



- (21) 申請案號：111148303 (22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 02 日
- (51) Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)* *A61K47/12 (2006.01)*  
*A61K47/18 (2006.01)* *A61K47/26 (2006.01)*  
*A61K9/08 (2006.01)* *A61P37/02 (2006.01)*
- (30) 優先權：2011/05/02 美國 61/481,522  
 2011/10/06 美國 61/544,054
- (71) 申請人：美商千禧製藥公司 (美國) MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (US)  
 美國
- (72) 發明人：福克斯 艾文 H FOX, IRVING H (US)；史可茲 凱薩琳 SCHOLZ, CATHERINE (US)；羅莎莉歐 瑪利亞 ROSARIO, MARIA (PT)；珍琴絲 艾瑞卡 海倫 JENKINS, ERICA HELEN (GB)；瓦加 科沙納德 M VARGA, CSANAD M. (US)；派倫尼亞潘恩 維斯亞納桑 PALANIAPPAN, VAITHIANATHAN (US)；布朗 傑森 BROWN, JASON (US)；迪魯茲歐 威洛 DILUZIO, WILLOW (US)；恩古揚 佛奧恩 M NGUYEN, PHUONG M. (US)
- (74) 代理人：陳長文
- 申請實體審查：有 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：18 共 140 頁

## (54) 名稱

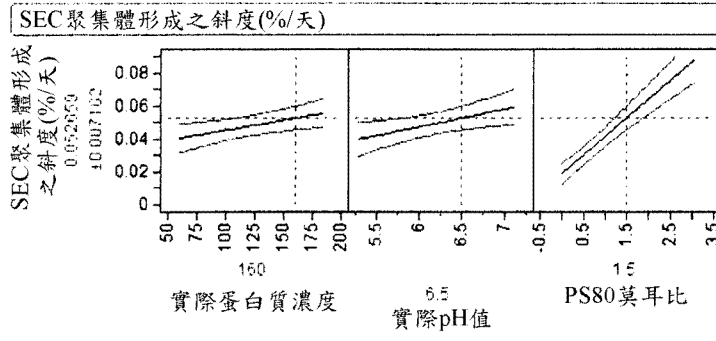
抗  $\alpha 4 \beta 7$  抗體之調配物

## (57) 摘要

本發明描述包含抗- $\alpha 4 \beta 7$  抗體、抗氧化劑或螯合劑及至少一種游離胺基酸之混合物的抗體調配物。所揭示之調配物可具有改良之穩定性、減少之聚集體形成或其兩者。本發明進一步提供一種此等抗體調配物之安全給藥方案，其易於遵循，且在活體內產生治療有效量之該抗- $\alpha 4 \beta 7$  抗體。

Antibody formulations are described comprising a mixture of an anti- $\alpha 4 \beta 7$  antibody, an antioxidant or chelator, and at least one free amino acid. The disclosed formulations may have improved stability, reduced aggregate formation, or both. The present invention further provides a safe dosing regimen of these antibody formulations that is easy to follow, and which results in a therapeutically effective amount of the anti- $\alpha 4 \beta 7$  antibody in vivo.

指定代表圖：



【圖6】

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體之調配物

### 【英文發明名稱】

FORMULATION FOR ANTI- $\alpha 4\beta 7$  ANTIBODY

### 【中文】

本發明描述包含抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體、抗氧化劑或螯合劑及至少一種游離胺基酸之混合物的抗體調配物。所揭示之調配物可具有改良之穩定性、減少之聚集體形成或其兩者。本發明進一步提供一種此等抗體調配物之安全給藥方案，其易於遵循，且在活體內產生治療有效量之該抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體。

### 【英文】

Antibody formulations are described comprising a mixture of an anti- $\alpha 4\beta 7$  antibody, an antioxidant or chelator, and at least one free amino acid. The disclosed formulations may have improved stability, reduced aggregate formation, or both. The present invention further provides a safe dosing regimen of these antibody formulations that is easy to follow, and which results in a therapeutically effective amount of the anti- $\alpha 4\beta 7$  antibody in vivo.

### 【指定代表圖】

圖6

### 【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之調配物

### 【英文發明名稱】

FORMULATION FOR ANTI- $\alpha 4\beta 7$  ANTIBODY

### 【技術領域】

### 【先前技術】

生物技術之進步使得可能使用重組DNA技術製造多種蛋白質用於醫藥應用。因為蛋白質比傳統有機及無機藥物更大且更複雜(亦即除複雜的三維結構外亦具有多個官能基)，所以該等蛋白質之調配出現特殊問題。為了使蛋白質保持生物學活性，調配物必須保持蛋白質胺基酸之至少一個核心序列之構形完整性，同時保護蛋白質之多個官能基免於降解。蛋白質可受缺乏穩定性的影響，且單株及多株抗體尤其會相對不穩定(參見例如Wang等人，*J. Pharm Sci.* 96:1-26 (2007))。許多調配選擇物係可用的，但沒有一種方法或系統可適用於所有蛋白質。待考量之若干因素已有報導(參見例如Wang等人)。

許多特徵可影響蛋白質之穩定性。實際上，即使在純化抗體之情況下，抗體結構亦可能為非均質的，此進一步使該等系統之調配複雜化。此外，包括於抗體調配物中之賦形劑較佳將任何潛在免疫反應減至最小。

在抗體之情況下，保持構形完整性更加重要。蛋白質之降解路徑可包括化學不穩定性(亦即包括藉由鍵形成或裂解修飾蛋白質產生新化學實體的任何過程)或物理不穩定性(亦即蛋白質更高級結構之變化)。化學不穩定性以例如脫醯胺、異構化、水解、氧化、片段化、聚糖 $\beta$ 消除或雙硫

鍵互換(disulfide exchange)形式表現。物理不穩定性可由例如變性、聚集、沈澱或吸附造成。四種最常見之蛋白質降解路徑為蛋白質片段化、聚集、脫醯胺及氧化。治療性蛋白質之化學或物理不穩定性之後果包括有效投與劑量減少、因例如刺激或免疫反應性所致之療法安全性降低及因存放期短所致之更頻繁製造。

數個公開案已大體上揭示治療發炎性腸病之多種方法，且提供用於投與經設計以治療發炎性腸病之藥劑的給藥方案。舉例而言，WO 96/24673揭示黏膜血管定址素及治療與因白血球結合至表現MAdCAM之細胞所致之白血球募集至胃腸道相關的疾病。U.S. 2005/0095238描述治療與黏膜組織之白血球浸潤相關之疾病的方法及向人類投與有效量之對 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類或人類化免疫球蛋白或抗原結合片段。U.S. 2005/0095238進一步描述多種劑量(例如每公斤體重0.15 mg、約0.5 mg、約1.0 mg、約1.5 mg或約2.0 mg免疫球蛋白或片段)及劑量之間的多個間隔時間(7天、14天、21天、28天或30天)。然而，上述專利及公開案並未揭示本文中描述且主張的抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之特定調配物或特定劑量及給藥方案。重要的是，上述專利並未揭示為本文中描述且主張的治療方法(由臨床試驗資料證明)而提供之調配物、劑量及給藥方案。

本發明之抗體調配物可適用於抑制白血球結合至表現MAdCAM之細胞且因此幫助治療患者之發炎性腸病。因此，急需找到此等化合物之適合劑量及給藥時程，且急需開發在長時間段內以穩定及適宜形式產生穩態治療有效血液含量之抗體調配物的調配物，較佳為皮下調配物。

### 【發明內容】

本發明係關於識別抗氧化劑或螯合劑及至少一種胺基酸作為適用於

調配抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之賦形劑，該等調配物之不穩定性使其易受脫醯胺、氧化、異構化及/或聚集。調配物改良穩定性，減少聚集體形成且延遲其中抗體之降解。

因此，在第一態樣中，本發明係關於一種穩定液體醫藥調配物，其包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、抗氧化劑或螯合劑及至少一種游離胺基酸之混合物。

在一些實施例中，穩定液體醫藥調配物在室溫下12個月之後具有小於約1.0%之聚集體形成。穩定液體醫藥調配物在室溫下12個月之後可具有小於約0.2%之聚集體形成。

在一些實施例中，抗氧化劑或螯合劑為檸檬酸鹽。在一些實施例中，螯合劑為EDTA。

在一些實施例中，調配物之游離胺基酸為組胺酸、丙胺酸、精胺酸、甘胺酸、麩胺酸或其任何組合。調配物可包含約50 mM至約175 mM之游離胺基酸。調配物可包含約100 mM至約175 mM之游離胺基酸。游離胺基酸與抗體之莫耳比之比率可為至少250:1。

調配物亦可含有界面活性劑。界面活性劑可為聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆(poloxamer)或其任何組合。

在一些實施例中，抗氧化劑與界面活性劑之莫耳比為約3:1至約156:1。

調配物可具有介於約6.3與約7.0之間的pH值。調配物之pH值可在約6.5與約6.8之間。調配物可具有介於約6.1與約7.0之間或介於約6.2與6.8之間的pH值。

在一些實施例中，穩定液體醫藥調配物含有至少約60 mg/ml至約160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。調配物可含有至少約160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。調配

物可含有約150 mg/ml至約180 mg/ml抗體或約165 mg/ml抗體。

在另一態樣中，本發明係關於一種穩定液體醫藥調配物，其包含至少約60 mg/ml至約160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、緩衝劑及至少約10 mM檸檬酸鹽。緩衝劑可為組胺酸緩衝劑。

在另一態樣中，本發明係關於一種穩定液體醫藥調配物，其包含至少約60 mg/ml至約180 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、緩衝劑及至少約5 mM檸檬酸鹽。緩衝劑可為組胺酸緩衝劑。

在另一態樣中，本發明係關於一種穩定液體醫藥調配物，其包含至少約160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體及至少約10 mM檸檬酸鹽。調配物可進一步含有聚山梨醇酯80。

在另一態樣中，本發明係關於一種穩定液體醫藥調配物，其包含約160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體及至少約5 mM檸檬酸鹽。調配物可進一步含有聚山梨醇酯80。

在另一態樣中，本發明係關於一種穩定液體醫藥調配物，其包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、檸檬酸鹽、組胺酸、精胺酸及聚山梨醇酯80之混合物。調配物可存在於容器(諸如小瓶、藥筒、注射器或自動注射器)中。

本發明之穩定液體醫藥調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體可為維多珠單抗(vedolizumab)。本發明之調配物可用於皮下、靜脈內或肌內投與。

在一些態樣中，調配物可將抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之免疫原性減至最小。

在另一態樣中，本發明係關於一種治療發炎性腸病之方法，其包含向有需要之患者投與本文所述之穩定液體醫藥調配物。投與可為皮下投與。投與可為自投與。

在另一態樣中，本發明係關於一種製品，其包含容器、本文所述之

穩定液體醫藥調配物及其使用說明。

在一個態樣中，本發明係關於一種治療罹患發炎性腸病之人類患者之方法，其中該方法包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中根據以下給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段：  
(a)例如在誘導期治療方案中，每隔一天呈皮下注射形式之165 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的初始劑量持續六個劑量；(b)隨後例如在維持期治療方案中，在第6週時，視需要每兩週或每四週呈皮下注射形式之165 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的第七後續劑量；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在一個態樣中，本發明係關於一種治療罹患發炎性腸病之人類患者之方法，其中該方法包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據包含靜脈內劑量之誘導期及皮下劑量之維持期的以下給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段：  
(a)呈靜脈內輸注形式之300 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的初

始靜脈內劑量；(b)隨後在初始劑量之後約兩週時，呈靜脈內輸注形式之300 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的第二靜脈內後續劑量；(c)隨後自第六週開始，視需要每週、每兩週、每三週或每四週呈皮下注射形式之165 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的第三後續劑量；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在另一態樣中，本發明係關於一種用於治療性治療發炎性腸病之給藥方案，其中該給藥方案包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據皮下或肌內給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，該給藥方案維持免疫球蛋白或其抗原結合片段之平均穩態最低(trough)血清濃度在約9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 範圍內；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、

CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在另一態樣中，本發明係關於一種用於治療性治療發炎性腸病之給藥方案，其中該給藥方案包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據皮下或肌內給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，該給藥方案維持人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段之平均穩態最低血清濃度在約35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 範圍內；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在另一態樣中，本發明係關於一種治療罹患發炎性腸病之人類患者之方法，其中該方法包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據以下給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段：(a)藉由約六週之初始給藥，足以達成人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段之平均最低血清濃度為約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約30

$\mu\text{g/mL}$  之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的複數個誘導期劑量；(b) 隨後，視需要維持免疫球蛋白或其抗原結合片段之平均穩態最低血清濃度在約  $9 \mu\text{g/mL}$  至約  $13 \mu\text{g/mL}$  或約  $35 \mu\text{g/mL}$  至  $40 \mu\text{g/mL}$  範圍內之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的複數個維持期劑量；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對  $\alpha 4\beta 7$  複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在一些態樣中，調配物、治療方法、劑量及/或給藥方案確保患者將產生對抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體有反應性之抗體的最小可能性。

患者可對用免疫調節劑、腫瘤壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )拮抗劑中之至少一者或其組合進行之治療缺乏足夠反應、喪失反應或不耐受。

發炎性腸病可為克隆氏病(Crohn's disease)或潰瘍性結腸炎。發炎性腸病可為中度至重度活動性潰瘍性結腸炎。

給藥方案可使得罹患中度至重度活動性潰瘍性結腸炎之患者之黏膜癒合。

患者可能先前已接受用至少一種用於發炎性腸病之皮質類固醇的治療。患者可同時接受用至少一種用於發炎性腸病之皮質類固醇的治療。給藥方案可使得患者之皮質類固醇使用減少、消除或減少及消除。

在一些態樣中，以約  $1.0 \text{ mg/ml}$  至約  $1.4 \text{ mg/ml}$  之濃度之最終劑型投

與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段。可以約1.2 mg/ml之最終劑型投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段。

在一些態樣中，以具有約70 mg至約250 mg、約90 mg至約200 mg、約150 mg至約180 mg或至少160 mg之量的抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之最終劑型投與人類化免疫球蛋白或抗原結合片段。

在一些態樣中，給藥方案不改變接受該治療之患者之腦脊髓液中的CD4與CD8之比率。

患者可為65歲或65歲以上之人且不需要給藥方案之任何調整。

在一些態樣中，用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之治療方法、劑量或給藥方案可將抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之免疫原性減至最小。

#### 【圖式簡單說明】

圖1為編碼人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白之重鏈之核苷酸序列(SEQ ID NO:1)及重鏈之演繹胺基酸序列(SEQ ID NO:2)的說明圖。核苷酸序列在重鏈之5'端處含有選殖位點(小寫)、Kozak序列(大寫，SEQ ID NO:1之核苷酸18至23)及前導序列(小寫，SEQ ID NO:1之核苷酸24至86)。核苷酸序列之開放閱讀框架為SEQ ID NO:1之核苷酸24至1433。

圖2為編碼人類化免疫球蛋白(在本文中稱為維多珠單抗(vedolizumab))之輕鏈之核苷酸序列(SEQ ID NO:3)及輕鏈之演繹胺基酸序列(SEQ ID NO:4)的說明圖。核苷酸序列在重鏈之5'端處含有選殖位點(小寫)、Kozak序列(大寫，SEQ ID NO:3之核苷酸18至23)及前導序列(小寫，SEQ ID NO:3之核苷酸24至80)。核苷酸序列之開放閱讀框架為SEQ ID NO:3之核苷酸24至737。

圖3為(A)人類化免疫球蛋白(在本文中稱為維多珠單抗)之成熟人類化

輕鏈(SEQ ID NO:4之胺基酸20-238)與(B)人類化免疫球蛋白(在本文中稱為LDP-02)之成熟人類化輕鏈(SEQ ID NO:5)之胺基酸序列的比對。(關於LDP-02，參見WO 98/06248及Feagan等人，*N. Eng. J. Med.* 352:2499-2507 (2005)。Feagan等人描述LDP-02之臨床研究，但在該文章中，其將LDP-02稱為MLN02)。該比對說明維多珠單抗與LDP-02之輕鏈之胺基酸序列在成熟輕鏈之位置114及115處不同。

圖4為(A)同屬人類 $\kappa$ 輕鏈恆定區(SEQ ID NO:6)與(B)同屬鼠類 $\kappa$ 輕鏈恆定區(SEQ ID NO:7)之胺基酸序列的比對。胺基酸殘基Thr及Val(其存在於成熟維多珠單抗輕鏈之位置114及115處(SEQ ID NO:4之胺基酸133及134))存在於人類 $\kappa$ 輕鏈之恆定區中，而胺基酸殘基Ala及Asp(其存在於成熟LDP-02輕鏈(SEQ ID NO:5)之位置114及115處)存在於小鼠 $\kappa$ 輕鏈之恆定區中。

圖5為載體pLKTOK38D(亦稱為pTOK38MLN02-TV)之圖譜，其編碼MLN02之人類化重鏈及人類化輕鏈，且適用於在CHO細胞中產生維多珠單抗。(參見揭示pLKTOK38之美國專利申請公開案第2004/0033561 A1號。pLKTOK38D為pLKTOK38之變異體，其中圖譜上指示之限制位點側接編碼輕鏈可變區之序列。)

圖6顯示由於蛋白質濃度、pH值及界面活性劑:蛋白質莫耳比之變化所致的SEC聚集體形成之斜度(每日百分比)。在6.0至6.5之pH值範圍下，調配物之聚集體形成類似於在0.7至1.5之聚山梨醇酯80:蛋白質莫耳比範圍下的聚集體形成。

圖7為展示在聚山梨醇酯80:蛋白質莫耳比大於1.5下，聚集體形成率隨pH值增加而增加的圖。

圖8為展示賦形劑對聚集體形成之效應之圖。將25 mM檸檬酸鹽、5 mM檸檬酸鹽、5 mM EDTA、25 mM半胱胺酸或5 mM半胱胺酸添加至調配物中。所有三種賦形劑均減少聚集體形成。

圖9為一組展示在調配物中存在25 mM檸檬酸鹽之情況下聚集體形成減少及蛋白質濃度增加與聚集體形成率增加之間的關係之圖。

圖10為展示40°C下CEX物質降解之結果的圖。資料展示pH值變化對CEX降解之影響。

圖11為展示溫度對調配物之pH值之效應的圖。含有組胺酸之調配物之pH值隨溫度而降低，而檸檬酸鹽調配物之pH值不受溫度影響。

圖12為展示CEX主要同功異型物在十二個月時間內之百分比的圖。pH值為6.0至6.2之調配物展示比pH值為6.3至6.4之調配物少約1%至2%之主要同功異型物。

圖13展示一組表明黏度主要受蛋白質濃度及pH值影響的圖。展示蔗糖、組胺酸及精胺酸添加物對調配物之黏度具有輕微影響。

圖14展示(A)成熟人類GM607'CL抗體κ輕鏈可變區及(B)人類21/28'CL重鏈可變區的胺基酸序列。

圖15展示預填充注射器中之蛋白質產物之組分。

圖16A至圖16B展示(A)蛋白質濃度及(B)黏度對所測試之各種注射器之注射力的效應。

圖17(A)展示初始滑動力隨蛋白質濃度及針尺寸之變化。圖17(B)展示各注射器製造商及針尺寸之初始滑動力。

圖18展示維多珠單抗之吸收曲線。該圖展示肌內及皮下劑量之濃度通常重疊。此等投與途徑之吸收曲線不存在明顯大體差異。

## 【實施方式】

本申請案主張2011年10月6日申請之美國臨時申請案61/544,054及2011年5月2日申請之美國臨時申請案61/481,522之優先權。前述申請案之全部內容以引用的方式併入本文中。

本發明係關於一種包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之醫藥調配物。醫藥調配物可為包含抗氧化劑或螯合劑(例如檸檬酸鹽)、抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體及游離胺基酸之混合物。醫藥調配物可呈固體或液體形式。

## 定義

術語「醫藥調配物」係指一種製劑，其含有呈使抗體之生物活性有效之形式的抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體，且其不含對將投與調配物之個體具不可接受毒性之其他組分。

「穩定」調配物為當儲存時其中之抗體實質上保持其物理穩定性及/或其化學穩定性及/或其生物活性的調配物。在一個態樣中，調配物在儲存時實質上保持其物理及化學穩定性以及其生物活性。一般基於調配物之預期存放期選擇儲存期。用於量測蛋白質穩定性之多種分析技術在此項技術中可用且於例如 *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee編，Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)及 Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993)中有綜述。穩定性可在選定溫度下持續選定時段進行量測。舉例而言，液體調配物在約40°C下穩定持續至少約3天、5天、1週、2週、3週、4週、5週或6週。在另一態樣中，凍乾調配物在約40°C下穩定持續至少約2週至4週、至少約3個月、至少約6個月、至少約9個月、至少約12個月或至少約18個月。在另一態樣中，液體及/或凍乾調配物在約5°C及/或25°C下穩定持續至少約1個月、至少約3

個月、至少約6個月、至少約9個月、至少約12個月、至少約18個月、至少約24個月、至少約30個月或至少約36個月；及/或在約-20°C及/或-70°C下穩定持續至少約1個月、至少約3個月、至少約6個月、至少約9個月、至少約12個月、至少約18個月、至少約24個月、至少約30個月、至少約36個月、至少約42個月或至少約48個月。此外，在一些實施例中，液體調配物在冷凍(至例如-80°C)及解凍之後(例如在1、2或3個冷凍及解凍循環之後)可為穩定的。

可以多種不同方法定性及/或定量評估液體調配物之穩定性，包括評估二聚體、多聚體及/或聚集體形成(例如使用尺寸排阻層析法(SEC)、基質輔助雷射脫附離子化飛行時間質譜法(MALDI-TOF MS)、分析超速離心、光散射(光子相關光譜法、動態光散射(DLS)、靜態光散射、多角雷射光散射(MALLS))、基於流動之顯微鏡成像、電子阻抗(庫爾特(coulter))計數、光遮蔽或其他液體顆粒計數系統、藉由量測混濁度及/或藉由目視檢查)；藉由使用陽離子交換層析(CEX)、等電聚焦(IEF)(例如毛細管技術(cIEF))或毛細管帶電泳評估電荷非均勻性；胺基端或羧基端序列分析；質譜分析；SDS-PAGE或SEC分析以比較片段化、完整及多聚(亦即二聚、三聚等)抗體；肽圖(例如胰蛋白酶或LYS-C)分析；評估抗體之生物活性或抗原結合功能；及其類似方法。亦可以多種不同方法定性及/或定量評估固態調配物之穩定性，該等方法包括直接測試，諸如藉由X射線粉末繞射(XRPD)鑑別晶體結構；使用傅立葉轉換紅外光譜法(FTIR)評估固態下之抗體結構；及使用差示掃描熱量測定(DSC)量測凍乾固體(熔融、玻璃轉移等)中之熱轉移；及間接測試，諸如藉由卡爾費雪(Karl Fisher)測試量測水分含量例如從而外推經由水解所致之化學不穩定性之可能性。不穩

定性可包括以下任一或多者：聚集(例如非共價可溶性聚集、共價可溶性聚集(例如二硫鍵重排/混雜)、不溶性聚集)、脫醯胺(例如Asn脫醯胺)、氧化(例如Met氧化)、異構化(例如Asp異構化)、截割/水解/片段化(例如鉸鏈區片段化)、丁二醯亞胺形成、N端延長、C端加工、糖基化差異及其類似變化。

「脫醯胺」單株抗體為其一或多個天冬醯胺或麩醯胺酸殘基已經衍生化為例如天冬胺酸或異天冬胺酸的單株抗體。

「易受脫醯胺」之抗體為包含一或多個發現有脫醯胺傾向之殘基的抗體。

「易受氧化」之抗體為包含一或多個發現有氧化傾向之殘基的抗體。

「易聚集」之抗體為發現其與其他抗體分子聚集(尤其在冷凍、加熱、乾燥、復原及/或攪拌時)的抗體。

「易片段化」之抗體為發現例如在其鉸鏈區處裂解為兩個或兩個以上片段的抗體。

「減少脫醯胺、氧化、聚集或片段化」欲意謂相對於在不同pH值下或在不同緩衝劑中調配之單株抗體，防止或減少(例如至80%、60%、50%、40%、30%、20%或10%)脫醯胺、聚集或片段化之量。

「聚集體」、「SEC聚集體」或「可溶性聚集體」為大於一個且小於或等於十個抗體蛋白質及/或片段經由共價、離子或疏水性相互作用結合在一起形成更大蛋白質體。

「不溶性聚集體」或「顆粒」為大於十個抗體蛋白質及/或片段經由共價、離子或疏水性相互作用結合在一起形成更大蛋白質體。

如本文所用，單株抗體之「生物活性」係指抗體結合至抗原且產生可活體外或活體內量測之可量測生物反應的能力。該活性可為拮抗性或促效性。

細胞表面分子「 $\alpha 4\beta 7$ 整合素」或「 $\alpha 4\beta 7$ 」為 $\alpha 4$ 鏈(CD49D, ITGA4)及 $\beta 7$ 鏈(ITGB7)之雜二聚體。每條鏈可與替代性整合素鏈形成雜二聚體，形成例如 $\alpha 4\beta 1$ 或 $\alpha E\beta 7$ 。人類 $\alpha 4$ 及 $\beta 7$ 基因(分別為GenBank(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD)RefSeq 寄存編號NM\_000885及NM\_000889)由B及T淋巴細胞、尤其是記憶性CD4+淋巴細胞表現。作為許多整合素之典型， $\alpha 4\beta 7$ 可以靜止或活化狀態存在。 $\alpha 4\beta 7$ 之配位體包括血管細胞黏著分子(VCAM)、纖維結合蛋白及黏膜定址素(MAdCAM(例如MAdCAM-1))。

如本文所用，具有「對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物之結合特異性」之人類免疫球蛋白或其抗原結合片段結合至 $\alpha 4\beta 7$ ，但不結合至 $\alpha 4\beta 1$ 或 $\alpha EB7$ 。

如本文所用，「等張」調配物具有與人類血液實質上相同之滲透壓。等張調配物通常具有約250 mOsm至350 mOsm之滲透壓。可使用例如蒸氣壓或冰凍型滲壓計來量測等張性。

如本文所用，「緩衝劑」係指藉由其酸鹼共軛組分之作用抵抗pH值變化之緩衝劑。緩衝劑可以本發明之液體或固體調配物形式存在。在一些實施例中，本發明之緩衝劑將調配物之pH值調節為約5.0至約7.5、約pH 5.5至約7.5、約pH 6.0至約7.0或約6.3至約6.5之pH值。在一個態樣中，將pH值控制在5.0至7.5範圍內之呈單獨或組合形式的緩衝劑之實例包括乙酸鹽、丁二酸鹽、葡糖酸鹽、組胺酸、檸檬酸鹽、磷酸鹽、順丁烯二酸鹽、二甲基胍酸鹽、2-[N-嗎啉基]乙磺酸(MES)、雙(2-羥乙基)亞胺基參[羥甲

基]甲烷(Bis-Tris)、N-[2-乙醯胺基]-2-亞胺二乙醯(ADA)、甘胺醯甘胺酸及其他有機酸緩衝劑。在另一態樣中，本文中之緩衝劑為組胺酸或檸檬酸鹽。

「組胺酸緩衝劑」為包含組胺酸離子之緩衝劑。組胺酸緩衝劑之實例包括組胺酸氯化物、組胺酸乙酸鹽、組胺酸磷酸鹽、組胺酸硫酸鹽溶液。組胺酸緩衝劑或組胺酸鹽酸鹽緩衝劑之pH值在約5.5至約7.0、約6.1至約6.9之範圍內或為約6.5。

「檸檬酸鹽緩衝劑」為包含檸檬酸根離子之緩衝劑。檸檬酸鹽緩衝劑之實例包括檸檬酸鈉、檸檬酸銨、檸檬酸鈣及檸檬酸鉀溶液。檸檬酸鹽緩衝劑之pH值為約3.0至6.2、約5.5至6.5、約6.1至約6.5、約6.1、約6.2或約6.5。

在本文中「醣」為具有通式 $(\text{CH}_2\text{O})_n$ 之化合物及其衍生物，包括單醣、雙醣、三醣、多醣、糖醇、還原糖、非還原糖及其類似物。本文中之醣之實例包括葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、果糖、麥芽糖、聚葡萄糖、赤藻糖醇、甘油、阿拉伯糖醇、木糖醇(sylitol)、山梨糖醇、甘露糖醇、蜜二糖、松三糖、棉子糖、甘露三糖、水蘇糖、麥芽糖、乳酮糖、麥芽酮糖、葡萄糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、異麥芽酮糖及其類似物。醣可為凍乾保護劑。在一個態樣中，本文中之醣為非還原雙醣，諸如蔗糖。

在本文中，「界面活性劑」係指降低液體之表面張力的試劑。在一個態樣中，界面活性劑為非離子界面活性劑。本文中之界面活性劑之實例包括聚山梨醇酯(聚氧乙烯脫水山梨糖醇單月桂酸酯，例如聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80)；TRITON(第三辛基苯氧基聚乙氧基乙醇，非離子清潔劑，Dow Chemical Co., Midland MI之Union Carbide子公司)；十二烷基

硫酸鈉(SDS)；月桂硫酸鈉；辛基糖苷鈉；月桂基磺基甜菜鹼、肉豆蔻基磺基甜菜鹼、亞油烯基(linoleyl)磺基甜菜鹼或硬脂醯基磺基甜菜鹼；月桂基肌胺酸、肉豆蔻基肌胺酸、亞油烯基肌胺酸或硬脂醯基肌胺酸；亞油烯基甜菜鹼、肉豆蔻基甜菜鹼或鯨蠟基甜菜鹼；月桂醯胺丙基甜菜鹼、椰油醯胺丙基甜菜鹼、亞油醯胺丙基甜菜鹼、肉豆蔻醯胺丙基甜菜鹼、棕櫚醯胺丙基(palimidopropyl)甜菜鹼或異硬脂醯胺丙基甜菜鹼(例如月桂醯胺丙基甜菜鹼)；肉豆蔻醯胺丙基二甲胺、棕櫚醯胺丙基二甲胺或異硬脂醯胺丙基二甲胺；甲基椰油醯基牛磺酸鈉或甲基油烯基牛磺酸二鈉；脫水山梨糖醇單棕櫚酸酯；及 MONAQUAT 系列(Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.)；聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)及聚氧乙烯與聚氧丙烯二醇之共聚物(例如泊洛尼克(Pluronic)/泊洛沙姆、PF68等)；等。在另一態樣中，本文中之界面活性劑為聚山梨醇酯80。

術語「螯合劑」係指經由一個以上鍵與原子結合之試劑。在一個態樣中，本文中之螯合劑之實例包括檸檬酸鹽、乙二胺四乙酸、乙二醇四乙酸(EGTA)、二巯基丙醇、二伸乙三胺五乙酸及N,N-雙(羧甲基)甘胺酸。在另一態樣中，螯合劑為檸檬酸鹽或EDTA。

術語「抗氧化劑」係指抑制其他分子氧化之試劑。本文中之抗氧化劑之實例包括檸檬酸鹽、硫辛酸、尿酸、麩胱甘肽、生育酚、胡蘿蔔素、番茄紅素、半胱胺酸、磷酸酯化合物(例如依替膦酸(etidronic acid))、去鐵胺及蘋果酸鹽。

本文中之術語「抗體」以最廣泛含義使用且尤其涵蓋全長單株抗體、免疫球蛋白、多株抗體、由至少兩種全長抗體例如各與不同抗原或抗原決定基形成之多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及個別抗原結合片段

(包括dAbs、scFv、Fab、F(ab)'<sub>2</sub>、Fab')，包括人類、人類化及來自非人類物種及重組抗原結合形式之抗體(諸如單功能抗體(monobody)及雙功能抗體)。

設想抗體之近似分子量為約150,000道爾頓(dalton)來計算本文中所描述之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體與其他賦形劑之莫耳量及比率。實際抗體分子量可不為150,000道爾頓，視胺基酸組成或轉譯後修飾(例如視用於表現抗體之細胞株)而定。實際抗體分子量可為150,000道爾頓 $\pm 5\%$ 。

術語「人類抗體」包括具有由人類生殖系免疫球蛋白序列衍生之序列之抗體，諸如由具有人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小鼠(例如XENOMOUSE基因工程改造小鼠(Abgenix, Fremont, CA)、HUMAB-MOUSE®、KIRIN TC MOUSE™轉染色體小鼠、KMMOUSE®(MEDAREX, Princeton, NJ))、人類噬菌體呈現庫、人類骨髓瘤細胞或人類B細胞衍生之抗體。

如本文所用之術語「單株抗體」係指由實質上均質抗體之群獲得之抗體，亦即除可在產生單株抗體期間出現之可能變異體(該等變異體一般以少量存在)之外，構成該群之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定基。與通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體之多株抗體製劑對比，各單株抗體針對抗原上之單一決定子。修飾語「單株」指示抗體係自實質上均質之抗體群獲得之特性，且不應理解為需要藉由任何特定方法來產生該抗體。舉例而言，欲根據本發明使用之單株抗體可藉由最初由Kohler等人，*Nature*, 256:495 (1975)所述之融合瘤方法產生，或可藉由重組DNA方法(參見例如美國專利第4,816,567號)產生。「單株抗體」亦可使用例如Clackson等人，*Nature*, 352:624-628 (1991)及Marks等人，*J.*

*Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)中所述之技術自噬菌體抗體庫中分離。

本文中之單株抗體特定言之包括「嵌合」抗體，其中一部分重鏈及/或輕鏈與衍生自特定物種或屬於特定抗體種類或子類之抗體中的相應序列相同或同源，而該(該等)鏈之剩餘部分與衍生自另一物種或屬於另一抗體種類或子類之抗體中的相應序列相同或同源；以及該等抗體之片段，只要其展現所要生物活性即可(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))。本文中之相關嵌合抗體包括包含衍生自非人類靈長類動物(例如舊大陸猴(Old World Monkey)、猿(Ape)等)之可變域抗原結合序列及人類恆定區序列的「靈長類化」抗體。

在本發明之調配物中製備之人類化免疫球蛋白之「抗原結合片段」至少包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之重鏈及/或輕鏈之可變區。舉例而言，維多珠單抗(vedolizumab)之抗原結合片段包含SEQ ID NO:4之人類化輕鏈序列之胺基酸殘基20至131。該等抗原結合片段之實例包括在此項技術中已知之人類化免疫球蛋白之Fab片段、Fab'片段、scFv及F(ab')<sub>2</sub>片段。本發明之人類化免疫球蛋白之抗原結合片段可藉由酶促裂解或藉由重組技術產生。舉例而言，番木瓜蛋白酶或胃蛋白酶裂解可分別用於產生Fab或F(ab')<sub>2</sub>片段。抗體亦可使用已將一或多個終止密碼子引入天然終止位點之上游的抗體基因以多種截短形式產生。舉例而言，編碼F(ab')<sub>2</sub>片段之重鏈之重組構築體可經設計以包括編碼重鏈之CH<sub>1</sub>結構域及鉸鏈區的DNA序列。在一個態樣中，抗原結合片段抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至一或多個其配位體(例如黏膜定址素MAdCAM(例如MAdCAM-1)、纖維結合蛋白)。

番木瓜蛋白酶消化抗體產生兩個稱為「Fab」片段之相同抗原結合片

段，各具有單一抗原結合位點；及一剩餘「Fc」片段，其名稱反映其易於結晶之能力。胃蛋白酶處理產生F(ab')<sub>2</sub>片段，其具有兩個抗原結合位點且仍能夠交聯抗原。

「Fv」為由一個重鏈可變域及一個輕鏈可變域呈非共價締合形式之二聚體組成之抗體片段。

Fab片段亦含有輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(CH1)。Fab'片段因在重鏈CH1結構域之羧基端添加少量殘基(包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸)而不同於Fab片段。Fab'-SH在本文中為恆定域之半胱胺酸殘基帶有至少一個游離硫醇基之Fab'的命名。F(ab')<sub>2</sub>抗體片段最初被製成其之間具有鉸鏈半胱胺酸之Fab'片段對。亦已知抗體片段之其他化學偶聯。

「單鏈Fv」或「scFv」抗體片段包含抗體之V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>結構域，其中此等結構域存在於單一多肽鏈中。在一個態樣中，Fv多肽進一步包含位於V<sub>H</sub>與V<sub>L</sub>結構域之間的多肽連接子，其使得scFv可形成抗原結合所需之結構。關於scFv之綜述，參見Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenberg及Moore編, Springer-Verlag, New York, 第269頁至第315頁(1994)。

術語「雙功能抗體」係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含與同一多肽鏈(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)中之輕鏈可變域(V<sub>L</sub>)連接的重鏈可變域(V<sub>H</sub>)。藉由使用過短而無法使同一鏈上兩個結構域之間配對的连接子，迫使該等結構域與另一鏈之互補結構域配對且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體更充分地描述於例如EP 404,097；WO 93/11161；及Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)中。

「全長抗體」為包含抗原結合可變區以及輕鏈恆定域(C<sub>L</sub>)及重鏈恆定域C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>及C<sub>H3</sub>之抗體。恆定域可為原生序列恆定域(例如人類原生序列恆定域)或其胺基酸序列變異體。在一個態樣中，全長抗體具有一或多種效應功能。

本文中之「胺基酸序列變異」抗體為具有不同於主要物種抗體之胺基酸序列的抗體。通常，胺基酸序列變異體將與主要物種抗體具有至少約70%、至少約80%、至少約85%、至少約90%或至少約95%同源性。胺基酸序列變異體在主要物種抗體之胺基酸序列內或鄰近於主要物種抗體之胺基酸序列的某些位置處具有取代、缺失及/或添加，但仍保持抗原結合活性。抗體之恆定區序列的變異對抗原結合活性之影響比可變區之變異小。在可變區中，胺基酸序列變異體將與主要物種抗體至少約90%同源、至少約95%同源、至少約97%同源、至少約98%同源或至少約99%同源。

「同源性」定義為在比對序列且(若必要)引入缺口以達成最大同源性百分比之後在胺基酸序列變異體中相同之殘基的百分比。用於比對之方法及電腦程式為此項技術中所熟知。

「治療性單株抗體」為用於治療人類個體之抗體。本文中所揭示之治療性單株抗體包括抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。

本文中之「糖基化變異」抗體為附接有不同於附接於主要物種抗體之一或多種碳水化合物部分之一或多種碳水化合物部分之抗體。本文中之糖基化變異體之實例包括有G1或G2寡醣結構而非G0寡醣結構附接於其Fc區之抗體，有一或兩種碳水化合物部分附接於其一或兩個輕鏈之抗體，無碳水化合物附接於抗體之一或兩個重鏈之抗體等，及糖基化變化之組合。

抗體「效應功能」係指可歸因於抗體之Fc區(原生序列Fc區或胺基酸

序列變異Fc區)之彼等生物活性。抗體效應功能之實例包括：C1q結合；補體依賴性細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體；BCR)之下調；及其類似功能。

視全長抗體之重鏈之恆定域的胺基酸序列而定，可將全長抗體分為不同「類別」。存在五種主要類別之全長抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等中之若干種可進一步細分為「子類」(同型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及IgA2。對應於抗體之不同類別的重鏈恆定域分別稱為 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 及 $\mu$ 。免疫球蛋白之不同類別之次單元結構及三維組態係熟知的。

來自任何脊椎動物物種之抗體之「輕鏈」可基於其恆定域之胺基酸序列指派為兩種明顯不同類型(稱為 $\kappa$ 及 $\lambda$ )中之一者。

「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」及「ADCC」係指細胞介導之反應，其中表現Fc受體(FcR)之非特異性細胞毒性細胞(例如自然殺手(Natural Killer, NK)細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)識別目標細胞上之結合抗體且隨後導致目標細胞溶解。用於介導ADCC之一次細胞(NK細胞)僅表現Fc $\gamma$ RIII，而單核細胞表現Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII及Fc $\gamma$ RIII。FcR在造血細胞上之表現概述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)第464頁上的表3中。為了評估相關分子之ADCC活性，可進行活體外ADCC分析，諸如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號中所述之分析。適用於該等分析之效應細胞包括外周血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，可例如在Clynes等人，*PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)中所揭示之動物模型中活體內評估相關分子之ADCC活性。

術語「Fc受體」或「FcR」用來描述結合至抗體之Fc區的受體。在一個態樣中，FcR為原生序列人類FcR。在另一態樣中，FcR為結合IgG抗體之受體( $\gamma$ 受體)且包括Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII及Fc $\gamma$ RIII子類之受體，包括此等受體之對偶基因變異體及交替剪接形式。Fc $\gamma$ RII受體包括Fc $\gamma$ RIIA(「活化受體」)及Fc $\gamma$ RIIB(「抑制受體」)，該等受體具有主要在其細胞質域中不同之類似胺基酸序列。活化受體Fc $\gamma$ RIIA在其細胞質域中含有免疫受體酪胺酸基活化基元(ITAM)。抑制受體Fc $\gamma$ RIIB在其細胞質域中含有免疫受體酪胺酸基抑制基元(ITIM)。(參見M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)中之綜述)。FcR於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)；Capel等人，*Immunomethods* 4:25-34 (1994)；及de Haas等人，*J. Lab. Clin. Med.* 126:33-41 (1995)中有綜述。本文中之術語「FcR」涵蓋其他FcR，包括將來待鑑別之FcR。該術語亦包括新生兒受體FcRn，其負責將母體IgG轉移至胎兒(Guyer等人，*J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人，*J. Immunol.* 24:249 (1994))。

術語「高變區」當在本文中使用时係指負責抗原結合之抗體的胺基酸殘基。高變區通常包含「互補決定區」或「CDR」之胺基酸殘基(例如輕鏈可變域中之殘基24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)，及重鏈可變域中之31-35(H1)、50-65(H2)及95-102(H3)；Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))及/或「高變環」之彼等殘基(例如輕鏈可變域之殘基26-32(L1)、50-52(L2)及91-96(L3)，及重鏈可變域之26-32(H1)、53-55(H2)及96-101(H3)；Chothia及Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。「構架區」或「FR」殘基為除如本文所

定義之高變區殘基外的彼等可變域殘基。可將高變區或其CDR自一個抗體鏈轉移至另一抗體鏈或至另一蛋白質以賦予所得(複合)抗體或結合蛋白以抗原結合特異性。

「人類化」形式之非人類(例如齧齒動物)抗體為含有衍生自非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。人類化抗體大部分為人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體之高變區的殘基經來自諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物之非人類物種(供體抗體)之高變區的具有所需特異性、親和力及容量之殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之構架區(FR)殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含未見於受體抗體或供體抗體中之殘基。進行此等修飾以進一步改良抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含實質上所有至少一個且通常兩個可變域，其中所有或實質上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環，且所有或實質上所有FR為人類免疫球蛋白序列之FR。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常為人類免疫球蛋白之恆定區之至少一部分。更多細節參見Jones等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。

「親和力成熟」抗體為與不具有變化之親本抗體相比，在其一或多個高變區中具有一或多個導致抗體對抗原之親和力改良之變化的抗體。在一個態樣中，親和力成熟抗體對目標抗原將具有奈莫耳或甚至皮莫耳親和力。藉由此項技術中已知之程序製備親和力成熟抗體。Marks等人，*Bio/Technology* 10:779-783 (1992)描述藉由VH及VL結構域改組實現之親和力成熟。CDR及/或構架殘基之無規突變誘發由以下描述：Barbas等

人，*Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994)；Schier等人，*Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton等人，*J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人，*J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)；及Hawkins等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

「經分離」抗體為已經鑑別且與其天然環境之組分分離及/或自其天然環境之組分中回收的抗體。在某些實施例中，抗體將：(1)經純化至如藉由勞立法(Lowry method)所測定大於95重量%蛋白質且或者大於99重量%；(2)經純化至足以藉由使用旋杯式序列分析儀獲得N端或內部胺基酸序列之至少15個殘基之程度；或(3)在還原或非還原條件下使用庫馬斯藍(Coomassie blue)或銀染色法藉由SDS-PAGE經純化至均質。經分離之抗體包括重組細胞內之原位抗體，這是因為抗體之天然環境之至少一種組分將不存在。然而，通常將藉由至少一個純化步驟來製備經分離抗體。

「治療」係指治療性治療及預防性(prophylactic或preventative)措施兩者。需要治療之人包括已患有疾病之人以及需要預防疾病或其復發之人。因此，本文中待治療之患者可能已診斷為患有疾病或可能易患疾病或對疾病易感。術語「患者」及「個體」在本文中可互換使用。

調配之抗體為實質上純的且宜為實質上均質的(亦即不含污染蛋白質等)。「實質上純的」抗體意謂包含以蛋白質之總重量計至少約90重量%、或者至少約95重量%或97重量%抗體的組合物。「實質上均質」抗體意謂包含蛋白質之組合物，其中以蛋白質之總重量計至少約99重量%蛋白質為特異性抗體，例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。

關於潰瘍性結腸炎個體的如本文所用之「臨床緩解」係指2或小於2個點之完全Mayo計分且沒有個別子計分大於1個點。克隆氏病「臨床緩

解」係指150個點或小於150個點之CDAI計分。

關於潰瘍性結腸炎個體的如本文所用之「臨床反應」係指3或大於3個點及自基線30%之完全Mayo計分(或若在隨訪時不進行完全Mayo計分,則為2或大於2個點及自基線25%或大於25%的部分Mayo計分)的降低,伴有1或大於1個點之直腸出血子計分或1個或小於1個點之絕對直腸出血計分的降低。關於克隆氏病個體的如本文所用之「臨床反應」係指CDAI計分自基線(0週)的70個點或大於70個點之降低。

關於潰瘍性結腸炎個體的如本文所用之「黏膜癒合」係指1個點或小於1個點之內窺鏡子計分。

如本文所用,「治療失敗」係指疾病惡化、需要急救藥物或手術介入來治療潰瘍性結腸炎或克隆氏病。急救藥物為任何新穎藥物或治療新型或未分型之潰瘍性結腸炎或克隆氏病症狀所需之基線藥物劑量的任何增加(除用於控制慢性腹瀉之止瀉藥以外)。

### 調配物

如本文所述,已發現抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體當與抗氧化劑或螯合劑一起調配時更穩定。另外,如本文所述,可調配抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體以減少聚集體形成(例如可減少調配物中的聚山梨醇酯80之量)。舉例而言,包含檸檬酸鹽或EDTA及抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之調配物在儲存期間降低抗體聚集體形成率。亦可在無氧氣的情況下儲存調配物以減少聚集體形成。在一個實施例中,調配物在25°C下12個月之後具有小於約2.5%之抗體聚集體形成。在一個實施例中,調配物在25°C下12個月之後具有小於約2.0%之抗體聚集體形成。在一個實施例中,調配物在25°C下12個月之後具有小於約1.6%之抗體聚集體形成。在一個實施例中,調配物在25°C下12個月之後具有小於約1.3%

之抗體聚集體形成。在一個實施例中，調配物在25°C下12個月之後具有小於約1.0%之抗體聚集體形成。在另一實施例中，調配物在5°C下12個月之後具有小於約0.5%之抗體聚集體形成。在另一實施例中，調配物在5°C下12個月之後具有小於約0.3%之抗體聚集體形成。

在第一態樣中，本發明提供一種穩定的抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物。調配物包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體及抗氧化劑或螯合劑。調配物亦包含可為一或多種游離胺基酸之緩衝劑。調配物可視情況進一步包含界面活性劑。調配物中之抗體可為全長抗體或其抗原結合片段(諸如Fab、Fv、scFv、Fab'或F(ab')<sub>2</sub>片段)。

可藉由自調配物移除氧氣減少聚集體形成。或者，調配物可含有抗氧化劑或螯合劑。在一個態樣中，可包括於調配物中之例示性抗氧化劑及螯合劑包括硫辛酸、尿酸、麩胱甘肽、生育酚、胡蘿蔔素、番茄紅素、半胱胺酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)、二巖基丙醇、二伸乙三胺五乙酸及N,N-雙(羧甲基)甘胺酸、磷酸酯化合物(例如依替磷酸)、去鐵胺、蘋果酸鹽及檸檬酸鹽。一些抗氧化劑及螯合劑可在調配物儲存期間降低聚集體形成率。在另一態樣中，螯合劑及/或抗氧化劑為檸檬酸鹽或EDTA。液體調配物之例示性螯合劑濃度在大致大於0 mM至約60 mM、約5 mM至約50 mM、約5 mM至約15 mM、約10 mM至約25 mM及約20 mM至約30 mM範圍內。在另一態樣中，螯合劑濃度為約0 mM至約30 mM。在一個實施例中，螯合劑及/或抗氧化劑為檸檬酸鹽，且檸檬酸鹽濃度為約0 mM至約15 mM、約0 mM至約10 mM或約0 mM至約5 mM。

調配物可含有任何一種所要游離胺基酸，其可呈L形式、D形式或此

等形式之任何所要混合物。在一個態樣中，可包括於調配物中之游離胺基酸包括例如組胺酸、丙胺酸、精胺酸、甘胺酸、麩胺酸、絲胺酸、離胺酸、色胺酸、纈胺酸、半胱胺酸及其組合。一些胺基酸可例如經由氫鍵、鹽橋、抗氧化性質或疏水性相互作用或藉由自蛋白質表面排阻在製造、乾燥、凍乾及/或儲存期間穩定化蛋白質免於降解。胺基酸可充當張力調節劑或可用來降低調配物之黏度。在另一態樣中，游離胺基酸(諸如組胺酸及精胺酸)可充當凍乾保護劑，且當凍乾為調配物之組分時不結晶。單獨或呈組合形式之游離胺基酸(諸如麩胺酸及組胺酸)可充當在5至7.5之pH值範圍內之水溶液中的緩衝劑。在另一態樣中，調配物含有組胺酸、精胺酸或組胺酸與精胺酸之組合。在另一態樣中，液體調配物之游離胺基酸濃度在約9 mM至約0.5 M範圍內，例如為約10 mM至約90 mM、約10 mM至約75 mM、約10 mM至約40 mM、約25 mM至約50 mM、約15 mM至約300 mM、約20 mM至約200 mM、約25 mM至約150 mM、約50 mM至約75 mM、約50 mM至約120 mM、約50 mM至約150 mM或約50 mM或約125 mM。

調配物可視情況進一步含有至少一種界面活性劑，例如用來控制可溶性及不溶性聚集體形成。在一個態樣中，界面活性劑為非離子界面活性劑。在另一態樣中，界面活性劑為離子型界面活性劑。可包括於調配物中之例示性界面活性劑包括例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆(泊洛尼克®)及其組合。當存在時，界面活性劑通常以減少在聚矽氧、填充小瓶、預填充注射器及/或藥筒存在下例如在裝瓶、冷凍、乾燥、凍乾及/或復原期間抗體之不溶性聚集體形成之量包括在內。界面活性劑濃度通常為約0.0001%至約1.0%、約0.01%至約0.5%，例如為約0.05%、

0.1%、0.15%、0.20%、0.3%、0.4%或0.5%(w/v)。較高濃度之界面活性劑(例如聚山梨醇酯80)可導致更多SEC聚集體形成。降低聚山梨醇酯80之濃度可減少在儲存時SEC聚集體之形成。在一個態樣中，界面活性劑:抗體莫耳比為約0.7:1至約2.0:1。在另一態樣中，界面活性劑:抗體莫耳比為1.5:1。

抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之實施例含有高濃度之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。舉例而言，在一個實施例中，液體調配物可包含至少約60 mg/ml、至少約70 mg/ml、至少約80 mg/ml、至少約90 mg/ml、至少約100 mg/ml、至少約110 mg/ml、至少約120 mg/ml、至少約130 mg/ml、至少約140 mg/ml、至少約150 mg/ml、至少約160 mg/ml、至少約170 mg/ml、至少約180 mg/ml、至少約190 mg/ml、至少約200 mg/ml、至少約250 mg/ml、至少約300 mg/ml、約60 mg/ml至約190 mg/ml、約60 mg/ml至約170 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體，約150 mg/ml至約180 mg/ml或約160 mg/ml或約165 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。或者，在另一態樣中，液體調配物可包含至少約154 mg/ml、至少約176 mg/ml。

調配物可為液體或固體。液體調配物為在適合水性溶劑(諸如水)或水性/有機混合物(諸如水醇混合物)中製備之水溶液或懸浮液。液體調配物之pH值介於約5.5與約7.5之間、約6.0與7.3之間、約6.0與約7.0之間、約6.0與6.5之間、約6.0與6.3之間、約6.3與7.1之間或約6.4與7.0之間或6.3與6.8之間，諸如為約6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8或6.9。液體調配物可保持於室溫下、冷藏(例如2°C至8°C)或冷凍(例如-20°C或-70°C)儲存。

固體調配物可例如在添加凍乾保護劑情況下以任何適合方法製備且

可呈例如餅或粉末形式。在一個態樣中，藉由乾燥如本文所述之液體調配物(例如藉由凍乾或噴霧乾燥)來製備固體調配物。當調配物為固體調配物時，調配物之水分含量可不超過約5%、不超過約4.5%、不超過約4%、不超過約3.5%、不超過約3%、不超過約2.5%、不超過約2%、不超過約1.5%、不超過約1%，或為實質上無水的。可將固體調配物溶解(亦即復原)於適合介質或溶劑中以變為適用於投與之液體。用於復原固體調配物之適合溶劑包括水、等張生理食鹽水、緩衝劑(例如磷酸鹽緩衝生理食鹽水)、林格氏(Ringer's)(乳酸鹽或右旋糖)溶液、最低必需培養基、醇/水性溶液、右旋糖溶液等。溶劑之量可導致治療性蛋白質濃度與乾燥前之濃度相比更高、相同或更低。在另一態樣中，復原之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體濃度與乾燥前液體調配物之濃度相同。

調配物可為無菌的，且此可在製備調配物之前或之後根據熟習此項技術者已知用於產生適用於向人類個體投與之無菌醫藥調配物的程序來達成。調配物可藉由經由小孔隙過濾、經由無菌處理或藉由暴露於紫外輻射以液體(例如在乾燥之前及/或復原之後)形式來滅菌。過濾器孔隙尺寸可為0.1  $\mu\text{m}$ 或0.2  $\mu\text{m}$ 以過濾微生物或為10 nm至20 nm以過濾病毒顆粒。或者或另外，乾燥調配物可例如藉由暴露於 $\gamma$ 輻射來滅菌。在一個態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體液體調配物係藉由在乾燥之前過濾來滅菌。

