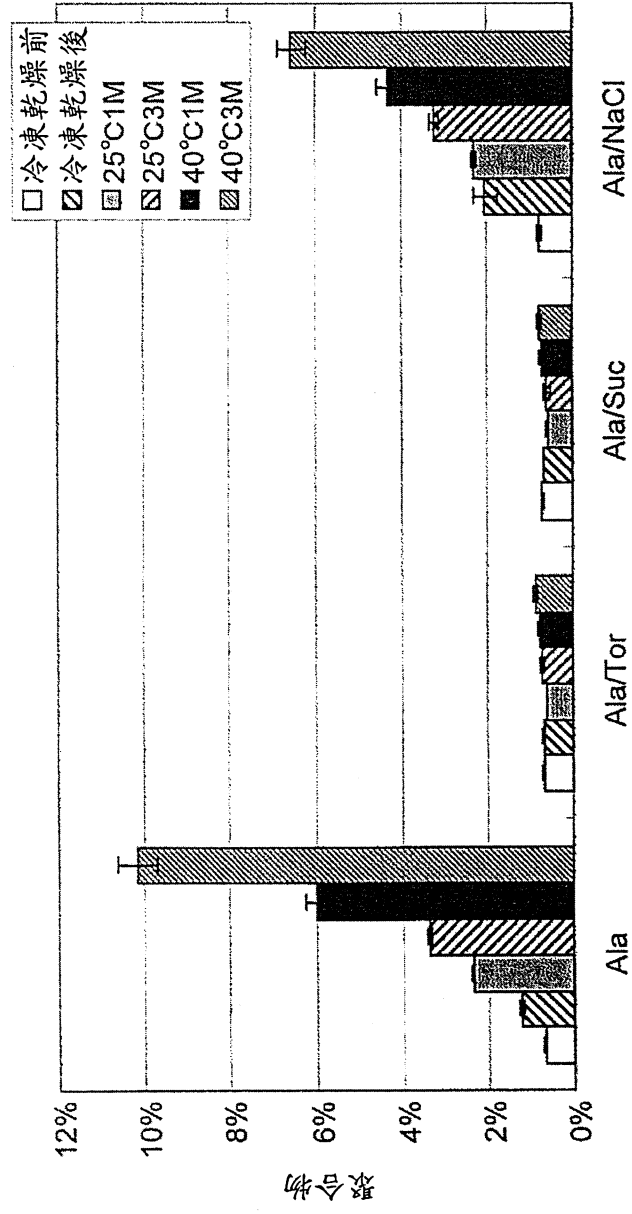
六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 一種冷凍乾燥製劑，其含有抗體，進而含有丙胺酸及多元醇作為賦形劑。
2. 如請求項1之冷凍乾燥製劑，其中多元醇為非還原性糖且為非晶質之多元醇。
3. 如請求項1之冷凍乾燥製劑，其中多元醇為非還原性糖且為非晶質之糖。
4. 如請求項3之冷凍乾燥製劑，其中多元醇為蔗糖或海藻糖。
5. 如請求項1至4中任一項之冷凍乾燥製劑，其中相對於抗體質量1之丙胺酸及多元醇之質量為5/6~50。
6. 如請求項5之冷凍乾燥製劑，其中多元醇質量/丙胺酸質量之比為0.5~2.5。
7. 如請求項5或6之冷凍乾燥製劑，其中抗體質量/丙胺酸質量之比為0.05~3。
8. 如請求項1至7中任一項之冷凍乾燥製劑，其中抗體質量與丙胺酸質量與蔗糖質量之3成分之質量比為1:0.3~20:0.5~30。
9. 如請求項1至8中任一項之冷凍乾燥製劑，其進而含有緩衝液。
10. 如請求項9之冷凍乾燥製劑，其中緩衝液為麩胺酸緩衝液。
11. 如請求項9或10之冷凍乾燥製劑，其中緩衝液之濃度為10 mM。