在一個態樣中，調配物在儲存時為穩定的。各種穩定性分析可為熟練技藝者所用來證實調配物之穩定性。舉例而言，液體調配物中之抗體當儲存於約25°C下時可穩定至少約4週、至少約2個月、至少約3個月或至少約6個月或至少約9個月或至少約12個月；在約2°C至8°C下穩定至少約3個月、至少約1年、至少約2年、至少約3年或更長時間。或者或另外，調配

物中之抗體當儲存於約15°C下時可穩定至少約4週、至少約3個月、至少約6個月、至少約9個月、至少約1年或更長時間。或者或另外，調配物中之抗體當儲存於約-20°C或-70°C下時可穩定至少約4週、至少約3個月、至少約6個月、至少約9個月、至少約1年、至少約2年、至少約3年、至少約4年或更長時間。

可藉由評估調配物中之抗體在調配時以及在指示溫度下儲存之後的物理穩定性、化學穩定性及/或生物活性來測試穩定性。可以多種不同法定性及/或定量評估液體調配物或復原乾燥粉末之物理及/或化學穩定性(參見例如 *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*, Rodriguez-Diaz等人編, Informa Healthcare (2005)), 包括評估可溶性及不溶性聚集體形成(例如使用尺寸排阻層析法、分析超速離心、MALDI-TOF MS、光散射(動態(DLS)或MALLS)、基於流動之顯微鏡成像或其他液體顆粒計數系統、藉由量測混濁度、藉由密度梯度離心及/或藉由目視檢查); 藉由使用陽離子交換層析(亦參見 Vlasak及 Ionescu, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:468-481 (2008)及 Harris等人, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 752:233-245 (2001))、等電聚焦或毛細管帶電泳評估電荷非均勻性; 胺基端或羧基端序列分析; 質譜分析; SDS-PAGE分析以比較片段化、完整及多聚(亦即二聚、三聚等)抗體; 肽圖(例如胰蛋白酶或LYS-及其類似物)。不穩定性可導致聚集、脫醯胺(例如Asn脫醯胺)、氧化(例如Met氧化)、異構化(例如Asp異構化)、變性、剪短/水解/片段化(例如鉸鏈區片段化)、丁二醯亞胺形成、不成對半胱胺酸、N端延長、C端加工、糖基化差異等。可使用熟練技藝者可用之多種技術來評估生物活性或抗原結合功能(例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體與MAdCAM(例如MAdCAM-1)之結合或抑制表

現  $\alpha 4\beta 7$  整合素之細胞與 MAdCAM(例如 MAdCAM-1)(例如固定 MAdCAM(例如 MAdCAM-1))之結合)(參見例如 Soler 等人, *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 330:864-875 (2009))。量測乾燥調配物之水分含量可指示調配物有多大可能經受化學或物理降解,水分含量愈高,降解愈多。

穩定調配物可促成抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體之低免疫原性。免疫原性抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體可導致人類個體或患者之人類-抗-人類抗體(HAHA)反應。對於抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體顯現HAHA反應之患者在治療時可具有不利事件(例如位點輸注反應)或可快速消除抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體,導致劑量比治療所計劃的低。抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體治療之早期研究之報導(Feagen等人(2005) *N. Engl. J. Med.* 352:2499-2507)指示人類抗人類抗體截至第8週時在44%治療患者中出現。此研究中之抗體係以液體形式儲存且不含任何聚山梨醇酯。

在一些實施例中,與不太穩定調配物之HAHA結果相比,調配物可將HAHA陰性患者之比例增至至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%之患者。

在一些實施例中,抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體調配物具有 $\geq 50\%$ 主要帶電同功異型物、 $\geq 55\%$ 主要帶電同功異型物或65%至70%主要帶電同功異型物。在其他態樣中,穩定抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體調配物具有 $\leq 45\%$ 酸性帶電同功異型物、 $\leq 40\%$ 酸性帶電同功異型物、 $\leq 30\%$ 酸性帶電同功異型物或22%至28%酸性同功異型物。在其他態樣中,穩定抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體調配物具有 $\leq 25\%$ 鹼性同功異型物、 $\leq 20\%$ 鹼性同功異型物、 $\leq 15\%$ 鹼性同功異型物、約5%鹼性同功異型物或約10%鹼性同功異型物。在一個態樣中,例如如藉由CEX所測定,穩定抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體調配物具有 $\geq 55\%$ 主要同功異型物、 $\leq 30\%$ 酸性同功

異型物及/或 $\leq 20\%$ 鹼性同功異型物。在另一態樣中，例如如藉由cIEF所測定，穩定抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有 $\geq 50\%$ 主要同功異型物、 $\leq 45\%$ 酸性同功異型物及/或 $< 10\%$ 鹼性同功異型物。

在一些態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體乾燥固體調配物具有 $\leq 10\%$ 水分含量、 $\leq 5\%$ 水分含量或 $< 2.5\%$ 水分含量。復原所需時間為 $\leq 60$ 分鐘、 $\leq 50$ 分鐘或 $\leq 40$ 分鐘或 $\leq 30$ 分鐘或 $\leq 20$ 分鐘。

可藉由SEC、分析超速離心、光散射(DLS或MALLS)、MALDI-TOF MS或奈米尺寸量測(諸如奈米粒子徑跡分析，NTA, NanoSight Ltd, Wiltshire, UK)來量測液體調配物或復原調配物中之單體含量及/或聚集體含量(例如二聚體、三聚體、四聚體、五聚體、寡聚物及更高級聚集體)。可以許多方法達成聚集體之解析、示性及定量，該等方法包括例如藉由更長管柱或藉由連續附接第二或更多SEC管柱與初始分析SEC管柱成直線來增加SEC管柱分離之長度；用光散射或藉由使用NTA來補充單體之SEC定量。

在一個實施例中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有 $\geq 90\%$ 單體抗體、 $\geq 95\%$ 單體抗體或 $97\%$ 至 $99\%$ 單體抗體。在另一實施例中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物中之大部分物質之平均半徑 $\leq 20$  nm、 $\leq 15$  nm、 $\leq 10$  nm，或為約 $5$  nm至約 $7$  nm。在一個態樣中，藉由蛋白質分析，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有 $\geq 80\%$ 量之重鏈加輕鏈。在一個態樣中，存在 $\geq 90\%$ 重鏈加輕鏈。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有 $\leq 10\%$ 聚集體、 $\leq 5\%$ 聚集體、 $\leq 2.5\%$ 聚集體、 $\leq 1.5\%$ 聚集體、 $\leq 1.0\%$ 聚集體或 $\leq 0.5\%$ 聚集體。在另一態樣中，穩定抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有 $\geq 96\%$ 單體及/或 $\leq 2.5\%$ 聚集體。在另一態樣中，穩定抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有約 $99\%$ 單體及/或約 $< 1\%$ 聚集體。

可藉由光遮蔽(例如Hach Ultra Analytics(Grants Pass, OR)之液體顆粒計數系統(HIAC))、顯微法、庫爾特計數器或基於數位(例如基於流動之)顯微鏡成像系統(諸如Brightwell(Ottawa, CA)之微流體(microfluidics)成像(MFI)或Fluid Imaging Technologies(Yarmouth, ME)之FLOWCAM® Image顆粒分析儀)來量測液體調配物或復原調配物中之(例如)聚集體或不溶性賦形劑之粒度(大於1微米至2微米)。在一個態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體製劑之粒度為約30  $\mu\text{m}$ 、約25  $\mu\text{m}$ 、約10  $\mu\text{m}$ 、約5  $\mu\text{m}$ 、約2  $\mu\text{m}$ 或1  $\mu\text{m}$ 或小於1  $\mu\text{m}$ 。應將抗體調配物中之顆粒之量減至最少。在一個態樣中，在一個劑量中抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物中的顆粒之量為<6000個顆粒 $\geq 10 \mu\text{m}$ 直徑及/或<600個顆粒 $\geq 25 \mu\text{m}$ 直徑(美國藥典(U.S. Pharmacopoeia)第788章，光遮蔽計數法；一半彼等量藉由顯微鏡定量法測定)。在另一態樣中，在一個劑量抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物中，顆粒之量為約1000個顆粒 $\geq 10 \mu\text{m}$ 及約0至100個顆粒 $\geq 25 \mu\text{m}$ (MFI方法)。在另一態樣中，例如藉由MFI量測，在一個劑量抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物中，每毫升顆粒之量為每毫升約500個至約2000個2  $\mu\text{m}$ 至10  $\mu\text{m}$ 顆粒、每毫升約50個至約350個 $\geq 10 \mu\text{m}$ 顆粒及每毫升約0至約50個 $\geq 25 \mu\text{m}$ 顆粒。在另一態樣中，在一個劑量抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物中，顆粒之量為每毫升約500個至約100,000個、約1000個至約5000個或約1500個至約3000個2  $\mu\text{m}$ 至10  $\mu\text{m}$ 顆粒。

可控制抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之黏度用於皮下或肌內投與。黏度可受蛋白質濃度及pH值的影響。舉例而言，隨著蛋白質濃度升高，黏度可提高。pH值升高可使抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之黏度降低。在一些蛋白質調配物中，添加氯化鈉以降低調配物之黏度。可影響抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之黏度的其他組分為胺基酸，諸如組胺酸及精胺酸。

抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物可為等張(例如250 mOsm至350 mOsm)或高張的(例如大於350 mOsm、大於450 mOsm、大於550 mOsm或大於650 mOsm)，例如以供皮下或肌內投與。在一個態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物不為低張的(例如小於250 mOsm)。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物為約350 mOsm至約400 mOsm、約400 mOsm至約450 mOsm或約350 mOsm至約450 mOsm。

導致變性之不穩定性可藉由差示掃描熱量測定(DSC)來評估。在DSC中抗體具有兩個熔融溫度( $T_m$ )，例如 $T_{m1}$ 及 $T_{m2}$ 。某些賦形劑可影響原生抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之穩定性。關於當藉由DSC比較調配物時熔融溫度較高之發現可表明， $T_m$ 愈高，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物愈穩定。舉例而言，在pH 5.7下，與在pH 6.5下相比，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之 $T_m$ 更低，且因此不太穩定。在一個態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之 $T_{m1} > 60^\circ\text{C}$ 。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之 $T_{m1}$ 為約 $65^\circ\text{C}$ 至約 $70^\circ\text{C}$ 或約 $69^\circ\text{C}$ 。在一個態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之 $T_{m2} > 80^\circ\text{C}$ 。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之 $T_{m2}$ 為約 $82^\circ\text{C}$ 至約 $88^\circ\text{C}$ 或約 $86^\circ\text{C}$ 。

在一個實施例中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之結合親和力或 $EC_{50}$ 值為參考標準抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體的約60%至約140%。在一個態樣中，本文所述之調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體以參考標準之約80%至約120%之值結合至例如於細胞上之 $\alpha 4\beta 7$ (WO 98/06248或美國專利第7,147,851號)。在另一實施例中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有抑制表現 $\alpha 4\beta 7$ 整合素之細胞與MAdCAM(例如MAdCAM-1)(例如MAdCAM-Ig嵌合體)之結合至少50%或至少60%的能力(參見美國專利申請公開案第20070122404號，亦參考標準實例)。

如上所述，在本文中尤其涵蓋調配物之冷凍。因此，可測試調配物

在冷凍及解凍時之穩定性。因此，液體調配物中之抗體在冷凍及解凍調配物時可為穩定的，例如抗體在一個、兩個、三個、四個、五個或五個以上冷凍/解凍循環之後可為穩定的。

在一些實施例中，醫藥調配物為包含至少約60 mg/ml至約170 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、緩衝劑(例如組胺酸)及至少約5 mM檸檬酸鹽之液體調配物。在其他實施例中，調配物為包含至少約60 mg/ml至約170 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、緩衝劑(例如檸檬酸鹽)、胺基酸(例如精胺酸)及界面活性劑(例如聚山梨醇酯80)之液體調配物。

在另一實施例中，調配物包含至少約140 mg/ml或約150 mg/ml至約170 mg/ml(例如約160 mg/ml)抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、緩衝劑(例如組胺酸)、至少約5 mM檸檬酸鹽及游離胺基酸(例如精胺酸)。

在另一實施例中，調配物包含至少約160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、緩衝劑(例如組胺酸)、至少約5 mM檸檬酸鹽、0.2%聚山梨醇酯80及游離胺基酸(例如精胺酸)。在一實施例中，調配物中之緩衝劑濃度為約15 mM至約75 mM、約25 mM至約65 mM或為約50 mM。調配物中之游離胺基酸濃度為約50 mM至約250 mM、約75 mM至約200 mM、約100 mM至約150 mM或為約125 mM；調配物中之聚山梨醇酯80濃度為約0.05%至0.4%、約0.1%至0.4%、約0.1%至0.3%、約0.1%至0.25%、約0.1%至0.2%或為約0.2%。

在一些實施例中，調配物為固體調配物(例如凍乾調配物)，其包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、檸檬酸鹽、組胺酸、精胺酸、聚山梨醇酯80及凍乾保護劑或醣(諸如非還原糖)之混合物。醣可以達到0%至20%或約6%至約10%之濃度包括於液體調配物中。

在一個實施例中，調配物經凍乾且以單次劑量形式儲存於一個容器(例如小瓶、注射器、藥筒及/或自動注射器)中。容器可儲存於約2°C至8°C或25°C下直至將其向有需要之個體投與。小瓶可例如為5 cc、10 cc或20 cc小瓶(例如用於160 mg/ml劑量)。小瓶可含有至少約20 mg、至少約50 mg、至少約70 mg、至少約80 mg、至少約100 mg、至少約120 mg、至少約155 mg、至少約180 mg、至少約200 mg、至少約240 mg、至少約300 mg、至少約360 mg、至少約400 mg、至少約540 mg或至少約900 mg抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在一個態樣中，容器含有約165 mg抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。

在另一實施例中，調配物為液體且以單次劑量形式儲存於一或兩個小瓶、藥筒、注射器或自動注射器中。小瓶、藥筒、注射器或自動注射器可儲存於約2°C至8°C下直至將其內含物(例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體)向有需要之個體投與。小瓶可例如為5 cc、10 cc或20 cc小瓶(例如用於160 mg/ml劑量)。小瓶可含有至少約20 mg、至少約50 mg、至少約70 mg、至少約80 mg、至少約100 mg、至少約120 mg、至少約155 mg、至少約180 mg、至少約200 mg、至少約240 mg、至少約300 mg、至少約360 mg、至少約400 mg、至少約540 mg或至少約900 mg抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在一個態樣中，小瓶含有約165 mg抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。注射器或藥筒可為1 mL或2 mL容器(例如用於160 mg/mL劑量)或大於2 mL例如用於較高劑量(至少320 mg或400 mg或更高)。注射器或藥筒可含有至少約20 mg、至少約50 mg、至少約70 mg、至少約80 mg、至少約100 mg、至少約120 mg、至少約155 mg、至少約180 mg、至少約200 mg、至少約240 mg、至少約300 mg、至少約360 mg、至少約400 mg或至少約500 mg抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。

一或多種其他醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(諸如

*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*，第 21 版，Hendrickson, R. 編(2005)中所述者)可包括於調配物中，只要其不會不利地影響調配物之所要特徵即可。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對受體無毒且包括：其他緩衝劑；共溶劑；抗氧化劑，包括檸檬酸鹽及半胱胺酸；螯合劑，諸如EDTA；金屬複合物(例如Zn-蛋白質複合物)；生物可降解聚合物，諸如聚酯；防腐劑；出於注射便利之容器壁潤滑劑，例如聚矽氧、礦物油、甘油或TRIBOGLIDE®(Tribolene Film Research, Inc.)全氟聚醚衍生物；及/或成鹽相對離子，諸如鈉。

### **$\alpha 4\beta 7$ 抗體**

適用於調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體包括來自任何所要來源之抗體，諸如全人類抗體、鼠類抗體、兔抗體及其類似抗體；及任何所要工程改造抗體，諸如嵌合抗體、人類化抗體及其類似抗體。此等類型抗體任一者之抗原結合片段(諸如Fab、Fv、scFv、Fab'及F(ab')<sub>2</sub>片段)亦適用於調配物中。

抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體可結合至 $\alpha 4$ 鏈(例如人類化MAb 21.6(Bendig等人，美國專利第5,840,299號))、 $\beta 7$ 鏈(例如FIB504或人類化衍生物(例如Fong等人，美國專利第7,528,236號))上之抗原決定基，或結合至由 $\alpha 4$ 鏈與 $\beta 7$ 鏈締合所形成之組合抗原決定基。在一個態樣中，抗體結合 $\alpha 4\beta 7$ 複合物上之組合抗原決定基，但不結合 $\alpha 4$ 鏈或 $\beta 7$ 鏈上之抗原決定基，除非該等鏈彼此締合。 $\alpha 4$ 整合素與 $\beta 7$ 整合素之締合可例如藉由引入至存在於兩個鏈(其一起構成抗原決定基)上之近接殘基中或藉由構形暴露一個鏈(例如 $\alpha 4$ 整合素鏈或 $\beta 7$ 整合素鏈)上之抗原決定基結合位點(其在不存在適當整合素搭配物或不存在整合素活化的情況下難以達成抗體結合)來製造組合抗原

決定基。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體結合 $\alpha 4$ 整合素鏈及 $\beta 7$ 整合素鏈兩者，且因此對於 $\alpha 4\beta 7$ 整合素複合物具有特異性。該等抗體可例如結合 $\alpha 4\beta 7$ 但不結合 $\alpha 4\beta 1$ 且/或不結合 $\alpha E\beta 7$ 。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體結合至與Act-1抗體相同或實質上相同之抗原決定基(Lazarovits, A. I.等人，*J. Immunol.*, 133(4): 1857-1862 (1984)；Schweighoffer等人，*J. Immunol.*, 151(2): 717-729, 1993；Bednarczyk等人，*J. Biol. Chem.*, 269(11): 8348-8354, 1994)。產生鼠類Act-1單株抗體之鼠類ACT-1融合瘤細胞株係根據2001年8月22日之布達佩斯條約(Budapest Treaty)之規定代表Millennium Pharmaceuticals, Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, Mass. 02139, U.S.A.以寄存編號PTA-3663存放於美國菌種保存中心(American Type Culture Collection), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, U.S.A.。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體為使用美國專利申請公開案第2010/0254975號中提供之CDR之人類抗體或 $\alpha 4\beta 7$ 結合蛋白。

在一個態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與其一或多個配位體(例如黏膜定址素(例如MAdCAM(例如MAdCAM-1))、纖維結合蛋白及/或血管定址素(VCAM))之結合。靈長類動物MAdCAM(例如MAdCAM-1)描述於PCT公開案WO 96/24673中，該案之全部教示係以引用的方式併入本文中。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM(例如MAdCAM-1)及/或纖維結合蛋白之結合而不抑制與VCAM之結合。

在一個態樣中，適用於調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體為小鼠Act-1抗體之人類化型式。適用於製備人類化抗體之方法在此項技術中熟知。一般而言，人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體將含有包含小鼠Act-1抗體之3個重鏈互補決定區

(CDR, CDR1, SEQ ID NO:8、CDR2, SEQ ID NO:9及CDR3, SEQ ID NO:10)及適合人類重鏈構架區之重鏈；且亦含有包含小鼠Act-1抗體之3個輕鏈CDR(CDR1, SEQ ID NO:11、CDR2, SEQ ID NO:12及CDR3, SEQ ID NO:13)及適合人類輕鏈構架區之輕鏈。人類化Act-1抗體可含有具有或不具有胺基酸取代之任何適合人類構架區(包括共同構架區)。舉例而言，構架胺基酸中之一或多者可經另一胺基酸(諸如小鼠Act-1抗體之相應位置處之胺基酸)置換。若存在，則人類恆定區或其部分可衍生自人類抗體(包括對偶基因變異體)之 $\kappa$ 或 $\lambda$ 輕鏈及/或 $\gamma$ (例如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ )、 $\mu$ 、 $\alpha$ (例如 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ )、 $\delta$ 或 $\epsilon$ 重鏈。可選擇特定恆定區(例如IgG1)、其變異體或部分以調整效應功能。舉例而言，可將突變恆定區(變異體)併入融合蛋白中以使與Fc受體之結合及/或固定補體之能力減至最小(參見例如Winter等人，GB 2,209,757 B；Morrison等人，WO 89/07142；Morgan等人，WO 94/29351, 1994年12月22日)。Act-1抗體之人類化型式描述於PCT公開案第WO 98/06248號及第WO 07/61679號中，其每一者之全部教示係以引用的方式併入本文中。

在另一態樣中，適用於調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 人類化抗體包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸20至140之重鏈可變區；及包含SEQ ID NO:4之胺基酸20至131或SEQ ID NO:5之胺基酸21至132的輕鏈可變區。若需要，則可存在適合人類恆定區。舉例而言，人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體可包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸20至470之重鏈及包含SEQ ID NO:5之胺基酸21至239之輕鏈。在另一實例中，人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體可包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸20至470之重鏈及包含SEQ ID NO:4之胺基酸20至238之輕鏈。圖4展示比較人類抗體與鼠類抗體之同屬輕鏈的比對。該比對說明有兩個小鼠殘基

轉換為人類殘基之維多珠單抗(例如化學文摘社(Chemical Abstract Service, CAS, 美國化學學會(American Chemical Society))登記編號 943609-66-3)之人類化輕鏈比LDP-02之輕鏈(圖3)更人類。另外, LDP-02 具有輕微疏水性、可撓性丙胺酸114及親水性位點(天冬胺酸115), 其在維多珠單抗中置換為輕微親水性的含羥基蘇胺酸114及疏水性的可能面向內纈胺酸115殘基。

抗體序列之其他取代可為例如重鏈及輕鏈構架區之突變, 諸如SEQ ID NO:14之殘基2上之異白胺酸突變為纈胺酸; SEQ ID NO:14之殘基4上之甲硫胺酸突變為纈胺酸; SEQ ID NO:15之殘基24上之丙胺酸突變為甘胺酸; SEQ ID NO:15之殘基38處之精胺酸突變為離胺酸; SEQ ID NO:15之殘基40處之丙胺酸突變為精胺酸; SEQ ID NO:15之殘基48上之甲硫胺酸突變為異白胺酸; SEQ ID NO:15之殘基69上之異白胺酸突變為白胺酸; SEQ ID NO:15之殘基71上之精胺酸突變為纈胺酸; SEQ ID NO:15之殘基73上之蘇胺酸突變為異白胺酸; 或其任何組合; 及用小鼠 Act-1 抗體之CDR(CDR1, SEQ ID NO:8、CDR2, SEQ ID NO:9及CDR3, SEQ ID NO:10)置換重鏈CDR; 及用小鼠 Act-1 抗體之輕鏈CDR(CDR1, SEQ ID NO:11、CDR2, SEQ ID NO:12及CDR3, SEQ ID NO:13)置換輕鏈CDR。

在一些實施例中, 適用於調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 人類化抗體包含相對於SEQ ID NO:2之胺基酸20至140具有約95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之重鏈可變區, 及相對於SEQ ID NO:4之胺基酸20至131或SEQ ID NO:5之胺基酸21至132具有約95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之輕鏈可變區。可使用預設參數使用適合序列比對演算法(諸如

Lasergene 系統(DNASTAR, Inc., Madison, Wis))測定胺基酸序列一致性。在一個實施例中，適用於調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體為維多珠單抗(CAS，美國化學學會，登記編號943609-66-3)。

其他 $\alpha 4\beta 7$ 抗體亦可用於本文所述之調配物及給藥方案中。舉例而言，全文以引用的方式併入本文中之US 2010/ 0254975 (Amgen, Inc.)中所述之 $\alpha 4\beta 7$ 抗體適用於治療個體之發炎性腸病之調配物及方法中。

抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體可藉由在活細胞(例如培養中之細胞)中表現編碼各鏈之核酸序列而產生。可使用多種宿主-表現載體系統來表現本發明之抗體分子。該等宿主-表現系統表示藉此相關編碼序列可產生且隨後純化之媒劑，但亦表示當用適當核苷酸編碼序列轉型或轉染時可原位表現抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之細胞。其包括(但不限於)微生物，諸如用含有抗體編碼序列之重組噬菌體DNA、質體DNA或黏質體DNA表現載體轉型之細菌(例如大腸桿菌(*E. coli*)、枯草桿菌(*B. subtilis*))；用含有抗體編碼序列之重組酵母表現載體轉型之酵母(例如酵母(*Saccharomyces*)、畢赤酵母(*Pichia*))；用含有抗體編碼序列之重組病毒表現載體(例如桿狀病毒)感染之昆蟲細胞系統；用重組病毒表現載體(例如花椰菜嵌紋病毒CaMV、菸草嵌紋病毒TMV)感染或用含有抗體編碼序列之重組質體表現載體(例如Ti質體)轉型之植物細胞系統；或具有含有源自哺乳動物細胞之基因組(例如金屬硫蛋白啟動子)或哺乳動物病毒(例如腺病毒晚期啟動子、痘瘡病毒7.5K啟動子)之啟動子之重組表現構築體的哺乳動物細胞系統(例如COS、CHO、BHK、293、3T3、NS0細胞)。舉例而言，與載體(諸如來自人類巨大細胞病毒之主要中間早期基因啟動子元件)結合之哺乳動物細胞(諸如中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell, CHO))為抗體之有效表現系統(Foecking等

人，*Gene* 45:101 (1986)；Cockett等人，*Bio/Technology* 8:2 (1990))。

在細菌系統中，許多表現載體宜視所表現之抗體分子之預期用途來選擇。舉例而言，當欲製備大量該種蛋白質時，為了產生抗體分子之醫藥組合物，可需要指導表現高含量之易於純化之融合蛋白產物的載體。該等載體包括(但不限於)大腸桿菌表現載體pUR278(Ruther等人，*EMBO J.* 2:1791 (1983))，其中抗體編碼序列可單獨接合至與lac Z編碼區同框之載體中，以便製備融合蛋白；pIN載體(Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985)；Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989))；及其類似載體。pGEX載體亦可用來與麩胱甘肽S-轉移酶(GST)一起表現呈融合蛋白形式之外來多肽。一般而言，該等融合蛋白為可溶性的，且易於藉由吸附且結合至基質麩胱甘肽-瓊脂糖珠粒隨後在游離麩胱甘肽存在下溶離而自溶解細胞中純化。pGEX載體經設計以包括凝血酶或因子Xa蛋白酶裂解位點以便可自GST部分釋放選殖目標基因產物。

在昆蟲系統中，使用加洲苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*，AcNPV)作為表現外來基因之載體。病毒生長於草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞中。可將抗體編碼序列單獨選殖至病毒之非必需區(例如多角體蛋白基因)中且置於AcNPV啟動子(例如多角體蛋白啟動子)之控制下。

在哺乳動物宿主細胞中，可使用許多基於病毒之表現系統。在使用腺病毒作為表現載體之情況下，相關抗體編碼序列可接合至腺病毒轉錄/轉譯控制複合物(例如晚期啟動子及三聯前導序列)。隨後可藉由活體外或活體內重組將此嵌合基因插入腺病毒基因組中。插入病毒基因組之非必需

區(例如區E1或E3)中將產生活的且能夠在受感染宿主中表現抗體分子之重組病毒(例如參見Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359 (1984))。亦可需要特異性起始信號來有效轉譯插入之抗體編碼序列。此等信號包括ATG起始密碼子及鄰近序列。此外，起始密碼子必須與所要編碼序列之閱讀框架同相以確保轉譯全部插入物。此等外生轉譯控制信號及起始密碼子可具有多種來源，天然及合成皆可。可藉由納入適當轉錄增強子元件、轉錄終止子等來提高表現效率(參見Bittner等人, *Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987))。

另外，可選擇調節插入序列之表現或以所要特定方式修飾並加工基因產物的宿主細胞品系。對蛋白質產物之該等修飾(例如糖基化)及加工(例如裂解)對蛋白質功能很重要。不同宿主細胞在蛋白質及基因產物之轉譯後加工及修飾中具有特徵化及特定機制。可選擇適當細胞株或宿主系統以確保所表現之外來蛋白質的恰當修飾及加工。為此目的，可使用具有用於適當加工初級轉錄物、糖基化且磷酸化基因產物之細胞機構的真核宿主細胞。該等哺乳動物宿主細胞包括(但不限於)中國倉鼠卵巢(CHO)、NS0、HeLa、VERY、幼倉鼠腎(BHK)、猴腎(COS)、MDCK、293、3T3、WI38、人類肝細胞癌細胞(例如Hep G2)、乳癌細胞株(諸如BT483、Hs578T、HTB2、BT20及T47D)及正常乳腺細胞株(諸如CRL7030及Hs578Bst)。

不同細胞類型之糖基化機構可產生具有與另一細胞類型不同之糖基化組成或沒有糖基化(如在細菌細胞之情況下)的抗體。在一個態樣中，用於產生抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之細胞類型為哺乳動物細胞，諸如NS0或CHO細胞。在一個態樣中，哺乳動物細胞可包含與細胞代謝有關之酶之缺失，且相關

外生基因可例如在構築體或載體中藉由轉型或轉染可操作地連接於置換酶以引入至細胞中。具有外生基因之構築體或載體賦予構築體或載體之宿主細胞以選擇優勢，從而促進產生由外生基因編碼之多肽。在一個實施例中，CHO細胞為DG44細胞(Chasin及Urlaub (1980) *PNAS USA* 77:4216)，其包含二氫葉酸還原酶基因之缺失或不活化。在另一實施例中，CHO細胞為CHO K1細胞，其包含麩醯胺酸合成酶基因之缺失或不活化(參見例如美國專利第5,122,464號或第5,827,739號)。

### 固體調配物

本發明之固體調配物通常藉由乾燥液體調配物來製備。可使用任何適合乾燥方法，諸如凍乾或噴霧乾燥。在一個態樣中，在凍乾之前添加凍乾保護劑至調配物中。凍乾包括通常在將用以儲存、運送及分配調配物之容器(例如小瓶、注射器(例如單室或雙室注射器)或藥筒(例如單室或雙室藥筒))中冷凍液體調配物(參見例如Gatlin及Nail, *Protein Purification Process Engineering*, Roger G. Harrison編，Marcel Dekker Inc., 317-367 (1994))。一旦冷凍調配物，則降低大氣壓且調節溫度以使得可例如經由昇華移除冷凍溶劑。凍乾製程之此步驟有時稱為初級乾燥。若需要，則隨後可升高溫度以藉由蒸發來移除仍結合至乾燥調配物之任何溶劑。凍乾製程之此步驟有時稱為二級乾燥。當調配物達到所要乾燥程度時，結束乾燥製程且密封容器。最終固體調配物有時稱為「凍乾調配物」或「餅」。凍乾製程可使用任何適合設備來進行。適合凍乾設備可自許多商業來源(例如SP Scientific, Stone Ridge, NY)獲得。

可使用多種適合裝置乾燥液體調配物來製備固體(例如凍乾)調配物。一般而言，熟習此項技術者使用含有架子之密封室製備凍乾調配物，在該

等架子上置放待乾燥之液體調配物之小瓶。可控制架子之溫度以及冷卻及加熱速率，亦可控制腔室內之壓力。應瞭解，本文中所論述之各種製程參數係指使用此類型裝置進行之製程。若需要，則一般技術者可輕易使本文所述之參數適於其他類型之乾燥裝置。

一般技術者可輕易測定用於初級及二級乾燥之適合溫度及真空之量。一般而言，調配物於約 $-30^{\circ}\text{C}$ 或小於 $-30^{\circ}\text{C}$ 之溫度(諸如 $-40^{\circ}\text{C}$ 或 $-50^{\circ}\text{C}$ )下冷凍。冷卻速率可影響基質中之冰晶之量及尺寸。初級乾燥通常在比冷凍溫度高約 $10^{\circ}\text{C}$ 、約 $20^{\circ}\text{C}$ 、約 $30^{\circ}\text{C}$ 、約 $40^{\circ}\text{C}$ 或約 $50^{\circ}\text{C}$ 之溫度下進行。在一個態樣中，初級乾燥條件可經設定以維持抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體低於調配物之玻璃轉移溫度或塌陷溫度。高於塌陷溫度時，非晶冷凍基質可流動(塌陷)，結果為蛋白質分子可能不由剛性固體基質所包圍，且蛋白質分子在塌陷基質中會不穩定。再者，若發生塌陷，則調配物可能難以充分乾燥。調配物中生成之較高水分量可導致蛋白質降解速率較高及在凍乾產物之品質削弱至不可接受水準之前其可儲存之時間量減少。在一個態樣中，選擇架子溫度及腔室壓力以在初級乾燥期間維持產物溫度低於塌陷溫度。冷凍調配物之玻璃轉移溫度可藉由此項技術中已知之方法(例如藉由差示掃描熱量測定(DSC))量測。塌陷溫度可藉由此項技術中已知之方法(例如冷凍乾燥顯微法、光學相干斷層攝影法)量測。乾燥步驟可移除至少50%、至少60%、至少70%或大於70%之溶劑。在一個態樣中，初級乾燥步驟自抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物移除大於80%溶劑。

可基於在凍乾期間暴露於架子及真空之表面積來選擇小瓶尺寸。乾燥時間與餅高度成正比，因此可基於經測定為合理之餅高度來選擇小瓶尺寸。直徑相對於體積較大之小瓶可提供與架子之大量接觸，以便於在凍乾

循環期間的有效熱傳遞。在大體積液體中之稀釋抗體溶液將需要更多乾燥時間。小瓶尺寸與調配物體積需要達到平衡，這是因為較大小瓶儲存及運送起來更為昂貴且具有較大頂空與調配物比率且在較長儲存期間內可使高比例之調配物暴露於水分之降解效應。就165 mg劑量而言，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之小瓶尺寸可為3 mL、5 ml或10 ml。在一個態樣中，就160 mg/ml溶液而言，小瓶尺寸為5 ml。

選擇用於凍乾之藥筒或注射器尺寸之原則類似於選擇小瓶之原則。餅高度之深度亦將隨著高度增加而增加乾燥時間。必須使注射器或藥筒之直徑及尺寸與最終調配物體積平衡。較大直徑可增加凍乾餅中之水分吸收速率，因此增加在儲存期間水分之降解效應。就165 mg劑量而言，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物體積可為1 ml或2 mL。在一個態樣中，就160 mg/mL溶液而言，注射器或藥筒尺寸大於1 mL。

在凍乾之後，小瓶、注射器或藥筒可在真空下密封，例如塞住。或者，可在密封之前使氣體(例如乾燥空氣或氮氣)進入容器。在涉及氧化的情況下，允許進入凍乾腔室之氣體可包含延遲或防止凍乾產物氧化之氣體。在一個態樣中，氣體為非含氧氣體，例如氮氣或惰性氣體(例如氮氣、氖氣、氬氣、氦氣或氙氣)。在另一態樣中，氣體為氮氣或氬氣。

### 用抗體調配物之治療

在一個態樣中，本發明提供一種治療個體之疾病或病症之方法，其包含向個體投與有效治療例如人類之疾病或病症之量的本文所述之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物。人類個體可為成人(例如18歲或18歲以上)、青少年或兒童。人類個體可為65歲或65歲以上之人。與替代性治療給藥方案對比，65歲或65歲以上之人類個體不需要本文所描述之給藥方案的任何修改，

且可投與本文所述之習知抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物。

個體可能會對用免疫調節劑、TNF- $\alpha$ 拮抗劑或其組合進行的治療缺乏足夠反應、喪失反應或不耐受。患者先前可能已接受用至少一種用於發炎性腸病之皮質類固醇(例如潑尼松(prednisone))的治療。對皮質類固醇之不足反應係指儘管經歷至少一個包括等於每日口服30 mg潑尼松之劑量持續2週或靜脈內1週的4週誘導方案，仍有持續活動性疾病之體征及症狀。對皮質類固醇之反應喪失係指逐漸減少皮質類固醇至低於等於每日口服10 mg潑尼松之劑量的兩種失敗嘗試。皮質類固醇之不耐性包括庫欣氏(Cushing's)症候群、骨質減少/骨質疏鬆症、高血糖症、失眠症及/或感染之病史。

免疫調節劑可為例如口服硫唑嘌呤(azathioprine)、6-巰基嘌呤或甲胺喋呤(methotrexate)。對免疫調節劑之不足反應係指儘管經歷至少一個8週方案或口服硫唑嘌呤( $\geq 1.5$  mg/kg)、6-巰基嘌呤( $\geq 0.75$  mg/kg)或甲胺喋呤( $\geq 12.5$  毫克/週)，仍有持續活動性疾病之體征及症狀。免疫調節劑之不耐性包括(但不限於)噁心/嘔吐、腹痛、胰腺炎、LFT異常、淋巴球減少症、TPMT遺傳突變及/或感染。

TNF- $\alpha$ 拮抗劑為例如抑制TNF- $\alpha$ 之生物活性且較佳結合TNF- $\alpha$ 之藥劑，諸如單株抗體，例如REMICADE(英利昔單抗(infliximab))、HUMIRA(阿達木單抗(adalimumab))、CIMZIA(賽妥珠單抗(certolizumab pegol))、SIMPONI(戈利木單抗(golimumab))；或循環受體融合蛋白，諸如ENBREL(依那西普(etanercept))。對TNF- $\alpha$ 拮抗劑之不足反應係指儘管經歷5 mg/kg IV(2個劑量相隔至少2週)英利昔單抗；一個80 mg皮下劑量之阿達木單抗、隨後一個40 mg劑量(相隔至少兩週)；或400 mg皮下賽

妥珠單抗(2個劑量相隔至少2週)的至少一個4週誘導方案，仍有持續活動性疾病之體征及症狀。對TNF- $\alpha$ 拮抗劑之反應喪失係指在先前臨床益處之後的維持給藥期間症狀之復發。TNF- $\alpha$ 拮抗劑之不耐性包括(但不限於)輸注相關反應、脫髓鞘、充血性心臟衰竭及/或感染。

如本文所用，潰瘍性結腸炎個體之緩解維持的喪失係指Mayo計分增加至少3個點且修正Baron計分(Modified Baron Score)增加至少2。

在另一態樣中，本發明提供抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物，其(1)可活體外及/或活體內結合 $\alpha 4\beta 7$ 整合素；及(2)可調節 $\alpha 4\beta 7$ 整合素之活性或功能，諸如(a)結合功能(例如 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至MAdCAM(例如MAdCAM-1)、纖維結合蛋白及/或VCAM-1之能力)及/或(b)白血球浸潤功能，包括組織中之白血球之募集及/或積聚(例如抑制淋巴細胞遷移至腸黏膜組織之能力)。在一個實施例中，調配物中之抗體可結合 $\alpha 4\beta 7$ 整合素，且可抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至其一或多個配位體(例如MAdCAM(例如MAdCAM-1)、VCAM-1、纖維結合蛋白)，從而抑制組織之白血球浸潤(包括組織中之白血球之募集及/或積聚)。在另一實施例中，調配物中之抗體可結合 $\alpha 4\beta 7$ 整合素，且可選擇性抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至其一或多個配位體(例如MAdCAM(例如MAdCAM-1)、VCAM-1、纖維結合蛋白)，從而抑制組織之白血球浸潤(包括組織中之白血球之募集及/或積聚)。該等抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物可活體外及/或活體內抑制帶有 $\alpha 4\beta 7$ 整合素之細胞細胞性黏著至黏膜組織(包括腸管相關組織、淋巴器官或白血球(尤其是淋巴細胞，諸如T細胞或B細胞))中之血管內皮細胞。在另一實施例中，本發明之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物可抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM(例如MAdCAM-1)及/或纖維結合蛋白之相互作用。在另一實施例中，本發明之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物可選擇性抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與

MAdCAM(例如MAdCAM-1)及/或纖維結合蛋白之相互作用，例如不抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與VCAM之相互作用。

本發明之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物可用於調節(例如抑制(降低或防止)) $\alpha 4\beta 7$ 整合素之結合功能及/或白血球(例如淋巴細胞、單核細胞)浸潤功能。舉例而言，抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至配位體(亦即一或多個配位體)之人類化免疫球蛋白可根據治療與組織(尤其表現分子MAdCAM(例如MAdCAM-1)之組織)之白血球(例如淋巴細胞、單核細胞)浸潤(包括組織中之白血球之募集及/或積聚)相關的疾病之方法投與。

向個體(例如哺乳動物，諸如人類或其他靈長類動物)投與有效量之本發明之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物(亦即一或多種)來治療該疾病。舉例而言，可根據本發明方法治療發炎疾病，包括與胃腸道(包括腸管相關內皮)、其他黏膜組織或表現分子MAdCAM(例如MAdCAM-1)之組織(例如腸管相關組織，諸如小腸及大腸之固有層之微靜脈；及乳腺(例如泌乳性乳腺))之白血球浸潤相關的疾病。同樣，可根據本發明治療患有由於白血球結合至表現MAdCAM(例如MAdCAM-1)之細胞(例如內皮細胞)所致的與組織之白血球浸潤相關之疾病的個體。

在一個實施例中，可治療之疾病因此包括發炎性腸病(IBD)，諸如潰瘍性結腸炎、克隆氏病、迴腸炎、乳糜瀉(Celiac disease)、非熱帶口炎性腹瀉(nontropical Sprue)、與血清陰性關節病相關之腸病、顯微性或膠原性結腸炎、嗜酸性胃腸炎、或直腸結腸切除術及迴腸肛門(ileoanal)吻合術後所致的囊炎(pouchitis)。在一些實施例中，發炎性腸病較佳為克隆氏病或潰瘍性結腸炎。潰瘍性結腸炎可為中度至重度活動性潰瘍性結腸炎。治療可使罹患中度至重度活動性潰瘍性結腸炎之患者之黏膜癒合。治療亦

可使患者之皮質類固醇使用減少、消除或減少及消除。

胰腺炎及胰島素依賴型糖尿病為可使用本發明之調配物治療之其他疾病。已報導MAdCAM(例如MAdCAM-1)係由來自NOD(非肥胖性糖尿病)小鼠以及BALB/c及SJL小鼠之外分泌胰臟中之一些血管表現。MAdCAM(MAdCAM-1)之表現據報導誘導於NOD小鼠之胰臟之發炎胰島中之內皮上，且MAdCAM(MAdCAM-1)為在胰島炎早期由NOD胰島內皮表現之主要定址素(Hanninen, A.等人, *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993))。用抗-MAdCAM或抗- $\beta$ 7抗體治療NOD小鼠預防糖尿病之發展(Yang等人, *Diabetes*, 46:1542-1547 (1997))。此外，觀測到胰島內表現 $\alpha$ 4 $\beta$ 7之淋巴細胞的積聚，且MAdCAM-1牽涉於淋巴瘤細胞經由 $\alpha$ 4 $\beta$ 7與來自發炎胰島之血管(Hanninen, A.等人, *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993))或與套細胞淋巴瘤中之胃腸道(Geissmann等人, *Am. J. Pathol.*, 153:1701-1705 (1998))之結合中。

可使用本發明之調配物治療的與黏膜組織相關之發炎疾病之實例包括膽囊炎、膽管炎(Adams及Eksteen, *Nature Reviews* 6:244-251 (2006)；Grant等人, *Hepatology* 33: 1065-1072 (2001))(例如原發性硬化性膽管炎)、(例如)腸之白塞氏病(Behcet's disease)或膽管周圍炎(膽管及肝臟之周圍組織)及移植物抗宿主疾病(例如在胃腸道中(例如在骨髓移植之後)(Petrovic等人, *Blood* 103:1542-1547 (2004))。如克隆氏病中所見，發炎常延伸超出黏膜表面，因此慢性發炎疾病(諸如類肉瘤病、慢性胃炎(例如自體免疫胃炎(Katakai等人, *Int. Immunol.*, 14:167-175 (2002)))及其他特發性病況)可經受治療。

本發明亦係關於一種抑制黏膜組織之白血球浸潤之方法。本發明亦

係關於一種治療癌症(例如 $\alpha 4\beta 7$ 陽性腫瘤，諸如淋巴瘤)之方法。可使用本發明之調配物治療的與黏膜組織相關之發炎疾病之其他實例包括乳腺炎(乳腺)及大腸急躁症(irritable bowel syndrome)。

其病因為MAdCAM(例如MAdCAM-1)與 $\alpha 4\beta 7$ 之相互作用的疾病或病原體可用本文所述之調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體來治療。該等疾病之實例包括諸如由人類免疫缺乏病毒所引起之免疫缺乏病症(參見例如WO 2008140602)。

本發明之調配物係以抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至其配位體之有效量投與。在治療中，有效量將足以達成所要治療(包括預防)作用(諸如足以降低或預防 $\alpha 4\beta 7$ 整合素介導之結合及/或信號傳導，從而抑制白血球黏著及浸潤及/或相關細胞反應的量)。有效量之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體(例如足以維持 $\alpha 4\beta 7$ 整合素之飽和(例如中和)之有效效價)可誘導發炎性腸病之臨床反應或緩解。有效量之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體可使潰瘍性結腸炎或克隆氏病之黏膜癒合。本發明之調配物可以單位劑量或多個劑量投與。劑量可由此項技術中已知之方法確定且可視例如個體之年齡、敏感性、耐受性及總體健康而定。投與模式之實例包括局部途徑，諸如經鼻或吸入或經皮投與；腸內途徑，諸如經由飼管或栓劑；及非經腸途徑，諸如靜脈內、肌內、皮下、動脈內、腹膜內或玻璃體內投與。抗體之適合劑量可為每次治療約0.1 mg/kg體重至約10.0 mg/kg體重，例如約2 mg/kg至約7 mg/kg、約3 mg/kg至約6 mg/kg或約3.5 mg/kg至約5 mg/kg。在特定實施例中，投與之劑量為約0.3 mg/kg、約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg或約10 mg/kg。總劑量可為約22 mg、約50 mg、約72 mg、約125 mg、約

165 mg或約432 mg。總劑量可為至少77 mg、至少125 mg或至少356 mg。在一個實施例中，總劑量為165 mg。在另一實施例中，總劑量為108 mg。在另一實施例中，總劑量為216 mg。

使用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體在投與之後隨時間之可用性研究之藥物動力學(PK)資料的模型及模擬(BERKELEY MADONNA™ 軟體，University of California)可評估皮下或肌內投與之可能給藥方案。可評估誘導及維持方案之PK資料。另一模型化方法為群體藥物動力學/藥效學分析(NONMEM®非線性混合效應模型化工具，ICON plc, Dublin, Ireland)。可分析暴露量及最低量。

通常，在達成目標(例如 $\alpha 4\beta 7$ 整合素)飽和之後，血液中之抗體濃度與投與劑量具有線性關係。藉由皮下或肌內途徑投與之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體具有藉由靜脈內途徑投與之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之生物可用性的約60%至約90%。在此關係之一實例中，若假定靜脈內劑量具有100%生物可用性且發現皮下劑量具有69.5%生物可用性，則300 mg靜脈內劑量可與藉由皮下投與之432 mg劑量相稱。因此，在69.5%相對生物可用性下，150 mg靜脈內劑量可與216 mg皮下劑量匹配。同樣，若發現皮下劑量具有75%可用性且發現肌內劑量具有80%生物可用性，則為了匹配300 mg靜脈內劑量，皮下劑量可為400 mg且肌內劑量可為375 mg。實例中之表40至表43說明此等關係且提供抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之適用劑量及給藥方案。

在一些態樣中，給藥方案具有兩個期，即誘導期及維持期。在誘導期中，以快速提供有效量之適用於某些目的(諸如誘導對抗體或其抗原結合片段之免疫耐受性或誘導臨床反應且改善發炎性腸病症狀)之抗體或其抗原結合片段之方式投與抗體或其抗原結合片段。當首次以抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體

治療時、當自抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體療法以來長期不治療之後(例如超過三個月、超過四個月、超過六個月、超過九個月、超過一年、超過十八個月或超過兩年)又進行治療時、或在抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體療法之維持期期間，若發炎性腸病症狀又重現(例如自疾病緩解中又復發)，則可對患者執行誘導期治療。在一些實施例中，誘導期方案產生比在維持方案期間維持之平均穩態最低(trough)血清濃度更高之平均最低血清濃度(例如在下一劑量之前即刻的濃度)。

在維持期中，用穩定含量之抗體或其抗原結合片段以使由誘導療法所達成之反應延續的方式投與抗體或其抗原結合片段。維持方案可預防症狀重現或發炎性腸病復發。維持方案可向患者提供便利，例如為簡單給藥方案或無需頻繁的療程。在一些實施例中，維持方案可包括藉由選自由以下組成之群之策略投與抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體或其抗原結合片段(例如於本文所述之調配物中)：小劑量、不頻繁投與、自投與及前述任一者之組合。

在一個實施例中，例如在療法之誘導期期間，給藥方案提供有效量之於本文所述之調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體或抗原結合片段用於誘導人類患者之發炎性腸病的緩解。在一些實施例中，有效量之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體足以在誘導期結束時達成約5  $\mu\text{g/ml}$ 至約60  $\mu\text{g/ml}$ 、約15  $\mu\text{g/ml}$ 至約45  $\mu\text{g/ml}$ 、約20  $\mu\text{g/ml}$ 至約30  $\mu\text{g/ml}$ 或約25  $\mu\text{g/ml}$ 至約35  $\mu\text{g/ml}$ 平均最低血清濃度之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。誘導期之持續時間可為約四週、約五週、約六週、約七週或約八週之治療。在一些實施例中，誘導方案可利用選自由以下組成之群之策略：例如於本文所述之調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體或其抗原結合片段的大劑量、頻繁投與及大劑量與頻繁投與之組合。誘導給藥可為一次或複數次一個以上劑量(例如至少兩個劑量)。在誘導期期間，劑量可以每日一次、

每隔一天一次、每週兩次、每週一次、每十天一次、每兩週一次或每三週一次投與。在一些實施例中，誘導劑量係在療法之頭兩週內用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體投與。在一個實施例中，誘導給藥可為在治療開始(第0天)時一次及在治療開始之後約兩週時一次。在另一實施例中，誘導期持續時間為六週。在另一實施例中，誘導期持續時間為六週且在頭兩週期間投與複數個誘導劑量。

在一些實施例中，例如當開始治療患有重度發炎性腸病之患者(例如抗-TNF $\alpha$ 療法失敗之患者)時，誘導期需要具有比患有輕度或中度疾病之患者更長期間。在一些實施例中，患有重度疾病之患者之誘導期可具有至少6週、至少8週、至少10週、至少12週或至少14週之期間。在一個實施例中，患有重度疾病之患者之誘導給藥方案可包括第0週(開始治療)一劑量、第2週一劑量及第6週一劑量。在另一實施例中，患有重度疾病之患者之誘導給藥方案可包含第0週(開始治療)一劑量、第2週一劑量、第6週一劑量及第10週一劑量。

在一個實施例中，例如在療法之維持期期間，給藥方案維持平均穩態最低血清濃度(例如下劑量之前的平台(plateau)濃度)約5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，或約9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在另一實施例中，例如在療法之維持期期間，給藥方案維持平均穩態最低血清濃度約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，或約35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在另一實施例中，例如在療法之維持期期間，給藥方案維持長期平均血清濃度，例如暴露(例如濃度-時

間曲線下面積)約15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約26  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，或約22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在另一實施例中，例如在維持療法期間，給藥方案維持長期平均血清濃度，例如暴露(例如濃度-時間曲線下面積)約35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約52  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，或約50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。

最終劑型可包含全部劑量在約0.5 ml、約1 ml、約1.5 ml、約2 ml、約2.5 ml、約3 ml抗體調配物中。

靜脈內投與之最終劑型可在約1.0 mg/ml至約1.4 mg/ml、約1.0 mg/ml至約1.3 mg/ml、約1.0 mg/ml至約1.2 mg/ml、約1.0 mg/ml至約1.1 mg/ml、約1.1 mg/ml至約1.4 mg/ml、約1.1 mg/ml至約1.3 mg/ml、約1.1 mg/ml至約1.2 mg/ml、約1.2 mg/ml至約1.4 mg/ml、約1.2 mg/ml至約1.3 mg/ml或約1.3 mg/ml至約1.4 mg/ml之濃度下。最終劑型可在約0.6 mg/ml、0.8 mg/ml、1.0 mg/ml、1.1 mg/ml、約1.2 mg/ml、約1.3 mg/ml、約1.4 mg/ml、約1.5 mg/ml、約1.6 mg/ml、約1.8 mg/ml或約2.0 mg/ml之濃度下。

劑量可每週一次、每2週一次、每3週一次、每4週一次、每6週一次、每8週一次或每10一次投與。較高或較頻繁劑量(例如每隔一天、每週一次、每2週一次、每3週一次或每4週一次)可適用於誘導活動性疾病之緩解或適用於治療新患者(例如適用於誘導對抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之耐受性)。每2週一次、每3週一次、每4週一次、每5週一次、每6週一次、每8週一次或每10週一次之劑量可適用於預防性療法，例如用於維持患有慢性疾病之患者之緩解。在一個態樣中，治療方案為第0天、約第2週、約第6週時及此後

每1週或每2週之治療。在另一態樣中，誘導治療方案為每隔一天之治療持續總共6次治療。

可使給藥方案最佳化以誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解。在一些實施例中，給藥方案不改變接受治療之患者之腦脊髓液中的CD4與CD8之比率。

在一些態樣中，可用最佳化給藥方案達成開始治療之後六個月或一年期之內的持久臨床緩解(例如持續至少兩個、至少三個、至少四個護理醫師之隨訪之臨床緩解)。

在一些態樣中，可用最佳化給藥方案達成持久臨床反應(例如開始治療之後持續至少6個月、至少9個月、至少一年的臨床反應)。

調配物可以單次或多次注射形式皮下投與。舉例而言，單次注射之體積可在約0.5 ml至約3 ml範圍內。在一個實施例中，單次注射之體積可為約0.6 ml至約1.1 ml或約1 ml至約3 ml。在一個態樣中，單次注射之體積為約1 ml。用於皮下投與調配物之針之規格可為約25 G、約26 G、約27 G、約28 G、約29 G或約30 G。

調配物可以單次或多次注射形式肌內投與。舉例而言，單次注射之體積可在約0.5 ml至約5 ml範圍內。在一個實施例中，單次注射之體積可為約2 ml至約5 ml、約0.6 ml至約1.1 ml或約1 ml至約3 ml。在一個態樣中，單次注射之體積為約1 ml、約2 ml、約3 ml、約4 ml或約5 ml。用以肌內投與調配物之針可為約5/8"、約7/8"、約1"、約1.25"、約1.5"、約2"或約3"。在肌內投與中，針之規格可在20 G與22 G之間。

在一個態樣中，本發明係關於一種治療罹患發炎性腸病之人類患者之方法，其中該方法包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類

$\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中根據以下給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段：

(a)每隔一天呈皮下注射形式之165 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的初始劑量持續六個劑量；(b)隨後為視需要每兩週或每四週呈皮下注射形式之165 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的第七後續劑量；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在一個態樣中，本發明係關於一種治療罹患發炎性腸病之人類患者之方法，其中該方法包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據以下給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段：(a)呈靜脈內輸注形式之300 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的初始靜脈內劑量；(b)隨後在初始劑量之後約兩週時，呈靜脈內輸注形式之300 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的第二靜脈內後續劑量；(c)隨後自第六週開始，視需要每週、每兩週或每三週呈皮下注射形式之165 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的第三後續劑量；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解。

解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在另一態樣中，本發明係關於一種用於治療性治療發炎性腸病之給藥方案，其中該給藥方案包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據皮下或肌內給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，該給藥方案維持抗體或其抗原結合片段之平均穩態血清最低濃度在約9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 範圍內；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在另一態樣中，本發明係關於一種用於治療性治療發炎性腸病之給藥方案，其中該給藥方案包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其

中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據皮下或肌內給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，該給藥方案維持抗體或其抗原結合片段之穩態血清最低濃度在約35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 範圍內；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在一些實施例中，治療方法、劑量或給藥方案降低患者產生對抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之HAHA反應的可能性。例如由對抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體有反應性之抗體所量測，HAHA之產生可增加抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之清除率，例如降低抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之血清濃度，例如降低結合至 $\alpha 4\beta 7$ 整合素之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之數目，由此使得治療不太有效。在一些實施例中，為了預防HAHA，可相繼用誘導方案及維持方案治療患者。在一些實施例中，誘導方案與維持方案之間不存在中止。在一些實施例中，誘導方案包含向患者投與複數個劑量之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。為了預防HAHA，當開始用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體治療時，可用較高初始劑量(例如至少1.5 mg/kg、至少2 mg/kg、至少2.5 mg/kg、至少3 mg/kg、至少5 mg/kg、至少8 mg/kg、至少10 mg/kg或約2 mg/kg至約6 mg/kg)或頻繁初始投與(例如約每週一次、約每兩週一次或約每三週一次)標準劑量來治療患者。在一些實施例中，治療方法維持至少30%、至少

40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%之患者呈HAHA陰性。在其他實施例中，治療方法維持患者呈HAHA陰性持續至少6週、至少10週、至少15週、至少6個月、至少1年、至少2年或持續療法持續時間。在一些實施例中，患者或至少30%、至少40%、至少50%或至少60%的產生HAHA之患者維持低效價(例如 $\leq 125$ )之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在一個實施例中，在開始抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之療法之後，治療方法維持至少70%患者呈HAHA陰性持續至少12週。

調配物可單獨或與另一藥劑聯合向個體(例如人類)投與。本發明之調配物可在另一藥劑投與之前、與另一藥劑一起投與或在另一藥劑投與之後投與。在一個實施例中，投與一種以上抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至其配位體的調配物。在該實施例中，可投與藥劑，例如單株抗體，諸如抗-MAdCAM或抗-VCAM-1單株抗體。在另一實施例中，另一藥劑以不同於 $\alpha 4\beta 7$ 路徑之路徑抑制白血球結合至內皮配位體。該藥劑可抑制(例如)表現趨化因子(C-C基元)受體9(CCR9)之淋巴細胞結合至胸腺表現趨化因子(TECK或CCL25)或為防止LFA-1結合至細胞間黏著分子(ICAM)之藥劑。舉例而言，除本發明之調配物之外，亦投與抗-TECK或抗-CCR9抗體或小分子CCR9抑制劑(諸如揭示於PCT公開案WO 03/099773或WO 04/046092中之抑制劑)或抗-ICAM-1抗體或防止ICAM表現之寡核苷酸。在另一實施例中，可與本發明之調配物聯合投與另一活性成分，例如消炎化合物，諸如含有柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤、5-氨基水楊酸之消炎劑；另一非類固醇消炎化合物；類固醇消炎化合物；或通常為控制IBD而投與之抗生素(例如環丙沙星(ciprofloxacin)、甲硝達唑(metronidazole))；或另一生物藥劑(例如TNF $\alpha$ 拮抗劑)。

在一個實施例中，共投與藥物之劑量可在由包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之調配物治療期間隨時間減少。舉例而言，在用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物治療開始時或之前用類固醇(例如潑尼松、潑尼龍)治療之患者將經歷早在用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物治療6週時即開始的減少類固醇劑量之方案。在用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物治療期間，類固醇劑量在開始逐漸減少之4至8週內將減少約25%，在逐漸減少之約8至12週時減少50%且在逐漸減少之約12至16週時減少75%。在一個態樣中，藉由用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物治療約16至24週，可消除類固醇劑量。在另一實例中，在用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物治療開始時或之前用消炎化合物(諸如6-巯基嘌呤)治療之患者將經歷類似於如上所述之類固醇給藥之逐漸減少方案的減少消炎化合物之劑量的方案。

在一個實施例中，該方法包含向患者皮下投與或肌內投與有效量之本發明之調配物。在另一實施例中，調配物可經製備以用於自投與。

若調配物呈固體形式(例如乾燥狀態)，則投與方法可包含將調配物轉化為液態之步驟。在一個態樣中，乾燥調配物可例如由如上所述適用於注射(例如靜脈內、肌內或皮下注射)之液體復原。在另一態樣中，固體或乾燥調配物可例如以貼片、乳膏、氣溶膠或栓劑形式局部投與。

本發明亦係關於一種治療與表現分子MAdCAM(例如MAdCAM-1)之組織之白血球浸潤相關之疾病的方法。該方法包含向有需要之患者投與有效量之本發明之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物。在一個實施例中，該疾病為移植物抗宿主疾病。在一些實施例中，該疾病為由於表現 $\alpha 4\beta 7$ 整合素之白血球結合至表現分子MAdCAM(例如MAdCAM-1)之腸管相關內皮所致的與組織之白血球浸潤相關之疾病。在其他實施例中，該疾病為胃炎(例如嗜酸性胃炎或自體免疫胃炎)、胰腺炎或胰島素依賴型糖尿病。在其他實施例

中，該疾病為膽囊炎、膽管炎或膽管周圍炎。

本發明亦係關於一種治療患者之發炎性腸病之方法。在一個實施例中，該方法包含向患者皮下投與有效量之本發明之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物。在一些實施例中，發炎性腸病為潰瘍性結腸炎或克隆氏病。在其他實施例中，發炎性腸病為乳糜瀉、與血清陰性關節病相關之腸病、顯微性或膠原性結腸炎、胃腸炎(例如嗜酸性胃腸炎)或囊炎。

在一些實施例中，用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之治療不改變CD4:CD8淋巴細胞之比率。CD4:CD8比率可在血液、淋巴結吸出物及腦脊髓液(CSF)中量測。健康個體中之CSF CD4+:CD8+淋巴細胞比率通常大於或等於約1。(Svenningsson等人，J. Neuroimmunol. 1995;63:39-46；Svenningsson等人，Ann Neurol. 1993; 34:155-161)。免疫調節劑可改變CD4:CD8比率至小於1。

## 製品

在另一態樣中，本發明為含有本發明之醫藥調配物且提供其使用說明之製品。製品包含容器。適合容器包括例如瓶、小瓶(例如雙室小瓶、具有或不具有針之液體調配物之小瓶、具有或不具有復原液體之小瓶與具有或不具有針之固體調配物之小瓶)、注射器(諸如雙室注射器、預裝載注射器、自動注射器)、藥筒及試管。容器可由多種材料(諸如玻璃、金屬或塑膠)形成。容器容納調配物且容器上之標籤或與容器關聯之標籤可指示使用說明。在另一實施例中，可製備調配物以供自投與及/或含有用於自投與之說明。在一個態樣中，容納調配物之容器可為單次使用之小瓶。在另一態樣中，容納調配物之容器可為多次使用之小瓶，其允許(例如)使用復原調配物之一個以上部分重複投與(例如2至6次投與)調配物。製品可進

一步包括自商業及使用者立場出發所要之其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、濾紙、針、注射器及具有如先前部分所述之使用說明之藥品說明書。

在一個實施例中，製品為具有針之注射器。針之規格可為25 G、26 G、27 G、29 G、30 G。薄壁針(例如19 G或23 G或大於23 G)可有助於高黏度調配物之注射。在一個態樣中，針規格為27 G或大於27 G。針長度可適用於皮下投與，且可為約1/2吋、約5/8吋或1吋長。在一些實施例中，注射器為預填充注射器。

### 預填充注射器產品開發

在一些態樣中，預填充注射器(PFS)(例如適用於投與調配物以供皮下或肌內傳遞)中之蛋白質產品(例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體)需要數種產品屬性。平衡其中一些屬性有助於減輕競爭效應。舉例而言，當需要低注射體積時，調配物之高蛋白質濃度可較佳。然而，在高蛋白質濃度情況下，可能存在較快之雜質形成速率(例如自注射器浸入調配物中之聚集雜質)且需要較大手動力來操作注射器。為了患者在注射部位處之舒適性所用之小針尺寸可需要較大力來操作注射器。瞭解調配物及注射器參數兩者(諸如蛋白質濃度、pH值及針內徑)是如何影響產品穩定性及效能的將對蛋白質產品(例如預填充注射器中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體)之開發有幫助。

在一個態樣中，開發適用於預填充注射器中之蛋白質產品(例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體)之方法包含例如以並列方式或同時一起改變注射器參數及調配物參數。此舉可使得比在單獨或連續改變各態樣時更好地瞭解對預填充注射器中之蛋白質產品所預期的蛋白質穩定性及產品效能之範圍。

預填充注射器產品(例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體)之開發涉及認知在某一點，液

體調配物與預填充注射器之若干組分有接觸(圖15)。舉例而言，調配物可接觸注射筒，其可由玻璃(例如I型硼矽玻璃)或塑膠(例如環烯烴聚合物(COP)、環烯烴共聚物(COC)、聚丙烯或聚四氟乙烯)構成。調配物可接觸注射器、柱塞及/或端帽(tip cap)，其可為彈性體(例如為相同或不同材料，例如塑膠(諸如聚乙烯、聚苯乙烯或聚丙烯，或彈力物(諸如橡膠(天然、合成、丁基))，或聚矽氧)。調配物可與添加至筒之內表面以便於柱塞移動的潤滑劑接觸。潤滑劑可為例如聚矽氧油、礦物油或甘油。在押針(staked needle)注射器之實施例中，可能存在金屬合金針(例如不鏽鋼針及用以將針膠黏於適當位置之黏著劑)。預填充注射器中蛋白質產品的一個考慮因素為在產品存放期中液體蛋白質溶液與此等注射器組分之一或多者直接接觸。調配物及注射器組分兩者均可對產品之穩定性有影響。

可影響預填充注射器產品穩定性之調配物參數包括蛋白質濃度、pH、緩衝劑類型、緩衝劑濃度、離子強度、穩定劑類型及穩定劑濃度。用於蛋白質調配物之穩定劑之實例包括例如如先前部分中所述之離子鹽、多醣、胺基酸、抗氧化劑、螯合劑及界面活性劑。

可影響預填充注射器產品穩定性之注射器組分包括例如潤滑劑，柱塞及端帽之組成，及雜質。潤滑劑(例如注射筒上之聚矽氧油)之量可影響產品穩定性。柱塞及端帽之組成可影響此等組分之透氧性且此等組分之可浸出物可引入蛋白質產品(例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物)中，亦可影響產品穩定性。可影響產品穩定性之另一注射器參數包括可滲入產品調配物(例如自筒(例如玻璃筒)及/或針(例如不鏽鋼針))之雜質(例如重金屬(例如鎢))之類型及/或量。(亦參見 Ludwig 等人，*J.Pharm. Sci.* 99:1721-1733 (2010)；Nashed-Samuel 等人，*American Pharmaceutical Review*

Jan/Feb:74-80 (2011) ; Badkar等人, *AAPS PharmSciTech* 12:564-572)

預填充注射器可手動注射或用自動注射器裝置來使用。預填充注射器之功能測試包括量測脫開力(break-loose force), 即開始移動柱塞所需之力; 及滑動力, 即以恆定速率注射注射器之內含物所需之力。預填充注射器之機械效能可視數種調配物及注射器參數(諸如注射器中之調配物之黏度及潤滑劑(例如聚矽氧油)之量)而定。

預填充注射器中之蛋白質產品之數種屬性及其可影響彼等產品屬性之調配物或注射器因素展示於表1中。許多產品屬性可為數種調配物及注射器參數之複合函數。舉例而言, 注射器滑動力為調配物黏度之函數, 但黏度可視數種調配物因素(諸如蛋白質濃度、穩定劑濃度及pH值)而定。

表1：預填充注射器中之蛋白質產品之產品屬性及其可影響此等屬性之可能調配物及注射器參數

產品屬性	可影響產品屬性之蛋白質調配物參數	可影響產品屬性之注射器參數
重量莫耳滲透濃度	穩定劑濃度、pH值、蛋白質濃度	無
黏度	穩定劑濃度、pH值、蛋白質濃度	無
注射器脫開力及滑動力	黏度、蛋白質濃度、界面活性劑濃度	注射速度、針長度、針ID、注射器筒ID、聚矽氧油量、柱塞調配物及形狀
蛋白質脫醯胺速率	穩定劑濃度、pH值、蛋白質濃度	無
蛋白質氧化速率	穩定劑/抗氧化劑濃度、pH值、蛋白質濃度、界面活性劑濃度、溶氧	柱塞及端帽調配物(透氧性)、重金屬雜質含量、氣泡尺寸
可溶性聚集體形成速率	穩定劑濃度、pH值、蛋白質濃度、界面活性劑濃度、	聚矽氧油量、重金屬雜質含量、氣泡尺寸

	呈溶解狀態之溶氧	
顯微鏡下可見(Sub-visible)及可見之蛋白質微粒形成速率	穩定劑濃度、pH值、蛋白質濃度、界面活性劑濃度	聚矽氧油量、重金屬雜質含量、氣泡尺寸、注射器內表面積

在一個態樣中，可添加界面活性劑(諸如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80)至預填充注射器中之蛋白質調配物中(從而例如防止蛋白質分子在液體/空氣及/或液體/潤滑劑(例如聚矽氧油)界面處吸附及變性)。蛋白質分子之表面吸附及變性可為顯微鏡下可見及可見蛋白質顆粒成核的一種機制。因此，添加界面活性劑至預填充注射器中可減少預填充注射器產品中之顯微鏡下可見及可見顆粒之形成。在一個實施例中，少量界面活性劑可乳化潤滑劑(例如溶液中之聚矽氧油小滴，且從而減少顯微鏡下可見及可見潤滑劑(例如聚矽氧油小滴)形成)(Ludwig等人，前述)。在另一實施例中，由於大量界面活性劑對蛋白質調配物之可能有害作用而將調配物中之界面活性劑之量減至最少。存在於聚山梨醇酯中之過氧化物雜質可導致蛋白質氧化增加(Wang及Wang *J. Pharm. Sci.* 91:2252-2264 (2002))。大量界面活性劑可乳化來自注射器壁之大量聚矽氧油且導致在存放期內功能性滑動力增加。應設計產品開發研究以檢驗變化的界面活性劑含量對產品穩定性及注射器效能兩者之作用。

使用品質源於設計(QbD)或實驗設計(DOE)方法使蛋白質/PFS系統中之調配物與注射器參數之間的複雜相互作用受此等系統檢驗。可設計同時改變調配物及注射器參數之研究以得到對此等複雜系統之更好瞭解。由此得到開發預填充注射器產品之綜合方法。表2展示可加入預填充注射器產品之實驗設計中之輸入參數及水準之實例及欲採用之分析測試之實例。視用於QbD研究之實驗設計類型而定，實驗數目可在9(篩選設計)至81(全因子設計)(所有可能組合)範圍內變化。實驗數目愈高，可解決之產品參數

之間的相互作用數目愈高。為此分析設計之軟體(例如JMP®統計分析軟體 (statistical discovery software)(Cary, NC))可有助於QbD研究。此分析產生對調配物及注射器參數如何相互作用來影響產品屬性的定量瞭解。

表2：預填充注射器中之液體蛋白質產品之實驗設計的實例

調配物輸入參數	水準	分析測試
蛋白質濃度	50 mg/mL、100 mg/mL、150 mg/mL	<ul style="list-style-type: none"> <li>藉由尺寸排阻層析法及離子交換層析測試蛋白質穩定性</li> <li>使用力測試來測試隨時間之脫開力及滑動力</li> <li>使用微流成像或庫爾特計數器測試顯微鏡下可見蛋白質顆粒及聚矽氧油小滴隨時間之形成</li> </ul>
pH值	5.5、6.5、7.5	
界面活性劑濃度	0.01%、0.08%、0.15%	
注射器中之聚矽氧油之量	每注射器0.2 mg、0.5 mg、0.8 mg	

如下給出可獲自表2中所示實例實驗之預測模型的實例，其中 $C_n$ 為數值常數。

可溶性聚集體隨時間之形成= $C_0+C_1$ [蛋白質濃度]+ $C_2$ [蛋白質濃度]<sup>2</sup>+ $C_3$ [pH]+ $C_4$ [界面活性劑濃度]+ $C_5$ [潤滑劑量]

眾多注射器參數可影響產品穩定性及效能，因此一實施例包括注射器參數之容許公差如何影響產品穩定性及效能的示性。注射器筒上之潤滑劑(例如聚矽氧油)之量在不同注射器間可變化50%至100%。該量之此變化可影響如表1中所示之數種產品特徵。注射器筒之內徑在不同注射器間可不同，其影響注射力。在押針注射器中，針內徑在不同批次間或在不同製造商間可不同，其將影響注射力。藉由使用QbD方法來檢驗注射器參數如何影響效能，可獲得預測模型，其可用於估計注射器參數之容許公差可如何影響產品效能。使用QbD方法獲得之預測模型可用來選擇滿足所要產品屬性之調配物及注射器參數且預測產品穩定性及效能。

預填充注射器可含有向蛋白質調配物中添加之聚矽氧乳液或鎊。可存在於預填充注射器中之聚矽氧之例示性量在約0.3 mg至約0.8 mg範圍內。在一個態樣中，可存在於預填充注射器中之聚矽氧之量為約0.3 mg、約0.4 mg、約0.5 mg、約0.6 mg、約0.7 mg或約0.8 mg。在另一態樣中，調配物之黏度將在2 cP至60 cP範圍內，使得在200毫米/分鐘速度下的注射力為5 N至80 N。在另一態樣中，調配物之黏度將在4 cP至27 cP範圍內，使得在200毫米/分鐘速度下的注射力為10 N至40 N。

參考以下實例將更充分地瞭解本發明。然而，不應將其視為限制本發明之範疇。所有文獻及專利引證以引用的方式併入本文中。

### 製備調配物之方案

使抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體溶液在切向流過濾系統中透濾以達到檸檬酸鹽、組胺酸、精胺酸緩衝劑之規定濃度，隨後集中且與聚山梨醇酯80於檸檬酸鹽、組胺酸、精胺酸緩衝劑中之溶液混合。將溶液於2 L或5 L瓶中儲存於-70°C下。隨後解凍溶液且經由0.2  $\mu\text{m}$ 濾紙過濾兩次。將約1.0 mL填充至滅菌注射器中且用滅菌柱塞(塞子)封閉。儲存調配物且在2°C至8°C下於注射器中運送最終藥物產品。

## 實例

### 實例1

#### 調配物製造

#### 因素

#### 賦形劑濃度

測試抗體調配物中之聚集體形成。自實驗數據開發SEC聚集體模型，該實驗檢驗蛋白質濃度、pH值及界面活性劑:蛋白質莫耳比。在6.0至

6.5之pH值範圍下，聚集體形成類似於0.7至1.5之聚山梨醇酯80與蛋白質莫耳比範圍下的聚集體形成。(圖6)一般而言，在PS80:蛋白質比率大於1.5時，聚集體形成率隨pH值升高而增加。(圖7)

進行檢驗在空氣存在下SEC聚集體形成之實驗。將11種不同組成之不同調配物置於硼矽小瓶中且用彈性塞子加蓋，具有空氣頂空。製造一組相同調配物，且用氬氣代替空氣頂空。此等樣品在40°C下穩定地置放兩週。與具有氬氣頂空之相同調配物相比，所有具有空氣頂空之樣品在實驗結束時產生大量聚集體。

表3

樣品	蛋白質濃度(mg/ml)	蔗糖 (%)	組胺酸 (mM)	精胺酸 (mM)	PS 80 (%)	pH值	聚集體空氣樣品(%)	聚集體氬氣樣品(%)
1	60	2	25	75	0.05	6.2	0.64	0.48
2	60	4	25	75	0.05	7	0.62	0.42
3	160	4	50	75	0.14	6.2	0.92	0.73
4	160	2	50	75	0.14	7	1.16	0.74
5	60	2	50	125	0.05	7	1.28	0.33
6	60	4	50	125	0.05	6.6	0.48	0.36
7	160	4	25	125	0.14	7	1.04	0.70
8	160	2	25	125	0.14	6.2	1.06	0.75
9	160	3	25	75	0.14	6.6	1.09	0.78
10	110	3	50	125	0.10	6.2	0.65	0.47
11	110	2	25	75	0.10	6.6	0.90	0.62

基於此等實驗，推測SEC聚集體藉由氧化或藉由二硫鍵形成而形成。探究抗氧化劑及/或螯合劑之添加。製備pH 6.6之聚山梨醇酯80與蛋白質莫耳比為1.5的含有40 mM組胺酸、90 mM精胺酸及160 mg/mL蛋白質之調配物。向調配物中添加25 mM檸檬酸鹽、5 mM檸檬酸鹽、5 mM

EDTA、25 mM半胱胺酸或5 mM半胱胺酸中之任一者。所有3種其他賦形劑減少聚集體形成(圖8)。按照檸檬酸鹽>EDTA>半胱胺酸之效能順序，將抗氧化劑及/或螯合劑之添加分級。與對照調配物相比，5 mM或25 mM檸檬酸鹽之任一者均減少SEC聚集體形成。

進行實驗以確定pH值、蛋白質濃度、檸檬酸鹽濃度、組胺酸濃度及聚山梨醇酯80與蛋白質莫耳比之效應。pH值在6.0至6.3範圍變化，蛋白質濃度在60 mg/mL至160 mg/mL範圍變化，檸檬酸鹽濃度在0至25 mM範圍變化，組胺酸濃度在25 mM至50 mM範圍變化，且聚山梨醇酯80與蛋白質莫耳比在0.7至1.5範圍變化。將調配物填充於1 ml長的27 G 1/2"注射器(0.55 +/- 0.2 mg聚矽氧)中。所有調配物均含有約125 mM精胺酸。

使用CEX及SEC測試40°C下歷時兩週之穩定性。結果(圖9及表4)展示在調配物中存在25 mM檸檬酸鹽之情況下聚集體形成減少，而增加蛋白質濃度可提高聚集體形成率。單體之量在25°C及40°C下展示與聚集體形成相反之趨勢，而在5°C下單體之量基本上無變化持續高達24個月(表5)。

另一組調配物探究在40°C、25°C、5°C下SEC聚集體在40 mM至63 mM檸檬酸鹽存在下但無組胺酸之形成率。在40°C下此等調配物中的聚集體形成率稍微高於具有組胺酸之調配物。然而，在5°C下，具有檸檬酸鹽且無組胺酸之調配物中的聚集體形成率可與含有檸檬酸鹽及組胺酸之調配物相當(表6)。再者，在5°C下，單體之量基本上無變化持續高達24個月(表7)。

表4

調配物編號	蛋白質濃度 (mg/mL)	pH值	組胺酸濃度 (mM)	檸檬酸鹽濃度 (mM)	精胺酸濃度 (mM)	PS80: 蛋白質莫耳比	聚集體之初始量 (%)	在5°C下 12個月之後 聚集體之變化	在5°C下 24個月之後 聚集體之變化	在25°C下 12個月之後 聚集體之變化	在40°C下 1個月之後 聚集體之變化
1	62	6.4	50	25	125	0.7	0.4	0.1	0.1	0.7	0.2
2	60	6.4	50	0	125	1.5	0.4	0.5	1.1	1.5	0.4
3	157	6.4	50	25	125	1.5	0.4	0.2	0.3	1.3	0.5
4	161	6.3	50	0	125	0.7	0.4	0.6	0.7	2.5	0.8
5	60	6.2	50	25	125	1.5	0.4	0.2	0.2	0.5	0.2
6	110	6.0	50	0	125	0.7	0.4	0.4	0.6	1.7	0.7
7	162	6.2	50	25	125	0.7	0.4	0.3	0.3	1.1	0.5
8	160	6.0	50	0	125	1.5	0.4	0.4	0.6	2.2	0.9
9	169	6.3	25	25	125	0.7	0.5	--	0.3	--	0.6
10	158	6.3	25	25	123	1.0	0.5	--	--	--	0.6

表5

調配物編號	蛋白質濃度 (mg/mL)	pH值	組胺酸濃度 (mM)	檸檬酸鹽濃度 (mM)	精胺酸濃度 (mM)	PS80: 蛋白質莫耳比	單體之初始量 (%)	在5°C下 12個月之後 單體之變化	在5°C下 24個月之後 單體之變化	在25°C下 12個月之後 單體之變化	在40°C下 1個月之後 單體之變化
1	62	6.4	50	25	125	0.7	98.3	0.4	0.1	-2.5	-1.3
2	60	6.4	50	0	125	1.5	98.3	-0.2	-1.0	-3.9	-2.0
3	157	6.4	50	25	125	1.5	98.2	0.2	0.0	-3.1	-1.6
4	161	6.3	50	0	125	0.7	98.2	0.0	-0.4	-4.5	-2.1
5	60	6.2	50	25	125	1.5	98.3	0.3	0.2	-2.2	-1.4
6	110	6.0	50	0	125	0.7	98.3	0.1	-0.3	-3.6	-2.1
7	162	6.2	50	25	125	0.7	98.3	0.2	-0.1	-2.8	-1.7
8	160	6.0	50	0	125	1.5	98.3	-0.1	-0.4	-4.2	-2.3
9	169	6.3	25	25	125	0.7	98.2	--	-0.1	--	-1.8
10	158	6.3	25	25	123	1.0	98.1	--	--	--	-1.7

表6

調配物編號	蛋白質濃度 (mg/mL)	pH值	組胺酸濃度 (mM)	檸檬酸鹽濃度 (mM)	精胺酸濃度 (mM)	PS80: 蛋白質莫耳比	聚集體之初始量 (%)	在5°C下 12個月之後 聚集體之變化	在5°C下 24個月之後 聚集體之變化	在25°C下 12個月之後 聚集體之變化	在40°C下 1個月之後 聚集體之變化
11	160	6.3	0	40	125	0.7	0.5	--	0.4	--	0.9
12	165	6.3	0	40	125	1.5	0.6	0.3	--	--	0.9
13	62	6.2	0	40	125	1.5	0.5	--	--	1.7	0.4
14	170	6.1	0	40	125	1.5	0.5	--	--	--	0.9
15	165	6.5	0	63	125	1.5	0.5	--	--	--	1.0
16	160	6.3	0	40	125	1.0	0.6	0.3	--	--	0.9

表7

調配物編號	蛋白質濃度 (mg/mL)	pH值	組胺酸濃度 (mM)	檸檬酸鹽濃度 (mM)	精胺酸濃度 (mM)	PS80: 蛋白質莫耳比	單體之初始量 (%)	在5°C下 12個月之後 單體之變化	在5°C下 24個月之後 單體之變化	在25°C下 12個月之後 單體之變化	在40°C下 1個月之後 單體之變化
11	160	6.3	0	40	125	0.7	98.3	--	-0.3	--	-2.2
12	165	6.3	0	40	125	1.5	98.2	0.1	--	-3.4	-2.1
13	62	6.2	0	40	125	1.5	98.1	--	--	--	-1.4
14	170	6.1	0	40	125	1.5	98.1	--	--	--	-2.0
15	165	6.5	0	63	125	1.5	98.2	--	--	--	-2.3
16	160	6.3	0	40	125	1.0	98.2	0.1	--	--	-2.0

## pH值

在5°C下進行數個pH值實驗以確定pH值對CEX降解之效應。維多珠單抗抗體調配物包含160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、125 mM精胺酸、50 mM組胺酸及25 mM檸檬酸鹽。在40°C、25°C及5°C下測試數個不同pH水準

6.3、6.5、6.7及6.9下之穩定性。

40°C下之CEX模型展示(圖10)pH值最大程度上影響CEX降解。含有組胺酸之調配物之pH值隨溫度升高而降低，然而，展示檸檬酸鹽調配物之pH值不受溫度影響(圖11)。組胺酸/檸檬酸鹽調配物經測定在pH 6.8下40°C下1週後、pH 6.3至6.5下25°C下6個月後及pH 6.3至6.5下5°C下6個月後具有良好穩定性。基於其他研究，調配物之穩定性在25°C下與在5°C下在6.2至6.9之pH值範圍下係類似的(表8及表9)。

表8

蛋白質濃度 (mg/mL)	pH值	組胺酸濃度 (mM)	檸檬酸鹽濃度 (mM)	精胺酸濃度 (mM)	PS80: 蛋白質莫耳比	酸性物質之初始量 (%)	鹼性物質之初始量 (%)	主要同功異型物之初始量 (%)	在25°C下相對面積%隨時間之差異					
									6個月後 CEX酸性之變化	12個月後 CEX酸性之變化	6個月後 CEX鹼性之變化	12個月後 CEX鹼性之變化	6個月後 CEX主要之變化	12個月後 CEX主要之變化
157	6.4	50	25	125	1.5	23.9	6.8	69.3	8.5	17.4	7.1	3.4	-15.6	-20.8
162	6.2	50	25	125	0.7	24.0	6.9	69.1	4.4	12.8	10.8	8.6	-15.2	-21.4
158	6.3	50	25	125	1.5	24.8	5.5	69.7	7.2	--	4.9	--	-14.4	--
160	6.4	42	25	125	1.5	24.9	5.5	69.7	9.5	--	1.0	--	-14.4	--
147	6.7	45	25	125	2.1	24.9	4.7	70.4	14.8	--	3.6	--	-16.5	--
147	6.9	45	25	125	2.2	25.0	4.9	70.1	14.5	--	3.2	--	-17.9	--
153	6.7	46	25	125	1.5	24.8	5.5	69.7	14.7	--	0.3	--	-17.3	--
154	6.9	46	25	125	1.5	24.9	5.3	69.8	19.7	--	0.5	--	-20.2	--
170	6.5	50	25	125	1.0	25.7	4.6	69.7	10.8	--	4.4	--	-15.2	--
170	6.5	50	25	125	1.5	25.7	4.6	69.7	11.1	--	5.2	--	-16.4	--
160	6.5	50	25	125	1.5	26.3	7.0	66.7	11.8	--	-2.6	--	-11.9	--

表9

蛋白質濃度 (mg/mL)	pH值	組胺酸濃度 (mM)	檸檬酸鹽濃度 (mM)	精胺酸濃度 (mM)	PS80: 蛋白質莫耳比	在5°C下相對面積%隨時間之差異					
						6個月後 CEX酸性之變化	24個月後 CEX酸性之變化	6個月後 CEX鹼性之變化	24個月後 CEX鹼性之變化	6個月後 CEX主要之變化	24個月後 CEX主要之變化
157	6.4	50	25	125	1.5	0.2	0.6	2.3	-0.9	-2.5	0.3
162	6.2	50	25	125	0.7	-0.2	-0.7	4.3	2.2	-4.1	-1.5
158	6.3	50	25	125	1.5	0.0	--	1.9	--	-1.9	--
160	6.4	42	25	125	1.5	0.1	--	1.7	--	-1.8	--
147	6.7	45	25	125	2.1	1.7	--	1.7	--	-3.4	--
147	6.9	45	25	125	2.2	1.6	--	1.1	--	-2.7	--
153	6.7	46	25	125	1.5	1.7	--	0.4	--	-2.1	--
154	6.9	46	25	125	1.5	2.1	--	0.4	--	-2.4	--
170	6.5	50	25	125	1.0	0.9	--	1.6	--	-2.5	--
170	6.5	50	25	125	1.5	0.8	--	1.6	--	-2.5	--
160	6.5	50	25	125	1.5	11.8	--	-2.6	--	-11.9	--

## 實例2

## 穩定性

測試四種不同抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物在十二個月之時程內之穩定性。pH值為6.0至6.2之調配物展示比pH值為6.3至6.4之調配物少約1%至2%主要物質(圖12)。在5°C下pH值為6.3至6.4之調配物展示鹼性或主要物質之變化小於1%。

藉由SEC測試十種不同抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物在十二個月之時程內之穩定性(表10)。具有60 mg/mL蛋白質濃度且含有25 mM檸檬酸鹽之調配物在1年之後聚集體變化為0.1%至0.2%，而含有160 mg/mL蛋白質及25 mM檸檬酸鹽之調配物在1年內聚集體增加為0.2%至0.3%。含有60 mg/mL、110 mg/mL或160 mg/mL蛋白質、無檸檬酸鹽之調配物的聚集體增加為0.4%至0.6%。

表10

調配物編號	蛋白質濃度(mg/mL)	pH值	組胺酸濃度(mM)	檸檬酸鹽濃度(mM)	精胺酸濃度(mM)	PS80莫耳比	在5°C下1年之後聚集體%之變化
1	62	6.41	50	25	125	0.7	0.11
2	60	6.35	50	0	125	1.5	0.50
3	157	6.44	50	25	125	1.5	0.23
4	161	6.3	50	0	125	0.7	0.56
5	60	6.19	50	25	125	1.5	0.16
6	110	6.03	50	0	125	0.7	0.39
7	162	6.19	50	25	125	0.7	0.26
8	160	6	50	0	125	1.5	0.44
9	165	6.28	0	40	125	1.5	0.30
10	160	6.3	0	40	125	1.0	0.33

## 實例3

## 黏度

投與醫藥調配物所需之注射力與調配物之黏度有關。製備具有不同pH值及不同蛋白質、精胺酸、組胺酸、檸檬酸鹽、蔗糖及聚山梨醇酯80之濃度的調配物。測試此等調配物之黏度。開發Ln(黏度)之統計模型。該模型展示黏度主要受蛋白質濃度及pH值影響(圖13)。蔗糖、組胺酸及精胺酸亦可對黏度具有輕微影響。在一些蛋白質調配物中，添加氯化鈉以降低調配物之黏度。然而，已知氯化鈉對黏度之作用具有蛋白質及調配物依賴性。

添加氯化鈉至聚山梨醇酯80與蛋白質莫耳比為1.5且pH值為6.4的含有140 mg/mL維多珠單抗、125 mM精胺酸、25 mM組胺酸、25 mM檸檬酸鹽及聚山梨醇酯80之調配物中。NaCl對調配物之黏度無任何影響。

黏度對所測試各種注射器之注射力之效應展示於圖16A及圖16B中。

#### 實例4

##### 方法

##### 陽離子交換層析(CEX)

弱陽離子交換管柱上之磷酸鹽/氯化鈉梯度在高效液相層析系統中用於分離抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物中之帶電物質且測定抗體物質之電荷組成。酸性同功異型物在主要同功異型物之前溶離且鹼性同功異型物在主要同功異型物之後溶離。

使用CEX分析產生之維多珠單抗調配物之穩定性數據指示主要同功異型物%高於55.0%。

##### 毛細管等電聚焦(cIEF)

使用iCE280全柱偵測cIEF系統(Convergent Biosciences, Toronto, Ontario)進行cIEF。兩性電解質之選擇可由製造商推薦或可為市售兩性電

解質之組合。適用之組合為3-10與5-8 PHARMALYTE™之混合物(GE Healthcare, Piscataway, NJ)。

使用cIEF分析產生之維多珠單抗調配物之穩定性數據指示主要同功異型物%為約53%，酸性物質%為約42%，且鹼性物質%為約5%。

#### 尺寸排阻層析法(SEC)

使用分析型SEC管柱(Tosoh Bioscience, LLC, King of Prussia, PA)進行SEC。移動相為磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液且在280 nm下監測吸光度。

使用SEC分析產生之維多珠單抗調配物之穩定性數據指示單體%為99.0%，聚集體%<0.5%，且低分子量物質%<1.0%。

#### SDS-PAGE分析

使用Invitrogen(Carlsbad, CA)Tris-甘胺酸凝膠(在還原條件下為4%至20%且在非還原條件下為4%至12%)進行SDS-PAGE。將復原抗體調配物樣品於液體調配物緩衝液中稀釋，隨後以具有10% 2-巰基乙醇(還原樣品緩衝劑)或不具有2-巰基乙醇(非還原樣品緩衝劑)之Tris-甘胺酸SDS樣品緩衝液(2X, Invitrogen)1:2稀釋。短暫加熱樣品且裝載，以與分子量標記物(Invitrogen)相比較。用膠狀庫馬斯藍(coomassie blue)(Invitrogen)根據製造商說明書對凝膠染色。藉由密度測定法分析蛋白質帶以確定還原凝膠之重鏈及輕鏈%及非還原凝膠之IgG %。

#### 結合功效

使懸浮於含1% BSA之PBS、0.01%疊氮化鈉中之HuT78細胞(人類T細胞淋巴瘤細胞，美國菌種保存中心，Manassas, VA)與初級測試抗體之連續稀釋液接觸。在冰上培育之後，洗滌細胞且以螢光標記之二級抗體處

理。在進一步洗滌之後，將細胞固定且懸浮於FACS試劑中用於藉由流動式細胞測量術(Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ)分析；亦參見美國專利第7,147,851號。

水分(藉由卡爾費雪測定)

用甲醇滴定調配物以供庫侖(coulometric)卡爾費雪水分測定之用。

## 實例5

### 來自預填充有抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之注射器產品之聚矽氧的效應

使用由60 mg/mL至160 mg/mL抗- $\alpha 4\beta 7$ 蛋白質於含有L-組胺酸、L-精胺酸鹽酸鹽、檸檬酸鹽及聚山梨醇酯80之緩衝劑中組成之皮下調配物來研究聚矽氧對蛋白質調配物之穩定性及容器/外殼屬性的效應。在0.5 mL填充下進行研究。

探究包括蛋白質濃度、聚山梨醇酯80與蛋白質莫耳比及噴塗於注射器筒上之聚矽氧之量的參數。各輸入參數之範圍展示於表11中。

**表11.** 輸入參數範圍

參數	低	高
蛋白質濃度(mg/mL)	100	160
聚山梨醇酯80:蛋白質比	0	2
聚矽氧量(mg)	0.4	0.8

使用實驗設計來測定該組調配物以進行研究。合理之調配物數目在6至8種調配物範圍內。測試之調配物之實例展示於表12中。

**表12**

輪次	蛋白質濃度(mg/mL)	PS80:蛋白質比率	PS80濃度(%)	聚矽氧含量(mg)
1	100	1	0.087	0.8
2	100	2	0.174	0.8
3	160	0	0	0.8

4	160	2	0.279	0.4
5	100	0	0	0.4
6	160	2	0.279	0.8
7	100	1	0.087	0.4
8	160	0	0	0.4
9	100	0	0	0
10	100	2	0.174	0
11	160	0	0	0
12	160	2	0.279	0

可將一些對照物添加至該組調配物中且在幾個選定時間點進行測試。

在數個不同溫度(例如5°C、25°C/60% RH、40°C/75% RH)穩定地置放此等調配物且在各時間點(例如第0週、第1週、第2週、第4週、第8週、第12週、第6個月及第12個月)拉伸(pull)來測試。在第0週、第12週、第6個月及第12個月測試對照物。

在各穩定性時間拉伸進行之測試包括SEC、CEX、英斯特朗(Instron)、MFI及聚矽氧定量。測試1個注射器之英斯特朗，排出之物質用於SEC、CEX、注射力量測及微流成像(MFI)及聚矽氧定量。

#### 實例6

##### 分析填充有抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之預填充注射器組分

此研究探究各個注射器製造商、柱塞(塞子)彈性體材料及調配物中的PS80之量如何影響系統之機械性質及調配物之穩定性。

建立實驗設計來探究3個不同注射器製造商、2種不同柱塞(塞子)材料類型及2個不同PS80與蛋白質莫耳比。保持調配物之其餘部分恆定在170 mg/mL蛋白質、125 mM精胺酸、50 mM組胺酸、25 mM檸檬酸鹽及pH 6.5。此等預填充注射器上之針尺寸為27 G ½'或29 G ½"薄壁。所進行之

實驗詳述於表15中。

實驗之活性部分之實驗設計輸入展示於下表13中，而常數展示於表14中。利用表13中所示之輸入來建立實驗設計。

實驗清單展示於表10中。

**表13.** 活性調配物之DOE變數及水準

變數	值		
PS80:蛋白質莫耳比	1.0		1.5
注射器製造商	A	B	C
柱塞(塞子)類型	4432		4023經塗佈

**表14.** 活性調配物之常數

常數	值
蛋白質濃度(mg/mL)	170
精胺酸濃度(mM)	125
組胺酸濃度(mM)	50
檸檬酸鹽濃度(mM)	25
pH值	6.5

**表15.** 實驗明細

輪次編號	注射器類型	柱塞(塞子)	PS80
1	C	4432	1
2	B	4432	1
3	A	4023	1
4	C	4023	1
5	B	4023	1
6	A	4023	1.5
7	C	4023	1.5
8	B	4023	1.5

將濃縮調配之抗- $\alpha 4\beta 7$ 調配物外加聚山梨醇酯80且稀釋降至170 mg/mL。起始調配物之組成展示於下表16中。

表16. 起始調配物緩衝劑明細

蛋白質(mg/ml)	總組胺酸(mM)	總檸檬酸鹽(mM)	精胺酸(mM)	pH值
183	50	25	125	6.48

為了稀釋所要調配物組成中之物質，製備PS80於25 mM檸檬酸鹽、50 mM組胺酸、125 mM精胺酸(pH 6.48)中之儲備溶液。

表17. 儲備溶液明細

賦形劑	濃度
PS 80 (%)	5

調配物之稀釋方案詳述於表18中。

表18. 稀釋明細

起始調配物 ( $\mu\text{L}$ )	PS80於組胺酸/精 胺酸/檸檬酸鹽緩 衝劑中( $\mu\text{L}$ )	50 mM組胺酸、125 mM 精胺酸、25 mM檸檬酸 鹽(pH 6.48)緩衝劑	總體積 ( $\mu\text{L}$ )
27868.9	890.8	1240.3	30000.0
18579.2	890.8	530.0	20000.0

基於稀釋方案進行混合，且應稱重起始調配物，而其他儲備溶液可按體積吸取。過濾調配物。將0.5 mL調配物等分試樣至儘可能多之1 mL長注射器中。藉由加塞機塞住注射器，留有2 mm至4 mm氣泡。在各時間點，一個注射器以針向下來儲存且一個注射器橫向儲存。額外注射器以針向下來儲存。

在5°C、25°C及40°C下在第2週及一個月時測試注射器。起初進行分析測試(外觀、英斯特朗、pH值、重量莫耳滲透濃度、密度、黏度、SEC、CEX及Brightwell)且隨後在25°C及40°C下第2週時及25°C下第4週時再進行分析測試。

## 實例7

### 分析用於預填充有抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之27 G薄壁針注射器中之皮下容器外殼

此研究探究具有27 G薄壁針之各個注射器模型及各個柱塞(塞子)製造商及模型如何影響系統之機械性質及調配物隨時間之穩定性。

此研究探究預填充注射器中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 皮下液體調配物之穩定性及注射器之機械性質如何受注射器製造商及用於具有27 G TW針之注射器之柱塞(塞子)模型的影響。自此研究生成之數據可確定液體皮下抗- $\alpha 4\beta 7$ 調配物之容器/外殼組分。

實驗設計輸入展示於下表19中，而常數展示於表20中。利用表19中所示之輸入來建立實驗設計。

所進行之實驗之清單展示於表21中。

**表19. 活性調配物之DOE變數及水準**

變數	值			
注射器製造商	A	B	C	
柱塞(塞子)類型	4432	4023經塗佈	D	E

**表20. 活性調配物之常數**

常數	值
蛋白質濃度(mg/mL)	160
精胺酸濃度(mM)	125
組胺酸濃度(mM)	50
檸檬酸鹽濃度(mM)	25
PS80 (%)	0.2
pH值	6.5

表21. 實驗明細

輪次編號	注射器	柱塞(塞子)
1	B	D
2	B	4432
3	A	4432
4	B	4023經塗佈
5	A	D
6	C	4023經塗佈
7	A	4023經塗佈
8	C	D
9	C	4432
10	C	E

將濃縮抗- $\alpha 4\beta 7$ 調配物外加聚山梨醇酯80且稀釋降至160 mg/mL。起始調配物之組成展示於下表22中。

表22. 起始調配物緩衝劑明細

蛋白質(mg/ml)	總組胺酸(mM)	總檸檬酸鹽(mM)	精胺酸(mM)	pH值
180	50	25	125	6.3

為了稀釋所要調配物組成中之物質，製備PS80於25 mM檸檬酸鹽、50 mM組胺酸及125 mM精胺酸(pH 6.3)中之儲備溶液。

表23. 儲備溶液明細

賦形劑	濃度
PS 80 (%)於組胺酸/精胺酸/檸檬酸鹽緩衝劑中，pH 6.3	1.68

調配物之稀釋方案詳述於表24中。

表24. 稀釋明細

起始調配物於組胺酸、精胺酸、檸檬酸鹽緩衝劑中(mL)	PS80於組胺酸/精胺酸/檸檬酸鹽緩衝劑中(mL)	總體積(mL)
78	10 (1.68%)	88

基於稀釋方案進行混合，且應稱重起始調配物，而其他儲備溶液可按體積吸取。過濾調配物。將0.5 mL調配物等分試樣至儘可能多之1 mL長注射器中。藉由加塞機塞住注射器，留有2 mm至4 mm氣泡。在各時間點，一個注射器以針向下來儲存(水平位置)。

在5°C、25°C/60% RH及40°C/75% RH下在第1個月、第3個月、第6個月、第9個月(視情況可選)、第12個月、第18個月及第24個月時測試注射器。

在第1、3、6、9、12、18、24個月(5°C)；第1、3、6、9、12、18個月(25°C)；第1、3、6、9、12個月(40°C)；及第1、3個月(40°C)時分析測試液體調配物(濃度、重量莫耳滲透濃度、pH值、英斯特朗、MFI、SEC及/或CEX)。

## 實例8

### 分析塑膠預填充注射器中之皮下抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物

開始此研究以調查塑膠注射器作為抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體皮下調配物之容器/外殼系統之用途。研究候選塑膠預填充注射器中之代表性抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體皮下調配物的穩定性。自此研究生成之數據有助於判斷使用塑膠注射器用於液體皮下抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之適用性。

如下所示製備穩定性測試樣品。在40°C/75% RH、25°C/60% RH及5°C之儲存條件下進行穩定性測試。

用表26中所示之液體皮下抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物測試表25中之兩種類型之塑膠注射器及一種玻璃注射器(對照物)。表27展示實驗中待測試之各組樣品之明細。

### 表25. 塑膠注射器

		樣品1 塑膠注射器1	樣品2 塑膠注射器2	樣品3 玻璃注射器 (對照物)
注射器	供應商	F	B	A
	組分	注射器：聚合物 針：27 G(TW) 剛性針罩	注射器：聚合物 針：26 G(RW) 魯爾(Luer)鎖定端帽	注射器：玻璃 針：27 G(TW) 剛性針罩
	矽塗層	無	有	有
柱塞	供應商	F	F	←
	產品描述	1 mL材料A	1 mL材料B	←
	矽塗層	無	有	←

表26. 抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體皮下調配物(pH 6.5)

組分	組成
抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體	160 mg/mL
精胺酸	125 mM
組胺酸	50 mM
檸檬酸鹽	25 mM
PS80(蛋白質莫耳比)	1.5 (0.2 w/v%)

表27. 樣品明細

樣品 編號	塑膠 注射 器供 應商	蛋白質 (MW:150000)		精胺酸 (MW:174.20) (mM)	組胺酸 (MW:155.15) (mM)	檸檬酸鹽 (MW:210.14) (mM)	PS 80 (MW:1309.68)		pH值
		(mg/ml)	(mM)				(w/v%)	蛋白質 莫耳比	
1	F	160	1.067	125	50	25	0.21	1.5	6.5
2	B	160	1.067	125	50	25	0.21	1.5	6.5
3 (對照物)	A	160	1.067	125	50	25	0.21	1.5	6.5

先前製備之液體皮下抗- $\alpha 4\beta 7$ 調配物用於此研究。過濾調配物。取樣用於品質測試之經過濾溶液作為「填充前」樣品(Appearance, MFI, DLS)。將0.5 mL調配物等分試樣至1 mL塑膠注射器中。藉由真空加塞機

塞住注射器。注射器以針向下來儲存。

進行初始檢查以量測pH值、重量莫耳滲透濃度、密度、黏度及蛋白質濃度。在40°C下1週後；40°C下2週後；5°C、25°C及40°C下1個月後；5°C及25°C下3個月後；5°C及25°C下6個月後；5°C及25°C下9個月後；及5°C及25°C下12個月後進行分析測試(外觀、SEC(聚集體、單體、LMW)、CEX(酸性、主要、鹼性)、滑動力、MFI、DLS及/或重量)。

在5°C及25°C下第1個月、第3個月、第6個月、第9個月及第12個月時採集樣品。在40°C下第1週、第2週及第1個月時採集樣品。

### 實例9：

在5°C及25°C下在各個時間點(可包括第0、1、3、6及12個月)分析樣品之外觀、注射力、SEC、CEX及微流成像。如藉由SEC及CEX量測的調配物之穩定性類似於實例1及實例2中所論述之穩定性。在注射力測試中，量測滑動力(表28)。統計模型確定影響滑動力之唯一重要因素為注射器製造商，其中A之滑動力比B高，B大於C(圖17)。在5°C下12個月及25°C下6個月內注射器之滑動力的變化小於10 N，但大多小於5 N。

表28

輪次編號	注射器製造商	針尺寸	柱塞(塞子)類型	PS80:蛋白質莫耳比	初始滑動力(N)
1	C	27G	D	1	19.2
2	B	27G	D	1	22.9
3	A	29GTW	E	1	25.0
4	C	27G	E	1	18.5
5	B	27G	E	1	22.7
6	A	29GTW	E	1.5	28.8
7	C	27G	E	1.5	18.7
8	B	27G	E	1.5	23.7

## 實例10

### 分析用於填充有抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之27 G薄壁針注射器之預填充注射器組分

此研究探究具有27 G薄壁針之各個注射器製造商及各個柱塞(塞子)製造商及彈性體材料如何影響預填充注射器系統之機械性質及調配物隨時間之穩定性。

用27 G ½"薄壁針及含有160 mg/mL蛋白質、125 mM精胺酸、50 mM組胺酸、25 mM檸檬酸鹽、0.2% PS80(pH 6.5)之調配物測試三個不同注射器製造商及4種不同柱塞(塞子)模型。所產生及測試之所有樣品均展示於表29中。

**表29. 實驗明細**

輪次編號	注射器	柱塞(塞子)
1	B	F
2	B	D
3	A	D
4	B	E
5	A	F
6	C	E
7	A	E
8	C	F
9	C	D
10	C	G

在5°C、25°C及40°C下在各個時間點(可包括第0、1、3、6及12個月)分析樣品之外觀、注射力、SEC、CEX及微流成像。如藉由SEC及CEX量測的調配物之穩定性類似於實例1及實例2中所論述之穩定性。在注射力測試中，量測脫開力及滑動力。起始時間點之結果展示於表30中。

表30

輪次 編號	注射器 製造商	柱塞(塞 子)類型	初始 滑動 力(N)	初始 脫開 力(N)	在5°C下 12個月時 之脫開力 (N)	在25°C下 12個月時 之脫開力 (N)	在40°C下 12個月時 之脫開力 (N)
1	B	F	12.0	4.0	3.8	12.9	28.7
2	B	D	11.9	3.9	4.6	12.4	36.0
3	A	D	7.0	4.0	6.5	5.1	6.4
4	B	E	13.9	4.5	4.7	5.8	17.2
5	A	F	5.7	4.1	3.0	17.5	23.9
6	C	E	6.7	4.1	5.0	5.8	11.4
7	A	E	7.9	7.6	4.3	10.4	6.1
8	C	F	6.3	4.2	4.1	15.0	33.3
9	C	D	5.9	4.8	3.9	4.4	10.0
10	C	G	7.2	4.6	6.1	9.8	13.0

統計模型展示注射器製造商A與C類似且滑動力比製造商B低，而柱塞(塞子)E之滑動力比其他柱塞(塞子)略高。

一般而言，初始脫開力在測試之所有樣品間均類似。

在5°C、25°C及40°C下12個月內，滑動力不顯著變化。然而，具有柱塞(塞子)F之注射器之脫開力在25°C及40°C下至12個月時有增加。

#### 實例11

##### 分析預填充注射器中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物

此研究確定不同水準之蛋白質濃度、聚山梨醇酯80濃度、檸檬酸鹽濃度及pH值如何影響預填充注射器模式中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物。

在JMP中用兩個水準之蛋白質濃度(60至160 mg/mL)、pH值(6.0至6.3)、聚山梨醇酯80:蛋白質莫耳比(0.723至1.5)及檸檬酸鹽濃度(0至25 mM)的分級析因(fraction factorial)產生部分實驗設計。此等調配物具有

恆定值之組胺酸濃度(50 mM)及精胺酸(125 mM)(調配物1至調配物8)。添加具有25 mM組胺酸之此等調配物之變化形式(調配物9至調配物10)。

開發另一組調配物以探究不存在組胺酸且僅檸檬酸鹽充當緩衝劑的情況下的調配物(調配物11至調配物16)。所探究之所有調配物之輸入水準均展示於表31中。用於所有調配物之常數均展示於表32中。

**表31. DOE變數及水準**

變數	標稱值	
	低	高
蛋白質濃度(mg/mL)	60	160
pH值	6.0	6.3
PS80:蛋白質莫耳比	0.723	1.5
檸檬酸鹽濃度(mM)	0	40
組胺酸濃度(mM)	0	50