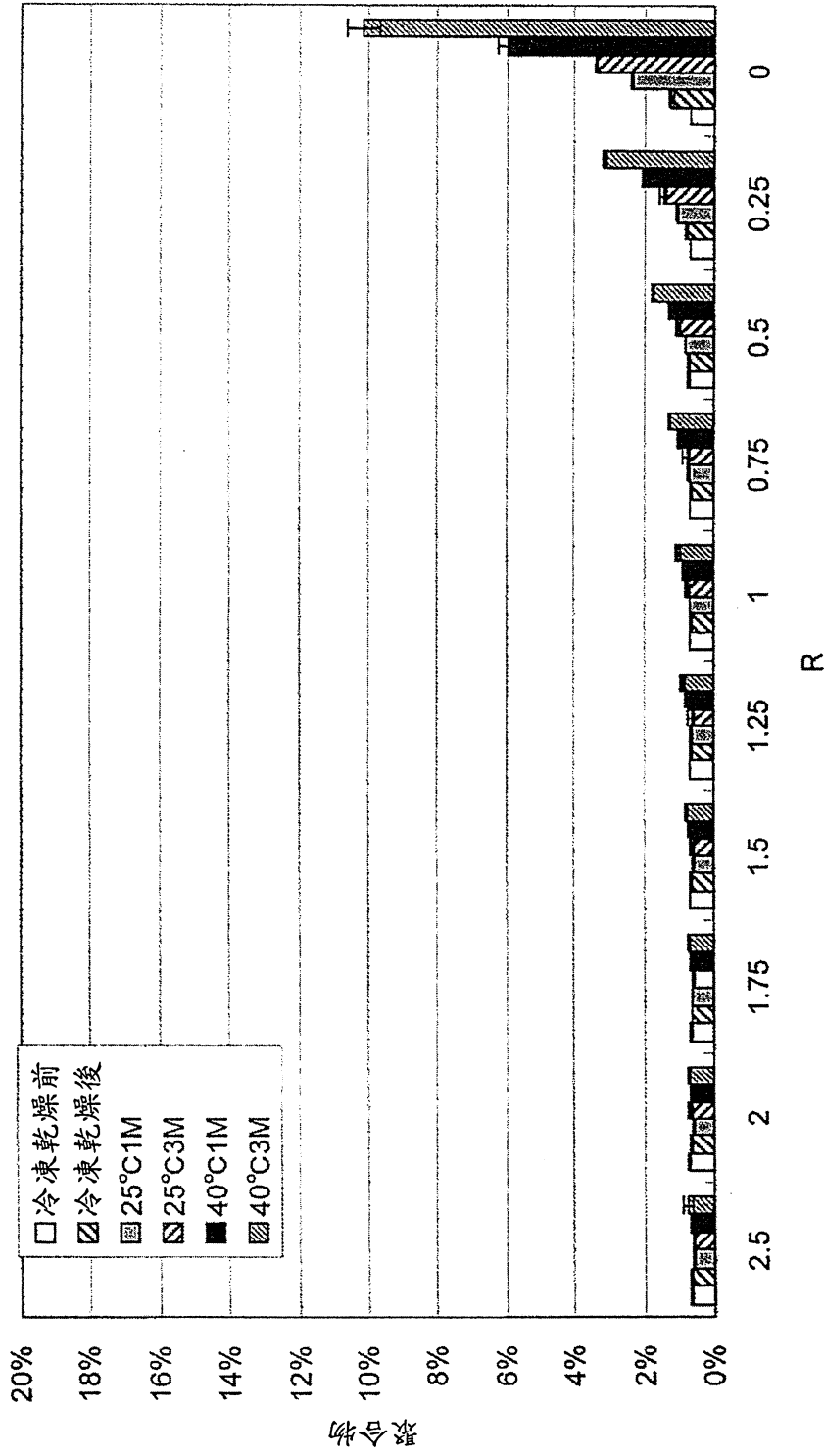
12. 如請求項1至11中任一項之冷凍乾燥製劑，其進而含有界面活性劑。
13. 如請求項12之冷凍乾燥製劑，其中界面活性劑為聚山梨醇酯。
14. 如請求項1至13中任一項之冷凍乾燥製劑，其係含有抗體作為有效成分之醫藥製劑。
15. 一種安定的冷凍乾燥製劑之製造方法，其包括：於抗體中添加丙胺酸及多元醇而冷凍乾燥。
16. 如請求項15之冷凍乾燥製劑之製造方法，其中多元醇為非還原性糖且為非晶質之多元醇。
17. 如請求項15之冷凍乾燥製劑之製造方法，其中多元醇為非還原性糖且為非晶質之糖。
18. 如請求項17之製造冷凍乾燥製劑之方法，其中多元醇為蔗糖或海藻糖。
19. 如請求項15至18中任一項之冷凍乾燥製劑之製造方法，其中相對於抗體質量1之丙胺酸及多元醇之質量為5/6~50。
20. 如請求項19之冷凍乾燥製劑之製造方法，其中多元醇質量/丙胺酸質量之比為0.5~2.5。
21. 如請求項19或20之冷凍乾燥製劑之製造方法，其中抗體質量/丙胺酸質量之比為0.05~3。
22. 如請求項15至21中任一項之冷凍乾燥製劑之製造方法，其中抗體質量與丙胺酸質量與蔗糖質量之3成分之質量比為1:0.3~20:0.5~30。