**表32. 常數**

常數	值
精胺酸濃度(mM)	125

表33列出待測試之調配物。

**表33. 調配物明細**

調配物 編號	蛋白質 (mg/ml)	蛋白質 (mM)	組胺酸 (mM)	精胺酸 (mM)	PS 80 %	pH值	PS80: 蛋白質 莫耳比	抗氧化劑	抗氧化劑 濃度 (mM)
1	60	0.400	50	125	0.038	6.3	0.723	檸檬酸	25
2	60	0.400	50	125	0.079	6.3	1.5	檸檬酸	0
3	157	1.047	50	125	0.206	6.3	1.5	檸檬酸	25
4	160	1.067	50	125	0.101	6.3	0.723	檸檬酸	0
5	60	0.400	50	125	0.079	6.0	1.5	檸檬酸	25
6	110	0.733	50	125	0.069	6.0	0.723	檸檬酸	0
7	160	1.067	50	125	0.101	6.0	0.723	檸檬酸	25

8	160	1.067	50	125	0.210	6.0	1.5	檸檬酸	0
9*	160	1.067	25	125	0.101	6.0	0.723	檸檬酸	25
10*	160	1.067	25	125	0.140	6.0	1	檸檬酸	25
11	160	1.067	0	125	0.101	6.3	0.723	檸檬酸	40
12	160	1.067	0	125	0.210	6.3	1.5	檸檬酸	40
13	60	0.400	0	125	0.079	6.3	1.5	檸檬酸	40
14*	160	1.067	0	125	0.210	6.1	1.5	檸檬酸	40
15*	160	1.067	0	125	0.210	6.6	1.5	檸檬酸	40
16*	160	1.067	0	125	0.140	6.3	1	檸檬酸	40

自含有抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之起始儲備調配物產生各調配物且用各種賦形劑儲備溶液稀釋。為了達成合理的稀釋體積，所用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體儲備溶液展示於表34中。進行兩種不同TFF操作以獲得調配物TFF 1及2。在透析中使用一部分TFF 1以達成調配物標記之「透析」。

表34. 起始調配物緩衝劑明細

起始調配物	蛋白質 (mg/ml)	總組胺酸 (mM)	總檸檬酸鹽 (mM)	精胺酸 (mM)	pH值
TFF 1	192.1	50	0	125	6.1
TFF 2	206.1	0	40	125	6.3
透析	169.65	25	25	125	6.0

為了稀釋所要調配物組成中之物質，製備由表35指定之濃度的各賦形劑於水中之儲備溶液。

表35. 儲備溶液明細

賦形劑	濃度
組胺酸(mM)	220
精胺酸鹽酸鹽(mM)	625
PS 80 (%)	2.5
組胺酸鹽酸鹽(mM)	600
檸檬酸(mM) (pH 6.3)	1500
檸檬酸(mM) (pH 6.0)	1500

檸檬酸鹽(mM)	600
檸檬酸鈉(mM)	800

調配物之稀釋方案詳述於表36及表37中。

表36. 稀釋明細

	起始調配物(μL)	起始調配物(mg)	組胺酸(μL)	組胺酸鹽(μL)	精胺酸(μL)	檸檬酸鹽溶液(μL)	PS80(μL)	WFI(μL)
1	4685.06	4961.01	1612.2	268.4	2063.0	250	227.3	5894.0
2	4685.06	4961.01	1612.2	268.4	2063.0	0	471.6	5899.7
3	12259.2	12981.31	724.1	0.0	548.2	250.0	1234.0	0.0
4	12493.49	13229.36	696.7	0.0	501.3	0	606.2	702.4
5	4685.06	4961.01	1002.8	491.9	2063.0	250	471.6	6035.7
6	8589.28	9095.18	545.0	334.4	1282.1	0	416.7	3832.4
7	12493.49	13229.36	87.2	176.9	501.3	250	606.2	884.9
8	12493.49	13229.36	87.2	176.9	501.3	0	1257.6	483.5
9	12260.8	12941.30	38.2	16.8	147.8	12.3	525.3	0.0
10	12260.8	12941.30	38.2	16.8	147.8	12.3	726.6	0.0

表37. 稀釋明細

	起始調配物(μL)	起始調配物(mg)	檸檬酸鹽(μL)	檸檬酸鈉(μL)	精胺酸(μL)	PS80(μL)	WFI(μL)
11	9315.87	9944.69	8.3	128.0	536.8	484.9	1526.1
12	9315.87	9944.69	8.3	128.0	536.8	1006.1	1005.0
13	3493.45	3729.26	30.5	402.5	1701.3	377.3	5995.0
14	5822.42	6215.43	22.0	67.4	335.5	628.8	623.9
15	5822.42	6215.43	0.0	300.0	335.5	628.8	413.3
16	5822.42	6215.43	5.2	80.0	335.5	419.2	837.7

基於稀釋方案進行混合，且稱重起始調配物，而其他儲備溶液按體積吸取。過濾調配物。將0.5 mL調配物等分試樣至儘可能多之1 mL長注射器中。藉由加塞機塞住注射器。注射器以針向下來儲存。

初始；及在40°C下第1週；40°C下第2週；25°C及40°C下第1個月；

5°C及25°C下第2個月；5°C及25°C下第3個月；5°C及25°C下第6個月；5°C及25°C下第9個月；及5°C及25°C下第12個月時以分析方式(外觀、pH值、重量莫耳滲透濃度、密度、DLS、SEC、CEX及/或Brightwell)測試液體調配物。

亦進行根據表38之特定調配物拉伸。

表38：特定調配物拉伸

調配物	溫度	第1週	第2週	第1個月	第2個月	第3個月	第6個月	第9個月	第12個月	額外
1	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
2	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
3	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
4	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
5	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
6	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
7	5	--	--	--	X	X	X	X	X	0
8	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
9	5	--	--	--	--	--	--	--	--	3
10	5	--	--	--	X	X	X	--	X	0
11	5	--	--	--	--	--	--	--	--	5
12	5	--	--	--	X	--	--	--	--	4
13	5	--	--	--	--	--	--	--	--	5
14	5	--	--	--	X	--	--	--	--	1
15	5	--	--	--	--	--	--	--	--	2
16	5	--	--	--	X	--	--	--	--	1
1	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
2	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
3	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
4	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
5	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
6	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
7	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
8	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1

9	25	--	--	X	--	--	--	--	--	3
10	25	--	--	X	X	--	X	--	--	0
11	25	--	--	X	--	--	--	--	--	5
12	25	--	--	X	X	--	--	--	--	4
13	25	--	--	X	--	--	--	--	--	6
14	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
15	25	--	--	X	--	--	--	--	--	2
16	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
1	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
2	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
3	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
4	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
5	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
6	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
7	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
8	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
9	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
10	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
11	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
12	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
13	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
14	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
15	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
16	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0

## 實例12

測試含有160 mg/mL蛋白質、50 mM組胺酸、25 mM檸檬酸鹽、125 mM精胺酸之調配物(pH 6.5)於玻璃注射器或兩種不同COP塑膠注射器中的穩定性。在5°C及25°C下12個月之後，聚集體及單體之量在塑膠與玻璃注射器間相當。

表39

調配物編號	PS80: 蛋白質 莫耳比	注射器材料	在5°C下12個月之後的SEC聚集體之變化(%)	在25°C下12個月之後的SEC聚集體之變化(%)	在5°C下12個月之後的單體之量(%)	在25°C下12個月之後的單體之量(%)
1	1.5	COP製造商1	0.2	1.0	98.3	96.8
2	1.5	COP製造商2	0.2	1.6	98.3	96.9
3	1.5	玻璃	0.2	1.4	98.4	96.8
4	1	玻璃	0.2	1.6	98.3	96.8

### 實例13：藉由皮下及肌內注射投與之維多珠單抗之生物可用性

完成藉由皮下及肌內注射向健康男性個體投與之維多珠單抗之生物可用性的第I期研究。總共42個健康男性參加該研究。將該等個體分成各14個個體之三組(皮下、肌內及靜脈內投與)。在一天時間內向個體投與180 mg維多珠單抗。劑量自60 mg/ml抗體於50 mM組胺酸、125 mM精胺酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH 6.3)中之凍乾調配物復原。對於肌內及皮下個體，將劑量分成各1.5 ml之兩次注射。取樣血液以測定血漿維多珠單抗濃度且測定各組個體中之維多珠單抗之生物可用性。

既未報導嚴重不利事件或重大感染、臨床上顯著異常、陽性主觀/客觀RAMP檢核表，亦未報導臨床上顯著之ECG結果。

完成PK/PD模型化及模擬以測定血管外劑量之劑量及方案，該血管外劑量產生與靜脈內劑量類似之暴露，以便維持此所要血清濃度於最低含量下。

吸收曲線(圖18)展示肌內及皮下劑量之濃度通常重疊。此等投與途徑之吸收曲線不存在顯著總體差異。維多珠單抗之絕對生物可用性在SC注射之後大致為75%且在IM注射之後大致為80%。

#### 實例14.模型化皮下劑量方案

完成PK/PD模型化及模擬以測定血管外劑量之劑量及方案，該血管外劑量產生與靜脈內劑量類似之暴露，以便維持某些血清濃度於最低含量下。

最終組合數據集(IV、SC及IM數據)展示就清除率(CL)及中心分佈體積(V2)、外周分佈體積(V3)、血管外途徑相關吸收率常數(KA)及血管外劑量之相對生物可用性(與靜脈內投與相比)(F)而言參數化的二室線性模型。IIV術語包括於CL、V2及V3上，體重為經由異速生長效應影響CL及V3的唯一共變數。

經由靴帶式參數估計、可見預測性檢查及擬合曲線良好性顯現模型可接受性及可預測性。對模型之分析確定體重為維多珠單抗之PK之預測因子，PK之變異性歸因於個體間及個體組分內之變異性。

一旦證明模型適用於模擬，則進行模擬以便評估投與途徑(IV、IM或SC)對穩態最低濃度之效應，且評估給藥頻率(每週、每2週、每4週及每8週)對穩態最低濃度之效應。基於此等值及維多珠單抗在IM及SC投與之後之相對生物可用性(F=69.5%)，選擇劑量以達成與IV劑量類似之最低濃度。

模擬使劑量及方案模型化以匹配靜脈內誘導及維持方案。目標為暴露(血清藥物濃度-時間曲線下面積(AUC))及最低藥物濃度兩者。表40至表43提供模擬結果。

表40. 匹配在第0週至第6週期間IV AUC之誘導方案

途徑	劑量	頻率
IV	300 mg	第0週及第2週
SC	485 mg	第0週及第2週

SC	160 mg	每隔一天(6個劑量)
SC	>160 mg	每週(6個劑量)

表41. 匹配第0週至第6週IV最低濃度之誘導方案

途徑	劑量	頻率
IV	300 mg	第0週及第2週
SC	>160 mg	第0週及第2週
SC	100 mg	每週(6個劑量)
SC	160 mg	每隔一天(持續2週)

表42. 匹配每4週300 mg IV劑量之維持方案

頻率	途徑	匹配4週IV穩態最低濃度之劑量	匹配4週IV AUC之劑量
每4週一次	IV	300	300
	IM	432	432
	SC	432	432
每2週一次	IV	115	150
	IM	165	216
	SC	165	216
每週	IV	50	75
	IM	72	108
	SC	72	108

表43. 匹配每8週300 mg IV劑量之維持方案

頻率	途徑	匹配8週IV穩態最低濃度之劑量	匹配8週IV AUC之劑量
每8週一次	IV	300	300
	IM	432	432
	SC	432	432
每4週一次	IV	90	150
	IM	125	216
	SC	125	216
每2週一次	IV	35	75
	IM	50	108
	SC	50	108

每週	IV	15	37.5
	IM	22	54
	SC	22	54

### 實例15：第2a期多劑量研究

第2a期多劑量研究可評估維多珠單抗在藉由皮下投與途徑投與維多珠單抗多個劑量之後的安全性、可耐受性及穩態PK，且評估皮下方案與靜脈內方案相比之相對生物可用性。可評估HAHA之發展及HAHA之中和及多個劑量之維多珠單抗在皮下投與之後對PD之效應。

部分Mayo計分為1至12之潰瘍性結腸炎患者及CDAI大於150之克隆氏病患者可包括於研究中。群組可接受第0週及第2週時IV投與之維多珠單抗(300 mg)之誘導方案，隨後接受以下任一維持方案：

在第6週至第22週時每4週IV投與維多珠單抗(300 mg)

在第6週至第22週時每8週IV投與維多珠單抗(300 mg)

在第6週至第22週時每週SC投與維多珠單抗(108 mg)

在第6週至第22週時每2週SC投與維多珠單抗(108 mg)

在第6週至第22週時每3週SC投與維多珠單抗(165 mg)。

可在給藥之前第1天且隨後再在第1(12小時)、2、3、5、8、15、29、43、127、127(12小時)、128、129、131、134、141及155天時收集樣品以評估PK及PD。

### 實例16：維多珠單抗用於治療IBD之長期臨床經驗

完成第2期開放標記之安全性擴展研究以評估維多珠單抗之長期藥物動力學(PK)、藥效學(PD)、安全性及功效。患者年齡為18歲至75歲，且先前參與過潰瘍性結腸炎患者之初期PK/PD/安全性研究或在篩選之36個月內具有內窺鏡檢查及/或組織病理學及/或放射學證實的IBD症狀持續至

少2個月。

所有患者均接受以下靜脈內給藥方案：在第1天、第15天及第43天投與2 mg/kg或6 mg/kg維多珠單抗(5 mg/mL抗體、20 mM檸檬酸鹽/檸檬酸、125 mM氯化鈉、0.05%聚山梨醇酯80、pH 6.0(長期儲存於-70°C且儲存於-20°C高達3個月))，隨後每8週一個劑量，持續高達總共78週。患者為未治療處理之潰瘍性結腸炎或克隆氏病患者，或參與過初期臨床試驗之潰瘍性結腸炎患者。

使用功效/生活品質(QoL)、部分Mayo計分(PMS)、克隆氏病活動性指數(CDAI)及發炎性腸病問卷(IBDQ)來評估研究結果。

#### PK結果

平均輸注前維多珠單抗濃度與劑量成比例，且在整個研究期間保持穩定及可偵測。

#### PD結果

在所有劑量水準下在整個研究期間受體(% ACT-1+[CD4+CD45RO HIGH]及% MADCAM+[CD4+CD45RO HIGH])幾乎得到完全抑制。

#### 部分Mayo計分

未治療處理之潰瘍性結腸炎患者(5.4)之基線平均PMS比潰瘍性結腸炎反覆(rollover)患者(2.3)高。至第43天，反覆及未治療處理之潰瘍性結腸炎患者之平均PMS均顯示顯著降低。至第155天，兩組之平均計分類似。平均PMS繼續降低直至第267天，且此後趨於平衡。

#### 克隆氏病活動性指數

CD患者之平均CDAI自基線處之294.6降低至第43天時之237.7，且繼續降低直至第155天(156.1)。

## IBDQ

潰瘍性結腸炎反覆患者在基線處具有最高平均IBDQ計分。至第43天，平均IBDQ計分在所有三個疾病組中均增加。平均IBDQ計分在所有3個疾病組中均繼續隨時間增加，在克隆氏病患者中在第155天時達到最大，且在未治療處理之潰瘍性結腸炎患者及潰瘍性結腸炎反覆患者中在第491天時達到最大。

## C-反應性蛋白

潰瘍性結腸炎反覆及克隆氏病患者均顯示平均CRP含量降低直至第155天且隨後趨於平衡。未治療處理之潰瘍性結腸炎患者之平均CRP含量在基線時比潰瘍性結腸炎反覆患者低(2.28相較於7.09)。未治療處理之潰瘍性結腸炎患者之平均CRP含量在所評估之所有時間點均保持相對恆定。

## 其他安全性結果

在研究期間未有全身機會性感染(包括PML)之報導。一個患者在單一時間點經測試為JC病毒血症陽性，但在所有其他時間點為JCV陰性。72個患者中有3個(4%)具有陽性HAHA結果(其中兩個為短暫性陽性)。研究顯示沒有肝毒性、淋巴球增多症或淋巴球減少症或任何其他藥物相關實驗室變化的跡象。

## 結論

以2.0 mg/kg或6.0 mg/kg每8週一次投與維多珠單抗持續高達78週達成目標受體飽和，與疾病活動性之持久平均降低及改良IBDQ計分相關，通常為安全且可充分耐受的，且顯示可接受之免疫原性。

實例17：患有中度至重度活動性潰瘍性結腸炎之患者之反應及緩解的誘導及維持

設計包含兩個隨機化雙盲多中心研究之單一試驗以評估患有中度至重度活動性潰瘍性結腸炎之患者之反應及緩解的誘導及維持。人口資料及基線疾病特徵在所有治療組間相當。

使用靜脈內投與之誘導研究將安慰劑與維多珠單抗(在自於50 mM組胺酸、125 mM精胺酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH 6.3)中之60 mg/mL抗體之凍乾調配物復原之300 mg劑量下)相比較，終點為2個劑量之維多珠單抗後第6週時。

使用與誘導研究相同之調配物及投與途徑的維持研究將安慰劑與每四週給藥之維多珠單抗及安慰劑與每八週給藥之維多珠單抗相比較。此研究之終點為在第52週時分析誘導反應者群體。

在研究期間收集血液樣品以量測維多珠單抗之濃度。在誘導期結束時維多珠單抗之平均血清濃度為20 µg/mL至30 µg/mL。30分鐘靜脈內輸注300 mg劑量之後的穩態下平均維多珠單抗最低血清濃度在每8週1次方案中為9 µg/mL至13 µg/mL且在每4週1次方案中為35 µg/mL至40 µg/mL。在輸注結束時，維多珠單抗中值血漿濃度在每8週1次方案中為98 µg/mL至101 µg/mL且在每4週1次中為約129 µg/mL至137 µg/mL。

誘導及維持研究之反應的概述提供於表44至表47中。與安慰劑相比，在第6週時，顯著更大比例之維多珠單抗治療之患者達成臨床反應、緩解及黏膜癒合(表44)。誘導期欲治療群體中有39%具有先前抗-TNF $\alpha$ 失敗。在具有先前抗-TNF失敗之患者及無先前抗-TNF暴露之患者中，維多珠單抗患者之臨床反應及緩解率均高於安慰劑患者。在直至第6週之初步分析中，安慰劑組中導致研究中止之不利事件(AE)、嚴重AE及不利事件之比率高於維多珠單抗組。與安慰劑患者相比，顯著更大比例之維多珠單

抗患者在第52週時達成臨床緩解、黏膜癒合及無皮質類固醇之緩解，且達成持久反應及緩解(表45)。維持研究群體中有32%具有先前抗-TNF $\alpha$ 失敗。在TNF失敗及未經TNF處理之患者中，維多珠單抗之臨床緩解及持久臨床反應率均比安慰劑大。在第0週至第52週中，在安全性群體(N=895)中，不利事件(AE)、嚴重AE及嚴重感染之比率在維多珠單抗與安慰劑組之間類似。在維多珠單抗組中未觀測到機會性感染或腸道感染之比率的增加。

表44：誘導研究結果--主要及關鍵次要終點

功效終點	安慰劑	維多珠單抗	差異/RR	P值
臨床反應(%)	25.5%	47.1%	21.7%/1.8	<0.0001
臨床緩解(%)	5.4%	16.9%	11.5%/3.1	0.0010
黏膜癒合(%)	24.8%	40.9	16.1%/1.6	0.0013

表45：維持研究結果--主要及關鍵次要終點

功效終點	安慰劑 N=126	VDZ Q8 N=122	VDZ Q4 N=125	差異/RR Q8相較於安慰劑 Q4相較於安慰劑	P值
臨床緩解(%)	15.9	41.8	44.8	26.1/2.7 29.1/2.8	<0.0001 <0.0001
持久反應(%)	23.8	56.6	52.0	32.8/2.4 28.5/2.2	<0.0001 <0.0001
黏膜癒合(%)	19.8	51.6	56.0	32.0/2.6 36.3/2.8	<0.0001 <0.0001
持久緩解(%)	8.7	20.5	24.0	11.8/2.4 15.3/2.8	0.0090 0.0011
無皮質類固醇 之緩解(%)	13.9 n=72	31.4 n=70	45.2 N=73	17.6/2.3 31.4/3.3	0.0133 <0.0001

表46：誘導研究：ITT群體中具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗及不具有抗-TNF暴露之患者在第6週時之臨床反應及緩解

具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗之患者(39%)				
終點	安慰劑 N=63	維多珠單抗 N=82	差異	95% CI
臨床反應(%)	20.6	39.0	18.4	3.9, 32.9
臨床緩解(%)	3.2	9.8	6.6	-9.8, 22.8
不具有抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑暴露之患者(55%)				
	安慰劑 N=76	維多珠單抗 N=130	差異	95% CI
臨床反應(%)	26.3	53.1	26.8	13.7, 39.9
臨床緩解(%)	6.6	23.1	16.5	2.4, 30.2

表47：在第52週時之臨床緩解及持久臨床反應：ITT群體中具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗或不具有抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑暴露之患者

具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗之患者(32%)					
終點	安慰劑 N=38	VDZ 每8週1次 N=43	VDZ 每4週1次 N=40	差異 每8週1次相較於安慰劑 每4週1次相較於安慰劑	95% CI
臨床緩解(%)	5.3	37.2	35.0	31.9 29.7	10.3, 51.4 7.4, 49.4
持久臨床反應(%)	15.8	46.5	42.5	30.7 26.7	11.8, 49.6 7.5, 45.9
不具有抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑暴露之患者(60%)					
	安慰劑 N=79	VDZ 每8週1次 N=72	VDZ 每4週1次 N=73	差異 每8週1次相較於安慰劑 每4週1次相較於安慰劑	95% CI
臨床緩解(%)	19.0	45.8	47.9	26.8 29.0	12.4, 41.2 14.6, 43.3
持久臨床反應(%)	26.6	65.3	56.2	38.7 29.6	24.0, 53.4 14.6, 44.6

實例18：患有中度至重度活動性克隆氏病之患者之反應及緩解的誘導及維持設計包含兩個隨機化雙盲多中心研究之單一試驗以評估患有中度至重度活動性克隆氏病之患者之反應及緩解的誘導及維持。人口資料及基線疾病特徵在所有治療組間相當。

使用靜脈內投與之誘導研究將安慰劑與維多珠單抗(在自於50 mM組胺酸、125 mM精胺酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH 6.3)中之60 mg/mL抗體之凍乾調配物復原之300 mg劑量下)相比較，終點為2個劑量之維多珠單抗後第6週時。

使用與誘導研究相同之調配物及投與途徑之維持研究將安慰劑與每四週給藥之維多珠單抗及安慰劑與每八週給藥之維多珠單抗相比較。此研究之終點為在第52週時分析誘導反應者群體。

令人驚訝的是，此研究顯示每4週1次及每8週1次組產生極類似結果。誘導及維持研究之反應的概述提供於表48至表51中。與安慰劑相比，顯著更大比例之維多珠單抗治療之患者達成臨床緩解及增加反應(表48)。在具有先前抗-TNF失敗之患者及無先前抗-TNF暴露之患者中，維多珠單抗患者之臨床緩解及提高反應率均高於安慰劑患者。不利事件(AE)、嚴重AE及嚴重感染之比率在維多珠單抗與安慰劑組之間類似。在維多珠單抗組中未觀測到機會性感染或腸道感染之比率的增加。

表48：誘導研究結果--主要及次要終點

終點	安慰劑 N=148	維多珠單抗 N=220	調整差異/RR	P值
臨床緩解%)	6.8%	14.5%	7.8%/2.1	0.0206
提高反應(%)	25.7%	31.4%	5.7%/1.2	0.2322
平均CRP變化(µg/mL)	-3.6 N=147	-2.9 N=220		0.9288

表49：維持研究結果--主要及關鍵次要終點

功效終點	安慰劑 N=153	VDZ Q8 N=154	VDZ Q4 N=154	調整差異/RR Q8相較於安慰劑 Q4相較於安慰劑	P值
臨床緩解(%)	21.6	39.0	36.4	17.4/1.8 14.7/1.7	0.0007 0.0042
提高反應(%)	30.1	43.5	45.5	13.4/1.4 15.3/1.5	0.0132 0.0053
無皮質類固 醇之緩解(%)	15.9 N=82	31.7 N=82	28.8 N=80	15.9/2.0 12.9/1.8	0.0154 0.0450
持久緩解(%)	14.4	21.4	16.2	7.2/1.5 2.0/1.1	0.1036 0.6413

表50：ITT群體中具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗及不具有抗-TNF暴露之患者在第6週時之臨床緩解及提高反應

具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗之患者(48%)				
終點	安慰劑 N=70	維多珠單抗 N=105	差異	95% CI
臨床緩解(%)	4.3	10.5	6.2	(-9.1, 21.3)
提高反應(%)	22.9	23.8	1.0	(-11.8, 13.7)
不具有抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑暴露之患者(50%)				
	安慰劑 N=76	維多珠單抗 N=130109	差異	95% CI
臨床緩解(%)	9.2	17.4	8.2	(-1.4, 17.9)
提高反應(%)	30.3	42.2	11.9	(-1.9, 25.8)

表51：在第52週時之臨床緩解及提高反應：ITT群體中具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗或不具有抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑暴露之患者

具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗之患者(51%)					
終點	安慰劑 N=78	VDZ 每8週1次 N=82	VDZ 每4週1次 N=77	差異 每8週1次相較於安慰劑 每4週1次相較於安慰劑	95% CI

臨床緩解(%)	12.8	28.0	27.3	15.2 14.5	(3.0, 27.5) (2.0, 26.9)
提高反應(%)	20.5	29.3	37.7	8.8 17.1	(-4.6, 22.1) (3.1, 31.2)
不具有抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑暴露之患者(45%)					
	安慰劑 N=71	VDZ 每8週1次 N=66	VDZ 每4週1次 N=71	差異 每8週1次相較於安慰劑 每4週1次相較於安慰劑	95% CI
臨床緩解(%)	26.8	51.1	46.5	24.8 19.7	(8.9, 40.6) (4.2, 35.2)
提高反應(%)	38.0	60.6	53.5	22.6 15.5	(6.3, 38.9) (-0.7, 31.7)

### 實例19：患有中度至重度活動性克隆氏病之患者之反應及緩解的誘導

完成隨機化雙盲安慰劑對照多中心研究以在評估300 mg劑量下之維多珠單抗(自於50 mM組胺酸、125 mM精胺酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH 6.3)中之60 mg/mL抗體之凍乾調配物復原)在TNF $\alpha$ 拮抗劑失敗患者中在第6週時(在2個劑量--第0週及第2週之後)及在第10週時(在3個劑量之後)之誘導效應。研究由416個患者組成，其中75%為TNF $\alpha$ 拮抗劑失敗的，且其中25%為未經TNF $\alpha$ 處理的。使治療組間的人口資料及伴隨IBD藥物平衡。亦使治療組間的基線疾病特徵平衡，但不使基線疾病活動性平衡。

研究所指定之主要終點為抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗群體的第6週緩解(%)。評估(依序測試程序)之關鍵次要終點為：總群體之第6週緩解(%)，抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗及總群體之第10週緩解(%) (使用Hochberg程序)，抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗及總群體之第6週及第10週持續緩解(%) (使用Hochberg程序)，及抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗群體之第6週提高反應(%)。

### 表52：基線CDAI：

	安慰劑	維多珠單抗	p值
TNF ITT：平均(標準差)	306.1 (55.43)	316.1 (52.63)	0.0945
總ITT：平均(標準差)	301.3 (54.97)	313.9 (53.17)	0.0153

表53：誘導研究結果：主要及關鍵次要終點

終點	TNF ITT (N=315)				總ITT (N=416)			
	PLA N=157	VDZ V=158	差異 (RR)	P-值	PLA N=207	VDZ N=209	差異 (RR)	P-值
主要第6週緩解	12.1 %	15.2 %	3.0 % (1.2)	0.4332				
第1次要第6週緩解					12.1 %	19.1 %	6.9 % (1.6)	0.0478
第2次要第10週緩解	12.1 %	26.6 %	14.4 % (2.2)	0.0012	13 %	28.7 %	15.5 % (2.2)	<0.0001
持續緩解(第6週及第10週兩者)	8.3 %	12.0 %	3.7 % (1.4)	0.2755	8.2 %	15.3 %	7% (1.9)	0.0249
提高反應 (CDAI100)	22.3 %	39.2 %	16.9% (1.8)	0.0011				

表54：未經抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑處理之患者之結果(n=101，總體之24%)

	安慰劑%	維多珠單抗%	差異%	95% CI
第6週緩解	12	31.4	19.1	(3.3, 35.0)
第10週緩解	16	35.3	19.2	(2.4, 35.8)

表55：研究結果：關鍵子組--先前Tx失敗、ITT總體在第6週及第10週時之臨床緩解

子組	變數	安慰劑	VDZ	差異	95% CI
任何先前抗-TNF失敗(ITT之75%)	N	156	155		
	第6週緩解(%)	12.8	14.8	2	(-5.7, 9.7)
	第10週緩解(%)	12.8	26.5	13.6	(4.9, 22.3)
先前免疫調節劑失敗而非抗-TNF失敗(21% ITT)	N	45	44		
	第6週緩解(%)	11.1	31.8	20.7	(-0.5, 39.7)
	第10週緩解(%)	15.6	31.8	16.3	(-1.1, 33.6)

僅先前皮質類固醇 失敗(3% ITT)	N	5	9		
	第6週緩解(%)	0	33.3	33.3	(-23.9, 75.7)
	第10週緩解(%)	0	44.4	44.4	(-13.4, 85.3)

研究顯示TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗患者需要3個劑量來誘導緩解。TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗患者之緩解率在第6週與第10週之間增加，但僅在維多珠單抗組(而非安慰劑)中如此。未經TNF- $\alpha$ 拮抗劑處理之患者之緩解率在第6週與第10週之間實質上不增加。在具有高疾病嚴重程度之TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗群體之中，43%從不對TNF- $\alpha$ 拮抗劑有反應，且45%喪失反應。

#### 實例20：穩定性

測試多種不同抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物在5°C下6至24個月之過程內之穩定性(表6及表7)。pH值為6.0至6.2之調配物在6個月之後及在24個月時展示大致小於4%的主要物質降解。

藉由SEC測試多種不同抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物持續高達24個月之穩定性(表4及表5)。具有60 mg/mL蛋白質濃度且含有25 mM檸檬酸鹽之調配物在2年之後的聚集體變化為0.1%至0.2%，而含有160 mg/mL蛋白質及25 mM檸檬酸鹽之調配物在2年內的聚集體增加大致為0.3%。含有60 mg/mL、110 mg/mL或160 mg/mL蛋白質、無檸檬酸鹽之調配物的聚集體增加為0.6%至1.1%。在含有檸檬酸鹽、但無組胺酸之所測試調配物中，在12個月及24個月之後，存在大致0.3%至0.4%聚集體生長。

#### 實例21：測定維多珠單抗對CD4:CD8比率之效應

以自10%蔗糖之凍乾調配物復原且稀釋至0.9%生理食鹽水之輸注系統中的單次450 mg劑量之維多珠單抗治療18歲至45歲之健康個體。在單次450 mg劑量之維多珠單抗之前(基線)及5週之後藉由腰椎穿刺收集腦脊髓液(CSF)。每一個體充當其自己之對照物。

基於先前研究選擇5週時間點，該研究展示以那他珠單抗治療之具有MS之患者僅在一個劑量之後即顯示對CSF CD4+:CD8+淋巴細胞比率的效應及腦病變之數目的減少(Stuve等人，*Arch Neurol.*2006;63:1383-1387；Stuve等人，*Ann Neurol.* 2006;59:743-747；Miller等人，*N Engl J Med.* 2003;348(1):15-23)；且亦因為在5週時，450 mg劑量之維多珠單抗足以使目標飽和且提供超過與每隔4週300 mg之第3期劑量方案相關之穩態最低含量估計值的血清濃度。

自每一個體獲得約15 mL CSF用於免疫表型。若CSF樣品滿足以下準則，則將其納入分析：每樣品 $\leq 10$  RBC/ $\mu\text{L}$ (將外周血液污染減至最少)；陰性CSF培養結果；在每一流動式細胞測量術樣品中有足夠T淋巴細胞數目；及未偵測到對維多珠單抗之血清抗體。

第5週中值(34.80  $\mu\text{g/mL}$ )及個別個體血清維多珠單抗濃度(範圍24.9  $\mu\text{g/mL}$ 至47.9  $\mu\text{g/mL}$ )高於第3期劑量方案之計劃穩態最低濃度(約24  $\mu\text{g/mL}$ )。如藉由MAdCAM-1-Fc所量測，在第5週時觀測到高度(>90%) $\alpha 4\beta 7$ 受體飽和，表明在終點評估時其目標之維多珠單抗飽和。

在任何CSF樣品中均未偵測到維多珠單抗(偵測限值 = 0.125  $\mu\text{g/mL}$ )。

### 對CD4+及CD8+ T淋巴細胞數目及比率之效應

維多珠單抗不顯著減小CD4+:CD8+比率(表56)。個體中無一者具有劑量後CD4+:CD8+比率 $< 1$ ( $p < 0.0001$ (1側t檢驗))。維多珠單抗不顯著減小CSF中的CD4+或CD8+ T淋巴細胞之數目。另外，CSF % CD4+及% CD8+ T淋巴細胞不存在顯著變化(表57)。亦未觀測到外周血液WBC、CD4+及CD8+記憶性T淋巴細胞有顯著變化(表58)。

表56：治療對CSF CD4+:CD8+比率之效應(可評估群體，n=13)

	基線	第5週	CD4+:CD8+比率差異†
CD4+:CD8+比率	3.59 (0.273)	3.60 (0.265)*	0.01 (0.197)
平均(SE)範圍	1.53-5.67	1.42-5.15	
比率之90% 2-側CI	3.00-4.19	3.132, 4.077	
差異之90% 2-側CI			-0.337, 0.363

CI=置信區間

\* $p < 0.0001$  ( $H_0: \mu < 1$  對  $H_1: \mu \geq 1$  之一側一個樣品t檢驗)。

†差異定義為第5週之比率減去基線比率

表57：治療對CSF CD4+及CD8+淋巴細胞計數之效應(可評估群體，n=13)

	基線	第5週
淋巴細胞之%形式之CD4+，平均值(SD)	75.160 (7.3831)	74.215 (6.3732)
淋巴細胞之%形式之CD8+，平均值(SD)	22.272 (5.4320)	22.007 (6.1624)

表58：外周血液記憶性T淋巴細胞(RO+)計數(可評估群體，n=13)

	基線	第5週
	平均值(SD)	平均值(SD)
CD4+CD45RO+	27.85 (4.98)	27.06 (5.02)
CD8+CD45RO+(%)	11.24 (3.40)	10.78 (2.98)

### 概述

維多珠單抗在單次450 mg劑量之後不影響健康志願者之CSF CD4+及CD8+細胞計數或CD4+:CD8+比率。個體中無一者的劑量後CSF CD4+:CD8+比率減小至小於1。在CSF中未偵測到維多珠單抗。另外，未觀測到外周血液中總WBC或記憶性T淋巴細胞CD4+及CD8+子集之變化。在終點評估時，在所有個體中均出現血液中目標( $\alpha\beta 7$ )之飽和。CSF CD4+及CD8+淋巴細胞含量及比率類似於文獻中先前報導之含量及比率。

此等結果與維多珠單抗缺乏對猴之生理性 CNS 免疫監視及病理性 CNS 發炎兩者之效應一致。

雖然本發明已參考其較佳實施例進行特別展示及描述，但熟習此項技術者應瞭解，可在不悖離由隨附申請專利範圍涵蓋之本發明之範疇的情況下在其中作出形式及細節之各種改變。

表59：序列

SEQ ID NO:	所示序列	描述
1	圖1	編碼人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白之重鏈之DNA
2	圖1	人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白之重鏈之胺基酸序列
3	圖2	編碼人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白之輕鏈之DNA
4	圖2	人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白之輕鏈之胺基酸序列
5	圖3	LDP-02之成熟人類化輕鏈
6	圖4	同屬人類 $\kappa$ 輕鏈恆定區
7	圖4	同屬鼠類 $\kappa$ 輕鏈恆定區
8	參考第31頁 SYWMH	重鏈小鼠ACT-1抗體之CDR1
9	參考第31頁 EIDPSESNTNYNQKFKG	重鏈小鼠ACT-1抗體之CDR2
10	參考第31頁 GGYDGWDYAIDY	重鏈小鼠ACT-1抗體之CDR3
11	參考第31頁 RSSQSLAKSYGNTYLS	輕鏈小鼠ACT-1抗體之CDR1
12	參考第31頁 GISNRFS	輕鏈小鼠ACT-1抗體之CDR2
13	參考第31頁 LQGTHQPYT	輕鏈小鼠ACT-1抗體之CDR3
14	圖7	人類GM607 CL抗體 $\kappa$ 輕鏈可變區
15	圖7	人類21/28 CL抗體重鏈可變區

## 【序列表】

<110> 美商千禧製藥公司 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.)

<120> 抗- $\alpha 4 \beta 7$ 抗體之調配物

<150> 61/544,054

<151> 2011-10-06

<150> 61/481,522

<151> 2011-05-02

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1445

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成聚核苷酸

<400> 1

```

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgiat catcctcttc ttggtagcaa      60
cagctacagg tgtccactcc caggtgcaat tgggtgcagtc tggggctgag gttaagaagc      120
ctggggcttc agtgaagggt tcctgcaagg gtctctggcta caccttcacc agctactgga      180
tgcattgggt gaggcaggcg cctggccaac gcttagagtg gatcggagag attgatcctt      240
ctgagagtaa tactaactac aatcaaaaat tcaagggacg cgtcacattg actgtagaca      300
tttccgctag cacagcctac atggagctct ccagcctgag atctgaggac actgcggtct      360
actattgtgc aagaggggggt tacgacggat gggactatgc tattgactac tggggtaag      420
gcaccctggt caccgtcagc tcagcctcca ccaagggccc atcggctctc cccctggcac      480
ctcctccaa gaggacctct gggggcacag cgccctggg ctgcctggtc aaggactact      540
tccccgaacc ggtgacgggt tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct      600
tcccggctgt cctacagtec tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgcctt      660
ccagcagctt gggcaccagc acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca      720

```

aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc 780  
 cagcacctga actcgcgggg gcaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca 840  
 ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag 900  
 accctgaggt caagttcaac tggtagtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca 960  
 agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc accgtcctgc 1020  
 accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag 1080  
 ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca 1140  
 ccctgcccc atcccgat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca 1200  
 aaggcttcta tcccagcagc atcgcctgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca 1260  
 actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc 1320  
 tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgatg 1380  
 aggtctgca caaccactac acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt aaataatcta 1440  
 gagca 1445

<210> 2

<211> 470

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 2

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn  
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ala Ser  
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp  
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
245 250 255

Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 3

<211> 751

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成聚核苷酸

<400> 3

```
gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctglat catcctcttc ttggtagcaa      60
cagctacagg tgtccactcc gatgtagtga tgactcaaag tccactctcc ctgcctgtca      120
cccctggaga accagcttct atctcttgca ggtctagtca gagtcttgca aagagttatg      180
ggaacaccta ttgtcttgg tacctgcaga agcctggcca gtctccacag ctccctcatct      240
atgggatttc caacagattt tctgggggtgc cagacaggtt cagtggcagt ggttcagggg      300
cagatttcac actcaagatc tcgcgagtag aggctgagga cgtgggagtg tattactgct      360
tacaaggtac acatcagccg tacacgttcg gacaggggac caaggtggag atcaagcgta      420
cggtggctgc accatctgtc ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa      480
ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggcctaa gtacagtggg      540
agggtgataa cgccctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca      600
aggacagcac ctacagcctc agcagcaccg tgaccctgag caaagcagac tacgagaaac      660
acaaagtcta cgccctcgaa gtcaccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct      720
tcaacagggg agagtgttag tctagagcag c      751
```

<210> 4

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

&lt;400&gt; 4

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val  
20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu  
35 40 45

Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro  
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser  
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys  
100 105 110

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
180 185 190

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

195

200

205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 219

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列描述: 合成多肽

&lt;400&gt; 5

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser  
 20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly  
 85 90 95

Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠種

<400> 7

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 100 105

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠種

<400> 8

Ser Tyr Trp Met His

1 5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠種

&lt;400&gt; 9

Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠種

&lt;400&gt; 10

Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠種

&lt;400&gt; 11

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser

1 5 10 15

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠種

&lt;400&gt; 12

Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠種

&lt;400&gt; 13

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr

1 5

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 15

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

1 5 10 15

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

## 【發明申請專利範圍】

### 【請求項1】

一種製備包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之醫藥調配物之方法，該方法包含：  
在切向流過濾系統(tangential flow filtration system)中透濾包含該抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之第一溶液以獲得第二溶液；且  
加入聚山梨醇酯至該第二溶液，  
進而製備包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之醫藥調配物，  
其中該抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體包含：  
輕鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 11之互補決定區1(CDR1)、包含SEQ ID NO: 12之CDR2及包含SEQ ID NO: 13之CDR3；及  
重鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 8之CDR1、包含SEQ ID NO: 9之CDR2及包含SEQ ID NO: 10之CDR3。

### 【請求項2】

如請求項1之方法，其中該第二溶液包含檸檬酸(citrate)、組胺酸及精胺酸。

### 【請求項3】

如請求項1或2之方法，其中該聚山梨醇酯為聚山梨醇酯80。

### 【請求項4】

一種製備包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之醫藥調配物之方法，該方法包含：  
在切向流過濾系統中透濾第一溶液以獲得第二溶液，該第一溶液包含第一濃度之該抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體；  
加入聚山梨醇酯至該第二溶液；且  
稀釋該第二溶液以獲得第三溶液，該第三溶液包含之該抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體

之濃度較該第一濃度低；

進而製備包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之醫藥調配物，

其中該抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體包含：

輕鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 11之互補決定區1(CDR1)、包含SEQ ID NO: 12之CDR2及包含SEQ ID NO: 13之CDR3；及

重鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 8之CDR1、包含SEQ ID NO: 9之CDR2及包含SEQ ID NO: 10之CDR3。

**【請求項5】**

如請求項4之方法，其中該第三溶液包含之抗體濃度為約160 mg/ml。

**【請求項6】**

如請求項4或5之方法，其中該第二溶液包含檸檬酸(citrate)、組胺酸及精胺酸。

**【請求項7】**

如請求項4或5之方法，其中該聚山梨醇酯為聚山梨醇酯80。

**【請求項8】**

如請求項1、2、4及5中任一項之方法，其中該抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體包含：

重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:2之胺基酸20至140，及

輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:4之胺基酸20至131或SEQ ID NO:5之胺基酸21-132。

**【請求項9】**

如請求項1、2、4及5中任一項之方法，其中該抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體包含：

重鏈，其包含SEQ ID NO:2之胺基酸20至470，及

輕鏈，其包含SEQ ID NO:4之胺基酸20至238。

**【請求項10】**

如請求項1、2、4及5中任一項之方法，其中該抗體為IgG1同型。

**【請求項11】**

如請求項1、2、4及5中任一項之方法，其中該抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體為維多珠單抗(vedolizumab)。

**【請求項12】**

一種醫藥調配物，其係以如請求項1至11中任一項之方法製備。

**【請求項13】**

一種包含如請求項12之醫藥調配物之小瓶、注射器或藥筒。

## 【發明圖式】

新LDP02重鏈DNA--含有選殖位點(小寫)、Kozak序列(大寫)及前導序列(小寫)

```

gaattctcgagatcgatCTCACCatgggatggagctgtatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactcccag
gtgCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTTAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
GGTGTCTTCAAGGGTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCATTGGG
TGAGGCAGGCGCCTGGCCAACGTCTAGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCCTC
TGAGAGTAATACTAATACTACAATCAAAAATTCAAGGGACGCGTCACATTGACT
GTAGACATTTCCGCTAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTG
AGGACACTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGGTTACGACGGATGGGACTA
TGCTATTGACTACTGGGGTCAAGGCACCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCA
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGC
TGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC
ACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGA
AAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT
GCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC
CTTCTTCTCTACAGCAAGTCCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAtaatctagagca

```

新LDP02重鏈蛋白(VHL、VH與人類IgG1-FcRmut之間的間隙)

```

MGWSCILFLVATATGVHS
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEIDP
SENTNYNQKFKGRVTLTVDISASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGWDY
AIDYWGQGTLLTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

```

【圖 1】

新LDP02輕鏈DNA--含有選殖位點(小寫)、Kozak序列(大寫)及前導序列(小寫)

gaattctcgagatcgatCTCACatgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgat  
GTAGTGATGACTCAAAGTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCTGGAGAACCAGC  
TTCTATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGTCTTGCAAAGAGTTATGGGAACACCT  
ATTTGTCTTGGTACCTGCAGAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTAT  
GGGATTTCCAACAGATTTTCTGGGGTGCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGTT  
CAGGGACAGATTTCACTCAAGATCTCGCGAGTAGAGGCTGAGGACGTGGG  
AGTGTATTACTGCTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACGTTCCGGACAGGGG  
ACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC  
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA  
ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT  
CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG  
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA  
CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA  
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTtagctagagcagc

新LDP02輕鏈蛋白(VKL、VK與人類C $\kappa$ 之間間隙)

MGWSCILFLVATATGVHS  
DVVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYGI  
SNRFSGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLOGTHQPYTFGQGTKVEI  
K  
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【圖 2】



成對人類κ恆定區

MI:鼠類κ恆定區

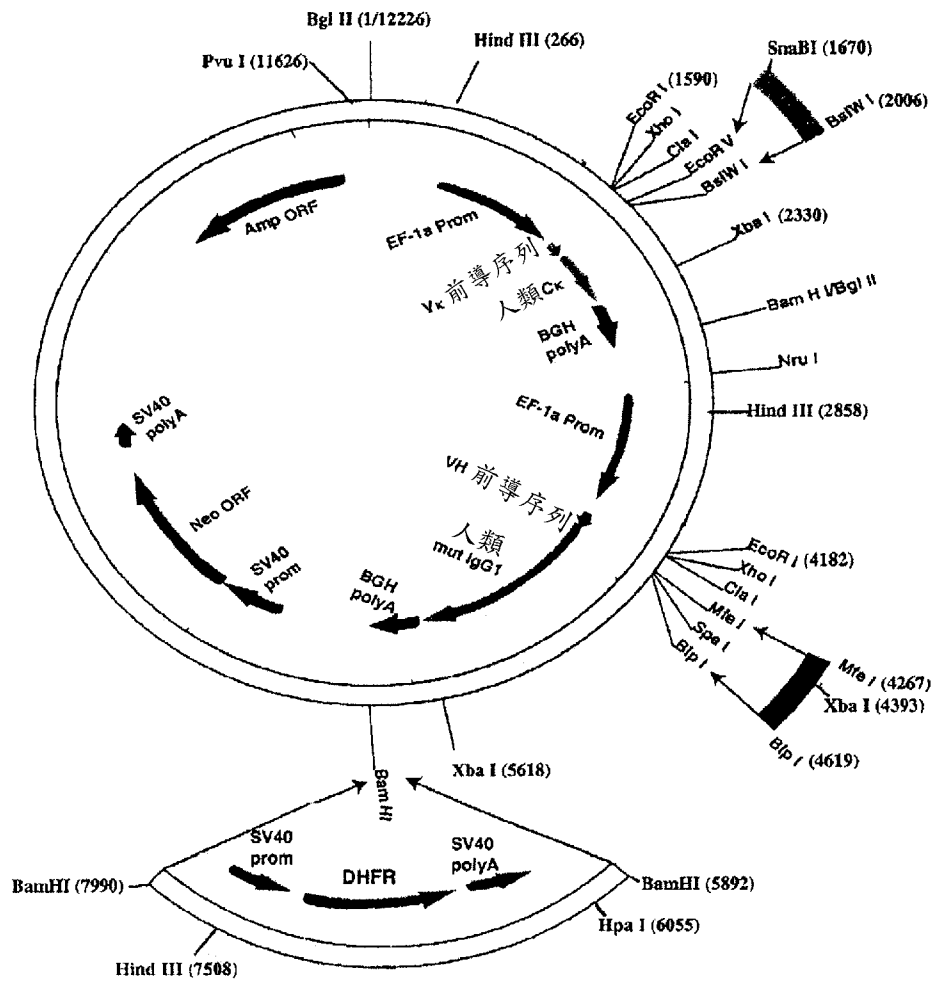
```

A 1 rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvc1lnnfypreakvqwkvdnalqsg 50
      |  |||. | ||||| ||| || ||||| |||||::: |.||:| . .
B 1 radaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfypkdinvkwkidgserqn 50
      . . . . .
51 nsqesvteqdskdstyslsstltliskadyekkhkvyacevthqglsspvtk 100
      | |:|||||||||:|||||. | :||:| | | | |. .||: |
51 gvlnswdqdskdstysmsstltltkdeyerhnsytceathktstspivk 100

101 sfnrgec 107
      ||| | |
101 sfnrnec 107

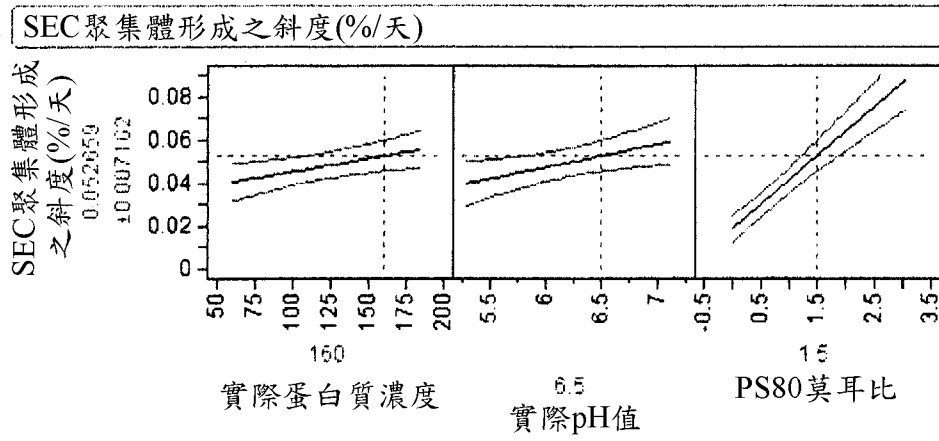
```

【圖4】

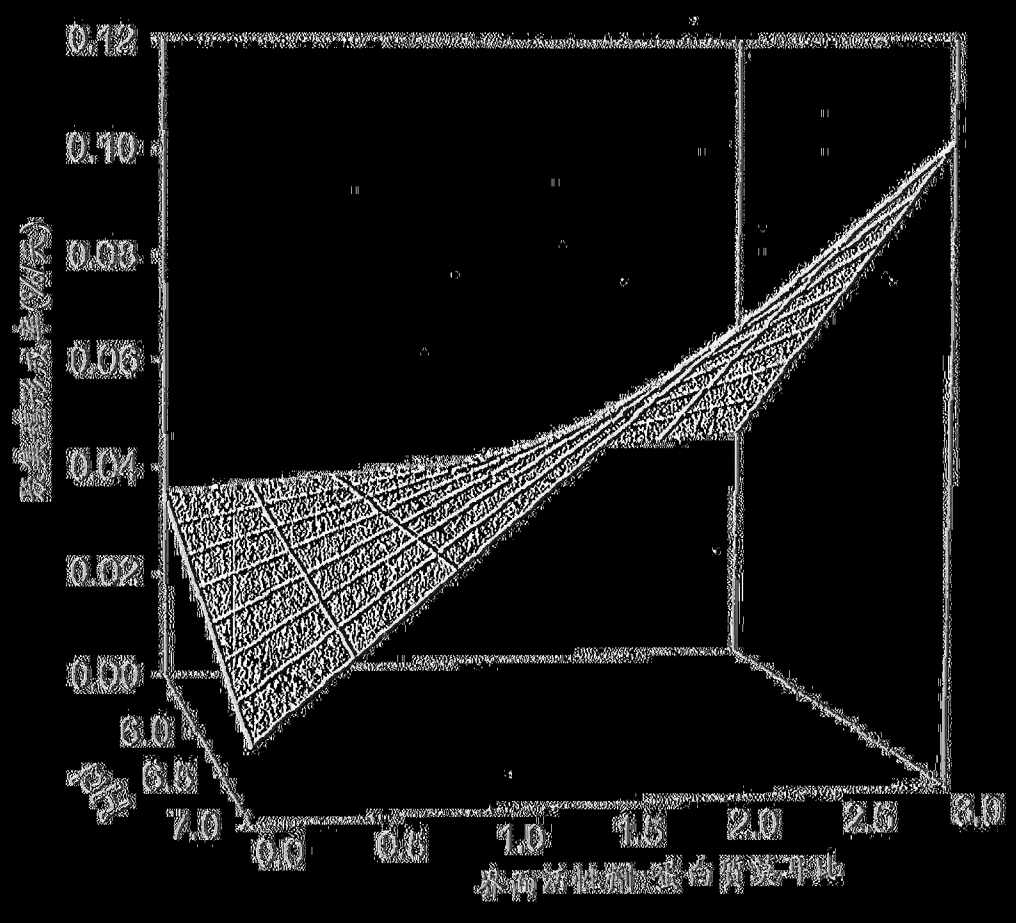


pLKTOK38D

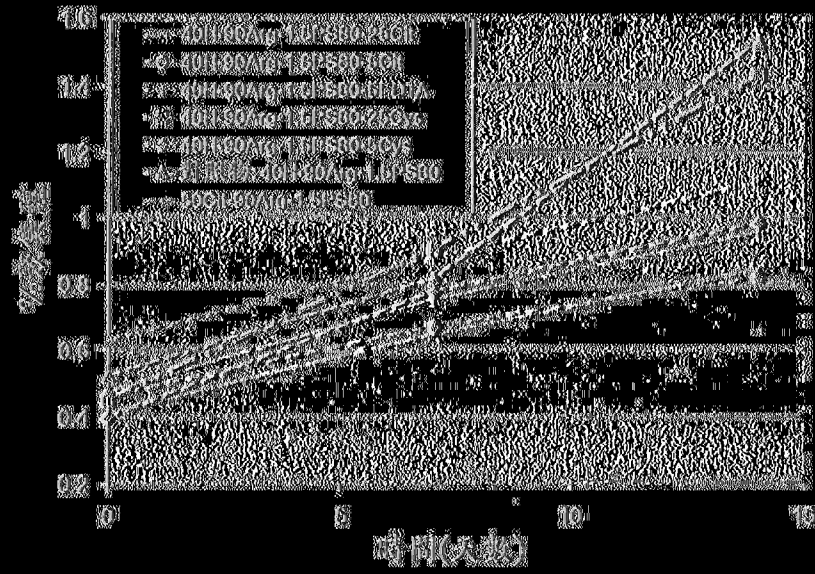
【圖 5】



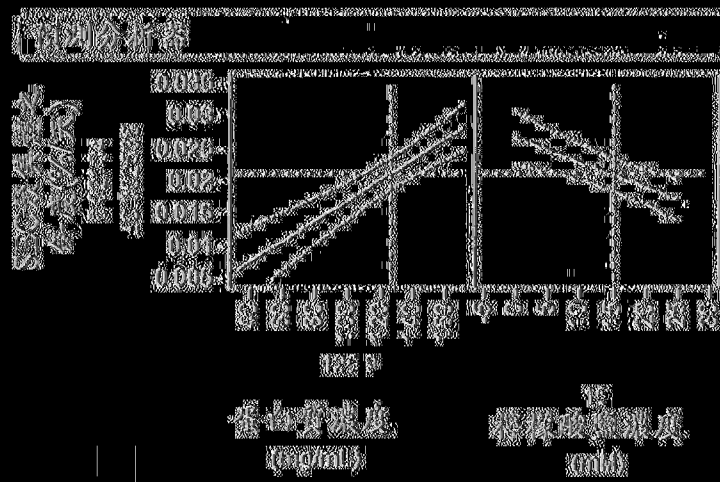
【圖 6】



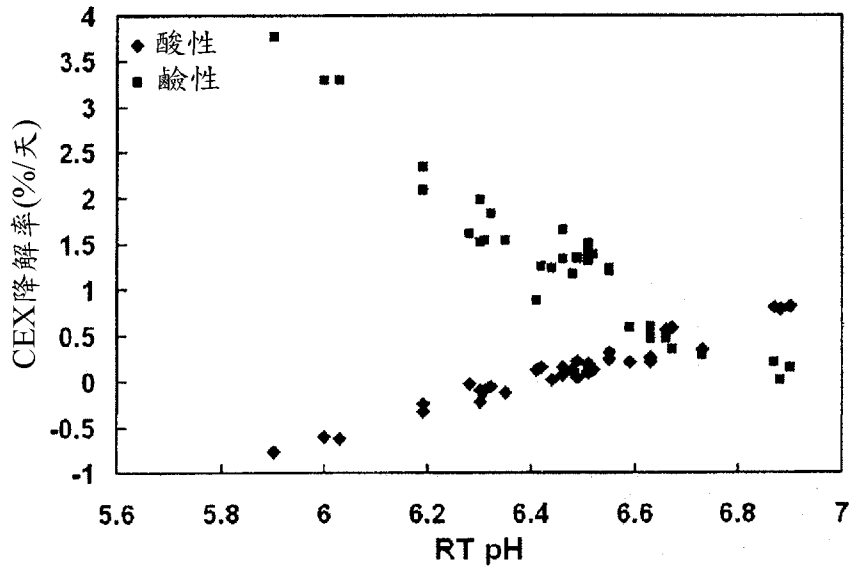
(同')



(圖 8)

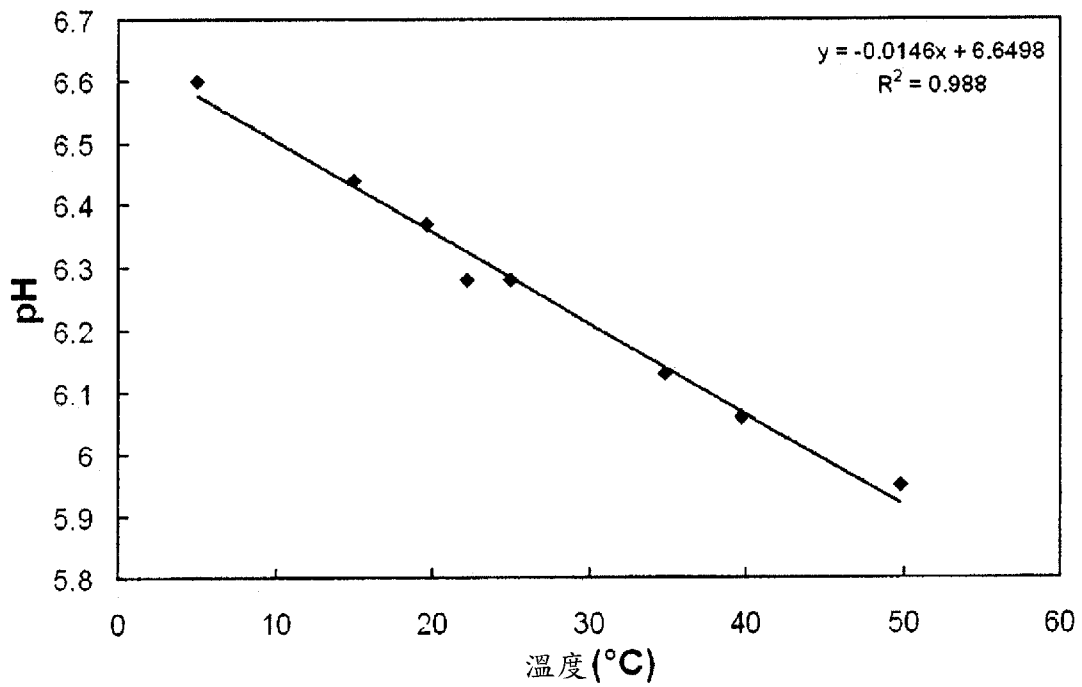


(圖 9)

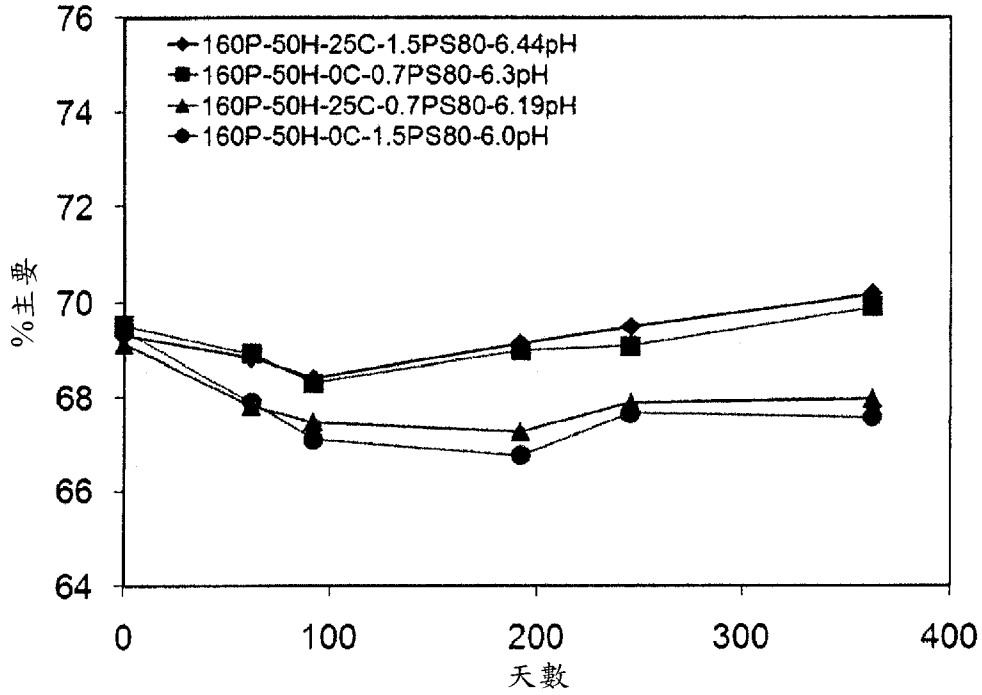


【圖 10】

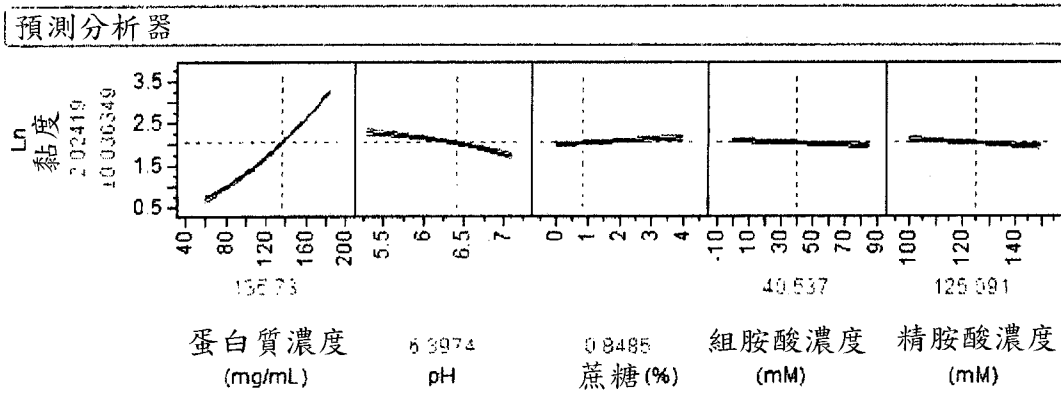
25 mM 檸檬酸鹽, 50 mM 組胺酸, 125 mM 精胺酸



【圖 11】



【圖 12】



【圖 13】

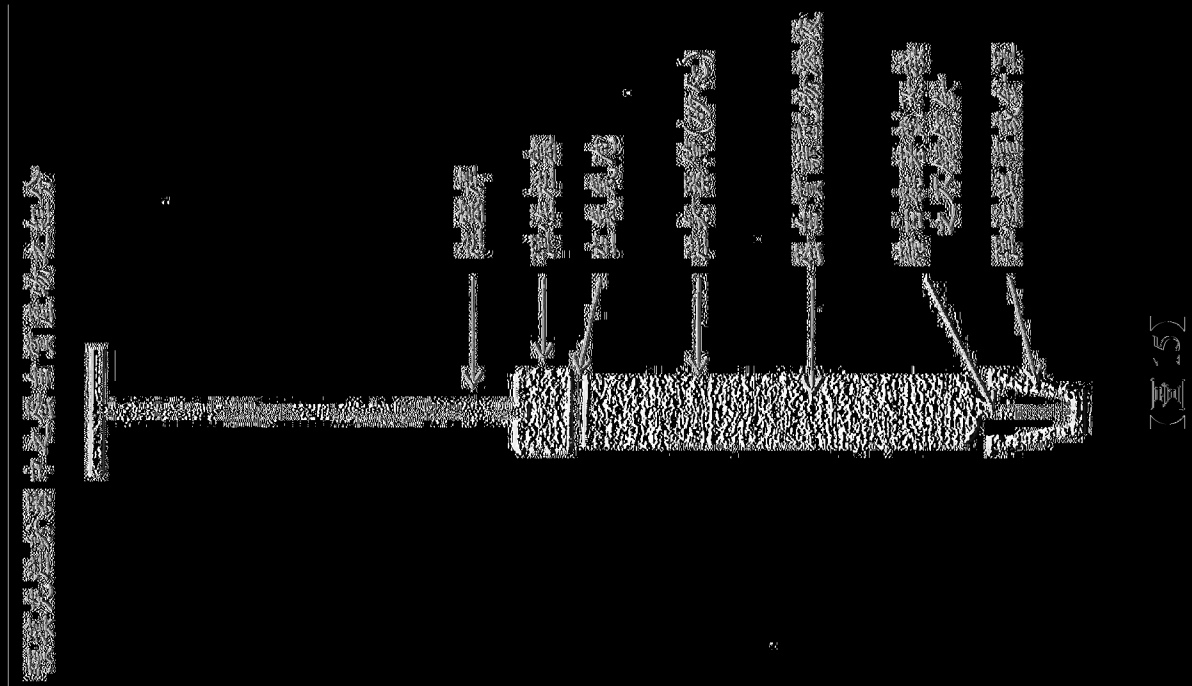
GM607'CL抗體κ輕鏈可變區  
SEQ ID NO:14

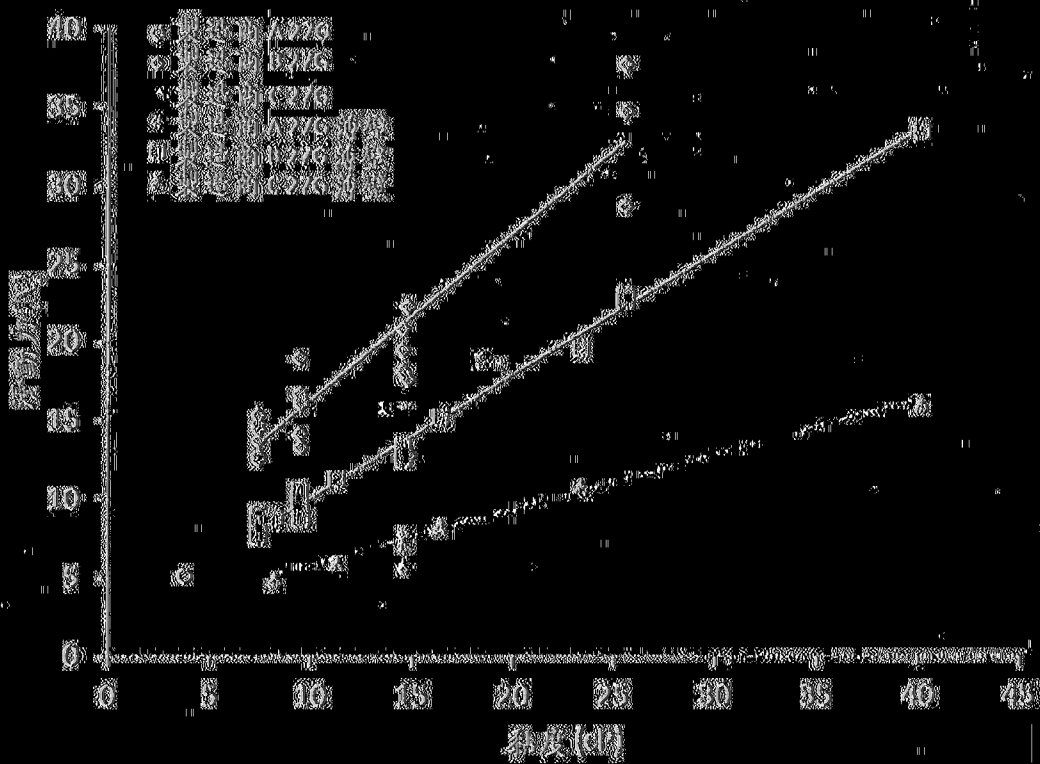
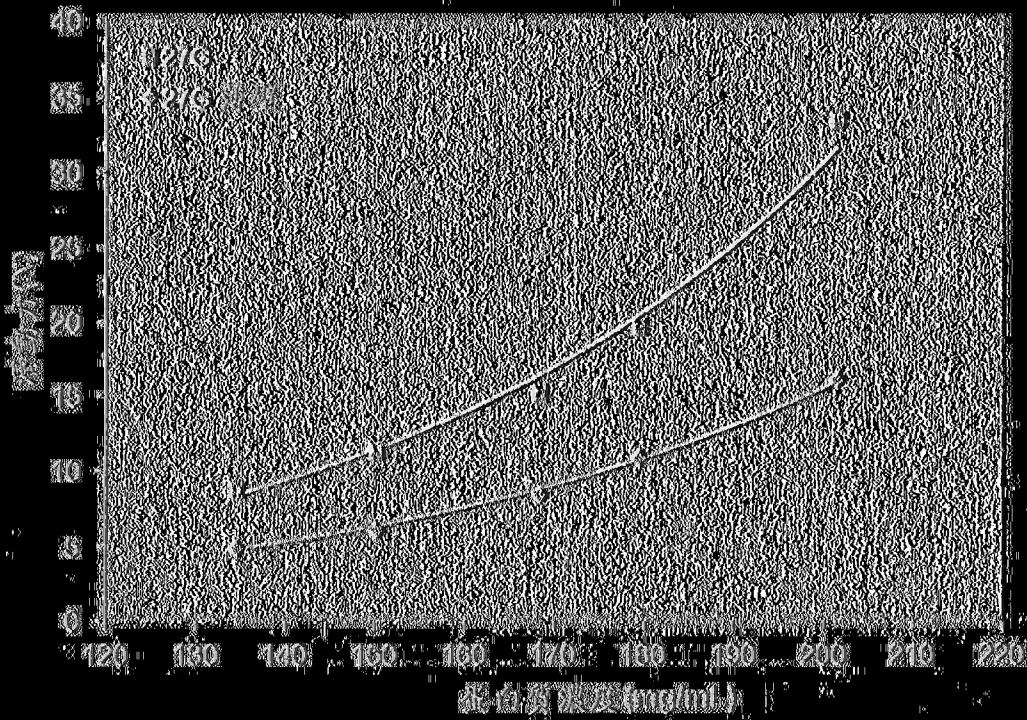
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30  
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45  
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
50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

21/28'CL抗體重鏈可變區  
SEQ ID NO:15

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

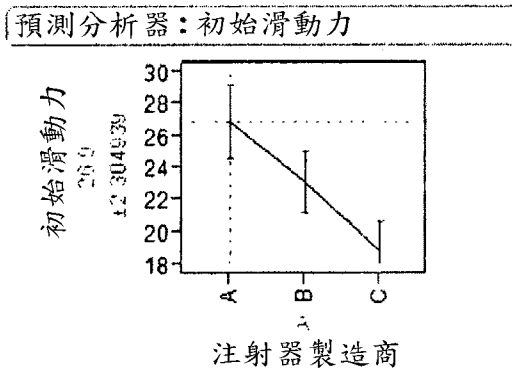
【圖 14】



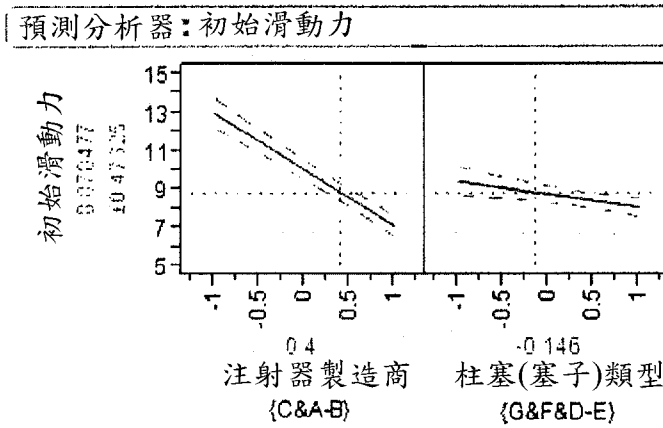


(圖 16)

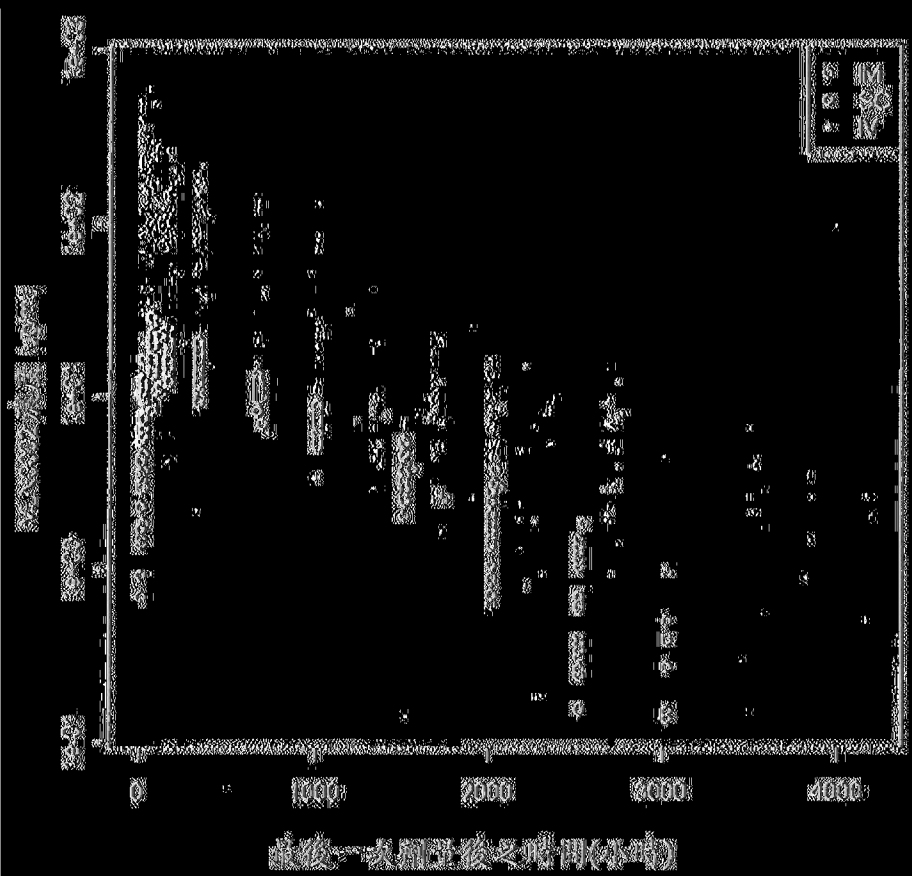
A



B



【圖 17】



(圖) 18)

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之調配物

### 【英文發明名稱】

FORMULATION FOR ANTI- $\alpha 4\beta 7$  ANTIBODY

### 【技術領域】

本發明係關於抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之調配物之技術領域。

### 【先前技術】

生物技術之進步使得可能使用重組DNA技術製造多種蛋白質用於醫藥應用。因為蛋白質比傳統有機及無機藥物更大且更複雜(亦即除複雜的三維結構外亦具有多個官能基)，所以該等蛋白質之調配出現特殊問題。為了使蛋白質保持生物學活性，調配物必須保持蛋白質胺基酸之至少一個核心序列之構形完整性，同時保護蛋白質之多個官能基免於降解。蛋白質可受缺乏穩定性的影響，且單株及多株抗體尤其會相對不穩定(參見例如Wang等人，*J. Pharm Sci.* 96:1-26 (2007))。許多調配選擇物係可用的，但沒有一種方法或系統可適用於所有蛋白質。待考量之若干因素已有報導(參見例如Wang等人)。

許多特徵可影響蛋白質之穩定性。實際上，即使在純化抗體之情況下，抗體結構亦可能為非均質的，此進一步使該等系統之調配複雜化。此外，包括於抗體調配物中之賦形劑較佳將任何潛在免疫反應減至最小。

在抗體之情況下，保持構形完整性更加重要。蛋白質之降解路徑可包括化學不穩定性(亦即包括藉由鍵形成或裂解修飾蛋白質產生新化學實體的任何過程)或物理不穩定性(亦即蛋白質更高級結構之變化)。化學不穩定性以例如脫醯胺、異構化、水解、氧化、片段化、聚糖 $\beta$ 消除或雙硫

鍵互換(disulfide exchange)形式表現。物理不穩定性可由例如變性、聚集、沈澱或吸附造成。四種最常見之蛋白質降解路徑為蛋白質片段化、聚集、脫醯胺及氧化。治療性蛋白質之化學或物理不穩定性之後果包括有效投與劑量減少、因例如刺激或免疫反應性所致之療法安全性降低及因存放期短所致之更頻繁製造。

數個公開案已大體上揭示治療發炎性腸病之多種方法，且提供用於投與經設計以治療發炎性腸病之藥劑的給藥方案。舉例而言，WO 96/24673揭示黏膜血管定址素及治療與因白血球結合至表現MAdCAM之細胞所致之白血球募集至胃腸道相關的疾病。U.S. 2005/0095238描述治療與黏膜組織之白血球浸潤相關之疾病的方法及向人類投與有效量之對 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類或人類化免疫球蛋白或抗原結合片段。U.S. 2005/0095238進一步描述多種劑量(例如每公斤體重0.15 mg、約0.5 mg、約1.0 mg、約1.5 mg或約2.0 mg免疫球蛋白或片段)及劑量之間的多個間隔時間(7天、14天、21天、28天或30天)。然而，上述專利及公開案並未揭示本文中描述且主張的抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之特定調配物或特定劑量及給藥方案。重要的是，上述專利並未揭示為本文中描述且主張的治療方法(由臨床試驗資料證明)而提供之調配物、劑量及給藥方案。

本發明之抗體調配物可適用於抑制白血球結合至表現MAdCAM之細胞且因此幫助治療患者之發炎性腸病。因此，急需找到此等化合物之適合劑量及給藥時程，且急需開發在長時間段內以穩定及適宜形式產生穩態治療有效血液含量之抗體調配物的調配物，較佳為皮下調配物。

### 【發明內容】

本發明係關於識別抗氧化劑或螯合劑及至少一種胺基酸作為適用於

調配抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之賦形劑，該等調配物之不穩定性使其易受脫醯胺、氧化、異構化及/或聚集。調配物改良穩定性，減少聚集體形成且延遲其中抗體之降解。

因此，在第一態樣中，本發明係關於一種穩定液體醫藥調配物，其包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、抗氧化劑或螯合劑及至少一種游離胺基酸之混合物。

在一些實施例中，穩定液體醫藥調配物在室溫下12個月之後具有小於約1.0%之聚集體形成。穩定液體醫藥調配物在室溫下12個月之後可具有小於約0.2%之聚集體形成。

在一些實施例中，抗氧化劑或螯合劑為檸檬酸鹽。在一些實施例中，螯合劑為EDTA。

在一些實施例中，調配物之游離胺基酸為組胺酸、丙胺酸、精胺酸、甘胺酸、麩胺酸或其任何組合。調配物可包含約50 mM至約175 mM之游離胺基酸。調配物可包含約100 mM至約175 mM之游離胺基酸。游離胺基酸與抗體之莫耳比之比率可為至少250:1。

調配物亦可含有界面活性劑。界面活性劑可為聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆(poloxamer)或其任何組合。

在一些實施例中，抗氧化劑與界面活性劑之莫耳比為約3:1至約156:1。

調配物可具有介於約6.3與約7.0之間的pH值。調配物之pH值可在約6.5與約6.8之間。調配物可具有介於約6.1與約7.0之間或介於約6.2與6.8之間的pH值。

在一些實施例中，穩定液體醫藥調配物含有至少約60 mg/ml至約160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。調配物可含有至少約160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。調配

物可含有約150 mg/ml至約180 mg/ml抗體或約165 mg/ml抗體。

在另一態樣中，本發明係關於一種穩定液體醫藥調配物，其包含至少約60 mg/ml至約160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、緩衝劑及至少約10 mM檸檬酸鹽。緩衝劑可為組胺酸緩衝劑。

在另一態樣中，本發明係關於一種穩定液體醫藥調配物，其包含至少約60 mg/ml至約180 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、緩衝劑及至少約5 mM檸檬酸鹽。緩衝劑可為組胺酸緩衝劑。

在另一態樣中，本發明係關於一種穩定液體醫藥調配物，其包含至少約160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體及至少約10 mM檸檬酸鹽。調配物可進一步含有聚山梨醇酯80。

在另一態樣中，本發明係關於一種穩定液體醫藥調配物，其包含約160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體及至少約5 mM檸檬酸鹽。調配物可進一步含有聚山梨醇酯80。

在另一態樣中，本發明係關於一種穩定液體醫藥調配物，其包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、檸檬酸鹽、組胺酸、精胺酸及聚山梨醇酯80之混合物。調配物可存在於容器(諸如小瓶、藥筒、注射器或自動注射器)中。

本發明之穩定液體醫藥調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體可為維多珠單抗(vedolizumab)。本發明之調配物可用於皮下、靜脈內或肌內投與。

在一些態樣中，調配物可將抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之免疫原性減至最小。

在另一態樣中，本發明係關於一種治療發炎性腸病之方法，其包含向有需要之患者投與本文所述之穩定液體醫藥調配物。投與可為皮下投與。投與可為自投與。

在另一態樣中，本發明係關於一種製品，其包含容器、本文所述之

穩定液體醫藥調配物及其使用說明。

在一個態樣中，本發明係關於一種治療罹患發炎性腸病之人類患者之方法，其中該方法包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中根據以下給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段：  
(a)例如在誘導期治療方案中，每隔一天呈皮下注射形式之165 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的初始劑量持續六個劑量；(b)隨後例如在維持期治療方案中，在第6週時，視需要每兩週或每四週呈皮下注射形式之165 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的第七後續劑量；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在一個態樣中，本發明係關於一種治療罹患發炎性腸病之人類患者之方法，其中該方法包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據包含靜脈內劑量之誘導期及皮下劑量之維持期的以下給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段：  
(a)呈靜脈內輸注形式之300 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的初

始靜脈內劑量；(b)隨後在初始劑量之後約兩週時，呈靜脈內輸注形式之300 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的第二靜脈內後續劑量；(c)隨後自第六週開始，視需要每週、每兩週、每三週或每四週呈皮下注射形式之165 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的第三後續劑量；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在另一態樣中，本發明係關於一種用於治療性治療發炎性腸病之給藥方案，其中該給藥方案包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據皮下或肌內給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，該給藥方案維持免疫球蛋白或其抗原結合片段之平均穩態最低(trough)血清濃度在約9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 範圍內；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、

CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在另一態樣中，本發明係關於一種用於治療性治療發炎性腸病之給藥方案，其中該給藥方案包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據皮下或肌內給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，該給藥方案維持人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段之平均穩態最低血清濃度在約35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 範圍內；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在另一態樣中，本發明係關於一種治療罹患發炎性腸病之人類患者之方法，其中該方法包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據以下給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段：(a)藉由約六週之初始給藥，足以達成人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段之平均最低血清濃度為約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約30

$\mu\text{g/mL}$  之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的複數個誘導期劑量；(b) 隨後，視需要維持免疫球蛋白或其抗原結合片段之平均穩態最低血清濃度在約  $9 \mu\text{g/mL}$  至約  $13 \mu\text{g/mL}$  或約  $35 \mu\text{g/mL}$  至  $40 \mu\text{g/mL}$  範圍內之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的複數個維持期劑量；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對  $\alpha 4\beta 7$  複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在一些態樣中，調配物、治療方法、劑量及/或給藥方案確保患者將產生對抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體有反應性之抗體的最小可能性。

患者可對用免疫調節劑、腫瘤壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )拮抗劑中之至少一者或其組合進行之治療缺乏足夠反應、喪失反應或不耐受。

發炎性腸病可為克隆氏病(Crohn's disease)或潰瘍性結腸炎。發炎性腸病可為中度至重度活動性潰瘍性結腸炎。

給藥方案可使得罹患中度至重度活動性潰瘍性結腸炎之患者之黏膜癒合。

患者可能先前已接受用至少一種用於發炎性腸病之皮質類固醇的治療。患者可同時接受用至少一種用於發炎性腸病之皮質類固醇的治療。給藥方案可使得患者之皮質類固醇使用減少、消除或減少及消除。

在一些態樣中，以約  $1.0 \text{ mg/ml}$  至約  $1.4 \text{ mg/ml}$  之濃度之最終劑型投

與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段。可以約1.2 mg/ml之最終劑型投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段。

在一些態樣中，以具有約70 mg至約250 mg、約90 mg至約200 mg、約150 mg至約180 mg或至少160 mg之量的抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之最終劑型投與人類化免疫球蛋白或抗原結合片段。

在一些態樣中，給藥方案不改變接受該治療之患者之腦脊髓液中的CD4與CD8之比率。

患者可為65歲或65歲以上之人且不需要給藥方案之任何調整。

在一些態樣中，用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之治療方法、劑量或給藥方案可將抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之免疫原性減至最小。

#### 【圖式簡單說明】

圖1為編碼人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白之重鏈之核苷酸序列(SEQ ID NO:1)及重鏈之演繹胺基酸序列(SEQ ID NO:2)的說明圖。核苷酸序列在重鏈之5'端處含有選殖位點(小寫)、Kozak序列(大寫，SEQ ID NO:1之核苷酸18至23)及前導序列(小寫，SEQ ID NO:1之核苷酸24至86)。核苷酸序列之開放閱讀框架為SEQ ID NO:1之核苷酸24至1433。

圖2為編碼人類化免疫球蛋白(在本文中稱為維多珠單抗(vedolizumab))之輕鏈之核苷酸序列(SEQ ID NO:3)及輕鏈之演繹胺基酸序列(SEQ ID NO:4)的說明圖。核苷酸序列在重鏈之5'端處含有選殖位點(小寫)、Kozak序列(大寫，SEQ ID NO:3之核苷酸18至23)及前導序列(小寫，SEQ ID NO:3之核苷酸24至80)。核苷酸序列之開放閱讀框架為SEQ ID NO:3之核苷酸24至737。

圖3為(A)人類化免疫球蛋白(在本文中稱為維多珠單抗)之成熟人類化

輕鏈(SEQ ID NO:4之胺基酸20-238)與(B)人類化免疫球蛋白(在本文中稱為LDP-02)之成熟人類化輕鏈(SEQ ID NO:5)之胺基酸序列的比對。(關於LDP-02, 參見WO 98/06248及Feagan等人, *N. Eng. J. Med.* 352:2499-2507 (2005)。Feagan等人描述LDP-02之臨床研究, 但在該文章中, 其將LDP-02稱為MLN02)。該比對說明維多珠單抗與LDP-02之輕鏈之胺基酸序列在成熟輕鏈之位置114及115處不同。

圖4為(A)同屬人類 $\kappa$ 輕鏈恆定區(SEQ ID NO:6)與(B)同屬鼠類 $\kappa$ 輕鏈恆定區(SEQ ID NO:7)之胺基酸序列的比對。胺基酸殘基Thr及Val(其存在於成熟維多珠單抗輕鏈之位置114及115處(SEQ ID NO:4之胺基酸133及134))存在於人類 $\kappa$ 輕鏈之恆定區中, 而胺基酸殘基Ala及Asp(其存在於成熟LDP-02輕鏈(SEQ ID NO:5)之位置114及115處)存在於小鼠 $\kappa$ 輕鏈之恆定區中。

圖5為載體pLKTOK38D(亦稱為pTOK38MLN02-TV)之圖譜, 其編碼MLN02之人類化重鏈及人類化輕鏈, 且適用於在CHO細胞中產生維多珠單抗。(參見揭示pLKTOK38之美國專利申請公開案第2004/0033561 A1號。pLKTOK38D為pLKTOK38之變異體, 其中圖譜上指示之限制位點側接編碼輕鏈可變區之序列。)

圖6顯示由於蛋白質濃度、pH值及界面活性劑:蛋白質莫耳比之變化所致的SEC聚集體形成之斜度(每日百分比)。在6.0至6.5之pH值範圍下, 調配物之聚集體形成類似於在0.7至1.5之聚山梨醇酯80:蛋白質莫耳比範圍下的聚集體形成。

圖7為展示在聚山梨醇酯80:蛋白質莫耳比大於1.5下, 聚集體形成率隨pH值增加而增加的圖。

圖8為展示賦形劑對聚集體形成之效應之圖。將25 mM檸檬酸鹽、5 mM檸檬酸鹽、5 mM EDTA、25 mM半胱胺酸或5 mM半胱胺酸添加至調配物中。所有三種賦形劑均減少聚集體形成。

圖9為一組展示在調配物中存在25 mM檸檬酸鹽之情況下聚集體形成減少及蛋白質濃度增加與聚集體形成率增加之間的關係之圖。

圖10為展示40°C下CEX物質降解之結果的圖。資料展示pH值變化對CEX降解之影響。

圖11為展示溫度對調配物之pH值之效應的圖。含有組胺酸之調配物之pH值隨溫度而降低，而檸檬酸鹽調配物之pH值不受溫度影響。

圖12為展示CEX主要同功異型物在十二個月時間內之百分比的圖。pH值為6.0至6.2之調配物展示比pH值為6.3至6.4之調配物少約1%至2%之主要同功異型物。

圖13展示一組表明黏度主要受蛋白質濃度及pH值影響的圖。展示蔗糖、組胺酸及精胺酸添加物對調配物之黏度具有輕微影響。

圖14展示(A)成熟人類GM607'CL抗體κ輕鏈可變區及(B)人類21/28'CL重鏈可變區的胺基酸序列。

圖15展示預填充注射器中之蛋白質產物之組分。

圖16A至圖16B展示(A)蛋白質濃度及(B)黏度對所測試之各種注射器之注射力的效應。

圖17(A)展示初始滑動力隨蛋白質濃度及針尺寸之變化。圖17(B)展示各注射器製造商及針尺寸之初始滑動力。

圖18展示維多珠單抗之吸收曲線。該圖展示肌內及皮下劑量之濃度通常重疊。此等投與途徑之吸收曲線不存在明顯大體差異。

## 【實施方式】

本申請案主張2011年10月6日申請之美國臨時申請案61/544,054及2011年5月2日申請之美國臨時申請案61/481,522之優先權。前述申請案之全部內容以引用的方式併入本文中。

本發明係關於一種包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之醫藥調配物。醫藥調配物可為包含抗氧化劑或螯合劑(例如檸檬酸鹽)、抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體及游離胺基酸之混合物。醫藥調配物可呈固體或液體形式。

## 定義

術語「醫藥調配物」係指一種製劑，其含有呈使抗體之生物活性有效之形式的抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體，且其不含對將投與調配物之個體具不可接受毒性之其他組分。

「穩定」調配物為當儲存時其中之抗體實質上保持其物理穩定性及/或其化學穩定性及/或其生物活性的調配物。在一個態樣中，調配物在儲存時實質上保持其物理及化學穩定性以及其生物活性。一般基於調配物之預期存放期選擇儲存期。用於量測蛋白質穩定性之多種分析技術在此項技術中可用且於例如 *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee編，Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)及 Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993)中有綜述。穩定性可在選定溫度下持續選定時段進行量測。舉例而言，液體調配物在約40°C下穩定持續至少約3天、5天、1週、2週、3週、4週、5週或6週。在另一態樣中，凍乾調配物在約40°C下穩定持續至少約2週至4週、至少約3個月、至少約6個月、至少約9個月、至少約12個月或至少約18個月。在另一態樣中，液體及/或凍乾調配物在約5°C及/或25°C下穩定持續至少約1個月、至少約3

個月、至少約6個月、至少約9個月、至少約12個月、至少約18個月、至少約24個月、至少約30個月或至少約36個月；及/或在約-20°C及/或-70°C下穩定持續至少約1個月、至少約3個月、至少約6個月、至少約9個月、至少約12個月、至少約18個月、至少約24個月、至少約30個月、至少約36個月、至少約42個月或至少約48個月。此外，在一些實施例中，液體調配物在冷凍(至例如-80°C)及解凍之後(例如在1、2或3個冷凍及解凍循環之後)可為穩定的。

可以多種不同方法定性及/或定量評估液體調配物之穩定性，包括評估二聚體、多聚體及/或聚集體形成(例如使用尺寸排阻層析法(SEC)、基質輔助雷射脫附離子化飛行時間質譜法(MALDI-TOF MS)、分析超速離心、光散射(光子相關光譜法、動態光散射(DLS)、靜態光散射、多角雷射光散射(MALLS))、基於流動之顯微鏡成像、電子阻抗(庫爾特(coulter))計數、光遮蔽或其他液體顆粒計數系統、藉由量測混濁度及/或藉由目視檢查)；藉由使用陽離子交換層析(CEX)、等電聚焦(IEF)(例如毛細管技術(cIEF))或毛細管帶電泳評估電荷非均勻性；胺基端或羧基端序列分析；質譜分析；SDS-PAGE或SEC分析以比較片段化、完整及多聚(亦即二聚、三聚等)抗體；肽圖(例如胰蛋白酶或LYS-C)分析；評估抗體之生物活性或抗原結合功能；及其類似方法。亦可以多種不同方法定性及/或定量評估固態調配物之穩定性，該等方法包括直接測試，諸如藉由X射線粉末繞射(XRPD)鑑別晶體結構；使用傅立葉轉換紅外光譜法(FTIR)評估固態下之抗體結構；及使用差示掃描熱量測定(DSC)量測凍乾固體(熔融、玻璃轉移等)中之熱轉移；及間接測試，諸如藉由卡爾費雪(Karl Fisher)測試量測水分含量例如從而外推經由水解所致之化學不穩定性之可能性。不穩

定性可包括以下任一或多者：聚集(例如非共價可溶性聚集、共價可溶性聚集(例如二硫鍵重排/混雜)、不溶性聚集)、脫醯胺(例如Asn脫醯胺)、氧化(例如Met氧化)、異構化(例如Asp異構化)、截割/水解/片段化(例如鉸鏈區片段化)、丁二醯亞胺形成、N端延長、C端加工、糖基化差異及其類似變化。

「脫醯胺」單株抗體為其一或多個天冬醯胺或麩醯胺酸殘基已經衍生化為例如天冬胺酸或異天冬胺酸的單株抗體。

「易受脫醯胺」之抗體為包含一或多個發現有脫醯胺傾向之殘基的抗體。

「易受氧化」之抗體為包含一或多個發現有氧化傾向之殘基的抗體。

「易聚集」之抗體為發現其與其他抗體分子聚集(尤其在冷凍、加熱、乾燥、復原及/或攪拌時)的抗體。

「易片段化」之抗體為發現例如在其鉸鏈區處裂解為兩個或兩個以上片段的抗體。

「減少脫醯胺、氧化、聚集或片段化」欲意謂相對於在不同pH值下或在不同緩衝劑中調配之單株抗體，防止或減少(例如至80%、60%、50%、40%、30%、20%或10%)脫醯胺、聚集或片段化之量。

「聚集體」、「SEC聚集體」或「可溶性聚集體」為大於一個且小於或等於十個抗體蛋白質及/或片段經由共價、離子或疏水性相互作用結合在一起形成更大蛋白質體。

「不溶性聚集體」或「顆粒」為大於十個抗體蛋白質及/或片段經由共價、離子或疏水性相互作用結合在一起形成更大蛋白質體。

如本文所用，單株抗體之「生物活性」係指抗體結合至抗原且產生可活體外或活體內量測之可量測生物反應的能力。該活性可為拮抗性或促效性。

細胞表面分子「 $\alpha 4\beta 7$ 整合素」或「 $\alpha 4\beta 7$ 」為 $\alpha 4$ 鏈(CD49D, ITGA4)及 $\beta 7$ 鏈(ITGB7)之雜二聚體。每條鏈可與替代性整合素鏈形成雜二聚體，形成例如 $\alpha 4\beta 1$ 或 $\alpha E\beta 7$ 。人類 $\alpha 4$ 及 $\beta 7$ 基因(分別為GenBank(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD)RefSeq 寄存編號NM\_000885及NM\_000889)由B及T淋巴細胞、尤其是記憶性CD4+淋巴細胞表現。作為許多整合素之典型， $\alpha 4\beta 7$ 可以靜止或活化狀態存在。 $\alpha 4\beta 7$ 之配位體包括血管細胞黏著分子(VCAM)、纖維結合蛋白及黏膜定址素(MAdCAM(例如MAdCAM-1))。

如本文所用，具有「對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物之結合特異性」之人類免疫球蛋白或其抗原結合片段結合至 $\alpha 4\beta 7$ ，但不結合至 $\alpha 4\beta 1$ 或 $\alpha EB7$ 。

如本文所用，「等張」調配物具有與人類血液實質上相同之滲透壓。等張調配物通常具有約250 mOsm至350 mOsm之滲透壓。可使用例如蒸氣壓或冰凍型滲壓計來量測等張性。

如本文所用，「緩衝劑」係指藉由其酸鹼共軛組分之作用抵抗pH值變化之緩衝劑。緩衝劑可以本發明之液體或固體調配物形式存在。在一些實施例中，本發明之緩衝劑將調配物之pH值調節為約5.0至約7.5、約pH 5.5至約7.5、約pH 6.0至約7.0或約6.3至約6.5之pH值。在一個態樣中，將pH值控制在5.0至7.5範圍內之呈單獨或組合形式的緩衝劑之實例包括乙酸鹽、丁二酸鹽、葡糖酸鹽、組胺酸、檸檬酸鹽、磷酸鹽、順丁烯二酸鹽、二甲基胍酸鹽、2-[N-嗎啉基]乙磺酸(MES)、雙(2-羥乙基)亞胺基參[羥甲

基]甲烷(Bis-Tris)、N-[2-乙醯胺基]-2-亞胺二乙醯(ADA)、甘胺醯甘胺酸及其他有機酸緩衝劑。在另一態樣中，本文中之緩衝劑為組胺酸或檸檬酸鹽。

「組胺酸緩衝劑」為包含組胺酸離子之緩衝劑。組胺酸緩衝劑之實例包括組胺酸氯化物、組胺酸乙酸鹽、組胺酸磷酸鹽、組胺酸硫酸鹽溶液。組胺酸緩衝劑或組胺酸鹽酸鹽緩衝劑之pH值在約5.5至約7.0、約6.1至約6.9之範圍內或為約6.5。

「檸檬酸鹽緩衝劑」為包含檸檬酸根離子之緩衝劑。檸檬酸鹽緩衝劑之實例包括檸檬酸鈉、檸檬酸銨、檸檬酸鈣及檸檬酸鉀溶液。檸檬酸鹽緩衝劑之pH值為約3.0至6.2、約5.5至6.5、約6.1至約6.5、約6.1、約6.2或約6.5。

在本文中「醣」為具有通式 $(CH_2O)_n$ 之化合物及其衍生物，包括單醣、雙醣、三醣、多醣、糖醇、還原糖、非還原糖及其類似物。本文中之醣之實例包括葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、果糖、麥芽糖、聚葡萄糖、赤藻糖醇、甘油、阿拉伯糖醇、木糖醇(sylitol)、山梨糖醇、甘露糖醇、蜜二糖、松三糖、棉子糖、甘露三糖、水蘇糖、麥芽糖、乳酮糖、麥芽酮糖、葡萄糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、異麥芽酮糖及其類似物。醣可為凍乾保護劑。在一個態樣中，本文中之醣為非還原雙醣，諸如蔗糖。

在本文中，「界面活性劑」係指降低液體之表面張力的試劑。在一個態樣中，界面活性劑為非離子界面活性劑。本文中之界面活性劑之實例包括聚山梨醇酯(聚氧乙烯脫水山梨糖醇單月桂酸酯，例如聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80)；TRITON(第三辛基苯氧基聚乙氧基乙醇，非離子清潔劑，Dow Chemical Co., Midland MI之Union Carbide子公司)；十二烷基

硫酸鈉(SDS)；月桂硫酸鈉；辛基糖苷鈉；月桂基磺基甜菜鹼、肉豆蔻基磺基甜菜鹼、亞油烯基(linoleyl)磺基甜菜鹼或硬脂醯基磺基甜菜鹼；月桂基肌胺酸、肉豆蔻基肌胺酸、亞油烯基肌胺酸或硬脂醯基肌胺酸；亞油烯基甜菜鹼、肉豆蔻基甜菜鹼或鯨蠟基甜菜鹼；月桂醯胺丙基甜菜鹼、椰油醯胺丙基甜菜鹼、亞油醯胺丙基甜菜鹼、肉豆蔻醯胺丙基甜菜鹼、棕櫚醯胺丙基(palimidopropyl)甜菜鹼或異硬脂醯胺丙基甜菜鹼(例如月桂醯胺丙基甜菜鹼)；肉豆蔻醯胺丙基二甲胺、棕櫚醯胺丙基二甲胺或異硬脂醯胺丙基二甲胺；甲基椰油醯基牛磺酸鈉或甲基油烯基牛磺酸二鈉；脫水山梨糖醇單棕櫚酸酯；及 MONAQUAT 系列 (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.)；聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)及聚氧乙烯與聚氧丙烯二醇之共聚物(例如泊洛尼克(Pluronic)/泊洛沙姆、PF68等)；等。在另一態樣中，本文中之界面活性劑為聚山梨醇酯80。

術語「螯合劑」係指經由一個以上鍵與原子結合之試劑。在一個態樣中，本文中之螯合劑之實例包括檸檬酸鹽、乙二胺四乙酸、乙二醇四乙酸(EGTA)、二巖基丙醇、二伸乙三胺五乙酸及N,N-雙(羧甲基)甘胺酸。在另一態樣中，螯合劑為檸檬酸鹽或EDTA。

術語「抗氧化劑」係指抑制其他分子氧化之試劑。本文中之抗氧化劑之實例包括檸檬酸鹽、硫辛酸、尿酸、麩胱甘肽、生育酚、胡蘿蔔素、番茄紅素、半胱胺酸、磷醯酯化合物(例如依替磷醯(etidronic acid))、去鐵胺及蘋果酸鹽。

本文中之術語「抗體」以最廣泛含義使用且尤其涵蓋全長單株抗體、免疫球蛋白、多株抗體、由至少兩種全長抗體例如各與不同抗原或抗原決定基形成之多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及個別抗原結合片段

(包括dAbs、scFv、Fab、F(ab)'<sub>2</sub>、Fab')，包括人類、人類化及來自非人類物種及重組抗原結合形式之抗體(諸如單功能抗體(monobody)及雙功能抗體)。

設想抗體之近似分子量為約150,000道爾頓(dalton)來計算本文中所描述之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體與其他賦形劑之莫耳量及比率。實際抗體分子量可不為150,000道爾頓，視胺基酸組成或轉譯後修飾(例如視用於表現抗體之細胞株)而定。實際抗體分子量可為150,000道爾頓 $\pm$  5%。

術語「人類抗體」包括具有由人類生殖系免疫球蛋白序列衍生之序列之抗體，諸如由具有人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小鼠(例如XENOMOUSE基因工程改造小鼠(Abgenix, Fremont, CA)、HUMAB-MOUSE®、KIRIN TC MOUSE™轉染色體小鼠、KMMOUSE®(MEDAREX, Princeton, NJ))、人類噬菌體呈現庫、人類骨髓瘤細胞或人類B細胞衍生之抗體。

如本文所用之術語「單株抗體」係指由實質上均質抗體之群獲得之抗體，亦即除可在產生單株抗體期間出現之可能變異體(該等變異體一般以少量存在)之外，構成該群之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定基。與通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體之多株抗體製劑對比，各單株抗體針對抗原上之單一決定子。修飾語「單株」指示抗體係自實質上均質之抗體群獲得之特性，且不應理解為需要藉由任何特定方法來產生該抗體。舉例而言，欲根據本發明使用之單株抗體可藉由最初由Kohler等人，*Nature*, 256:495 (1975)所述之融合瘤方法產生，或可藉由重組DNA方法(參見例如美國專利第4,816,567號)產生。「單株抗體」亦可使用例如Clackson等人，*Nature*, 352:624-628 (1991)及Marks等人，*J.*

*Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)中所述之技術自噬菌體抗體庫中分離。

本文中之單株抗體特定言之包括「嵌合」抗體，其中一部分重鏈及/或輕鏈與衍生自特定物種或屬於特定抗體種類或子類之抗體中的相應序列相同或同源，而該(該等)鏈之剩餘部分與衍生自另一物種或屬於另一抗體種類或子類之抗體中的相應序列相同或同源；以及該等抗體之片段，只要其展現所要生物活性即可(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))。本文中之相關嵌合抗體包括包含衍生自非人類靈長類動物(例如舊大陸猴(Old World Monkey)、猿(Ape)等)之可變域抗原結合序列及人類恆定區序列的「靈長類化」抗體。

在本發明之調配物中製備之人類化免疫球蛋白之「抗原結合片段」至少包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之重鏈及/或輕鏈之可變區。舉例而言，維多珠單抗(vedolizumab)之抗原結合片段包含SEQ ID NO:4之人類化輕鏈序列之胺基酸殘基20至131。該等抗原結合片段之實例包括在此項技術中已知之人類化免疫球蛋白之Fab片段、Fab'片段、scFv及F(ab')<sub>2</sub>片段。本發明之人類化免疫球蛋白之抗原結合片段可藉由酶促裂解或藉由重組技術產生。舉例而言，番木瓜蛋白酶或胃蛋白酶裂解可分別用於產生Fab或F(ab')<sub>2</sub>片段。抗體亦可使用已將一或多個終止密碼子引入天然終止位點之上游的抗體基因以多種截短形式產生。舉例而言，編碼F(ab')<sub>2</sub>片段之重鏈之重組構築體可經設計以包括編碼重鏈之CH<sub>1</sub>結構域及鉸鏈區的DNA序列。在一個態樣中，抗原結合片段抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至一或多個其配位體(例如黏膜定址素MAdCAM(例如MAdCAM-1)、纖維結合蛋白)。

番木瓜蛋白酶消化抗體產生兩個稱為「Fab」片段之相同抗原結合片

段，各具有單一抗原結合位點；及一剩餘「Fc」片段，其名稱反映其易於結晶之能力。胃蛋白酶處理產生F(ab')<sub>2</sub>片段，其具有兩個抗原結合位點且仍能夠交聯抗原。

「Fv」為由一個重鏈可變域及一個輕鏈可變域呈非共價締合形式之二聚體組成之抗體片段。

Fab片段亦含有輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(CH1)。Fab'片段因在重鏈CH1結構域之羧基端添加少量殘基(包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸)而不同於Fab片段。Fab'-SH在本文中為恆定域之半胱胺酸殘基帶有至少一個游離硫醇基之Fab'的命名。F(ab')<sub>2</sub>抗體片段最初被製成其之間具有鉸鏈半胱胺酸之Fab'片段對。亦已知抗體片段之其他化學偶聯。

「單鏈Fv」或「scFv」抗體片段包含抗體之V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>結構域，其中此等結構域存在於單一多肽鏈中。在一個態樣中，Fv多肽進一步包含位於V<sub>H</sub>與V<sub>L</sub>結構域之間的多肽連接子，其使得scFv可形成抗原結合所需之結構。關於scFv之綜述，參見Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenberg及Moore編, Springer-Verlag, New York, 第269頁至第315頁(1994)。

術語「雙功能抗體」係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含與同一多肽鏈(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)中之輕鏈可變域(V<sub>L</sub>)連接的重鏈可變域(V<sub>H</sub>)。藉由使用過短而無法使同一鏈上兩個結構域之間配對的连接子，迫使該等結構域與另一鏈之互補結構域配對且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體更充分地描述於例如EP 404,097；WO 93/11161；及Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)中。