十一、圖式：



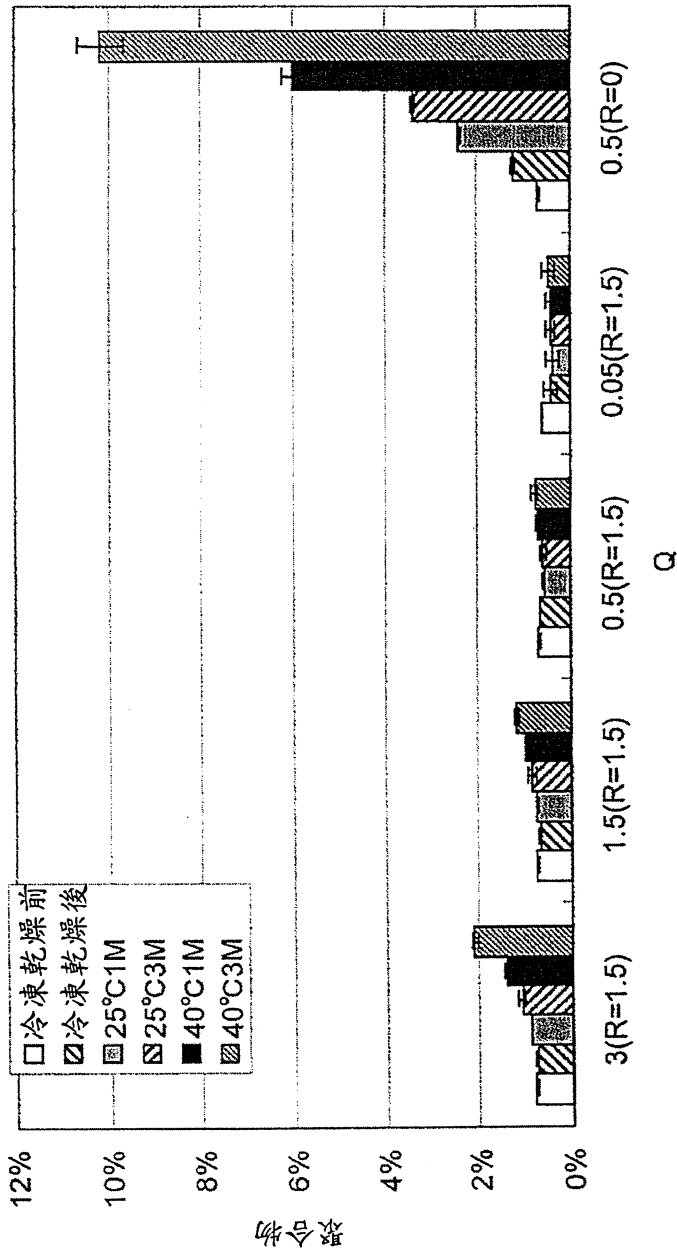
賦形劑之組合

圖 1



R=(蔗糖質量/丙胺酸質量)

圖2



抗體：丙胺酸：蔗糖=Q:1:R
 Q=(抗體質量/丙胺酸質量)

圖3

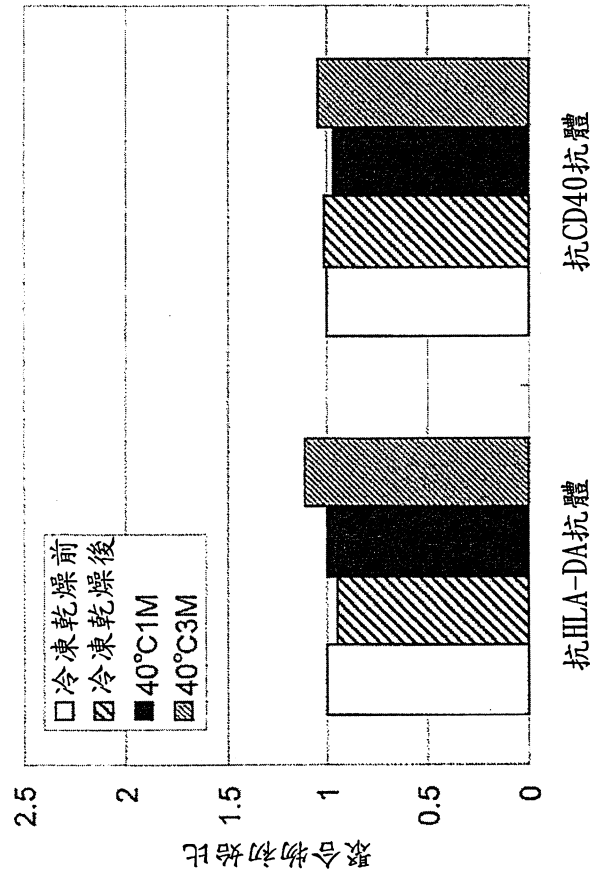


圖4

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)