「全長抗體」為包含抗原結合可變區以及輕鏈恆定域(C<sub>L</sub>)及重鏈恆定域C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>及C<sub>H3</sub>之抗體。恆定域可為原生序列恆定域(例如人類原生序列恆定域)或其胺基酸序列變異體。在一個態樣中，全長抗體具有一或多種效應功能。

本文中之「胺基酸序列變異」抗體為具有不同於主要物種抗體之胺基酸序列的抗體。通常，胺基酸序列變異體將與主要物種抗體具有至少約70%、至少約80%、至少約85%、至少約90%或至少約95%同源性。胺基酸序列變異體在主要物種抗體之胺基酸序列內或鄰近於主要物種抗體之胺基酸序列的某些位置處具有取代、缺失及/或添加，但仍保持抗原結合活性。抗體之恆定區序列的變異對抗原結合活性之影響比可變區之變異小。在可變區中，胺基酸序列變異體將與主要物種抗體至少約90%同源、至少約95%同源、至少約97%同源、至少約98%同源或至少約99%同源。

「同源性」定義為在比對序列且(若必要)引入缺口以達成最大同源性百分比之後在胺基酸序列變異體中相同之殘基的百分比。用於比對之方法及電腦程式為此項技術中所熟知。

「治療性單株抗體」為用於治療人類個體之抗體。本文中所揭示之治療性單株抗體包括抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。

本文中之「糖基化變異」抗體為附接有不同於附接於主要物種抗體之一或多種碳水化合物部分之一或多種碳水化合物部分之抗體。本文中之糖基化變異體之實例包括有G1或G2寡醣結構而非G0寡醣結構附接於其Fc區之抗體，有一或兩種碳水化合物部分附接於其一或兩個輕鏈之抗體，無碳水化合物附接於抗體之一或兩個重鏈之抗體等，及糖基化變化之組合。

抗體「效應功能」係指可歸因於抗體之Fc區(原生序列Fc區或胺基酸

序列變異Fc區)之彼等生物活性。抗體效應功能之實例包括：C1q結合；補體依賴性細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體；BCR)之下調；及其類似功能。

視全長抗體之重鏈之恆定域的胺基酸序列而定，可將全長抗體分為不同「類別」。存在五種主要類別之全長抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等中之若干種可進一步細分為「子類」(同型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及IgA2。對應於抗體之不同類別的重鏈恆定域分別稱為 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 及 $\mu$ 。免疫球蛋白之不同類別之次單元結構及三維組態係熟知的。

來自任何脊椎動物物種之抗體之「輕鏈」可基於其恆定域之胺基酸序列指派為兩種明顯不同類型(稱為 $\kappa$ 及 $\lambda$ )中之一者。

「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」及「ADCC」係指細胞介導之反應，其中表現Fc受體(FcR)之非特異性細胞毒性細胞(例如自然殺手(Natural Killer, NK)細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)識別目標細胞上之結合抗體且隨後導致目標細胞溶解。用於介導ADCC之一次細胞(NK細胞)僅表現Fc $\gamma$ RIII，而單核細胞表現Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII及Fc $\gamma$ RIII。FcR在造血細胞上之表現概述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)第464頁上的表3中。為了評估相關分子之ADCC活性，可進行活體外ADCC分析，諸如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號中所述之分析。適用於該等分析之效應細胞包括外周血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，可例如在Clynes等人，*PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)中所揭示之動物模型中活體內評估相關分子之ADCC活性。

術語「Fc受體」或「FcR」用來描述結合至抗體之Fc區的受體。在一個態樣中，FcR為原生序列人類FcR。在另一態樣中，FcR為結合IgG抗體之受體( $\gamma$ 受體)且包括Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII及Fc $\gamma$ RIII子類之受體，包括此等受體之對偶基因變異體及交替剪接形式。Fc $\gamma$ RII受體包括Fc $\gamma$ RIIA(「活化受體」)及Fc $\gamma$ RIIB(「抑制受體」)，該等受體具有主要在其細胞質域中不同之類似胺基酸序列。活化受體Fc $\gamma$ RIIA在其細胞質域中含有免疫受體酪胺酸基活化基元(ITAM)。抑制受體Fc $\gamma$ RIIB在其細胞質域中含有免疫受體酪胺酸基抑制基元(ITIM)。(參見M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)中之綜述)。FcR於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)；Capel等人，*Immunomethods* 4:25-34 (1994)；及de Haas等人，*J. Lab. Clin. Med.* 126:33-41 (1995)中有綜述。本文中之術語「FcR」涵蓋其他FcR，包括將來待鑑別之FcR。該術語亦包括新生兒受體FcRn，其負責將母體IgG轉移至胎兒(Guyer等人，*J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人，*J. Immunol.* 24:249 (1994))。

術語「高變區」當在本文中使用时係指負責抗原結合之抗體的胺基酸殘基。高變區通常包含「互補決定區」或「CDR」之胺基酸殘基(例如輕鏈可變域中之殘基24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)，及重鏈可變域中之31-35(H1)、50-65(H2)及95-102(H3)；Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))及/或「高變環」之彼等殘基(例如輕鏈可變域之殘基26-32(L1)、50-52(L2)及91-96(L3)，及重鏈可變域之26-32(H1)、53-55(H2)及96-101(H3)；Chothia及Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。「構架區」或「FR」殘基為除如本文所

定義之高變區殘基外的彼等可變域殘基。可將高變區或其CDR自一個抗體鏈轉移至另一抗體鏈或至另一蛋白質以賦予所得(複合)抗體或結合蛋白以抗原結合特異性。

「人類化」形式之非人類(例如齧齒動物)抗體為含有衍生自非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。人類化抗體大部分為人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體之高變區的殘基經來自諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物之非人類物種(供體抗體)之高變區的具有所需特異性、親和力及容量之殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之構架區(FR)殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含未見於受體抗體或供體抗體中之殘基。進行此等修飾以進一步改良抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含實質上所有至少一個且通常兩個可變域，其中所有或實質上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環，且所有或實質上所有FR為人類免疫球蛋白序列之FR。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常為人類免疫球蛋白之恆定區之至少一部分。更多細節參見Jones等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。

「親和力成熟」抗體為與不具有變化之親本抗體相比，在其一或多個高變區中具有一或多個導致抗體對抗原之親和力改良之變化的抗體。在一個態樣中，親和力成熟抗體對目標抗原將具有奈莫耳或甚至皮莫耳親和力。藉由此項技術中已知之程序製備親和力成熟抗體。Marks等人，*Bio/Technology* 10:779-783 (1992)描述藉由VH及VL結構域改組實現之親和力成熟。CDR及/或構架殘基之無規突變誘發由以下描述：Barbas等

人，*Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994)；Schier等人，*Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton等人，*J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人，*J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)；及Hawkins等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

「經分離」抗體為已經鑑別且與其天然環境之組分分離及/或自其天然環境之組分中回收的抗體。在某些實施例中，抗體將：(1)經純化至如藉由勞立法(Lowry method)所測定大於95重量%蛋白質且或者大於99重量%；(2)經純化至足以藉由使用旋杯式序列分析儀獲得N端或內部胺基酸序列之至少15個殘基之程度；或(3)在還原或非還原條件下使用庫馬斯藍(Coomassie blue)或銀染色法藉由SDS-PAGE經純化至均質。經分離之抗體包括重組細胞內之原位抗體，這是因為抗體之天然環境之至少一種組分將不存在。然而，通常將藉由至少一個純化步驟來製備經分離抗體。

「治療」係指治療性治療及預防性(prophylactic或preventative)措施兩者。需要治療之人包括已患有疾病之人以及需要預防疾病或其復發之人。因此，本文中待治療之患者可能已診斷為患有疾病或可能易患疾病或對疾病易感。術語「患者」及「個體」在本文中可互換使用。

調配之抗體為實質上純的且宜為實質上均質的(亦即不含污染蛋白質等)。「實質上純的」抗體意謂包含以蛋白質之總重量計至少約90重量%、或者至少約95重量%或97重量%抗體的組合物。「實質上均質」抗體意謂包含蛋白質之組合物，其中以蛋白質之總重量計至少約99重量%蛋白質為特異性抗體，例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。

關於潰瘍性結腸炎個體的如本文所用之「臨床緩解」係指2或小於2個點之完全Mayo計分且沒有個別子計分大於1個點。克隆氏病「臨床緩

解」係指150個點或小於150個點之CDAI計分。

關於潰瘍性結腸炎個體的如本文所用之「臨床反應」係指3或大於3個點及自基線30%之完全Mayo計分(或若在隨訪時不進行完全Mayo計分,則為2或大於2個點及自基線25%或大於25%的部分Mayo計分)的降低,伴有1或大於1個點之直腸出血子計分或1個或小於1個點之絕對直腸出血計分的降低。關於克隆氏病個體的如本文所用之「臨床反應」係指CDAI計分自基線(0週)的70個點或大於70個點之降低。

關於潰瘍性結腸炎個體的如本文所用之「黏膜癒合」係指1個點或小於1個點之內窺鏡子計分。

如本文所用,「治療失敗」係指疾病惡化、需要急救藥物或手術介入來治療潰瘍性結腸炎或克隆氏病。急救藥物為任何新穎藥物或治療新型或未分型之潰瘍性結腸炎或克隆氏病症狀所需之基線藥物劑量的任何增加(除用於控制慢性腹瀉之止瀉藥以外)。

### 調配物

如本文所述,已發現抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體當與抗氧化劑或螯合劑一起調配時更穩定。另外,如本文所述,可調配抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體以減少聚集體形成(例如可減少調配物中的聚山梨醇酯80之量)。舉例而言,包含檸檬酸鹽或EDTA及抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之調配物在儲存期間降低抗體聚集體形成率。亦可在無氧氣的情況下儲存調配物以減少聚集體形成。在一個實施例中,調配物在25°C下12個月之後具有小於約2.5%之抗體聚集體形成。在一個實施例中,調配物在25°C下12個月之後具有小於約2.0%之抗體聚集體形成。在一個實施例中,調配物在25°C下12個月之後具有小於約1.6%之抗體聚集體形成。在一個實施例中,調配物在25°C下12個月之後具有小於約1.3%

之抗體聚集體形成。在一個實施例中，調配物在25°C下12個月之後具有小於約1.0%之抗體聚集體形成。在另一實施例中，調配物在5°C下12個月之後具有小於約0.5%之抗體聚集體形成。在另一實施例中，調配物在5°C下12個月之後具有小於約0.3%之抗體聚集體形成。

在第一態樣中，本發明提供一種穩定的抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物。調配物包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體及抗氧化劑或螯合劑。調配物亦包含可為一或多種游離胺基酸之緩衝劑。調配物可視情況進一步包含界面活性劑。調配物中之抗體可為全長抗體或其抗原結合片段(諸如Fab、Fv、scFv、Fab'或F(ab')<sub>2</sub>片段)。

可藉由自調配物移除氧氣減少聚集體形成。或者，調配物可含有抗氧化劑或螯合劑。在一個態樣中，可包括於調配物中之例示性抗氧化劑及螯合劑包括硫辛酸、尿酸、麩胱甘肽、生育酚、胡蘿蔔素、番茄紅素、半胱胺酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)、二巖基丙醇、二伸乙三胺五乙酸及N,N-雙(羧甲基)甘胺酸、磷酸酯化合物(例如依替磷酸)、去鐵胺、蘋果酸鹽及檸檬酸鹽。一些抗氧化劑及螯合劑可在調配物儲存期間降低聚集體形成率。在另一態樣中，螯合劑及/或抗氧化劑為檸檬酸鹽或EDTA。液體調配物之例示性螯合劑濃度在大致大於0 mM至約60 mM、約5 mM至約50 mM、約5 mM至約15 mM、約10 mM至約25 mM及約20 mM至約30 mM範圍內。在另一態樣中，螯合劑濃度為約0 mM至約30 mM。在一個實施例中，螯合劑及/或抗氧化劑為檸檬酸鹽，且檸檬酸鹽濃度為約0 mM至約15 mM、約0 mM至約10 mM或約0 mM至約5 mM。

調配物可含有任何一種所要游離胺基酸，其可呈L形式、D形式或此

等形式之任何所要混合物。在一個態樣中，可包括於調配物中之游離胺基酸包括例如組胺酸、丙胺酸、精胺酸、甘胺酸、麩胺酸、絲胺酸、離胺酸、色胺酸、纈胺酸、半胱胺酸及其組合。一些胺基酸可例如經由氫鍵、鹽橋、抗氧化性質或疏水性相互作用或藉由自蛋白質表面排阻在製造、乾燥、凍乾及/或儲存期間穩定化蛋白質免於降解。胺基酸可充當張力調節劑或可用來降低調配物之黏度。在另一態樣中，游離胺基酸(諸如組胺酸及精胺酸)可充當凍乾保護劑，且當凍乾為調配物之組分時不結晶。單獨或呈組合形式之游離胺基酸(諸如麩胺酸及組胺酸)可充當在5至7.5之pH值範圍內之水溶液中的緩衝劑。在另一態樣中，調配物含有組胺酸、精胺酸或組胺酸與精胺酸之組合。在另一態樣中，液體調配物之游離胺基酸濃度在約9 mM至約0.5 M範圍內，例如為約10 mM至約90 mM、約10 mM至約75 mM、約10 mM至約40 mM、約25 mM至約50 mM、約15 mM至約300 mM、約20 mM至約200 mM、約25 mM至約150 mM、約50 mM至約75 mM、約50 mM至約120 mM、約50 mM至約150 mM或約50 mM或約125 mM。

調配物可視情況進一步含有至少一種界面活性劑，例如用來控制可溶性及不溶性聚集體形成。在一個態樣中，界面活性劑為非離子界面活性劑。在另一態樣中，界面活性劑為離子型界面活性劑。可包括於調配物中之例示性界面活性劑包括例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆(泊洛尼克®)及其組合。當存在時，界面活性劑通常以減少在聚矽氧、填充小瓶、預填充注射器及/或藥筒存在下例如在裝瓶、冷凍、乾燥、凍乾及/或復原期間抗體之不溶性聚集體形成之量包括在內。界面活性劑濃度通常為約0.0001%至約1.0%、約0.01%至約0.5%，例如為約0.05%、

0.1%、0.15%、0.20%、0.3%、0.4%或0.5%(w/v)。較高濃度之界面活性劑(例如聚山梨醇酯80)可導致更多SEC聚集體形成。降低聚山梨醇酯80之濃度可減少在儲存時SEC聚集體之形成。在一個態樣中，界面活性劑:抗體莫耳比為約0.7:1至約2.0:1。在另一態樣中，界面活性劑:抗體莫耳比為1.5:1。

抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之實施例含有高濃度之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。舉例而言，在一個實施例中，液體調配物可包含至少約60 mg/ml、至少約70 mg/ml、至少約80 mg/ml、至少約90 mg/ml、至少約100 mg/ml、至少約110 mg/ml、至少約120 mg/ml、至少約130 mg/ml、至少約140 mg/ml、至少約150 mg/ml、至少約160 mg/ml、至少約170 mg/ml、至少約180 mg/ml、至少約190 mg/ml、至少約200 mg/ml、至少約250 mg/ml、至少約300 mg/ml、約60 mg/ml至約190 mg/ml、約60 mg/ml至約170 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體，約150 mg/ml至約180 mg/ml或約160 mg/ml或約165 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。或者，在另一態樣中，液體調配物可包含至少約154 mg/ml、至少約176 mg/ml。

調配物可為液體或固體。液體調配物為在適合水性溶劑(諸如水)或水性/有機混合物(諸如水醇混合物)中製備之水溶液或懸浮液。液體調配物之pH值介於約5.5與約7.5之間、約6.0與7.3之間、約6.0與約7.0之間、約6.0與6.5之間、約6.0與6.3之間、約6.3與7.1之間或約6.4與7.0之間或6.3與6.8之間，諸如為約6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8或6.9。液體調配物可保持於室溫下、冷藏(例如2°C至8°C)或冷凍(例如-20°C或-70°C)儲存。

固體調配物可例如在添加凍乾保護劑情況下以任何適合方法製備且

可呈例如餅或粉末形式。在一個態樣中，藉由乾燥如本文所述之液體調配物(例如藉由凍乾或噴霧乾燥)來製備固體調配物。當調配物為固體調配物時，調配物之水分含量可不超過約5%、不超過約4.5%、不超過約4%、不超過約3.5%、不超過約3%、不超過約2.5%、不超過約2%、不超過約1.5%、不超過約1%，或為實質上無水的。可將固體調配物溶解(亦即復原)於適合介質或溶劑中以變為適用於投與之液體。用於復原固體調配物之適合溶劑包括水、等張生理食鹽水、緩衝劑(例如磷酸鹽緩衝生理食鹽水)、林格氏(Ringer's)(乳酸鹽或右旋糖)溶液、最低必需培養基、醇/水性溶液、右旋糖溶液等。溶劑之量可導致治療性蛋白質濃度與乾燥前之濃度相比更高、相同或更低。在另一態樣中，復原之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體濃度與乾燥前液體調配物之濃度相同。

調配物可為無菌的，且此可在製備調配物之前或之後根據熟習此項技術者已知用於產生適用於向人類個體投與之無菌醫藥調配物的程序來達成。調配物可藉由經由小孔隙過濾、經由無菌處理或藉由暴露於紫外輻射以液體(例如在乾燥之前及/或復原之後)形式來滅菌。過濾器孔隙尺寸可為0.1  $\mu\text{m}$ 或0.2  $\mu\text{m}$ 以過濾微生物或為10 nm至20 nm以過濾病毒顆粒。或者或另外，乾燥調配物可例如藉由暴露於 $\gamma$ 輻射來滅菌。在一個態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體液體調配物係藉由在乾燥之前過濾來滅菌。

在一個態樣中，調配物在儲存時為穩定的。各種穩定性分析可為熟練技藝者所用來證實調配物之穩定性。舉例而言，液體調配物中之抗體當儲存於約25°C下時可穩定至少約4週、至少約2個月、至少約3個月或至少約6個月或至少約9個月或至少約12個月；在約2°C至8°C下穩定至少約3個月、至少約1年、至少約2年、至少約3年或更長時間。或者或另外，調配

物中之抗體當儲存於約15°C下時可穩定至少約4週、至少約3個月、至少約6個月、至少約9個月、至少約1年或更長時間。或者或另外，調配物中之抗體當儲存於約-20°C或-70°C下時可穩定至少約4週、至少約3個月、至少約6個月、至少約9個月、至少約1年、至少約2年、至少約3年、至少約4年或更長時間。

可藉由評估調配物中之抗體在調配時以及在指示溫度下儲存之後的物理穩定性、化學穩定性及/或生物活性來測試穩定性。可以多種不同法定性及/或定量評估液體調配物或復原乾燥粉末之物理及/或化學穩定性(參見例如 *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*, Rodriguez-Diaz等人編, Informa Healthcare (2005)), 包括評估可溶性及不溶性聚集體形成(例如使用尺寸排阻層析法、分析超速離心、MALDI-TOF MS、光散射(動態(DLS)或MALLS)、基於流動之顯微鏡成像或其他液體顆粒計數系統、藉由量測混濁度、藉由密度梯度離心及/或藉由目視檢查); 藉由使用陽離子交換層析(亦參見 Vlasak及Ionescu, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:468-481 (2008)及Harris等人, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 752:233-245 (2001))、等電聚焦或毛細管帶電泳評估電荷非均勻性; 胺基端或羧基端序列分析; 質譜分析; SDS-PAGE分析以比較片段化、完整及多聚(亦即二聚、三聚等)抗體; 肽圖(例如胰蛋白酶或LYS-及其類似物)。不穩定性可導致聚集、脫醯胺(例如Asn脫醯胺)、氧化(例如Met氧化)、異構化(例如Asp異構化)、變性、剪短/水解/片段化(例如鉸鏈區片段化)、丁二醯亞胺形成、不成對半胱胺酸、N端延長、C端加工、糖基化差異等。可使用熟練技藝者可用之多種技術來評估生物活性或抗原結合功能(例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體與MAdCAM(例如MAdCAM-1)之結合或抑制表

現  $\alpha 4\beta 7$  整合素之細胞與 MAdCAM(例如 MAdCAM-1)(例如固定 MAdCAM(例如 MAdCAM-1))之結合)(參見例如 Soler 等人, *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 330:864-875 (2009))。量測乾燥調配物之水分含量可指示調配物有多大可能經受化學或物理降解,水分含量愈高,降解愈多。

穩定調配物可促成抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體之低免疫原性。免疫原性抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體可導致人類個體或患者之人類-抗-人類抗體(HAHA)反應。對於抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體顯現HAHA反應之患者在治療時可具有不利事件(例如位點輸注反應)或可快速消除抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體,導致劑量比治療所計劃的低。抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體治療之早期研究之報導(Feagen等人(2005) *N. Engl. J. Med.* 352:2499-2507)指示人類抗人類抗體截至第8週時在44%治療患者中出現。此研究中之抗體係以液體形式儲存且不含任何聚山梨醇酯。

在一些實施例中,與不太穩定調配物之HAHA結果相比,調配物可將HAHA陰性患者之比例增至至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%之患者。

在一些實施例中,抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體調配物具有 $\geq 50\%$ 主要帶電同功異型物、 $\geq 55\%$ 主要帶電同功異型物或65%至70%主要帶電同功異型物。在其他態樣中,穩定抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體調配物具有 $\leq 45\%$ 酸性帶電同功異型物、 $\leq 40\%$ 酸性帶電同功異型物、 $\leq 30\%$ 酸性帶電同功異型物或22%至28%酸性同功異型物。在其他態樣中,穩定抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體調配物具有 $\leq 25\%$ 鹼性同功異型物、 $\leq 20\%$ 鹼性同功異型物、 $\leq 15\%$ 鹼性同功異型物、約5%鹼性同功異型物或約10%鹼性同功異型物。在一個態樣中,例如如藉由CEX所測定,穩定抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體調配物具有 $\geq 55\%$ 主要同功異型物、 $\leq 30\%$ 酸性同功

異型物及/或 $\leq 20\%$ 鹼性同功異型物。在另一態樣中，例如如藉由cIEF所測定，穩定抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有 $\geq 50\%$ 主要同功異型物、 $\leq 45\%$ 酸性同功異型物及/或 $< 10\%$ 鹼性同功異型物。

在一些態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體乾燥固體調配物具有 $\leq 10\%$ 水分含量、 $\leq 5\%$ 水分含量或 $< 2.5\%$ 水分含量。復原所需時間為 $\leq 60$ 分鐘、 $\leq 50$ 分鐘或 $\leq 40$ 分鐘或 $\leq 30$ 分鐘或 $\leq 20$ 分鐘。

可藉由SEC、分析超速離心、光散射(DLS或MALLS)、MALDI-TOF MS或奈米尺寸量測(諸如奈米粒子徑跡分析，NTA, NanoSight Ltd, Wiltshire, UK)來量測液體調配物或復原調配物中之單體含量及/或聚集體含量(例如二聚體、三聚體、四聚體、五聚體、寡聚物及更高級聚集體)。可以許多方法達成聚集體之解析、示性及定量，該等方法包括例如藉由更長管柱或藉由連續附接第二或更多SEC管柱與初始分析SEC管柱成直線來增加SEC管柱分離之長度；用光散射或藉由使用NTA來補充單體之SEC定量。

在一個實施例中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有 $\geq 90\%$ 單體抗體、 $\geq 95\%$ 單體抗體或 $97\%$ 至 $99\%$ 單體抗體。在另一實施例中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物中之大部分物質之平均半徑 $\leq 20$  nm、 $\leq 15$  nm、 $\leq 10$  nm，或為約 $5$  nm至約 $7$  nm。在一個態樣中，藉由蛋白質分析，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有 $\geq 80\%$ 量之重鏈加輕鏈。在一個態樣中，存在 $\geq 90\%$ 重鏈加輕鏈。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有 $\leq 10\%$ 聚集體、 $\leq 5\%$ 聚集體、 $\leq 2.5\%$ 聚集體、 $\leq 1.5\%$ 聚集體、 $\leq 1.0\%$ 聚集體或 $\leq 0.5\%$ 聚集體。在另一態樣中，穩定抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有 $\geq 96\%$ 單體及/或 $\leq 2.5\%$ 聚集體。在另一態樣中，穩定抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有約 $99\%$ 單體及/或約 $< 1\%$ 聚集體。

可藉由光遮蔽(例如Hach Ultra Analytics(Grants Pass, OR)之液體顆粒計數系統(HIAC))、顯微法、庫爾特計數器或基於數位(例如基於流動之)顯微鏡成像系統(諸如Brightwell(Ottawa, CA)之微流體(microfluidics)成像(MFI)或Fluid Imaging Technologies(Yarmouth, ME)之FLOWCAM® Image顆粒分析儀)來量測液體調配物或復原調配物中之(例如)聚集體或不溶性賦形劑之粒度(大於1微米至2微米)。在一個態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體製劑之粒度為約30  $\mu\text{m}$ 、約25  $\mu\text{m}$ 、約10  $\mu\text{m}$ 、約5  $\mu\text{m}$ 、約2  $\mu\text{m}$ 或1  $\mu\text{m}$ 或小於1  $\mu\text{m}$ 。應將抗體調配物中之顆粒之量減至最少。在一個態樣中，在一個劑量中抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物中的顆粒之量為<6000個顆粒 $\geq 10 \mu\text{m}$ 直徑及/或<600個顆粒 $\geq 25 \mu\text{m}$ 直徑(美國藥典(U.S. Pharmacopoeia)第788章，光遮蔽計數法；一半彼等量藉由顯微鏡定量法測定)。在另一態樣中，在一個劑量抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物中，顆粒之量為約1000個顆粒 $\geq 10 \mu\text{m}$ 及約0至100個顆粒 $\geq 25 \mu\text{m}$ (MFI方法)。在另一態樣中，例如藉由MFI量測，在一個劑量抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物中，每毫升顆粒之量為每毫升約500個至約2000個2  $\mu\text{m}$ 至10  $\mu\text{m}$ 顆粒、每毫升約50個至約350個 $\geq 10 \mu\text{m}$ 顆粒及每毫升約0至約50個 $\geq 25 \mu\text{m}$ 顆粒。在另一態樣中，在一個劑量抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物中，顆粒之量為每毫升約500個至約100,000個、約1000個至約5000個或約1500個至約3000個2  $\mu\text{m}$ 至10  $\mu\text{m}$ 顆粒。

可控制抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之黏度用於皮下或肌內投與。黏度可受蛋白質濃度及pH值的影響。舉例而言，隨著蛋白質濃度升高，黏度可提高。pH值升高可使抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之黏度降低。在一些蛋白質調配物中，添加氯化鈉以降低調配物之黏度。可影響抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之黏度的其他組分為胺基酸，諸如組胺酸及精胺酸。

抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物可為等張(例如250 mOsm至350 mOsm)或高張的(例如大於350 mOsm、大於450 mOsm、大於550 mOsm或大於650 mOsm)，例如以供皮下或肌內投與。在一個態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物不為低張的(例如小於250 mOsm)。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物為約350 mOsm至約400 mOsm、約400 mOsm至約450 mOsm或約350 mOsm至約450 mOsm。

導致變性之不穩定性可藉由差示掃描熱量測定(DSC)來評估。在DSC中抗體具有兩個熔融溫度( $T_m$ )，例如 $T_{m1}$ 及 $T_{m2}$ 。某些賦形劑可影響原生抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之穩定性。關於當藉由DSC比較調配物時熔融溫度較高之發現可表明， $T_m$ 愈高，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物愈穩定。舉例而言，在pH 5.7下，與在pH 6.5下相比，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之 $T_m$ 更低，且因此不太穩定。在一個態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之 $T_{m1} > 60^\circ\text{C}$ 。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之 $T_{m1}$ 為約 $65^\circ\text{C}$ 至約 $70^\circ\text{C}$ 或約 $69^\circ\text{C}$ 。在一個態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之 $T_{m2} > 80^\circ\text{C}$ 。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之 $T_{m2}$ 為約 $82^\circ\text{C}$ 至約 $88^\circ\text{C}$ 或約 $86^\circ\text{C}$ 。

在一個實施例中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之結合親和力或 $EC_{50}$ 值為參考標準抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體的約60%至約140%。在一個態樣中，本文所述之調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體以參考標準之約80%至約120%之值結合至例如於細胞上之 $\alpha 4\beta 7$ (WO 98/06248或美國專利第7,147,851號)。在另一實施例中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物具有抑制表現 $\alpha 4\beta 7$ 整合素之細胞與MAdCAM(例如MAdCAM-1)(例如MAdCAM-Ig嵌合體)之結合至少50%或至少60%的能力(參見美國專利申請公開案第20070122404號，亦參考標準實例)。

如上所述，在本文中尤其涵蓋調配物之冷凍。因此，可測試調配物

在冷凍及解凍時之穩定性。因此，液體調配物中之抗體在冷凍及解凍調配物時可為穩定的，例如抗體在一個、兩個、三個、四個、五個或五個以上冷凍/解凍循環之後可為穩定的。

在一些實施例中，醫藥調配物為包含至少約60 mg/ml至約170 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、緩衝劑(例如組胺酸)及至少約5 mM檸檬酸鹽之液體調配物。在其他實施例中，調配物為包含至少約60 mg/ml至約170 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、緩衝劑(例如檸檬酸鹽)、胺基酸(例如精胺酸)及界面活性劑(例如聚山梨醇酯80)之液體調配物。

在另一實施例中，調配物包含至少約140 mg/ml或約150 mg/ml至約170 mg/ml(例如約160 mg/ml)抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、緩衝劑(例如組胺酸)、至少約5 mM檸檬酸鹽及游離胺基酸(例如精胺酸)。

在另一實施例中，調配物包含至少約160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、緩衝劑(例如組胺酸)、至少約5 mM檸檬酸鹽、0.2%聚山梨醇酯80及游離胺基酸(例如精胺酸)。在一實施例中，調配物中之緩衝劑濃度為約15 mM至約75 mM、約25 mM至約65 mM或為約50 mM。調配物中之游離胺基酸濃度為約50 mM至約250 mM、約75 mM至約200 mM、約100 mM至約150 mM或為約125 mM；調配物中之聚山梨醇酯80濃度為約0.05%至0.4%、約0.1%至0.4%、約0.1%至0.3%、約0.1%至0.25%、約0.1%至0.2%或為約0.2%。

在一些實施例中，調配物為固體調配物(例如凍乾調配物)，其包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、檸檬酸鹽、組胺酸、精胺酸、聚山梨醇酯80及凍乾保護劑或醣(諸如非還原糖)之混合物。醣可以達到0%至20%或約6%至約10%之濃度包括於液體調配物中。

在一個實施例中，調配物經凍乾且以單次劑量形式儲存於一個容器(例如小瓶、注射器、藥筒及/或自動注射器)中。容器可儲存於約2°C至8°C或25°C下直至將其向有需要之個體投與。小瓶可例如為5 cc、10 cc或20 cc小瓶(例如用於160 mg/ml劑量)。小瓶可含有至少約20 mg、至少約50 mg、至少約70 mg、至少約80 mg、至少約100 mg、至少約120 mg、至少約155 mg、至少約180 mg、至少約200 mg、至少約240 mg、至少約300 mg、至少約360 mg、至少約400 mg、至少約540 mg或至少約900 mg抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在一個態樣中，容器含有約165 mg抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。

在另一實施例中，調配物為液體且以單次劑量形式儲存於一或兩個小瓶、藥筒、注射器或自動注射器中。小瓶、藥筒、注射器或自動注射器可儲存於約2°C至8°C下直至將其內含物(例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體)向有需要之個體投與。小瓶可例如為5 cc、10 cc或20 cc小瓶(例如用於160 mg/ml劑量)。小瓶可含有至少約20 mg、至少約50 mg、至少約70 mg、至少約80 mg、至少約100 mg、至少約120 mg、至少約155 mg、至少約180 mg、至少約200 mg、至少約240 mg、至少約300 mg、至少約360 mg、至少約400 mg、至少約540 mg或至少約900 mg抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在一個態樣中，小瓶含有約165 mg抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。注射器或藥筒可為1 mL或2 mL容器(例如用於160 mg/mL劑量)或大於2 mL例如用於較高劑量(至少320 mg或400 mg或更高)。注射器或藥筒可含有至少約20 mg、至少約50 mg、至少約70 mg、至少約80 mg、至少約100 mg、至少約120 mg、至少約155 mg、至少約180 mg、至少約200 mg、至少約240 mg、至少約300 mg、至少約360 mg、至少約400 mg或至少約500 mg抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。

一或多種其他醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(諸如

*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*，第 21 版，Hendrickson, R. 編(2005)中所述者)可包括於調配物中，只要其不會不利地影響調配物之所要特徵即可。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對受體無毒且包括：其他緩衝劑；共溶劑；抗氧化劑，包括檸檬酸鹽及半胱胺酸；螯合劑，諸如EDTA；金屬複合物(例如Zn-蛋白質複合物)；生物可降解聚合物，諸如聚酯；防腐劑；出於注射便利之容器壁潤滑劑，例如聚矽氧、礦物油、甘油或TRIBOGLIDE®(Tribo Film Research, Inc.)全氟聚醚衍生物；及/或成鹽相對離子，諸如鈉。

### **$\alpha 4\beta 7$ 抗體**

適用於調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體包括來自任何所要來源之抗體，諸如全人類抗體、鼠類抗體、兔抗體及其類似抗體；及任何所要工程改造抗體，諸如嵌合抗體、人類化抗體及其類似抗體。此等類型抗體任一者之抗原結合片段(諸如Fab、Fv、scFv、Fab'及F(ab')<sub>2</sub>片段)亦適用於調配物中。

抗- $\alpha 4\beta 7$  抗體可結合至 $\alpha 4$  鏈(例如人類化MAb 21.6(Bendig等人，美國專利第5,840,299號))、 $\beta 7$  鏈(例如FIB504或人類化衍生物(例如Fong等人，美國專利第7,528,236號))上之抗原決定基，或結合至由 $\alpha 4$  鏈與 $\beta 7$  鏈締合所形成之組合抗原決定基。在一個態樣中，抗體結合 $\alpha 4\beta 7$  複合物上之組合抗原決定基，但不結合 $\alpha 4$  鏈或 $\beta 7$  鏈上之抗原決定基，除非該等鏈彼此締合。 $\alpha 4$  整合素與 $\beta 7$  整合素之締合可例如藉由引入至存在於兩個鏈(其一起構成抗原決定基)上之近接殘基中或藉由構形暴露一個鏈(例如 $\alpha 4$  整合素鏈或 $\beta 7$  整合素鏈)上之抗原決定基結合位點(其在不存在適當整合素搭配物或不存在整合素活化的情況下難以達成抗體結合)來製造組合抗原

決定基。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體結合 $\alpha 4$ 整合素鏈及 $\beta 7$ 整合素鏈兩者，且因此對於 $\alpha 4\beta 7$ 整合素複合物具有特異性。該等抗體可例如結合 $\alpha 4\beta 7$ 但不結合 $\alpha 4\beta 1$ 且/或不結合 $\alpha E\beta 7$ 。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體結合至與Act-1抗體相同或實質上相同之抗原決定基(Lazarovits, A. I.等人，*J. Immunol.*, 133(4): 1857-1862 (1984)；Schweighoffer等人，*J. Immunol.*, 151(2): 717-729, 1993；Bednarczyk等人，*J. Biol. Chem.*, 269(11): 8348-8354, 1994)。產生鼠類Act-1單株抗體之鼠類ACT-1融合瘤細胞株係根據2001年8月22日之布達佩斯條約(Budapest Treaty)之規定代表Millennium Pharmaceuticals, Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, Mass. 02139, U.S.A.以寄存編號PTA-3663存放於美國菌種保存中心(American Type Culture Collection), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, U.S.A.。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體為使用美國專利申請公開案第2010/0254975號中提供之CDR之人類抗體或 $\alpha 4\beta 7$ 結合蛋白。

在一個態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與其一或多個配位體(例如黏膜定址素(例如MAdCAM(例如MAdCAM-1))、纖維結合蛋白及/或血管定址素(VCAM))之結合。靈長類動物MAdCAM(例如MAdCAM-1)描述於PCT公開案WO 96/24673中，該案之全部教示係以引用的方式併入本文中。在另一態樣中，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM(例如MAdCAM-1)及/或纖維結合蛋白之結合而不抑制與VCAM之結合。

在一個態樣中，適用於調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體為小鼠Act-1抗體之人類化型式。適用於製備人類化抗體之方法在此項技術中熟知。一般而言，人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體將含有包含小鼠Act-1抗體之3個重鏈互補決定區

(CDR, CDR1, SEQ ID NO:8、CDR2, SEQ ID NO:9及CDR3, SEQ ID NO:10)及適合人類重鏈構架區之重鏈；且亦含有包含小鼠Act-1抗體之3個輕鏈CDR(CDR1, SEQ ID NO:11、CDR2, SEQ ID NO:12及CDR3, SEQ ID NO:13)及適合人類輕鏈構架區之輕鏈。人類化Act-1抗體可含有具有或不具有胺基酸取代之任何適合人類構架區(包括共同構架區)。舉例而言，構架胺基酸中之一或多者可經另一胺基酸(諸如小鼠Act-1抗體之相應位置處之胺基酸)置換。若存在，則人類恆定區或其部分可衍生自人類抗體(包括對偶基因變異體)之 $\kappa$ 或 $\lambda$ 輕鏈及/或 $\gamma$ (例如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ )、 $\mu$ 、 $\alpha$ (例如 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ )、 $\delta$ 或 $\epsilon$ 重鏈。可選擇特定恆定區(例如IgG1)、其變異體或部分以調整效應功能。舉例而言，可將突變恆定區(變異體)併入融合蛋白中以使與Fc受體之結合及/或固定補體之能力減至最小(參見例如Winter等人，GB 2,209,757 B；Morrison等人，WO 89/07142；Morgan等人，WO 94/29351, 1994年12月22日)。Act-1抗體之人類化型式描述於PCT公開案第WO 98/06248號及第WO 07/61679號中，其每一者之全部教示係以引用的方式併入本文中。

在另一態樣中，適用於調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 人類化抗體包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸20至140之重鏈可變區；及包含SEQ ID NO:4之胺基酸20至131或SEQ ID NO:5之胺基酸21至132的輕鏈可變區。若需要，則可存在適合人類恆定區。舉例而言，人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體可包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸20至470之重鏈及包含SEQ ID NO:5之胺基酸21至239之輕鏈。在另一實例中，人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體可包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸20至470之重鏈及包含SEQ ID NO:4之胺基酸20至238之輕鏈。圖4展示比較人類抗體與鼠類抗體之同屬輕鏈的比對。該比對說明有兩個小鼠殘基

轉換為人類殘基之維多珠單抗(例如化學文摘社(Chemical Abstract Service, CAS, 美國化學學會(American Chemical Society))登記編號 943609-66-3)之人類化輕鏈比LDP-02之輕鏈(圖3)更人類。另外, LDP-02 具有輕微疏水性、可撓性丙胺酸114及親水性位點(天冬胺酸115), 其在維多珠單抗中置換為輕微親水性的含羥基蘇胺酸114及疏水性的可能面向內纈胺酸115殘基。

抗體序列之其他取代可為例如重鏈及輕鏈構架區之突變, 諸如SEQ ID NO:14之殘基2上之異白胺酸突變為纈胺酸; SEQ ID NO:14之殘基4上之甲硫胺酸突變為纈胺酸; SEQ ID NO:15之殘基24上之丙胺酸突變為甘胺酸; SEQ ID NO:15之殘基38處之精胺酸突變為離胺酸; SEQ ID NO:15之殘基40處之丙胺酸突變為精胺酸; SEQ ID NO:15之殘基48上之甲硫胺酸突變為異白胺酸; SEQ ID NO:15之殘基69上之異白胺酸突變為白胺酸; SEQ ID NO:15之殘基71上之精胺酸突變為纈胺酸; SEQ ID NO:15之殘基73上之蘇胺酸突變為異白胺酸; 或其任何組合; 及用小鼠 Act-1 抗體之CDR(CDR1, SEQ ID NO:8、CDR2, SEQ ID NO:9及CDR3, SEQ ID NO:10)置換重鏈CDR; 及用小鼠 Act-1 抗體之輕鏈CDR(CDR1, SEQ ID NO:11、CDR2, SEQ ID NO:12及CDR3, SEQ ID NO:13)置換輕鏈CDR。

在一些實施例中, 適用於調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 人類化抗體包含相對於SEQ ID NO:2之胺基酸20至140具有約95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之重鏈可變區, 及相對於SEQ ID NO:4之胺基酸20至131或SEQ ID NO:5之胺基酸21至132具有約95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之輕鏈可變區。可使用預設參數使用適合序列比對演算法(諸如

Lasergene 系統(DNASTAR, Inc., Madison, Wis))測定胺基酸序列一致性。在一個實施例中，適用於調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體為維多珠單抗(CAS，美國化學學會，登記編號943609-66-3)。

其他 $\alpha 4\beta 7$ 抗體亦可用於本文所述之調配物及給藥方案中。舉例而言，全文以引用的方式併入本文中之US 2010/ 0254975 (Amgen, Inc.)中所述之 $\alpha 4\beta 7$ 抗體適用於治療個體之發炎性腸病之調配物及方法中。

抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體可藉由在活細胞(例如培養中之細胞)中表現編碼各鏈之核酸序列而產生。可使用多種宿主-表現載體系統來表現本發明之抗體分子。該等宿主-表現系統表示藉此相關編碼序列可產生且隨後純化之媒劑，但亦表示當用適當核苷酸編碼序列轉型或轉染時可原位表現抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之細胞。其包括(但不限於)微生物，諸如用含有抗體編碼序列之重組噬菌體DNA、質體DNA或黏質體DNA表現載體轉型之細菌(例如大腸桿菌(*E. coli*)、枯草桿菌(*B. subtilis*))；用含有抗體編碼序列之重組酵母表現載體轉型之酵母(例如酵母(*Saccharomyces*)、畢赤酵母(*Pichia*))；用含有抗體編碼序列之重組病毒表現載體(例如桿狀病毒)感染之昆蟲細胞系統；用重組病毒表現載體(例如花椰菜嵌紋病毒CaMV、菸草嵌紋病毒TMV)感染或用含有抗體編碼序列之重組質體表現載體(例如Ti質體)轉型之植物細胞系統；或具有含有源自哺乳動物細胞之基因組(例如金屬硫蛋白啟動子)或哺乳動物病毒(例如腺病毒晚期啟動子、痘瘡病毒7.5K啟動子)之啟動子之重組表現構築體的哺乳動物細胞系統(例如COS、CHO、BHK、293、3T3、NS0細胞)。舉例而言，與載體(諸如來自人類巨大細胞病毒之主要中間早期基因啟動子元件)結合之哺乳動物細胞(諸如中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell, CHO))為抗體之有效表現系統(Foecking等

人，*Gene* 45:101 (1986)；Cockett等人，*Bio/Technology* 8:2 (1990))。

在細菌系統中，許多表現載體宜視所表現之抗體分子之預期用途來選擇。舉例而言，當欲製備大量該種蛋白質時，為了產生抗體分子之醫藥組合物，可需要指導表現高含量之易於純化之融合蛋白產物的載體。該等載體包括(但不限於)大腸桿菌表現載體pUR278(Ruther等人，*EMBO J.* 2:1791 (1983))，其中抗體編碼序列可單獨接合至與lac Z編碼區同框之載體中，以便製備融合蛋白；pIN載體(Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985)；Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989))；及其類似載體。pGEX載體亦可用來與麩胱甘肽S-轉移酶(GST)一起表現呈融合蛋白形式之外來多肽。一般而言，該等融合蛋白為可溶性的，且易於藉由吸附且結合至基質麩胱甘肽-瓊脂糖珠粒隨後在游離麩胱甘肽存在下溶離而自溶解細胞中純化。pGEX載體經設計以包括凝血酶或因子Xa蛋白酶裂解位點以便可自GST部分釋放選殖目標基因產物。

在昆蟲系統中，使用加洲苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*，AcNPV)作為表現外來基因之載體。病毒生長於草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞中。可將抗體編碼序列單獨選殖至病毒之非必需區(例如多角體蛋白基因)中且置於AcNPV啟動子(例如多角體蛋白啟動子)之控制下。

在哺乳動物宿主細胞中，可使用許多基於病毒之表現系統。在使用腺病毒作為表現載體之情況下，相關抗體編碼序列可接合至腺病毒轉錄/轉譯控制複合物(例如晚期啟動子及三聯前導序列)。隨後可藉由活體外或活體內重組將此嵌合基因插入腺病毒基因組中。插入病毒基因組之非必需

區(例如區E1或E3)中將產生活的且能夠在受感染宿主中表現抗體分子之重組病毒(例如參見Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359 (1984))。亦可需要特異性起始信號來有效轉譯插入之抗體編碼序列。此等信號包括ATG起始密碼子及鄰近序列。此外，起始密碼子必須與所要編碼序列之閱讀框架同相以確保轉譯全部插入物。此等外生轉譯控制信號及起始密碼子可具有多種來源，天然及合成皆可。可藉由納入適當轉錄增強子元件、轉錄終止子等來提高表現效率(參見Bittner等人, *Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987))。

另外，可選擇調節插入序列之表現或以所要特定方式修飾並加工基因產物的宿主細胞品系。對蛋白質產物之該等修飾(例如糖基化)及加工(例如裂解)對蛋白質功能很重要。不同宿主細胞在蛋白質及基因產物之轉譯後加工及修飾中具有特徵化及特定機制。可選擇適當細胞株或宿主系統以確保所表現之外來蛋白質的恰當修飾及加工。為此目的，可使用具有用於適當加工初級轉錄物、糖基化且磷酸化基因產物之細胞機構的真核宿主細胞。該等哺乳動物宿主細胞包括(但不限於)中國倉鼠卵巢(CHO)、NS0、HeLa、VERY、幼倉鼠腎(BHK)、猴腎(COS)、MDCK、293、3T3、WI38、人類肝細胞癌細胞(例如Hep G2)、乳癌細胞株(諸如BT483、Hs578T、HTB2、BT20及T47D)及正常乳腺細胞株(諸如CRL7030及Hs578Bst)。

不同細胞類型之糖基化機構可產生具有與另一細胞類型不同之糖基化組成或沒有糖基化(如在細菌細胞之情況下)的抗體。在一個態樣中，用於產生抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之細胞類型為哺乳動物細胞，諸如NS0或CHO細胞。在一個態樣中，哺乳動物細胞可包含與細胞代謝有關之酶之缺失，且相關

外生基因可例如在構築體或載體中藉由轉型或轉染可操作地連接於置換酶以引入至細胞中。具有外生基因之構築體或載體賦予構築體或載體之宿主細胞以選擇優勢，從而促進產生由外生基因編碼之多肽。在一個實施例中，CHO細胞為DG44細胞(Chasin及Urlaub (1980) *PNAS USA* 77:4216)，其包含二氫葉酸還原酶基因之缺失或不活化。在另一實施例中，CHO細胞為CHO K1細胞，其包含麩醯胺酸合成酶基因之缺失或不活化(參見例如美國專利第5,122,464號或第5,827,739號)。

### 固體調配物

本發明之固體調配物通常藉由乾燥液體調配物來製備。可使用任何適合乾燥方法，諸如凍乾或噴霧乾燥。在一個態樣中，在凍乾之前添加凍乾保護劑至調配物中。凍乾包括通常在將用以儲存、運送及分配調配物之容器(例如小瓶、注射器(例如單室或雙室注射器)或藥筒(例如單室或雙室藥筒))中冷凍液體調配物(參見例如Gatlin及Nail, *Protein Purification Process Engineering*, Roger G. Harrison編，Marcel Dekker Inc., 317-367 (1994))。一旦冷凍調配物，則降低大氣壓且調節溫度以使得可例如經由昇華移除冷凍溶劑。凍乾製程之此步驟有時稱為初級乾燥。若需要，則隨後可升高溫度以藉由蒸發來移除仍結合至乾燥調配物之任何溶劑。凍乾製程之此步驟有時稱為二級乾燥。當調配物達到所要乾燥程度時，結束乾燥製程且密封容器。最終固體調配物有時稱為「凍乾調配物」或「餅」。凍乾製程可使用任何適合設備來進行。適合凍乾設備可自許多商業來源(例如SP Scientific, Stone Ridge, NY)獲得。

可使用多種適合裝置乾燥液體調配物來製備固體(例如凍乾)調配物。一般而言，熟習此項技術者使用含有架子之密封室製備凍乾調配物，在該

等架子上置放待乾燥之液體調配物之小瓶。可控制架子之溫度以及冷卻及加熱速率，亦可控制腔室內之壓力。應瞭解，本文中所論述之各種製程參數係指使用此類型裝置進行之製程。若需要，則一般技術者可輕易使本文所述之參數適於其他類型之乾燥裝置。

一般技術者可輕易測定用於初級及二級乾燥之適合溫度及真空之量。一般而言，調配物於約 $-30^{\circ}\text{C}$ 或小於 $-30^{\circ}\text{C}$ 之溫度(諸如 $-40^{\circ}\text{C}$ 或 $-50^{\circ}\text{C}$ )下冷凍。冷卻速率可影響基質中之冰晶之量及尺寸。初級乾燥通常在比冷凍溫度高約 $10^{\circ}\text{C}$ 、約 $20^{\circ}\text{C}$ 、約 $30^{\circ}\text{C}$ 、約 $40^{\circ}\text{C}$ 或約 $50^{\circ}\text{C}$ 之溫度下進行。在一個態樣中，初級乾燥條件可經設定以維持抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體低於調配物之玻璃轉移溫度或塌陷溫度。高於塌陷溫度時，非晶冷凍基質可流動(塌陷)，結果為蛋白質分子可能不由剛性固體基質所包圍，且蛋白質分子在塌陷基質中會不穩定。再者，若發生塌陷，則調配物可能難以充分乾燥。調配物中生成之較高水分量可導致蛋白質降解速率較高及在凍乾產物之品質削弱至不可接受水準之前其可儲存之時間量減少。在一個態樣中，選擇架子溫度及腔室壓力以在初級乾燥期間維持產物溫度低於塌陷溫度。冷凍調配物之玻璃轉移溫度可藉由此項技術中已知之方法(例如藉由差示掃描熱量測定(DSC))量測。塌陷溫度可藉由此項技術中已知之方法(例如冷凍乾燥顯微法、光學相干斷層攝影法)量測。乾燥步驟可移除至少50%、至少60%、至少70%或大於70%之溶劑。在一個態樣中，初級乾燥步驟自抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物移除大於80%溶劑。

可基於在凍乾期間暴露於架子及真空之表面積來選擇小瓶尺寸。乾燥時間與餅高度成正比，因此可基於經測定為合理之餅高度來選擇小瓶尺寸。直徑相對於體積較大之小瓶可提供與架子之大量接觸，以便於在凍乾

循環期間的有效熱傳遞。在大體積液體中之稀釋抗體溶液將需要更多乾燥時間。小瓶尺寸與調配物體積需要達到平衡，這是因為較大小瓶儲存及運送起來更為昂貴且具有較大頂空與調配物比率且在較長儲存期間內可使高比例之調配物暴露於水分之降解效應。就165 mg劑量而言，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之小瓶尺寸可為3 mL、5 ml或10 ml。在一個態樣中，就160 mg/ml溶液而言，小瓶尺寸為5 ml。

選擇用於凍乾之藥筒或注射器尺寸之原則類似於選擇小瓶之原則。餅高度之深度亦將隨著高度增加而增加乾燥時間。必須使注射器或藥筒之直徑及尺寸與最終調配物體積平衡。較大直徑可增加凍乾餅中之水分吸收速率，因此增加在儲存期間水分之降解效應。就165 mg劑量而言，抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物體積可為1 ml或2 mL。在一個態樣中，就160 mg/mL溶液而言，注射器或藥筒尺寸大於1 mL。

在凍乾之後，小瓶、注射器或藥筒可在真空下密封，例如塞住。或者，可在密封之前使氣體(例如乾燥空氣或氮氣)進入容器。在涉及氧化的情況下，允許進入凍乾腔室之氣體可包含延遲或防止凍乾產物氧化之氣體。在一個態樣中，氣體為非含氧氣體，例如氮氣或惰性氣體(例如氮氣、氖氣、氬氣、氦氣或氙氣)。在另一態樣中，氣體為氮氣或氬氣。

### 用抗體調配物之治療

在一個態樣中，本發明提供一種治療個體之疾病或病症之方法，其包含向個體投與有效治療例如人類之疾病或病症之量的本文所述之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物。人類個體可為成人(例如18歲或18歲以上)、青少年或兒童。人類個體可為65歲或65歲以上之人。與替代性治療給藥方案對比，65歲或65歲以上之人類個體不需要本文所描述之給藥方案的任何修改，

且可投與本文所述之習知抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物。

個體可能會對用免疫調節劑、TNF- $\alpha$ 拮抗劑或其組合進行的治療缺乏足夠反應、喪失反應或不耐受。患者先前可能已接受用至少一種用於發炎性腸病之皮質類固醇(例如潑尼松(prednisone))的治療。對皮質類固醇之不足反應係指儘管經歷至少一個包括等於每日口服30 mg潑尼松之劑量持續2週或靜脈內1週的4週誘導方案，仍有持續活動性疾病之體征及症狀。對皮質類固醇之反應喪失係指逐漸減少皮質類固醇至低於等於每日口服10 mg潑尼松之劑量的兩種失敗嘗試。皮質類固醇之不耐性包括庫欣氏(Cushing's)症候群、骨質減少/骨質疏鬆症、高血糖症、失眠症及/或感染之病史。

免疫調節劑可為例如口服硫唑嘌呤(azathioprine)、6-巯基嘌呤或甲胺喋呤(methotrexate)。對免疫調節劑之不足反應係指儘管經歷至少一個8週方案或口服硫唑嘌呤( $\geq 1.5$  mg/kg)、6-巯基嘌呤( $\geq 0.75$  mg/kg)或甲胺喋呤( $\geq 12.5$  毫克/週)，仍有持續活動性疾病之體征及症狀。免疫調節劑之不耐性包括(但不限於)噁心/嘔吐、腹痛、胰腺炎、LFT異常、淋巴球減少症、TPMT遺傳突變及/或感染。

TNF- $\alpha$ 拮抗劑為例如抑制TNF- $\alpha$ 之生物活性且較佳結合TNF- $\alpha$ 之藥劑，諸如單株抗體，例如REMICADE(英利昔單抗(infliximab))、HUMIRA(阿達木單抗(adalimumab))、CIMZIA(賽妥珠單抗(certolizumab pegol))、SIMPONI(戈利木單抗(golimumab))；或循環受體融合蛋白，諸如ENBREL(依那西普(etanercept))。對TNF- $\alpha$ 拮抗劑之不足反應係指儘管經歷5 mg/kg IV(2個劑量相隔至少2週)英利昔單抗；一個80 mg皮下劑量之阿達木單抗、隨後一個40 mg劑量(相隔至少兩週)；或400 mg皮下賽

妥珠單抗(2個劑量相隔至少2週)的至少一個4週誘導方案，仍有持續活動性疾病之體征及症狀。對TNF- $\alpha$ 拮抗劑之反應喪失係指在先前臨床益處之後的維持給藥期間症狀之復發。TNF- $\alpha$ 拮抗劑之不耐性包括(但不限於)輸注相關反應、脫髓鞘、充血性心臟衰竭及/或感染。

如本文所用，潰瘍性結腸炎個體之緩解維持的喪失係指Mayo計分增加至少3個點且修正Baron計分(Modified Baron Score)增加至少2。

在另一態樣中，本發明提供抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物，其(1)可活體外及/或活體內結合 $\alpha 4\beta 7$ 整合素；及(2)可調節 $\alpha 4\beta 7$ 整合素之活性或功能，諸如(a)結合功能(例如 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至MAdCAM(例如MAdCAM-1)、纖維結合蛋白及/或VCAM-1之能力)及/或(b)白血球浸潤功能，包括組織中之白血球之募集及/或積聚(例如抑制淋巴細胞遷移至腸黏膜組織之能力)。在一個實施例中，調配物中之抗體可結合 $\alpha 4\beta 7$ 整合素，且可抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至其一或多個配位體(例如MAdCAM(例如MAdCAM-1)、VCAM-1、纖維結合蛋白)，從而抑制組織之白血球浸潤(包括組織中之白血球之募集及/或積聚)。在另一實施例中，調配物中之抗體可結合 $\alpha 4\beta 7$ 整合素，且可選擇性抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至其一或多個配位體(例如MAdCAM(例如MAdCAM-1)、VCAM-1、纖維結合蛋白)，從而抑制組織之白血球浸潤(包括組織中之白血球之募集及/或積聚)。該等抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物可活體外及/或活體內抑制帶有 $\alpha 4\beta 7$ 整合素之細胞細胞性黏著至黏膜組織(包括腸管相關組織、淋巴器官或白血球(尤其是淋巴細胞，諸如T細胞或B細胞))中之血管內皮細胞。在另一實施例中，本發明之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物可抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM(例如MAdCAM-1)及/或纖維結合蛋白之相互作用。在另一實施例中，本發明之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物可選擇性抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與

MAdCAM(例如MAdCAM-1)及/或纖維結合蛋白之相互作用，例如不抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與VCAM之相互作用。

本發明之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物可用於調節(例如抑制(降低或防止)) $\alpha 4\beta 7$ 整合素之結合功能及/或白血球(例如淋巴細胞、單核細胞)浸潤功能。舉例而言，抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至配位體(亦即一或多個配位體)之人類化免疫球蛋白可根據治療與組織(尤其表現分子MAdCAM(例如MAdCAM-1)之組織)之白血球(例如淋巴細胞、單核細胞)浸潤(包括組織中之白血球之募集及/或積聚)相關的疾病之方法投與。

向個體(例如哺乳動物，諸如人類或其他靈長類動物)投與有效量之本發明之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物(亦即一或多種)來治療該疾病。舉例而言，可根據本發明方法治療發炎疾病，包括與胃腸道(包括腸管相關內皮)、其他黏膜組織或表現分子MAdCAM(例如MAdCAM-1)之組織(例如腸管相關組織，諸如小腸及大腸之固有層之微靜脈；及乳腺(例如泌乳性乳腺))之白血球浸潤相關的疾病。同樣，可根據本發明治療患有由於白血球結合至表現MAdCAM(例如MAdCAM-1)之細胞(例如內皮細胞)所致的與組織之白血球浸潤相關之疾病的個體。

在一個實施例中，可治療之疾病因此包括發炎性腸病(IBD)，諸如潰瘍性結腸炎、克隆氏病、迴腸炎、乳糜瀉(Celiac disease)、非熱帶口炎性腹瀉(nontropical Sprue)、與血清陰性關節病相關之腸病、顯微性或膠原性結腸炎、嗜酸性胃腸炎、或直腸結腸切除術及迴腸肛門(ileoanal)吻合術後所致的囊炎(pouchitis)。在一些實施例中，發炎性腸病較佳為克隆氏病或潰瘍性結腸炎。潰瘍性結腸炎可為中度至重度活動性潰瘍性結腸炎。治療可使罹患中度至重度活動性潰瘍性結腸炎之患者之黏膜癒合。治療亦

可使患者之皮質類固醇使用減少、消除或減少及消除。

胰腺炎及胰島素依賴型糖尿病為可使用本發明之調配物治療之其他疾病。已報導MAdCAM(例如MAdCAM-1)係由來自NOD(非肥胖性糖尿病)小鼠以及BALB/c及SJL小鼠之外分泌胰臟中之一些血管表現。MAdCAM(MAdCAM-1)之表現據報導誘導於NOD小鼠之胰臟之發炎胰島中之內皮上，且MAdCAM(MAdCAM-1)為在胰島炎早期由NOD胰島內皮表現之主要定址素(Hanninen, A.等人, *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993))。用抗-MAdCAM或抗- $\beta 7$ 抗體治療NOD小鼠預防糖尿病之發展(Yang等人, *Diabetes*, 46:1542-1547 (1997))。此外，觀測到胰島內表現 $\alpha 4\beta 7$ 之淋巴細胞的積聚，且MAdCAM-1牽涉於淋巴瘤細胞經由 $\alpha 4\beta 7$ 與來自發炎胰島之血管(Hanninen, A.等人, *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993))或與套細胞淋巴瘤中之胃腸道(Geissmann等人, *Am. J. Pathol.*, 153:1701-1705 (1998))之結合中。

可使用本發明之調配物治療的與黏膜組織相關之發炎疾病之實例包括膽囊炎、膽管炎(Adams及Eksteen, *Nature Reviews* 6:244-251 (2006)；Grant等人, *Hepatology* 33: 1065-1072 (2001))(例如原發性硬化性膽管炎)、(例如)腸之白塞氏病(Behcet's disease)或膽管周圍炎(膽管及肝臟之周圍組織)及移植物抗宿主疾病(例如在胃腸道中(例如在骨髓移植之後)(Petrovic等人, *Blood* 103:1542-1547 (2004))。如克隆氏病中所見，發炎常延伸超出黏膜表面，因此慢性發炎疾病(諸如類肉瘤病、慢性胃炎(例如自體免疫胃炎(Katakai等人, *Int. Immunol.*, 14:167-175 (2002)))及其他特發性病況)可經受治療。

本發明亦係關於一種抑制黏膜組織之白血球浸潤之方法。本發明亦

係關於一種治療癌症(例如 $\alpha 4\beta 7$ 陽性腫瘤，諸如淋巴瘤)之方法。可使用本發明之調配物治療的與黏膜組織相關之發炎疾病之其他實例包括乳腺炎(乳腺)及大腸急躁症(irritable bowel syndrome)。

其病因為MAdCAM(例如MAdCAM-1)與 $\alpha 4\beta 7$ 之相互作用的疾病或病原體可用本文所述之調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體來治療。該等疾病之實例包括諸如由人類免疫缺乏病毒所引起之免疫缺乏病症(參見例如WO 2008140602)。

本發明之調配物係以抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至其配位體之有效量投與。在治療中，有效量將足以達成所要治療(包括預防)作用(諸如足以降低或預防 $\alpha 4\beta 7$ 整合素介導之結合及/或信號傳導，從而抑制白血球黏著及浸潤及/或相關細胞反應的量)。有效量之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體(例如足以維持 $\alpha 4\beta 7$ 整合素之飽和(例如中和)之有效效價)可誘導發炎性腸病之臨床反應或緩解。有效量之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體可使潰瘍性結腸炎或克隆氏病之黏膜癒合。本發明之調配物可以單位劑量或多個劑量投與。劑量可由此項技術中已知之方法確定且可視例如個體之年齡、敏感性、耐受性及總體健康而定。投與模式之實例包括局部途徑，諸如經鼻或吸入或經皮投與；腸內途徑，諸如經由飼管或栓劑；及非經腸途徑，諸如靜脈內、肌內、皮下、動脈內、腹膜內或玻璃體內投與。抗體之適合劑量可為每次治療約0.1 mg/kg體重至約10.0 mg/kg體重，例如約2 mg/kg至約7 mg/kg、約3 mg/kg至約6 mg/kg或約3.5 mg/kg至約5 mg/kg。在特定實施例中，投與之劑量為約0.3 mg/kg、約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg或約10 mg/kg。總劑量可為約22 mg、約50 mg、約72 mg、約125 mg、約

165 mg或約432 mg。總劑量可為至少77 mg、至少125 mg或至少356 mg。在一個實施例中，總劑量為165 mg。在另一實施例中，總劑量為108 mg。在另一實施例中，總劑量為216 mg。

使用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體在投與之後隨時間之可用性研究之藥物動力學(PK)資料的模型及模擬(BERKELEY MADONNA™ 軟體，University of California)可評估皮下或肌內投與之可能給藥方案。可評估誘導及維持方案之PK資料。另一模型化方法為群體藥物動力學/藥效學分析(NONMEM®非線性混合效應模型化工具，ICON plc, Dublin, Ireland)。可分析暴露量及最低量。

通常，在達成目標(例如 $\alpha 4\beta 7$ 整合素)飽和之後，血液中之抗體濃度與投與劑量具有線性關係。藉由皮下或肌內途徑投與之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體具有藉由靜脈內途徑投與之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之生物可用性的約60%至約90%。在此關係之一實例中，若假定靜脈內劑量具有100%生物可用性且發現皮下劑量具有69.5%生物可用性，則300 mg靜脈內劑量可與藉由皮下投與之432 mg劑量相稱。因此，在69.5%相對生物可用性下，150 mg靜脈內劑量可與216 mg皮下劑量匹配。同樣，若發現皮下劑量具有75%可用性且發現肌內劑量具有80%生物可用性，則為了匹配300 mg靜脈內劑量，皮下劑量可為400 mg且肌內劑量可為375 mg。實例中之表40至表43說明此等關係且提供抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之適用劑量及給藥方案。

在一些態樣中，給藥方案具有兩個期，即誘導期及維持期。在誘導期中，以快速提供有效量之適用於某些目的(諸如誘導對抗體或其抗原結合片段之免疫耐受性或誘導臨床反應且改善發炎性腸病症狀)之抗體或其抗原結合片段之方式投與抗體或其抗原結合片段。當首次以抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體

治療時、當自抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體療法以來長期不治療之後(例如超過三個月、超過四個月、超過六個月、超過九個月、超過一年、超過十八個月或超過兩年)又進行治療時、或在抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體療法之維持期期間，若發炎性腸病症狀又重現(例如自疾病緩解中又復發)，則可對患者執行誘導期治療。在一些實施例中，誘導期方案產生比在維持方案期間維持之平均穩態最低(trough)血清濃度更高之平均最低血清濃度(例如在下一劑量之前即刻的濃度)。

在維持期中，用穩定含量之抗體或其抗原結合片段以使由誘導療法所達成之反應延續的方式投與抗體或其抗原結合片段。維持方案可預防症狀重現或發炎性腸病復發。維持方案可向患者提供便利，例如為簡單給藥方案或無需頻繁的療程。在一些實施例中，維持方案可包括藉由選自由以下組成之群之策略投與抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體或其抗原結合片段(例如於本文所述之調配物中)：小劑量、不頻繁投與、自投與及前述任一者之組合。

在一個實施例中，例如在療法之誘導期期間，給藥方案提供有效量之於本文所述之調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體或抗原結合片段用於誘導人類患者之發炎性腸病的緩解。在一些實施例中，有效量之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體足以在誘導期結束時達成約5  $\mu\text{g/ml}$ 至約60  $\mu\text{g/ml}$ 、約15  $\mu\text{g/ml}$ 至約45  $\mu\text{g/ml}$ 、約20  $\mu\text{g/ml}$ 至約30  $\mu\text{g/ml}$ 或約25  $\mu\text{g/ml}$ 至約35  $\mu\text{g/ml}$ 平均最低血清濃度之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。誘導期之持續時間可為約四週、約五週、約六週、約七週或約八週之治療。在一些實施例中，誘導方案可利用選自由以下組成之群之策略：例如於本文所述之調配物中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體或其抗原結合片段的大劑量、頻繁投與及大劑量與頻繁投與之組合。誘導給藥可為一次或複數次一個以上劑量(例如至少兩個劑量)。在誘導期期間，劑量可以每日一次、

每隔一天一次、每週兩次、每週一次、每十天一次、每兩週一次或每三週一次投與。在一些實施例中，誘導劑量係在療法之頭兩週內用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體投與。在一個實施例中，誘導給藥可為在治療開始(第0天)時一次及在治療開始之後約兩週時一次。在另一實施例中，誘導期持續時間為六週。在另一實施例中，誘導期持續時間為六週且在頭兩週期間投與複數個誘導劑量。

在一些實施例中，例如當開始治療患有重度發炎性腸病之患者(例如抗-TNF $\alpha$ 療法失敗之患者)時，誘導期需要具有比患有輕度或中度疾病之患者更長期間。在一些實施例中，患有重度疾病之患者之誘導期可具有至少6週、至少8週、至少10週、至少12週或至少14週之期間。在一個實施例中，患有重度疾病之患者之誘導給藥方案可包括第0週(開始治療)一劑量、第2週一劑量及第6週一劑量。在另一實施例中，患有重度疾病之患者之誘導給藥方案可包含第0週(開始治療)一劑量、第2週一劑量、第6週一劑量及第10週一劑量。

在一個實施例中，例如在療法之維持期期間，給藥方案維持平均穩態最低血清濃度(例如下劑量之前的平台(plateau)濃度)約5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，或約9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在另一實施例中，例如在療法之維持期期間，給藥方案維持平均穩態最低血清濃度約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，或約35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在另一實施例中，例如在療法之維持期期間，給藥方案維持長期平均血清濃度，例如暴露(例如濃度-時

間曲線下面積)約15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約26  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，或約22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在另一實施例中，例如在維持療法期間，給藥方案維持長期平均血清濃度，例如暴露(例如濃度-時間曲線下面積)約35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約52  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，或約50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。

最終劑型可包含全部劑量在約0.5 ml、約1 ml、約1.5 ml、約2 ml、約2.5 ml、約3 ml抗體調配物中。

靜脈內投與之最終劑型可在約1.0 mg/ml至約1.4 mg/ml、約1.0 mg/ml至約1.3 mg/ml、約1.0 mg/ml至約1.2 mg/ml、約1.0 mg/ml至約1.1 mg/ml、約1.1 mg/ml至約1.4 mg/ml、約1.1 mg/ml至約1.3 mg/ml、約1.1 mg/ml至約1.2 mg/ml、約1.2 mg/ml至約1.4 mg/ml、約1.2 mg/ml至約1.3 mg/ml或約1.3 mg/ml至約1.4 mg/ml之濃度下。最終劑型可在約0.6 mg/ml、0.8 mg/ml、1.0 mg/ml、1.1 mg/ml、約1.2 mg/ml、約1.3 mg/ml、約1.4 mg/ml、約1.5 mg/ml、約1.6 mg/ml、約1.8 mg/ml或約2.0 mg/ml之濃度下。

劑量可每週一次、每2週一次、每3週一次、每4週一次、每6週一次、每8週一次或每10一次投與。較高或較頻繁劑量(例如每隔一天、每週一次、每2週一次、每3週一次或每4週一次)可適用於誘導活動性疾病之緩解或適用於治療新患者(例如適用於誘導對抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之耐受性)。每2週一次、每3週一次、每4週一次、每5週一次、每6週一次、每8週一次或每10週一次之劑量可適用於預防性療法，例如用於維持患有慢性疾病之患者之緩解。在一個態樣中，治療方案為第0天、約第2週、約第6週時及此後

每1週或每2週之治療。在另一態樣中，誘導治療方案為每隔一天之治療持續總共6次治療。

可使給藥方案最佳化以誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解。在一些實施例中，給藥方案不改變接受治療之患者之腦脊髓液中的CD4與CD8之比率。

在一些態樣中，可用最佳化給藥方案達成開始治療之後六個月或一年期之內的持久臨床緩解(例如持續至少兩個、至少三個、至少四個護理醫師之隨訪之臨床緩解)。

在一些態樣中，可用最佳化給藥方案達成持久臨床反應(例如開始治療之後持續至少6個月、至少9個月、至少一年的臨床反應)。

調配物可以單次或多次注射形式皮下投與。舉例而言，單次注射之體積可在約0.5 ml至約3 ml範圍內。在一個實施例中，單次注射之體積可為約0.6 ml至約1.1 ml或約1 ml至約3 ml。在一個態樣中，單次注射之體積為約1 ml。用於皮下投與調配物之針之規格可為約25 G、約26 G、約27 G、約28 G、約29 G或約30 G。

調配物可以單次或多次注射形式肌內投與。舉例而言，單次注射之體積可在約0.5 ml至約5 ml範圍內。在一個實施例中，單次注射之體積可為約2 ml至約5 ml、約0.6 ml至約1.1 ml或約1 ml至約3 ml。在一個態樣中，單次注射之體積為約1 ml、約2 ml、約3 ml、約4 ml或約5 ml。用以肌內投與調配物之針可為約5/8"、約7/8"、約1"、約1.25"、約1.5"、約2"或約3"。在肌內投與中，針之規格可在20 G與22 G之間。

在一個態樣中，本發明係關於一種治療罹患發炎性腸病之人類患者之方法，其中該方法包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類

$\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中根據以下給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段：

(a)每隔一天呈皮下注射形式之165 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的初始劑量持續六個劑量；(b)隨後為視需要每兩週或每四週呈皮下注射形式之165 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的第七後續劑量；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在一個態樣中，本發明係關於一種治療罹患發炎性腸病之人類患者之方法，其中該方法包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據以下給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段：(a)呈靜脈內輸注形式之300 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的初始靜脈內劑量；(b)隨後在初始劑量之後約兩週時，呈靜脈內輸注形式之300 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的第二靜脈內後續劑量；(c)隨後自第六週開始，視需要每週、每兩週或每三週呈皮下注射形式之165 mg人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段的第三後續劑量；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解。

解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在另一態樣中，本發明係關於一種用於治療性治療發炎性腸病之給藥方案，其中該給藥方案包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據皮下或肌內給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，該給藥方案維持抗體或其抗原結合片段之平均穩態血清最低濃度在約9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 範圍內；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在另一態樣中，本發明係關於一種用於治療性治療發炎性腸病之給藥方案，其中該給藥方案包含步驟：向罹患發炎性腸病之患者投與對人類 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有結合特異性之人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，其

中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段包含非人類來源之抗原結合區及至少一部分人類來源之抗體，其中根據皮下或肌內給藥方案向患者投與人類化免疫球蛋白或其抗原結合片段，該給藥方案維持抗體或其抗原結合片段之穩態血清最低濃度在約35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 範圍內；其中給藥方案誘導患者之發炎性腸病之臨床反應及臨床緩解；且此外，其中人類化免疫球蛋白或抗原結合片段對 $\alpha 4\beta 7$ 複合物具有結合特異性，其中抗原結合區包含以下闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)及重鏈可變區之三個互補決定區(CDR1、CDR2及CDR3)：輕鏈：CDR1 SEQ ID NO:9、CDR2 SEQ ID NO:10、CDR3 SEQ ID NO:11；重鏈：CDR1 SEQ ID NO:12、CDR2 SEQ ID NO:13、CDR3 SEQ ID NO:14。

在一些實施例中，治療方法、劑量或給藥方案降低患者產生對抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之HAHA反應的可能性。例如由對抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體有反應性之抗體所量測，HAHA之產生可增加抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之清除率，例如降低抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之血清濃度，例如降低結合至 $\alpha 4\beta 7$ 整合素之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之數目，由此使得治療不太有效。在一些實施例中，為了預防HAHA，可相繼用誘導方案及維持方案治療患者。在一些實施例中，誘導方案與維持方案之間不存在中止。在一些實施例中，誘導方案包含向患者投與複數個劑量之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。為了預防HAHA，當開始用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體治療時，可用較高初始劑量(例如至少1.5 mg/kg、至少2 mg/kg、至少2.5 mg/kg、至少3 mg/kg、至少5 mg/kg、至少8 mg/kg、至少10 mg/kg或約2 mg/kg至約6 mg/kg)或頻繁初始投與(例如約每週一次、約每兩週一次或約每三週一次)標準劑量來治療患者。在一些實施例中，治療方法維持至少30%、至少

40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%之患者呈HAHA陰性。在其他實施例中，治療方法維持患者呈HAHA陰性持續至少6週、至少10週、至少15週、至少6個月、至少1年、至少2年或持續療法持續時間。在一些實施例中，患者或至少30%、至少40%、至少50%或至少60%的產生HAHA之患者維持低效價(例如 $\leq 125$ )之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在一個實施例中，在開始抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之療法之後，治療方法維持至少70%患者呈HAHA陰性持續至少12週。

調配物可單獨或與另一藥劑聯合向個體(例如人類)投與。本發明之調配物可在另一藥劑投與之前、與另一藥劑一起投與或在另一藥劑投與之後投與。在一個實施例中，投與一種以上抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素結合至其配位體的調配物。在該實施例中，可投與藥劑，例如單株抗體，諸如抗-MAdCAM或抗-VCAM-1單株抗體。在另一實施例中，另一藥劑以不同於 $\alpha 4\beta 7$ 路徑之路徑抑制白血球結合至內皮配位體。該藥劑可抑制(例如)表現趨化因子(C-C基元)受體9(CCR9)之淋巴細胞結合至胸腺表現趨化因子(TECK或CCL25)或為防止LFA-1結合至細胞間黏著分子(ICAM)之藥劑。舉例而言，除本發明之調配物之外，亦投與抗-TECK或抗-CCR9抗體或小分子CCR9抑制劑(諸如揭示於PCT公開案WO 03/099773或WO 04/046092中之抑制劑)或抗-ICAM-1抗體或防止ICAM表現之寡核苷酸。在另一實施例中，可與本發明之調配物聯合投與另一活性成分，例如消炎化合物，諸如含有柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤、5-胺基水楊酸之消炎劑；另一非類固醇消炎化合物；類固醇消炎化合物；或通常為控制IBD而投與之抗生素(例如環丙沙星(ciprofloxacin)、甲硝達唑(metronidazole))；或另一生物藥劑(例如TNF $\alpha$ 拮抗劑)。

在一個實施例中，共投與藥物之劑量可在由包含抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之調配物治療期間隨時間減少。舉例而言，在用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物治療開始時或之前用類固醇(例如潑尼松、潑尼龍)治療之患者將經歷早在用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物治療6週時即開始的減少類固醇劑量之方案。在用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物治療期間，類固醇劑量在開始逐漸減少之4至8週內將減少約25%，在逐漸減少之約8至12週時減少50%且在逐漸減少之約12至16週時減少75%。在一個態樣中，藉由用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物治療約16至24週，可消除類固醇劑量。在另一實例中，在用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物治療開始時或之前用消炎化合物(諸如6-巯基嘌呤)治療之患者將經歷類似於如上所述之類固醇給藥之逐漸減少方案的減少消炎化合物之劑量的方案。

在一個實施例中，該方法包含向患者皮下投與或肌內投與有效量之本發明之調配物。在另一實施例中，調配物可經製備以用於自投與。

若調配物呈固體形式(例如乾燥狀態)，則投與方法可包含將調配物轉化為液態之步驟。在一個態樣中，乾燥調配物可例如由如上所述適用於注射(例如靜脈內、肌內或皮下注射)之液體復原。在另一態樣中，固體或乾燥調配物可例如以貼片、乳膏、氣溶膠或栓劑形式局部投與。

本發明亦係關於一種治療與表現分子MAdCAM(例如MAdCAM-1)之組織之白血球浸潤相關之疾病的方法。該方法包含向有需要之患者投與有效量之本發明之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物。在一個實施例中，該疾病為移植物抗宿主疾病。在一些實施例中，該疾病為由於表現 $\alpha 4\beta 7$ 整合素之白血球結合至表現分子MAdCAM(例如MAdCAM-1)之腸管相關內皮所致的與組織之白血球浸潤相關之疾病。在其他實施例中，該疾病為胃炎(例如嗜酸性胃炎或自體免疫胃炎)、胰腺炎或胰島素依賴型糖尿病。在其他實施例

中，該疾病為膽囊炎、膽管炎或膽管周圍炎。

本發明亦係關於一種治療患者之發炎性腸病之方法。在一個實施例中，該方法包含向患者皮下投與有效量之本發明之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物。在一些實施例中，發炎性腸病為潰瘍性結腸炎或克隆氏病。在其他實施例中，發炎性腸病為乳糜瀉、與血清陰性關節病相關之腸病、顯微性或膠原性結腸炎、胃腸炎(例如嗜酸性胃腸炎)或囊炎。

在一些實施例中，用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之治療不改變CD4:CD8淋巴細胞之比率。CD4:CD8比率可在血液、淋巴結吸出物及腦脊髓液(CSF)中量測。健康個體中之CSF CD4+:CD8+淋巴細胞比率通常大於或等於約1。(Svenningsson等人，J. Neuroimmunol. 1995;63:39-46；Svenningsson等人，Ann Neurol. 1993; 34:155-161)。免疫調節劑可改變CD4:CD8比率至小於1。

## 製品

在另一態樣中，本發明為含有本發明之醫藥調配物且提供其使用說明之製品。製品包含容器。適合容器包括例如瓶、小瓶(例如雙室小瓶、具有或不具有針之液體調配物之小瓶、具有或不具有復原液體之小瓶與具有或不具有針之固體調配物之小瓶)、注射器(諸如雙室注射器、預裝載注射器、自動注射器)、藥筒及試管。容器可由多種材料(諸如玻璃、金屬或塑膠)形成。容器容納調配物且容器上之標籤或與容器關聯之標籤可指示使用說明。在另一實施例中，可製備調配物以供自投與及/或含有用於自投與之說明。在一個態樣中，容納調配物之容器可為單次使用之小瓶。在另一態樣中，容納調配物之容器可為多次使用之小瓶，其允許(例如)使用復原調配物之一個以上部分重複投與(例如2至6次投與)調配物。製品可進

一步包括自商業及使用者立場出發所要之其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、濾紙、針、注射器及具有如先前部分所述之使用說明之藥品說明書。

在一個實施例中，製品為具有針之注射器。針之規格可為25 G、26 G、27 G、29 G、30 G。薄壁針(例如19 G或23 G或大於23 G)可有助於高黏度調配物之注射。在一個態樣中，針規格為27 G或大於27 G。針長度可適用於皮下投與，且可為約1/2吋、約5/8吋或1吋長。在一些實施例中，注射器為預填充注射器。

### 預填充注射器產品開發

在一些態樣中，預填充注射器(PFS)(例如適用於投與調配物以供皮下或肌內傳遞)中之蛋白質產品(例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體)需要數種產品屬性。平衡其中一些屬性有助於減輕競爭效應。舉例而言，當需要低注射體積時，調配物之高蛋白質濃度可較佳。然而，在高蛋白質濃度情況下，可能存在較快之雜質形成速率(例如自注射器浸入調配物中之聚集雜質)且需要較大手動力來操作注射器。為了患者在注射部位處之舒適性所用之小針尺寸可需要較大力來操作注射器。瞭解調配物及注射器參數兩者(諸如蛋白質濃度、pH值及針內徑)是如何影響產品穩定性及效能的將對蛋白質產品(例如預填充注射器中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體)之開發有幫助。

在一個態樣中，開發適用於預填充注射器中之蛋白質產品(例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體)之方法包含例如以並列方式或同時一起改變注射器參數及調配物參數。此舉可使得比在單獨或連續改變各態樣時更好地瞭解對預填充注射器中之蛋白質產品所預期的蛋白質穩定性及產品效能之範圍。

預填充注射器產品(例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體)之開發涉及認知在某一點，液

體調配物與預填充注射器之若干組分有接觸(圖15)。舉例而言，調配物可接觸注射筒，其可由玻璃(例如I型硼矽玻璃)或塑膠(例如環烯烴聚合物(COP)、環烯烴共聚物(COC)、聚丙烯或聚四氟乙烯)構成。調配物可接觸注射器、柱塞及/或端帽(tip cap)，其可為彈性體(例如為相同或不同材料，例如塑膠(諸如聚乙烯、聚苯乙烯或聚丙烯，或彈力物(諸如橡膠(天然、合成、丁基))，或聚矽氧)。調配物可與添加至筒之內表面以便於柱塞移動的潤滑劑接觸。潤滑劑可為例如聚矽氧油、礦物油或甘油。在押針(staked needle)注射器之實施例中，可能存在金屬合金針(例如不鏽鋼針及用以將針膠黏於適當位置之黏著劑)。預填充注射器中蛋白質產品的一個考慮因素為在產品存放期中液體蛋白質溶液與此等注射器組分之一或多者直接接觸。調配物及注射器組分兩者均可對產品之穩定性有影響。

可影響預填充注射器產品穩定性之調配物參數包括蛋白質濃度、pH、緩衝劑類型、緩衝劑濃度、離子強度、穩定劑類型及穩定劑濃度。用於蛋白質調配物之穩定劑之實例包括例如如先前部分中所述之離子鹽、多醣、胺基酸、抗氧化劑、螯合劑及界面活性劑。

可影響預填充注射器產品穩定性之注射器組分包括例如潤滑劑，柱塞及端帽之組成，及雜質。潤滑劑(例如注射筒上之聚矽氧油)之量可影響產品穩定性。柱塞及端帽之組成可影響此等組分之透氧性且此等組分之可浸出物可引入蛋白質產品(例如抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物)中，亦可影響產品穩定性。可影響產品穩定性之另一注射器參數包括可滲入產品調配物(例如自筒(例如玻璃筒)及/或針(例如不鏽鋼針))之雜質(例如重金屬(例如鎢))之類型及/或量。(亦參見 Ludwig 等人，*J.Pharm. Sci.* 99:1721-1733 (2010)；Nashed-Samuel 等人，*American Pharmaceutical Review*

Jan/Feb:74-80 (2011)；Badkar等人，*AAPS PharmSciTech* 12:564-572)

預填充注射器可手動注射或用自動注射器裝置來使用。預填充注射器之功能測試包括量測脫開力(break-loose force)，即開始移動柱塞所需之力；及滑動力，即以恆定速率注射注射器之內含物所需之力。預填充注射器之機械效能可視數種調配物及注射器參數(諸如注射器中之調配物之黏度及潤滑劑(例如聚矽氧油)之量)而定。

預填充注射器中之蛋白質產品之數種屬性及其可影響彼等產品屬性之調配物或注射器因素展示於表1中。許多產品屬性可為數種調配物及注射器參數之複合函數。舉例而言，注射器滑動力為調配物黏度之函數，但黏度可視數種調配物因素(諸如蛋白質濃度、穩定劑濃度及pH值)而定。

表1：預填充注射器中之蛋白質產品之產品屬性及其可影響此等屬性之可能調配物及注射器參數

產品屬性	可影響產品屬性之蛋白質調配物參數	可影響產品屬性之注射器參數
重量莫耳滲透濃度	穩定劑濃度、pH值、蛋白質濃度	無
黏度	穩定劑濃度、pH值、蛋白質濃度	無
注射器脫開力及滑動力	黏度、蛋白質濃度、界面活性劑濃度	注射速度、針長度、針ID、注射器筒ID、聚矽氧油量、柱塞調配物及形狀
蛋白質脫醯胺速率	穩定劑濃度、pH值、蛋白質濃度	無
蛋白質氧化速率	穩定劑/抗氧化劑濃度、pH值、蛋白質濃度、界面活性劑濃度、溶氧	柱塞及端帽調配物(透氧性)、重金屬雜質含量、氣泡尺寸
可溶性聚集體形成速率	穩定劑濃度、pH值、蛋白質濃度、界面活性劑濃度、	聚矽氧油量、重金屬雜質含量、氣泡尺寸

	呈溶解狀態之溶氧	
顯微鏡下可見(Sub-visible)及可見之蛋白質微粒形成速率	穩定劑濃度、pH值、蛋白質濃度、界面活性劑濃度	聚矽氧油量、重金屬雜質含量、氣泡尺寸、注射器內表面積

在一個態樣中，可添加界面活性劑(諸如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80)至預填充注射器中之蛋白質調配物中(從而例如防止蛋白質分子在液體/空氣及/或液體/潤滑劑(例如聚矽氧油)界面處吸附及變性)。蛋白質分子之表面吸附及變性可為顯微鏡下可見及可見蛋白質顆粒成核的一種機制。因此，添加界面活性劑至預填充注射器中可減少預填充注射器產品中之顯微鏡下可見及可見顆粒之形成。在一個實施例中，少量界面活性劑可乳化潤滑劑(例如溶液中之聚矽氧油小滴，且從而減少顯微鏡下可見及可見潤滑劑(例如聚矽氧油小滴)形成)(Ludwig等人，前述)。在另一實施例中，由於大量界面活性劑對蛋白質調配物之可能有害作用而將調配物中之界面活性劑之量減至最少。存在於聚山梨醇酯中之過氧化物雜質可導致蛋白質氧化增加(Wang及Wang *J. Pharm. Sci.* 91:2252-2264 (2002))。大量界面活性劑可乳化來自注射器壁之大量聚矽氧油且導致在存放期內功能性滑動力增加。應設計產品開發研究以檢驗變化的界面活性劑含量對產品穩定性及注射器效能兩者之作用。

使用品質源於設計(QbD)或實驗設計(DOE)方法使蛋白質/PFS系統中之調配物與注射器參數之間的複雜相互作用受此等系統檢驗。可設計同時改變調配物及注射器參數之研究以得到對此等複雜系統之更好瞭解。由此得到開發預填充注射器產品之綜合方法。表2展示可加入預填充注射器產品之實驗設計中之輸入參數及水準之實例及欲採用之分析測試之實例。視用於QbD研究之實驗設計類型而定，實驗數目可在9(篩選設計)至81(全因子設計)(所有可能組合)範圍內變化。實驗數目愈高，可解決之產品參數

之間的相互作用數目愈高。為此分析設計之軟體(例如JMP®統計分析軟體 (statistical discovery software)(Cary, NC))可有助於QbD研究。此分析產生對調配物及注射器參數如何相互作用來影響產品屬性的定量瞭解。

表2：預填充注射器中之液體蛋白質產品之實驗設計的實例

調配物輸入參數	水準	分析測試
蛋白質濃度	50 mg/mL、100 mg/mL、150 mg/mL	<ul style="list-style-type: none"> <li>藉由尺寸排阻層析法及離子交換層析測試蛋白質穩定性</li> <li>使用力測試來測試隨時間之脫開力及滑動力</li> <li>使用微流成像或庫爾特計數器測試顯微鏡下可見蛋白質顆粒及聚矽氧油小滴隨時間之形成</li> </ul>
pH值	5.5、6.5、7.5	
界面活性劑濃度	0.01%、0.08%、0.15%	
注射器中之聚矽氧油之量	每注射器0.2 mg、0.5 mg、0.8 mg	

如下給出可獲自表2中所示實例實驗之預測模型的實例，其中 $C_n$ 為數值常數。

可溶性聚集體隨時間之形成= $C_0+C_1$ [蛋白質濃度]+ $C_2$ [蛋白質濃度]<sup>2</sup>+ $C_3$ [pH]+ $C_4$ [界面活性劑濃度]+ $C_5$ [潤滑劑量]

眾多注射器參數可影響產品穩定性及效能，因此一實施例包括注射器參數之容許公差如何影響產品穩定性及效能的示性。注射器筒上之潤滑劑(例如聚矽氧油)之量在不同注射器間可變化50%至100%。該量之此變化可影響如表1中所示之數種產品特徵。注射器筒之內徑在不同注射器間可不同，其影響注射力。在押針注射器中，針內徑在不同批次間或在不同製造商間可不同，其將影響注射力。藉由使用QbD方法來檢驗注射器參數如何影響效能，可獲得預測模型，其可用於估計注射器參數之容許公差可如何影響產品效能。使用QbD方法獲得之預測模型可用來選擇滿足所要產品屬性之調配物及注射器參數且預測產品穩定性及效能。

預填充注射器可含有向蛋白質調配物中添加之聚矽氧乳液或鎊。可存在於預填充注射器中之聚矽氧之例示性量在約0.3 mg至約0.8 mg範圍內。在一個態樣中，可存在於預填充注射器中之聚矽氧之量為約0.3 mg、約0.4 mg、約0.5 mg、約0.6 mg、約0.7 mg或約0.8 mg。在另一態樣中，調配物之黏度將在2 cP至60 cP範圍內，使得在200毫米/分鐘速度下的注射力為5 N至80 N。在另一態樣中，調配物之黏度將在4 cP至27 cP範圍內，使得在200毫米/分鐘速度下的注射力為10 N至40 N。

參考以下實例將更充分地瞭解本發明。然而，不應將其視為限制本發明之範疇。所有文獻及專利引證以引用的方式併入本文中。

### 製備調配物之方案

使抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體溶液在切向流過濾系統中透濾以達到檸檬酸鹽、組胺酸、精胺酸緩衝劑之規定濃度，隨後集中且與聚山梨醇酯80於檸檬酸鹽、組胺酸、精胺酸緩衝劑中之溶液混合。將溶液於2 L或5 L瓶中儲存於-70°C下。隨後解凍溶液且經由0.2  $\mu\text{m}$ 濾紙過濾兩次。將約1.0 mL填充至滅菌注射器中且用滅菌柱塞(塞子)封閉。儲存調配物且在2°C至8°C下於注射器中運送最終藥物產品。

## 實例

### 實例1

#### 調配物製造

#### 因素

#### 賦形劑濃度

測試抗體調配物中之聚集體形成。自實驗數據開發SEC聚集體模型，該實驗檢驗蛋白質濃度、pH值及界面活性劑:蛋白質莫耳比。在6.0至

6.5之pH值範圍下，聚集體形成類似於0.7至1.5之聚山梨醇酯80與蛋白質莫耳比範圍下的聚集體形成。(圖6)一般而言，在PS80:蛋白質比率大於1.5時，聚集體形成率隨pH值升高而增加。(圖7)

進行檢驗在空氣存在下SEC聚集體形成之實驗。將11種不同組成之不同調配物置於硼矽小瓶中且用彈性塞子加蓋，具有空氣頂空。製造一組相同調配物，且用氬氣代替空氣頂空。此等樣品在40°C下穩定地置放兩週。與具有氬氣頂空之相同調配物相比，所有具有空氣頂空之樣品在實驗結束時產生大量聚集體。

表3

樣品	蛋白質濃度(mg/ml)	蔗糖(%)	組胺酸(mM)	精胺酸(mM)	PS 80(%)	pH值	聚集體空氣樣品(%)	聚集體氬氣樣品(%)
1	60	2	25	75	0.05	6.2	0.64	0.48
2	60	4	25	75	0.05	7	0.62	0.42
3	160	4	50	75	0.14	6.2	0.92	0.73
4	160	2	50	75	0.14	7	1.16	0.74
5	60	2	50	125	0.05	7	1.28	0.33
6	60	4	50	125	0.05	6.6	0.48	0.36
7	160	4	25	125	0.14	7	1.04	0.70
8	160	2	25	125	0.14	6.2	1.06	0.75
9	160	3	25	75	0.14	6.6	1.09	0.78
10	110	3	50	125	0.10	6.2	0.65	0.47
11	110	2	25	75	0.10	6.6	0.90	0.62

基於此等實驗，推測SEC聚集體藉由氧化或藉由二硫鍵形成而形成。探究抗氧化劑及/或螯合劑之添加。製備pH 6.6之聚山梨醇酯80與蛋白質莫耳比為1.5的含有40 mM組胺酸、90 mM精胺酸及160 mg/mL蛋白質之調配物。向調配物中添加25 mM檸檬酸鹽、5 mM檸檬酸鹽、5 mM

EDTA、25 mM半胱胺酸或5 mM半胱胺酸中之任一者。所有3種其他賦形劑減少聚集體形成(圖8)。按照檸檬酸鹽>EDTA>半胱胺酸之效能順序，將抗氧化劑及/或螯合劑之添加分級。與對照調配物相比，5 mM或25 mM檸檬酸鹽之任一者均減少SEC聚集體形成。

進行實驗以確定pH值、蛋白質濃度、檸檬酸鹽濃度、組胺酸濃度及聚山梨醇酯80與蛋白質莫耳比之效應。pH值在6.0至6.3範圍變化，蛋白質濃度在60 mg/mL至160 mg/mL範圍變化，檸檬酸鹽濃度在0至25 mM範圍變化，組胺酸濃度在25 mM至50 mM範圍變化，且聚山梨醇酯80與蛋白質莫耳比在0.7至1.5範圍變化。將調配物填充於1 ml長的27 G 1/2"注射器(0.55 +/- 0.2 mg聚矽氧)中。所有調配物均含有約125 mM精胺酸。

使用CEX及SEC測試40°C下歷時兩週之穩定性。結果(圖9及表4)展示在調配物中存在25 mM檸檬酸鹽之情況下聚集體形成減少，而增加蛋白質濃度可提高聚集體形成率。單體之量在25°C及40°C下展示與聚集體形成相反之趨勢，而在5°C下單體之量基本上無變化持續高達24個月(表5)。

另一組調配物探究在40°C、25°C、5°C下SEC聚集體在40 mM至63 mM檸檬酸鹽存在下但無組胺酸之形成率。在40°C下此等調配物中的聚集體形成率稍微高於具有組胺酸之調配物。然而，在5°C下，具有檸檬酸鹽且無組胺酸之調配物中的聚集體形成率可與含有檸檬酸鹽及組胺酸之調配物相當(表6)。再者，在5°C下，單體之量基本上無變化持續高達24個月(表7)。

表4

調配物編號	蛋白質濃度 (mg/mL)	pH值	組胺酸濃度 (mM)	檸檬酸鹽濃度 (mM)	精胺酸濃度 (mM)	PS80: 蛋白質莫耳比	聚集體之初始量 (%)	在5°C下 12個月之後 聚集體之變化	在5°C下 24個月之後 聚集體之變化	在25°C下 12個月之後 聚集體之變化	在40°C下 1個月之後 聚集體之變化
1	62	6.4	50	25	125	0.7	0.4	0.1	0.1	0.7	0.2
2	60	6.4	50	0	125	1.5	0.4	0.5	1.1	1.5	0.4
3	157	6.4	50	25	125	1.5	0.4	0.2	0.3	1.3	0.5
4	161	6.3	50	0	125	0.7	0.4	0.6	0.7	2.5	0.8
5	60	6.2	50	25	125	1.5	0.4	0.2	0.2	0.5	0.2
6	110	6.0	50	0	125	0.7	0.4	0.4	0.6	1.7	0.7
7	162	6.2	50	25	125	0.7	0.4	0.3	0.3	1.1	0.5
8	160	6.0	50	0	125	1.5	0.4	0.4	0.6	2.2	0.9
9	169	6.3	25	25	125	0.7	0.5	--	0.3	--	0.6
10	158	6.3	25	25	123	1.0	0.5	--	--	--	0.6

表5

調配物編號	蛋白質濃度 (mg/mL)	pH值	組胺酸濃度 (mM)	檸檬酸鹽濃度 (mM)	精胺酸濃度 (mM)	PS80: 蛋白質莫耳比	單體之初始量 (%)	在5°C下 12個月之後 單體之變化	在5°C下 24個月之後 單體之變化	在25°C下 12個月之後 單體之變化	在40°C下 1個月之後 單體之變化
1	62	6.4	50	25	125	0.7	98.3	0.4	0.1	-2.5	-1.3
2	60	6.4	50	0	125	1.5	98.3	-0.2	-1.0	-3.9	-2.0
3	157	6.4	50	25	125	1.5	98.2	0.2	0.0	-3.1	-1.6
4	161	6.3	50	0	125	0.7	98.2	0.0	-0.4	-4.5	-2.1
5	60	6.2	50	25	125	1.5	98.3	0.3	0.2	-2.2	-1.4
6	110	6.0	50	0	125	0.7	98.3	0.1	-0.3	-3.6	-2.1
7	162	6.2	50	25	125	0.7	98.3	0.2	-0.1	-2.8	-1.7
8	160	6.0	50	0	125	1.5	98.3	-0.1	-0.4	-4.2	-2.3
9	169	6.3	25	25	125	0.7	98.2	--	-0.1	--	-1.8
10	158	6.3	25	25	123	1.0	98.1	--	--	--	-1.7

表6

調配物編號	蛋白質濃度 (mg/mL)	pH值	組胺酸濃度 (mM)	檸檬酸鹽濃度 (mM)	精胺酸濃度 (mM)	PS80: 蛋白質莫耳比	聚集體之初始量 (%)	在5°C下 12個月之後 聚集體之變化	在5°C下 24個月之後 聚集體之變化	在25°C下 12個月之後 聚集體之變化	在40°C下 1個月之後 聚集體之變化
11	160	6.3	0	40	125	0.7	0.5	--	0.4	--	0.9
12	165	6.3	0	40	125	1.5	0.6	0.3	--	--	0.9
13	62	6.2	0	40	125	1.5	0.5	--	--	1.7	0.4
14	170	6.1	0	40	125	1.5	0.5	--	--	--	0.9
15	165	6.5	0	63	125	1.5	0.5	--	--	--	1.0
16	160	6.3	0	40	125	1.0	0.6	0.3	--	--	0.9

表7

調配物編號	蛋白質濃度 (mg/mL)	pH值	組胺酸濃度 (mM)	檸檬酸鹽濃度 (mM)	精胺酸濃度 (mM)	PS80: 蛋白質莫耳比	單體之初始量 (%)	在5°C下 12個月之後 單體之變化	在5°C下 24個月之後 單體之變化	在25°C下 12個月之後 單體之變化	在40°C下 1個月之後 單體之變化
11	160	6.3	0	40	125	0.7	98.3	--	-0.3	--	-2.2
12	165	6.3	0	40	125	1.5	98.2	0.1	--	-3.4	-2.1
13	62	6.2	0	40	125	1.5	98.1	--	--	--	-1.4
14	170	6.1	0	40	125	1.5	98.1	--	--	--	-2.0
15	165	6.5	0	63	125	1.5	98.2	--	--	--	-2.3
16	160	6.3	0	40	125	1.0	98.2	0.1	--	--	-2.0

## pH值

在5°C下進行數個pH值實驗以確定pH值對CEX降解之效應。維多珠單抗抗體調配物包含160 mg/ml抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體、125 mM精胺酸、50 mM組胺酸及25 mM檸檬酸鹽。在40°C、25°C及5°C下測試數個不同pH水準

6.3、6.5、6.7及6.9下之穩定性。

40°C下之CEX模型展示(圖10)pH值最大程度上影響CEX降解。含有組胺酸之調配物之pH值隨溫度升高而降低，然而，展示檸檬酸鹽調配物之pH值不受溫度影響(圖11)。組胺酸/檸檬酸鹽調配物經測定在pH 6.8下40°C下1週後、pH 6.3至6.5下25°C下6個月後及pH 6.3至6.5下5°C下6個月後具有良好穩定性。基於其他研究，調配物之穩定性在25°C下與在5°C下在6.2至6.9之pH值範圍下係類似的(表8及表9)。

表8

蛋白質濃度 (mg/mL)	pH值	組胺酸濃度 (mM)	檸檬酸鹽濃度 (mM)	精胺酸濃度 (mM)	PS80: 蛋白質莫耳比	酸性物質之初始量 (%)	鹼性物質之初始量 (%)	主要同功異型物之初始量 (%)	在25°C下相對面積%隨時間之差異					
									6個月後 CEX酸性之變化	12個月後 CEX酸性之變化	6個月後 CEX鹼性之變化	12個月後 CEX鹼性之變化	6個月後 CEX主要之變化	12個月後 CEX主要之變化
157	6.4	50	25	125	1.5	23.9	6.8	69.3	8.5	17.4	7.1	3.4	-15.6	-20.8
162	6.2	50	25	125	0.7	24.0	6.9	69.1	4.4	12.8	10.8	8.6	-15.2	-21.4
158	6.3	50	25	125	1.5	24.8	5.5	69.7	7.2	--	4.9	--	-14.4	--
160	6.4	42	25	125	1.5	24.9	5.5	69.7	9.5	--	1.0	--	-14.4	--
147	6.7	45	25	125	2.1	24.9	4.7	70.4	14.8	--	3.6	--	-16.5	--
147	6.9	45	25	125	2.2	25.0	4.9	70.1	14.5	--	3.2	--	-17.9	--
153	6.7	46	25	125	1.5	24.8	5.5	69.7	14.7	--	0.3	--	-17.3	--
154	6.9	46	25	125	1.5	24.9	5.3	69.8	19.7	--	0.5	--	-20.2	--
170	6.5	50	25	125	1.0	25.7	4.6	69.7	10.8	--	4.4	--	-15.2	--
170	6.5	50	25	125	1.5	25.7	4.6	69.7	11.1	--	5.2	--	-16.4	--
160	6.5	50	25	125	1.5	26.3	7.0	66.7	11.8	--	-2.6	--	-11.9	--

表9

蛋白質濃度 (mg/mL)	pH值	組胺酸濃度 (mM)	檸檬酸鹽濃度 (mM)	精胺酸濃度 (mM)	PS80: 蛋白質莫耳比	在5°C下相對面積%隨時間之差異					
						6個月後 CEX酸性之變化	24個月後 CEX酸性之變化	6個月後 CEX鹼性之變化	24個月後 CEX鹼性之變化	6個月後 CEX主要之變化	24個月後 CEX主要之變化
157	6.4	50	25	125	1.5	0.2	0.6	2.3	-0.9	-2.5	0.3
162	6.2	50	25	125	0.7	-0.2	-0.7	4.3	2.2	-4.1	-1.5
158	6.3	50	25	125	1.5	0.0	--	1.9	--	-1.9	--
160	6.4	42	25	125	1.5	0.1	--	1.7	--	-1.8	--
147	6.7	45	25	125	2.1	1.7	--	1.7	--	-3.4	--
147	6.9	45	25	125	2.2	1.6	--	1.1	--	-2.7	--
153	6.7	46	25	125	1.5	1.7	--	0.4	--	-2.1	--
154	6.9	46	25	125	1.5	2.1	--	0.4	--	-2.4	--
170	6.5	50	25	125	1.0	0.9	--	1.6	--	-2.5	--
170	6.5	50	25	125	1.5	0.8	--	1.6	--	-2.5	--
160	6.5	50	25	125	1.5	11.8	--	-2.6	--	-11.9	--

## 實例2

## 穩定性

測試四種不同抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物在十二個月之時程內之穩定性。pH值為6.0至6.2之調配物展示比pH值為6.3至6.4之調配物少約1%至2%主要物質(圖12)。在5°C下pH值為6.3至6.4之調配物展示鹼性或主要物質之變化小於1%。

藉由SEC測試十種不同抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物在十二個月之時程內之穩定性(表10)。具有60 mg/mL蛋白質濃度且含有25 mM檸檬酸鹽之調配物在1年之後聚集體變化為0.1%至0.2%，而含有160 mg/mL蛋白質及25 mM檸檬酸鹽之調配物在1年內聚集體增加為0.2%至0.3%。含有60 mg/mL、110 mg/mL或160 mg/mL蛋白質、無檸檬酸鹽之調配物的聚集體增加為0.4%至0.6%。

表10

調配物編號	蛋白質濃度(mg/mL)	pH值	組胺酸濃度(mM)	檸檬酸鹽濃度(mM)	精胺酸濃度(mM)	PS80莫耳比	在5°C下1年之後聚集體%之變化
1	62	6.41	50	25	125	0.7	0.11
2	60	6.35	50	0	125	1.5	0.50
3	157	6.44	50	25	125	1.5	0.23
4	161	6.3	50	0	125	0.7	0.56
5	60	6.19	50	25	125	1.5	0.16
6	110	6.03	50	0	125	0.7	0.39
7	162	6.19	50	25	125	0.7	0.26
8	160	6	50	0	125	1.5	0.44
9	165	6.28	0	40	125	1.5	0.30
10	160	6.3	0	40	125	1.0	0.33

## 實例3

## 黏度

投與醫藥調配物所需之注射力與調配物之黏度有關。製備具有不同pH值及不同蛋白質、精胺酸、組胺酸、檸檬酸鹽、蔗糖及聚山梨醇酯80之濃度的調配物。測試此等調配物之黏度。開發Ln(黏度)之統計模型。該模型展示黏度主要受蛋白質濃度及pH值影響(圖13)。蔗糖、組胺酸及精胺酸亦可對黏度具有輕微影響。在一些蛋白質調配物中，添加氯化鈉以降低調配物之黏度。然而，已知氯化鈉對黏度之作用具有蛋白質及調配物依賴性。

添加氯化鈉至聚山梨醇酯80與蛋白質莫耳比為1.5且pH值為6.4的含有140 mg/mL維多珠單抗、125 mM精胺酸、25 mM組胺酸、25 mM檸檬酸鹽及聚山梨醇酯80之調配物中。NaCl對調配物之黏度無任何影響。

黏度對所測試各種注射器之注射力之效應展示於圖16A及圖16B中。

#### 實例4

##### 方法

##### 陽離子交換層析(CEX)

弱陽離子交換管柱上之磷酸鹽/氯化鈉梯度在高效液相層析系統中用於分離抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物中之帶電物質且測定抗體物質之電荷組成。酸性同功異型物在主要同功異型物之前溶離且鹼性同功異型物在主要同功異型物之後溶離。

使用CEX分析產生之維多珠單抗調配物之穩定性數據指示主要同功異型物%高於55.0%。

##### 毛細管等電聚焦(cIEF)

使用iCE280全柱偵測cIEF系統(Convergent Biosciences, Toronto, Ontario)進行cIEF。兩性電解質之選擇可由製造商推薦或可為市售兩性電

解質之組合。適用之組合為3-10與5-8 PHARMALYTE™之混合物(GE Healthcare, Piscataway, NJ)。

使用cIEF分析產生之維多珠單抗調配物之穩定性數據指示主要同功異型物%為約53%，酸性物質%為約42%，且鹼性物質%為約5%。

#### 尺寸排阻層析法(SEC)

使用分析型SEC管柱(Tosoh Bioscience, LLC, King of Prussia, PA)進行SEC。移動相為磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液且在280 nm下監測吸光度。

使用SEC分析產生之維多珠單抗調配物之穩定性數據指示單體%為99.0%，聚集體%<0.5%，且低分子量物質%<1.0%。

#### SDS-PAGE分析

使用Invitrogen(Carlsbad, CA)Tris-甘胺酸凝膠(在還原條件下為4%至20%且在非還原條件下為4%至12%)進行SDS-PAGE。將復原抗體調配物樣品於液體調配物緩衝液中稀釋，隨後以具有10% 2-巰基乙醇(還原樣品緩衝劑)或不具有2-巰基乙醇(非還原樣品緩衝劑)之Tris-甘胺酸SDS樣品緩衝液(2X, Invitrogen)1:2稀釋。短暫加熱樣品且裝載，以與分子量標記物(Invitrogen)相比較。用膠狀庫馬斯藍(coomassie blue)(Invitrogen)根據製造商說明書對凝膠染色。藉由密度測定法分析蛋白質帶以確定還原凝膠之重鏈及輕鏈%及非還原凝膠之IgG %。

#### 結合功效

使懸浮於含1% BSA之PBS、0.01%疊氮化鈉中之HuT78細胞(人類T細胞淋巴瘤細胞，美國菌種保存中心，Manassas, VA)與初級測試抗體之連續稀釋液接觸。在冰上培育之後，洗滌細胞且以螢光標記之二級抗體處

理。在進一步洗滌之後，將細胞固定且懸浮於FACS試劑中用於藉由流動式細胞測量術(Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ)分析；亦參見美國專利第7,147,851號。

水分(藉由卡爾費雪測定)

用甲醇滴定調配物以供庫侖(coulometric)卡爾費雪水分測定之用。

## 實例5

### 來自預填充有抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之注射器產品之聚矽氧的效應

使用由60 mg/mL至160 mg/mL抗- $\alpha 4\beta 7$ 蛋白質於含有L-組胺酸、L-精胺酸鹽酸鹽、檸檬酸鹽及聚山梨醇酯80之緩衝劑中組成之皮下調配物來研究聚矽氧對蛋白質調配物之穩定性及容器/外殼屬性的效應。在0.5 mL填充下進行研究。

探究包括蛋白質濃度、聚山梨醇酯80與蛋白質莫耳比及噴塗於注射器筒上之聚矽氧之量的參數。各輸入參數之範圍展示於表11中。

**表11.** 輸入參數範圍

參數	低	高
蛋白質濃度(mg/mL)	100	160
聚山梨醇酯80:蛋白質比	0	2
聚矽氧量(mg)	0.4	0.8

使用實驗設計來測定該組調配物以進行研究。合理之調配物數目在6至8種調配物範圍內。測試之調配物之實例展示於表12中。

**表12**

輪次	蛋白質濃度(mg/mL)	PS80:蛋白質比率	PS80濃度(%)	聚矽氧含量(mg)
1	100	1	0.087	0.8
2	100	2	0.174	0.8
3	160	0	0	0.8

4	160	2	0.279	0.4
5	100	0	0	0.4
6	160	2	0.279	0.8
7	100	1	0.087	0.4
8	160	0	0	0.4
9	100	0	0	0
10	100	2	0.174	0
11	160	0	0	0
12	160	2	0.279	0

可將一些對照物添加至該組調配物中且在幾個選定時間點進行測試。

在數個不同溫度(例如5°C、25°C/60% RH、40°C/75% RH下)穩定地置放此等調配物且在各時間點(例如第0週、第1週、第2週、第4週、第8週、第12週、第6個月及第12個月)拉伸(pull)來測試。在第0週、第12週、第6個月及第12個月測試對照物。

在各穩定性時間拉伸進行之測試包括SEC、CEX、英斯特朗(Instron)、MFI及聚矽氧定量。測試1個注射器之英斯特朗，排出之物質用於SEC、CEX、注射力量測及微流成像(MFI)及聚矽氧定量。

#### 實例6

#### 分析填充有抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之預填充注射器組分

此研究探究各個注射器製造商、柱塞(塞子)彈性體材料及調配物中的PS80之量如何影響系統之機械性質及調配物之穩定性。

建立實驗設計來探究3個不同注射器製造商、2種不同柱塞(塞子)材料類型及2個不同PS80與蛋白質莫耳比。保持調配物之其餘部分恆定在170 mg/mL蛋白質、125 mM精胺酸、50 mM組胺酸、25 mM檸檬酸鹽及pH 6.5。此等預填充注射器上之針尺寸為27 G ½'或29 G ½"薄壁。所進行之

實驗詳述於表15中。

實驗之活性部分之實驗設計輸入展示於下表13中，而常數展示於表14中。利用表13中所示之輸入來建立實驗設計。

實驗清單展示於表10中。

**表13.** 活性調配物之DOE變數及水準

變數	值		
PS80:蛋白質莫耳比	1.0		1.5
注射器製造商	A	B	C
柱塞(塞子)類型	4432		4023經塗佈

**表14.** 活性調配物之常數

常數	值
蛋白質濃度(mg/mL)	170
精胺酸濃度(mM)	125
組胺酸濃度(mM)	50
檸檬酸鹽濃度(mM)	25
pH值	6.5

**表15.** 實驗明細

輪次編號	注射器類型	柱塞(塞子)	PS80
1	C	4432	1
2	B	4432	1
3	A	4023	1
4	C	4023	1
5	B	4023	1
6	A	4023	1.5
7	C	4023	1.5
8	B	4023	1.5

將濃縮調配之抗- $\alpha 4\beta 7$ 調配物外加聚山梨醇酯80且稀釋降至170 mg/mL。起始調配物之組成展示於下表16中。

表16. 起始調配物緩衝劑明細

蛋白質(mg/ml)	總組胺酸(mM)	總檸檬酸鹽(mM)	精胺酸(mM)	pH值
183	50	25	125	6.48

為了稀釋所要調配物組成中之物質，製備PS80於25 mM檸檬酸鹽、50 mM組胺酸、125 mM精胺酸(pH 6.48)中之儲備溶液。

表17. 儲備溶液明細

賦形劑	濃度
PS 80 (%)	5

調配物之稀釋方案詳述於表18中。

表18. 稀釋明細

起始調配物 ( $\mu\text{L}$ )	PS80於組胺酸/精 胺酸/檸檬酸鹽緩 衝劑中( $\mu\text{L}$ )	50 mM組胺酸、125 mM 精胺酸、25 mM檸檬酸 鹽(pH 6.48)緩衝劑	總體積 ( $\mu\text{L}$ )
27868.9	890.8	1240.3	30000.0
18579.2	890.8	530.0	20000.0

基於稀釋方案進行混合，且應稱重起始調配物，而其他儲備溶液可按體積吸取。過濾調配物。將0.5 mL調配物等分試樣至儘可能多之1 mL長注射器中。藉由加塞機塞住注射器，留有2 mm至4 mm氣泡。在各時間點，一個注射器以針向下來儲存且一個注射器橫向儲存。額外注射器以針向下來儲存。

在5°C、25°C及40°C下在第2週及一個月時測試注射器。起初進行分析測試(外觀、英斯特朗、pH值、重量莫耳滲透濃度、密度、黏度、SEC、CEX及Brightwell)且隨後在25°C及40°C下第2週時及25°C下第4週時再進行分析測試。

## 實例7

### 分析用於預填充有抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之27 G薄壁針注射器中之皮下容器外殼

此研究探究具有27 G薄壁針之各個注射器模型及各個柱塞(塞子)製造商及模型如何影響系統之機械性質及調配物隨時間之穩定性。

此研究探究預填充注射器中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 皮下液體調配物之穩定性及注射器之機械性質如何受注射器製造商及用於具有27 G TW針之注射器之柱塞(塞子)模型的影響。自此研究生成之數據可確定液體皮下抗- $\alpha 4\beta 7$ 調配物之容器/外殼組分。

實驗設計輸入展示於下表19中，而常數展示於表20中。利用表19中所示之輸入來建立實驗設計。

所進行之實驗之清單展示於表21中。

**表19. 活性調配物之DOE變數及水準**

變數	值			
注射器製造商	A	B	C	
柱塞(塞子)類型	4432	4023經塗佈	D	E

**表20. 活性調配物之常數**

常數	值
蛋白質濃度(mg/mL)	160
精胺酸濃度(mM)	125
組胺酸濃度(mM)	50
檸檬酸鹽濃度(mM)	25
PS80 (%)	0.2
pH值	6.5

表21. 實驗明細

輪次編號	注射器	柱塞(塞子)
1	B	D
2	B	4432
3	A	4432
4	B	4023經塗佈
5	A	D
6	C	4023經塗佈
7	A	4023經塗佈
8	C	D
9	C	4432
10	C	E

將濃縮抗- $\alpha 4\beta 7$ 調配物外加聚山梨醇酯80且稀釋降至160 mg/mL。起始調配物之組成展示於下表22中。

表22. 起始調配物緩衝劑明細

蛋白質(mg/ml)	總組胺酸(mM)	總檸檬酸鹽(mM)	精胺酸(mM)	pH值
180	50	25	125	6.3

為了稀釋所要調配物組成中之物質，製備PS80於25 mM檸檬酸鹽、50 mM組胺酸及125 mM精胺酸(pH 6.3)中之儲備溶液。

表23. 儲備溶液明細

賦形劑	濃度
PS 80 (%)於組胺酸/精胺酸/檸檬酸鹽緩衝劑中，pH 6.3	1.68

調配物之稀釋方案詳述於表24中。

表24. 稀釋明細

起始調配物於組胺酸、精胺酸、檸檬酸鹽緩衝劑中(mL)	PS80於組胺酸/精胺酸/檸檬酸鹽緩衝劑中(mL)	總體積(mL)
78	10 (1.68%)	88

基於稀釋方案進行混合，且應稱重起始調配物，而其他儲備溶液可按體積吸取。過濾調配物。將0.5 mL調配物等分試樣至儘可能多之1 mL長注射器中。藉由加塞機塞住注射器，留有2 mm至4 mm氣泡。在各時間點，一個注射器以針向下來儲存(水平位置)。

在5°C、25°C/60% RH及40°C/75% RH下在第1個月、第3個月、第6個月、第9個月(視情況可選)、第12個月、第18個月及第24個月時測試注射器。

在第1、3、6、9、12、18、24個月(5°C)；第1、3、6、9、12、18個月(25°C)；第1、3、6、9、12個月(40°C)；及第1、3個月(40°C)時分析測試液體調配物(濃度、重量莫耳滲透濃度、pH值、英斯特朗、MFI、SEC及/或CEX)。

## 實例8

### 分析塑膠預填充注射器中之皮下抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物

開始此研究以調查塑膠注射器作為抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體皮下調配物之容器/外殼系統之用途。研究候選塑膠預填充注射器中之代表性抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體皮下調配物的穩定性。自此研究生成之數據有助於判斷使用塑膠注射器用於液體皮下抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之適用性。

如下所示製備穩定性測試樣品。在40°C/75% RH、25°C/60% RH及5°C之儲存條件下進行穩定性測試。

用表26中所示之液體皮下抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物測試表25中之兩種類型之塑膠注射器及一種玻璃注射器(對照物)。表27展示實驗中待測試之各組樣品之明細。

### 表25. 塑膠注射器

		樣品1 塑膠注射器1	樣品2 塑膠注射器2	樣品3 玻璃注射器 (對照物)
注射器	供應商	F	B	A
	組分	注射器：聚合物 針：27 G(TW) 剛性針罩	注射器：聚合物 針：26 G(RW) 魯爾(Luer)鎖定端帽	注射器：玻璃 針：27 G(TW) 剛性針罩
	矽塗層	無	有	有
柱塞	供應商	F	F	←
	產品描述	1 mL材料A	1 mL材料B	←
	矽塗層	無	有	←

表26. 抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體皮下調配物(pH 6.5)

組分	組成
抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體	160 mg/mL
精胺酸	125 mM
組胺酸	50 mM
檸檬酸鹽	25 mM
PS80(蛋白質莫耳比)	1.5 (0.2 w/v%)

表27. 樣品明細

樣品 編號	塑膠 注射 器供 應商	蛋白質 (MW:150000)		精胺酸 (MW:174.20) (mM)	組胺酸 (MW:155.15) (mM)	檸檬酸鹽 (MW:210.14) (mM)	PS 80 (MW:1309.68)		pH值
		(mg/ml)	(mM)				(w/v%)	蛋白質 莫耳比	
1	F	160	1.067	125	50	25	0.21	1.5	6.5
2	B	160	1.067	125	50	25	0.21	1.5	6.5
3 (對照物)	A	160	1.067	125	50	25	0.21	1.5	6.5

先前製備之液體皮下抗- $\alpha 4\beta 7$ 調配物用於此研究。過濾調配物。取樣用於品質測試之經過濾溶液作為「填充前」樣品(Appearance, MFI, DLS)。將0.5 mL調配物等分試樣至1 mL塑膠注射器中。藉由真空加塞機

塞住注射器。注射器以針向下來儲存。

進行初始檢查以量測pH值、重量莫耳滲透濃度、密度、黏度及蛋白質濃度。在40°C下1週後；40°C下2週後；5°C、25°C及40°C下1個月後；5°C及25°C下3個月後；5°C及25°C下6個月後；5°C及25°C下9個月後；及5°C及25°C下12個月後進行分析測試(外觀、SEC(聚集體、單體、LMW)、CEX(酸性、主要、鹼性)、滑動力、MFI、DLS及/或重量)。

在5°C及25°C下第1個月、第3個月、第6個月、第9個月及第12個月時採集樣品。在40°C下第1週、第2週及第1個月時採集樣品。

### 實例9：

在5°C及25°C下在各個時間點(可包括第0、1、3、6及12個月)分析樣品之外觀、注射力、SEC、CEX及微流成像。如藉由SEC及CEX量測的調配物之穩定性類似於實例1及實例2中所論述之穩定性。在注射力測試中，量測滑動力(表28)。統計模型確定影響滑動力之唯一重要因素為注射器製造商，其中A之滑動力比B高，B大於C(圖17)。在5°C下12個月及25°C下6個月內注射器之滑動力的變化小於10 N，但大多小於5 N。

表28

輪次編號	注射器製造商	針尺寸	柱塞(塞子)類型	PS80:蛋白質莫耳比	初始滑動力(N)
1	C	27G	D	1	19.2
2	B	27G	D	1	22.9
3	A	29GTW	E	1	25.0
4	C	27G	E	1	18.5
5	B	27G	E	1	22.7
6	A	29GTW	E	1.5	28.8
7	C	27G	E	1.5	18.7
8	B	27G	E	1.5	23.7

## 實例10

### 分析用於填充有抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物之27 G薄壁針注射器之預填充注射器組分

此研究探究具有27 G薄壁針之各個注射器製造商及各個柱塞(塞子)製造商及彈性體材料如何影響預填充注射器系統之機械性質及調配物隨時間之穩定性。

用27 G ½"薄壁針及含有160 mg/mL蛋白質、125 mM精胺酸、50 mM組胺酸、25 mM檸檬酸鹽、0.2% PS80(pH 6.5)之調配物測試三個不同注射器製造商及4種不同柱塞(塞子)模型。所產生及測試之所有樣品均展示於表29中。

**表29. 實驗明細**

輪次編號	注射器	柱塞(塞子)
1	B	F
2	B	D
3	A	D
4	B	E
5	A	F
6	C	E
7	A	E
8	C	F
9	C	D
10	C	G

在5°C、25°C及40°C下在各個時間點(可包括第0、1、3、6及12個月)分析樣品之外觀、注射力、SEC、CEX及微流成像。如藉由SEC及CEX量測的調配物之穩定性類似於實例1及實例2中所論述之穩定性。在注射力測試中，量測脫開力及滑動力。起始時間點之結果展示於表30中。

表30

輪次 編號	注射器 製造商	柱塞(塞 子)類型	初始 滑動 力(N)	初始 脫開 力(N)	在5°C下 12個月時 之脫開力 (N)	在25°C下 12個月時 之脫開力 (N)	在40°C下 12個月時 之脫開力 (N)
1	B	F	12.0	4.0	3.8	12.9	28.7
2	B	D	11.9	3.9	4.6	12.4	36.0
3	A	D	7.0	4.0	6.5	5.1	6.4
4	B	E	13.9	4.5	4.7	5.8	17.2
5	A	F	5.7	4.1	3.0	17.5	23.9
6	C	E	6.7	4.1	5.0	5.8	11.4
7	A	E	7.9	7.6	4.3	10.4	6.1
8	C	F	6.3	4.2	4.1	15.0	33.3
9	C	D	5.9	4.8	3.9	4.4	10.0
10	C	G	7.2	4.6	6.1	9.8	13.0

統計模型展示注射器製造商A與C類似且滑動力比製造商B低，而柱塞(塞子)E之滑動力比其他柱塞(塞子)略高。

一般而言，初始脫開力在測試之所有樣品間均類似。

在5°C、25°C及40°C下12個月內，滑動力不顯著變化。然而，具有柱塞(塞子)F之注射器之脫開力在25°C及40°C下至12個月時有增加。

#### 實例11

##### 分析預填充注射器中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物

此研究確定不同水準之蛋白質濃度、聚山梨醇酯80濃度、檸檬酸鹽濃度及pH值如何影響預填充注射器模式中之抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物。

在JMP中用兩個水準之蛋白質濃度(60至160 mg/mL)、pH值(6.0至6.3)、聚山梨醇酯80:蛋白質莫耳比(0.723至1.5)及檸檬酸鹽濃度(0至25 mM)的分級析因(fraction factorial)產生部分實驗設計。此等調配物具有

恆定值之組胺酸濃度(50 mM)及精胺酸(125 mM)(調配物1至調配物8)。添加具有25 mM組胺酸之此等調配物之變化形式(調配物9至調配物10)。

開發另一組調配物以探究不存在組胺酸且僅檸檬酸鹽充當緩衝劑的情況下的調配物(調配物11至調配物16)。所探究之所有調配物之輸入水準均展示於表31中。用於所有調配物之常數均展示於表32中。

**表31. DOE變數及水準**

變數	標稱值	
	低	高
蛋白質濃度(mg/mL)	60	160
pH值	6.0	6.3
PS80:蛋白質莫耳比	0.723	1.5
檸檬酸鹽濃度(mM)	0	40
組胺酸濃度(mM)	0	50

**表32. 常數**

常數	值
精胺酸濃度(mM)	125

表33列出待測試之調配物。

**表33. 調配物明細**

調配物 編號	蛋白質 (mg/ml)	蛋白質 (mM)	組胺酸 (mM)	精胺酸 (mM)	PS 80 %	pH值	PS80: 蛋白質 莫耳比	抗氧化劑	抗氧化劑 濃度 (mM)
1	60	0.400	50	125	0.038	6.3	0.723	檸檬酸	25
2	60	0.400	50	125	0.079	6.3	1.5	檸檬酸	0
3	157	1.047	50	125	0.206	6.3	1.5	檸檬酸	25
4	160	1.067	50	125	0.101	6.3	0.723	檸檬酸	0
5	60	0.400	50	125	0.079	6.0	1.5	檸檬酸	25
6	110	0.733	50	125	0.069	6.0	0.723	檸檬酸	0
7	160	1.067	50	125	0.101	6.0	0.723	檸檬酸	25

8	160	1.067	50	125	0.210	6.0	1.5	檸檬酸	0
9*	160	1.067	25	125	0.101	6.0	0.723	檸檬酸	25
10*	160	1.067	25	125	0.140	6.0	1	檸檬酸	25
11	160	1.067	0	125	0.101	6.3	0.723	檸檬酸	40
12	160	1.067	0	125	0.210	6.3	1.5	檸檬酸	40
13	60	0.400	0	125	0.079	6.3	1.5	檸檬酸	40
14*	160	1.067	0	125	0.210	6.1	1.5	檸檬酸	40
15*	160	1.067	0	125	0.210	6.6	1.5	檸檬酸	40
16*	160	1.067	0	125	0.140	6.3	1	檸檬酸	40

自含有抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體之起始儲備調配物產生各調配物且用各種賦形劑儲備溶液稀釋。為了達成合理的稀釋體積，所用抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體儲備溶液展示於表34中。進行兩種不同TFF操作以獲得調配物TFF 1及2。在透析中使用一部分TFF 1以達成調配物標記之「透析」。

表34. 起始調配物緩衝劑明細

起始調配物	蛋白質 (mg/ml)	總組胺酸 (mM)	總檸檬酸鹽 (mM)	精胺酸 (mM)	pH值
TFF 1	192.1	50	0	125	6.1
TFF 2	206.1	0	40	125	6.3
透析	169.65	25	25	125	6.0

為了稀釋所要調配物組成中之物質，製備由表35指定之濃度的各賦形劑於水中之儲備溶液。

表35. 儲備溶液明細

賦形劑	濃度
組胺酸(mM)	220
精胺酸鹽酸鹽(mM)	625
PS 80 (%)	2.5
組胺酸鹽酸鹽(mM)	600
檸檬酸(mM) (pH 6.3)	1500
檸檬酸(mM) (pH 6.0)	1500

檸檬酸鹽(mM)	600
檸檬酸鈉(mM)	800

調配物之稀釋方案詳述於表36及表37中。

表36. 稀釋明細

	起始調配物(μL)	起始調配物(mg)	組胺酸(μL)	組胺酸鹽酸鹽(μL)	精胺酸(μL)	檸檬酸鹽溶液(μL)	PS80(μL)	WFI(μL)
1	4685.06	4961.01	1612.2	268.4	2063.0	250	227.3	5894.0
2	4685.06	4961.01	1612.2	268.4	2063.0	0	471.6	5899.7
3	12259.2	12981.31	724.1	0.0	548.2	250.0	1234.0	0.0
4	12493.49	13229.36	696.7	0.0	501.3	0	606.2	702.4
5	4685.06	4961.01	1002.8	491.9	2063.0	250	471.6	6035.7
6	8589.28	9095.18	545.0	334.4	1282.1	0	416.7	3832.4
7	12493.49	13229.36	87.2	176.9	501.3	250	606.2	884.9
8	12493.49	13229.36	87.2	176.9	501.3	0	1257.6	483.5
9	12260.8	12941.30	38.2	16.8	147.8	12.3	525.3	0.0
10	12260.8	12941.30	38.2	16.8	147.8	12.3	726.6	0.0

表37. 稀釋明細

	起始調配物(μL)	起始調配物(mg)	檸檬酸鹽(μL)	檸檬酸鈉(μL)	精胺酸(μL)	PS80(μL)	WFI(μL)
11	9315.87	9944.69	8.3	128.0	536.8	484.9	1526.1
12	9315.87	9944.69	8.3	128.0	536.8	1006.1	1005.0
13	3493.45	3729.26	30.5	402.5	1701.3	377.3	5995.0
14	5822.42	6215.43	22.0	67.4	335.5	628.8	623.9
15	5822.42	6215.43	0.0	300.0	335.5	628.8	413.3
16	5822.42	6215.43	5.2	80.0	335.5	419.2	837.7

基於稀釋方案進行混合，且稱重起始調配物，而其他儲備溶液按體積吸取。過濾調配物。將0.5 mL調配物等分試樣至儘可能多之1 mL長注射器中。藉由加塞機塞住注射器。注射器以針向下來儲存。

初始；及在40°C下第1週；40°C下第2週；25°C及40°C下第1個月；

5°C及25°C下第2個月；5°C及25°C下第3個月；5°C及25°C下第6個月；5°C及25°C下第9個月；及5°C及25°C下第12個月時以分析方式(外觀、pH值、重量莫耳滲透濃度、密度、DLS、SEC、CEX及/或Brightwell)測試液體調配物。

亦進行根據表38之特定調配物拉伸。

表38：特定調配物拉伸

調配物	溫度	第1週	第2週	第1個月	第2個月	第3個月	第6個月	第9個月	第12個月	額外
1	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
2	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
3	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
4	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
5	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
6	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
7	5	--	--	--	X	X	X	X	X	0
8	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
9	5	--	--	--	--	--	--	--	--	3
10	5	--	--	--	X	X	X	--	X	0
11	5	--	--	--	--	--	--	--	--	5
12	5	--	--	--	X	--	--	--	--	4
13	5	--	--	--	--	--	--	--	--	5
14	5	--	--	--	X	--	--	--	--	1
15	5	--	--	--	--	--	--	--	--	2
16	5	--	--	--	X	--	--	--	--	1
1	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
2	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
3	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
4	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
5	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
6	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
7	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
8	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1

9	25	--	--	X	--	--	--	--	--	3
10	25	--	--	X	X	--	X	--	--	0
11	25	--	--	X	--	--	--	--	--	5
12	25	--	--	X	X	--	--	--	--	4
13	25	--	--	X	--	--	--	--	--	6
14	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
15	25	--	--	X	--	--	--	--	--	2
16	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
1	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
2	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
3	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
4	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
5	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
6	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
7	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
8	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
9	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
10	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
11	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
12	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
13	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
14	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
15	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
16	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0

## 實例12

測試含有160 mg/mL蛋白質、50 mM組胺酸、25 mM檸檬酸鹽、125 mM精胺酸之調配物(pH 6.5)於玻璃注射器或兩種不同COP塑膠注射器中的穩定性。在5°C及25°C下12個月之後，聚集體及單體之量在塑膠與玻璃注射器間相當。

表39

調配物編號	PS80: 蛋白質 莫耳比	注射器材料	在5°C下12個月之後的SEC聚集體之變化(%)	在25°C下12個月之後的SEC聚集體之變化(%)	在5°C下12個月之後的單體之量(%)	在25°C下12個月之後的單體之量(%)
1	1.5	COP製造商1	0.2	1.0	98.3	96.8
2	1.5	COP製造商2	0.2	1.6	98.3	96.9
3	1.5	玻璃	0.2	1.4	98.4	96.8
4	1	玻璃	0.2	1.6	98.3	96.8

### 實例13：藉由皮下及肌內注射投與之維多珠單抗之生物可用性

完成藉由皮下及肌內注射向健康男性個體投與之維多珠單抗之生物可用性的第I期研究。總共42個健康男性參加該研究。將該等個體分成各14個個體之三組(皮下、肌內及靜脈內投與)。在一天時間內向個體投與180 mg維多珠單抗。劑量自60 mg/ml抗體於50 mM組胺酸、125 mM精胺酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH 6.3)中之凍乾調配物復原。對於肌內及皮下個體，將劑量分成各1.5 ml之兩次注射。取樣血液以測定血漿維多珠單抗濃度且測定各組個體中之維多珠單抗之生物可用性。

既未報導嚴重不利事件或重大感染、臨床上顯著異常、陽性主觀/客觀RAMP檢核表，亦未報導臨床上顯著之ECG結果。

完成PK/PD模型化及模擬以測定血管外劑量之劑量及方案，該血管外劑量產生與靜脈內劑量類似之暴露，以便維持此所要血清濃度於最低含量下。

吸收曲線(圖18)展示肌內及皮下劑量之濃度通常重疊。此等投與途徑之吸收曲線不存在顯著總體差異。維多珠單抗之絕對生物可用性在SC注射之後大致為75%且在IM注射之後大致為80%。

#### 實例14.模型化皮下劑量方案

完成PK/PD模型化及模擬以測定血管外劑量之劑量及方案，該血管外劑量產生與靜脈內劑量類似之暴露，以便維持某些血清濃度於最低含量下。

最終組合數據集(IV、SC及IM數據)展示就清除率(CL)及中心分佈體積(V2)、外周分佈體積(V3)、血管外途徑相關吸收率常數(KA)及血管外劑量之相對生物可用性(與靜脈內投與相比)(F)而言參數化的二室線性模型。IIV術語包括於CL、V2及V3上，體重為經由異速生長效應影響CL及V3的唯一共變數。

經由靴帶式參數估計、可見預測性檢查及擬合曲線良好性顯現模型可接受性及可預測性。對模型之分析確定體重為維多珠單抗之PK之預測因子，PK之變異性歸因於個體間及個體組分內之變異性。

一旦證明模型適用於模擬，則進行模擬以便評估投與途徑(IV、IM或SC)對穩態最低濃度之效應，且評估給藥頻率(每週、每2週、每4週及每8週)對穩態最低濃度之效應。基於此等值及維多珠單抗在IM及SC投與之後之相對生物可用性(F=69.5%)，選擇劑量以達成與IV劑量類似之最低濃度。

模擬使劑量及方案模型化以匹配靜脈內誘導及維持方案。目標為暴露(血清藥物濃度-時間曲線下面積(AUC))及最低藥物濃度兩者。表40至表43提供模擬結果。

表40. 匹配在第0週至第6週期間IV AUC之誘導方案

途徑	劑量	頻率
IV	300 mg	第0週及第2週
SC	485 mg	第0週及第2週

SC	160 mg	每隔一天(6個劑量)
SC	>160 mg	每週(6個劑量)

表41. 匹配第0週至第6週IV最低濃度之誘導方案

途徑	劑量	頻率
IV	300 mg	第0週及第2週
SC	>160 mg	第0週及第2週
SC	100 mg	每週(6個劑量)
SC	160 mg	每隔一天(持續2週)

表42. 匹配每4週300 mg IV劑量之維持方案

頻率	途徑	匹配4週IV穩態最低濃度之劑量	匹配4週IV AUC之劑量
每4週一次	IV	300	300
	IM	432	432
	SC	432	432
每2週一次	IV	115	150
	IM	165	216
	SC	165	216
每週	IV	50	75
	IM	72	108
	SC	72	108

表43. 匹配每8週300 mg IV劑量之維持方案

頻率	途徑	匹配8週IV穩態最低濃度之劑量	匹配8週IV AUC之劑量
每8週一次	IV	300	300
	IM	432	432
	SC	432	432
每4週一次	IV	90	150
	IM	125	216
	SC	125	216
每2週一次	IV	35	75
	IM	50	108
	SC	50	108

每週	IV	15	37.5
	IM	22	54
	SC	22	54

### 實例15：第2a期多劑量研究

第2a期多劑量研究可評估維多珠單抗在藉由皮下投與途徑投與維多珠單抗多個劑量之後的安全性、可耐受性及穩態PK，且評估皮下方案與靜脈內方案相比之相對生物可用性。可評估HAHA之發展及HAHA之中和及多個劑量之維多珠單抗在皮下投與之後對PD之效應。

部分Mayo計分為1至12之潰瘍性結腸炎患者及CDAI大於150之克隆氏病患者可包括於研究中。群組可接受第0週及第2週時IV投與之維多珠單抗(300 mg)之誘導方案，隨後接受以下任一維持方案：

在第6週至第22週時每4週IV投與維多珠單抗(300 mg)

在第6週至第22週時每8週IV投與維多珠單抗(300 mg)

在第6週至第22週時每週SC投與維多珠單抗(108 mg)

在第6週至第22週時每2週SC投與維多珠單抗(108 mg)

在第6週至第22週時每3週SC投與維多珠單抗(165 mg)。

可在給藥之前第1天且隨後再在第1(12小時)、2、3、5、8、15、29、43、127、127(12小時)、128、129、131、134、141及155天時收集樣品以評估PK及PD。

### 實例16：維多珠單抗用於治療IBD之長期臨床經驗

完成第2期開放標記之安全性擴展研究以評估維多珠單抗之長期藥物動力學(PK)、藥效學(PD)、安全性及功效。患者年齡為18歲至75歲，且先前參與過潰瘍性結腸炎患者之初期PK/PD/安全性研究或在篩選之36個月內具有內窺鏡檢查及/或組織病理學及/或放射學證實的IBD症狀持續至

少2個月。

所有患者均接受以下靜脈內給藥方案：在第1天、第15天及第43天投與2 mg/kg或6 mg/kg維多珠單抗(5 mg/mL抗體、20 mM檸檬酸鹽/檸檬酸、125 mM氯化鈉、0.05%聚山梨醇酯80、pH 6.0(長期儲存於-70°C且儲存於-20°C高達3個月))，隨後每8週一個劑量，持續高達總共78週。患者為未治療處理之潰瘍性結腸炎或克隆氏病患者，或參與過初期臨床試驗之潰瘍性結腸炎患者。

使用功效/生活品質(QoL)、部分Mayo計分(PMS)、克隆氏病活動性指數(CDAI)及發炎性腸病問卷(IBDQ)來評估研究結果。

#### PK結果

平均輸注前維多珠單抗濃度與劑量成比例，且在整個研究期間保持穩定及可偵測。

#### PD結果

在所有劑量水準下在整個研究期間受體(% ACT-1+[CD4+CD45RO HIGH]及% MADCAM+[CD4+CD45RO HIGH])幾乎得到完全抑制。

#### 部分Mayo計分

未治療處理之潰瘍性結腸炎患者(5.4)之基線平均PMS比潰瘍性結腸炎反覆(rollover)患者(2.3)高。至第43天，反覆及未治療處理之潰瘍性結腸炎患者之平均PMS均顯示顯著降低。至第155天，兩組之平均計分類似。平均PMS繼續降低直至第267天，且此後趨於平衡。

#### 克隆氏病活動性指數

CD患者之平均CDAI自基線處之294.6降低至第43天時之237.7，且繼續降低直至第155天(156.1)。

## IBDQ

潰瘍性結腸炎反覆患者在基線處具有最高平均IBDQ計分。至第43天，平均IBDQ計分在所有三個疾病組中均增加。平均IBDQ計分在所有3個疾病組中均繼續隨時間增加，在克隆氏病患者中在第155天時達到最大，且在未治療處理之潰瘍性結腸炎患者及潰瘍性結腸炎反覆患者中在第491天時達到最大。

## C-反應性蛋白

潰瘍性結腸炎反覆及克隆氏病患者均顯示平均CRP含量降低直至第155天且隨後趨於平衡。未治療處理之潰瘍性結腸炎患者之平均CRP含量在基線時比潰瘍性結腸炎反覆患者低(2.28相較於7.09)。未治療處理之潰瘍性結腸炎患者之平均CRP含量在所評估之所有時間點均保持相對恆定。

## 其他安全性結果

在研究期間未有全身機會性感染(包括PML)之報導。一個患者在單一時間點經測試為JC病毒血症陽性，但在所有其他時間點為JCV陰性。72個患者中有3個(4%)具有陽性HAHA結果(其中兩個為短暫性陽性)。研究顯示沒有肝毒性、淋巴球增多症或淋巴球減少症或任何其他藥物相關實驗室變化的跡象。

## 結論

以2.0 mg/kg或6.0 mg/kg每8週一次投與維多珠單抗持續高達78週達成目標受體飽和，與疾病活動性之持久平均降低及改良IBDQ計分相關，通常為安全且可充分耐受的，且顯示可接受之免疫原性。

實例17：患有中度至重度活動性潰瘍性結腸炎之患者之反應及緩解的誘導及維持

設計包含兩個隨機化雙盲多中心研究之單一試驗以評估患有中度至重度活動性潰瘍性結腸炎之患者之反應及緩解的誘導及維持。人口資料及基線疾病特徵在所有治療組間相當。

使用靜脈內投與之誘導研究將安慰劑與維多珠單抗(在自於50 mM組胺酸、125 mM精胺酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH 6.3)中之60 mg/mL抗體之凍乾調配物復原之300 mg劑量下)相比較，終點為2個劑量之維多珠單抗後第6週時。

使用與誘導研究相同之調配物及投與途徑的維持研究將安慰劑與每四週給藥之維多珠單抗及安慰劑與每八週給藥之維多珠單抗相比較。此研究之終點為在第52週時分析誘導反應者群體。

在研究期間收集血液樣品以量測維多珠單抗之濃度。在誘導期結束時維多珠單抗之平均血清濃度為20 µg/mL至30 µg/mL。30分鐘靜脈內輸注300 mg劑量之後的穩態下平均維多珠單抗最低血清濃度在每8週1次方案中為9 µg/mL至13 µg/mL且在每4週1次方案中為35 µg/mL至40 µg/mL。在輸注結束時，維多珠單抗中值血漿濃度在每8週1次方案中為98 µg/mL至101 µg/mL且在每4週1次中為約129 µg/mL至137 µg/mL。

誘導及維持研究之反應的概述提供於表44至表47中。與安慰劑相比，在第6週時，顯著更大比例之維多珠單抗治療之患者達成臨床反應、緩解及黏膜癒合(表44)。誘導期欲治療群體中有39%具有先前抗-TNF $\alpha$ 失敗。在具有先前抗-TNF失敗之患者及無先前抗-TNF暴露之患者中，維多珠單抗患者之臨床反應及緩解率均高於安慰劑患者。在直至第6週之初步分析中，安慰劑組中導致研究中止之不利事件(AE)、嚴重AE及不利事件之比率高於維多珠單抗組。與安慰劑患者相比，顯著更大比例之維多珠單

抗患者在第52週時達成臨床緩解、黏膜癒合及無皮質類固醇之緩解，且達成持久反應及緩解(表45)。維持研究群體中有32%具有先前抗-TNF $\alpha$ 失敗。在TNF失敗及未經TNF處理之患者中，維多珠單抗之臨床緩解及持久臨床反應率均比安慰劑大。在第0週至第52週中，在安全性群體(N=895)中，不利事件(AE)、嚴重AE及嚴重感染之比率在維多珠單抗與安慰劑組之間類似。在維多珠單抗組中未觀測到機會性感染或腸道感染之比率的增加。

表44：誘導研究結果--主要及關鍵次要終點

功效終點	安慰劑	維多珠單抗	差異/RR	P值
臨床反應(%)	25.5%	47.1%	21.7%/1.8	<0.0001
臨床緩解(%)	5.4%	16.9%	11.5%/3.1	0.0010
黏膜癒合(%)	24.8%	40.9	16.1%/1.6	0.0013

表45：維持研究結果--主要及關鍵次要終點

功效終點	安慰劑 N=126	VDZ Q8 N=122	VDZ Q4 N=125	差異/RR Q8相較於安慰劑 Q4相較於安慰劑	P值
臨床緩解(%)	15.9	41.8	44.8	26.1/2.7 29.1/2.8	<0.0001 <0.0001
持久反應(%)	23.8	56.6	52.0	32.8/2.4 28.5/2.2	<0.0001 <0.0001
黏膜癒合(%)	19.8	51.6	56.0	32.0/2.6 36.3/2.8	<0.0001 <0.0001
持久緩解(%)	8.7	20.5	24.0	11.8/2.4 15.3/2.8	0.0090 0.0011
無皮質類固醇 之緩解(%)	13.9 n=72	31.4 n=70	45.2 N=73	17.6/2.3 31.4/3.3	0.0133 <0.0001

表46：誘導研究：ITT群體中具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗及不具有抗-TNF暴露之患者在第6週時之臨床反應及緩解

具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗之患者(39%)				
終點	安慰劑 N=63	維多珠單抗 N=82	差異	95% CI
臨床反應(%)	20.6	39.0	18.4	3.9, 32.9
臨床緩解(%)	3.2	9.8	6.6	-9.8, 22.8
不具有抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑暴露之患者(55%)				
	安慰劑 N=76	維多珠單抗 N=130	差異	95% CI
臨床反應(%)	26.3	53.1	26.8	13.7, 39.9
臨床緩解(%)	6.6	23.1	16.5	2.4, 30.2

表47：在第52週時之臨床緩解及持久臨床反應：ITT群體中具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗或不具有抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑暴露之患者

具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗之患者(32%)					
終點	安慰劑 N=38	VDZ 每8週1次 N=43	VDZ 每4週1次 N=40	差異 每8週1次相較於安慰劑 每4週1次相較於安慰劑	95% CI
臨床緩解(%)	5.3	37.2	35.0	31.9 29.7	10.3, 51.4 7.4, 49.4
持久臨床反應(%)	15.8	46.5	42.5	30.7 26.7	11.8, 49.6 7.5, 45.9
不具有抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑暴露之患者(60%)					
	安慰劑 N=79	VDZ 每8週1次 N=72	VDZ 每4週1次 N=73	差異 每8週1次相較於安慰劑 每4週1次相較於安慰劑	95% CI
臨床緩解(%)	19.0	45.8	47.9	26.8 29.0	12.4, 41.2 14.6, 43.3
持久臨床反應(%)	26.6	65.3	56.2	38.7 29.6	24.0, 53.4 14.6, 44.6

實例18：患有中度至重度活動性克隆氏病之患者之反應及緩解的誘導及維持設計包含兩個隨機化雙盲多中心研究之單一試驗以評估患有中度至重度活動性克隆氏病之患者之反應及緩解的誘導及維持。人口資料及基線疾病特徵在所有治療組間相當。

使用靜脈內投與之誘導研究將安慰劑與維多珠單抗(在自於50 mM組胺酸、125 mM精胺酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH 6.3)中之60 mg/mL抗體之凍乾調配物復原之300 mg劑量下)相比較，終點為2個劑量之維多珠單抗後第6週時。

使用與誘導研究相同之調配物及投與途徑之維持研究將安慰劑與每四週給藥之維多珠單抗及安慰劑與每八週給藥之維多珠單抗相比較。此研究之終點為在第52週時分析誘導反應者群體。

令人驚訝的是，此研究顯示每4週1次及每8週1次組產生極類似結果。誘導及維持研究之反應的概述提供於表48至表51中。與安慰劑相比，顯著更大比例之維多珠單抗治療之患者達成臨床緩解及增加反應(表48)。在具有先前抗-TNF失敗之患者及無先前抗-TNF暴露之患者中，維多珠單抗患者之臨床緩解及提高反應率均高於安慰劑患者。不利事件(AE)、嚴重AE及嚴重感染之比率在維多珠單抗與安慰劑組之間類似。在維多珠單抗組中未觀測到機會性感染或腸道感染之比率的增加。

表48：誘導研究結果--主要及次要終點

終點	安慰劑 N=148	維多珠單抗 N=220	調整差異/RR	P值
臨床緩解(%)	6.8%	14.5%	7.8%/2.1	0.0206
提高反應(%)	25.7%	31.4%	5.7%/1.2	0.2322
平均CRP變化(µg/mL)	-3.6 N=147	-2.9 N=220		0.9288

表49：維持研究結果--主要及關鍵次要終點

功效終點	安慰劑 N=153	VDZ Q8 N=154	VDZ Q4 N=154	調整差異/RR Q8相較於安慰劑 Q4相較於安慰劑	P值
臨床緩解(%)	21.6	39.0	36.4	17.4/1.8 14.7/1.7	0.0007 0.0042
提高反應(%)	30.1	43.5	45.5	13.4/1.4 15.3/1.5	0.0132 0.0053
無皮質類固 醇之緩解(%)	15.9 N=82	31.7 N=82	28.8 N=80	15.9/2.0 12.9/1.8	0.0154 0.0450
持久緩解(%)	14.4	21.4	16.2	7.2/1.5 2.0/1.1	0.1036 0.6413

表50：ITT群體中具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗及不具有抗-TNF暴露之患者在第6週時之臨床緩解及提高反應

具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗之患者(48%)				
終點	安慰劑 N=70	維多珠單抗 N=105	差異	95% CI
臨床緩解(%)	4.3	10.5	6.2	(-9.1, 21.3)
提高反應(%)	22.9	23.8	1.0	(-11.8, 13.7)
不具有抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑暴露之患者(50%)				
	安慰劑 N=76	維多珠單抗 N=130109	差異	95% CI
臨床緩解(%)	9.2	17.4	8.2	(-1.4, 17.9)
提高反應(%)	30.3	42.2	11.9	(-1.9, 25.8)

表51：在第52週時之臨床緩解及提高反應：ITT群體中具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗或不具有抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑暴露之患者

具有先前抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗之患者(51%)					
終點	安慰劑 N=78	VDZ 每8週1次 N=82	VDZ 每4週1次 N=77	差異 每8週1次相較於安慰劑 每4週1次相較於安慰劑	95% CI

臨床緩解(%)	12.8	28.0	27.3	15.2 14.5	(3.0, 27.5) (2.0, 26.9)
提高反應(%)	20.5	29.3	37.7	8.8 17.1	(-4.6, 22.1) (3.1, 31.2)
不具有抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑暴露之患者(45%)					
	安慰劑 N=71	VDZ 每8週1次 N=66	VDZ 每4週1次 N=71	差異 每8週1次相較於安慰劑 每4週1次相較於安慰劑	95% CI
臨床緩解(%)	26.8	51.1	46.5	24.8 19.7	(8.9, 40.6) (4.2, 35.2)
提高反應(%)	38.0	60.6	53.5	22.6 15.5	(6.3, 38.9) (-0.7, 31.7)

### 實例19：患有中度至重度活動性克隆氏病之患者之反應及緩解的誘導

完成隨機化雙盲安慰劑對照多中心研究以在評估300 mg劑量下之維多珠單抗(自於50 mM組胺酸、125 mM精胺酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH 6.3)中之60 mg/mL抗體之凍乾調配物復原)在TNF $\alpha$ 拮抗劑失敗患者中在第6週時(在2個劑量--第0週及第2週之後)及在第10週時(在3個劑量之後)之誘導效應。研究由416個患者組成，其中75%為TNF $\alpha$ 拮抗劑失敗的，且其中25%為未經TNF $\alpha$ 處理的。使治療組間的人口資料及伴隨IBD藥物平衡。亦使治療組間的基線疾病特徵平衡，但不使基線疾病活動性平衡。

研究所指定之主要終點為抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗群體的第6週緩解(%)。評估(依序測試程序)之關鍵次要終點為：總群體之第6週緩解(%)，抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗及總群體之第10週緩解(%) (使用Hochberg程序)，抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗及總群體之第6週及第10週持續緩解(%) (使用Hochberg程序)，及抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗群體之第6週提高反應(%)。

### 表52：基線CDAI：

	安慰劑	維多珠單抗	p值
<b>TNF ITT：平均(標準差)</b>	<b>306.1 (55.43)</b>	<b>316.1 (52.63)</b>	<b>0.0945</b>
<b>總ITT：平均(標準差)</b>	<b>301.3 (54.97)</b>	<b>313.9 (53.17)</b>	<b>0.0153</b>

表53：誘導研究結果：主要及關鍵次要終點

終點	TNF ITT (N=315)				總ITT (N=416)			
	PLA N=157	VDZ V=158	差異 (RR)	P-值	PLA N=207	VDZ N=209	差異 (RR)	P-值
主要第6週緩解	12.1 %	15.2 %	3.0 % (1.2)	0.4332				
第1次要第6週緩解					12.1 %	19.1 %	6.9 % (1.6)	0.0478
第2次要第10週緩解	12.1 %	26.6 %	14.4 % (2.2)	0.0012	13 %	28.7 %	15.5 % (2.2)	<0.0001
持續緩解(第6週及第10週兩者)	8.3 %	12.0 %	3.7 % (1.4)	0.2755	8.2 %	15.3 %	7% (1.9)	0.0249
提高反應 (CDAI100)	22.3 %	39.2 %	16.9% (1.8)	0.0011				

表54：未經抗-TNF- $\alpha$ 拮抗劑處理之患者之結果(n=101，總體之24%)

	安慰劑%	維多珠單抗%	差異%	95% CI
第6週緩解	12	31.4	19.1	(3.3, 35.0)
第10週緩解	16	35.3	19.2	(2.4, 35.8)

表55：研究結果：關鍵子組--先前Tx失敗、ITT總體在第6週及第10週時之臨床緩解

子組	變數	安慰劑	VDZ	差異	95% CI
任何先前抗-TNF失敗(ITT之75%)	N	156	155		
	第6週緩解(%)	12.8	14.8	2	(-5.7, 9.7)
	第10週緩解(%)	12.8	26.5	13.6	(4.9, 22.3)
先前免疫調節劑失敗而非抗-TNF失敗(21% ITT)	N	45	44		
	第6週緩解(%)	11.1	31.8	20.7	(-0.5, 39.7)
	第10週緩解(%)	15.6	31.8	16.3	(-1.1, 33.6)

僅先前皮質類固醇 失敗(3% ITT)	N	5	9		
	第6週緩解(%)	0	33.3	33.3	(-23.9, 75.7)
	第10週緩解(%)	0	44.4	44.4	(-13.4, 85.3)

研究顯示TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗患者需要3個劑量來誘導緩解。TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗患者之緩解率在第6週與第10週之間增加，但僅在維多珠單抗組(而非安慰劑)中如此。未經TNF- $\alpha$ 拮抗劑處理之患者之緩解率在第6週與第10週之間實質上不增加。在具有高疾病嚴重程度之TNF- $\alpha$ 拮抗劑失敗群體之中，43%從不對TNF- $\alpha$ 拮抗劑有反應，且45%喪失反應。

#### 實例20：穩定性

測試多種不同抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物在5°C下6至24個月之過程內之穩定性(表6及表7)。pH值為6.0至6.2之調配物在6個月之後及在24個月時展示大致小於4%的主要物質降解。

藉由SEC測試多種不同抗- $\alpha 4\beta 7$ 抗體調配物持續高達24個月之穩定性(表4及表5)。具有60 mg/mL蛋白質濃度且含有25 mM檸檬酸鹽之調配物在2年之後的聚集體變化為0.1%至0.2%，而含有160 mg/mL蛋白質及25 mM檸檬酸鹽之調配物在2年內的聚集體增加大致為0.3%。含有60 mg/mL、110 mg/mL或160 mg/mL蛋白質、無檸檬酸鹽之調配物的聚集體增加為0.6%至1.1%。在含有檸檬酸鹽、但無組胺酸之所測試調配物中，在12個月及24個月之後，存在大致0.3%至0.4%聚集體生長。

#### 實例21：測定維多珠單抗對CD4:CD8比率之效應

以自10%蔗糖之凍乾調配物復原且稀釋至0.9%生理食鹽水之輸注系統中的單次450 mg劑量之維多珠單抗治療18歲至45歲之健康個體。在單次450 mg劑量之維多珠單抗之前(基線)及5週之後藉由腰椎穿刺收集腦脊髓液(CSF)。每一個體充當其自己之對照物。

基於先前研究選擇5週時間點，該研究展示以那他珠單抗治療之具有MS之患者僅在一個劑量之後即顯示對CSF CD4+:CD8+淋巴細胞比率的效應及腦病變之數目的減少(Stuve等人，*Arch Neurol.*2006;63:1383-1387；Stuve等人，*Ann Neurol.* 2006;59:743-747；Miller等人，*N Engl J Med.* 2003;348(1):15-23)；且亦因為在5週時，450 mg劑量之維多珠單抗足以使目標飽和且提供超過與每隔4週300 mg之第3期劑量方案相關之穩態最低含量估計值的血清濃度。

自每一個體獲得約15 mL CSF用於免疫表型。若CSF樣品滿足以下準則，則將其納入分析：每樣品 $\leq 10$  RBC/ $\mu\text{L}$ (將外周血液污染減至最少)；陰性CSF培養結果；在每一流動式細胞測量術樣品中有足夠T淋巴細胞數目；及未偵測到對維多珠單抗之血清抗體。

第5週中值(34.80  $\mu\text{g/mL}$ )及個別個體血清維多珠單抗濃度(範圍24.9  $\mu\text{g/mL}$ 至47.9  $\mu\text{g/mL}$ )高於第3期劑量方案之計劃穩態最低濃度(約24  $\mu\text{g/mL}$ )。如藉由MAdCAM-1-Fc所量測，在第5週時觀測到高度(>90%) $\alpha 4\beta 7$ 受體飽和，表明在終點評估時其目標之維多珠單抗飽和。

在任何CSF樣品中均未偵測到維多珠單抗(偵測限值 = 0.125  $\mu\text{g/mL}$ )。

### 對CD4+及CD8+ T淋巴細胞數目及比率之效應

維多珠單抗不顯著減小CD4+:CD8+比率(表56)。個體中無一者具有劑量後CD4+:CD8+比率 $< 1$ ( $p < 0.0001$ (1側t檢驗))。維多珠單抗不顯著減小CSF中的CD4+或CD8+ T淋巴細胞之數目。另外，CSF % CD4+及% CD8+ T淋巴細胞不存在顯著變化(表57)。亦未觀測到外周血液WBC、CD4+及CD8+記憶性T淋巴細胞有顯著變化(表58)。

表56：治療對CSF CD4+:CD8+比率之效應(可評估群體，n=13)

	基線	第5週	CD4+:CD8+比率差異†
CD4+:CD8+比率	3.59 (0.273)	3.60 (0.265)*	0.01 (0.197)
平均(SE)範圍	1.53-5.67	1.42-5.15	
比率之90% 2-側CI	3.00-4.19	3.132, 4.077	
差異之90% 2-側CI			-0.337, 0.363

CI=置信區間

\* $p < 0.0001$  ( $H_0: \mu < 1$  對  $H_1: \mu \geq 1$  之一側一個樣品t檢驗)。

†差異定義為第5週之比率減去基線比率

表57：治療對CSF CD4+及CD8+淋巴細胞計數之效應(可評估群體，n=13)

	基線	第5週
淋巴細胞之%形式之CD4+，平均值(SD)	75.160 (7.3831)	74.215 (6.3732)
淋巴細胞之%形式之CD8+，平均值(SD)	22.272 (5.4320)	22.007 (6.1624)

表58：外周血液記憶性T淋巴細胞(RO+)計數(可評估群體，n=13)

	基線	第5週
	平均值(SD)	平均值(SD)
CD4+CD45RO+	27.85 (4.98)	27.06 (5.02)
CD8+CD45RO+(%)	11.24 (3.40)	10.78 (2.98)

### 概述

維多珠單抗在單次450 mg劑量之後不影響健康志願者之CSF CD4+及CD8+細胞計數或CD4+:CD8+比率。個體中無一者的劑量後CSF CD4+:CD8+比率減小至小於1。在CSF中未偵測到維多珠單抗。另外，未觀測到外周血液中總WBC或記憶性T淋巴細胞CD4+及CD8+子集之變化。在終點評估時，在所有個體中均出現血液中目標( $\alpha\beta 7$ )之飽和。CSF CD4+及CD8+淋巴細胞含量及比率類似於文獻中先前報導之含量及比率。

此等結果與維多珠單抗缺乏對猴之生理性 CNS 免疫監視及病理性 CNS 發炎兩者之效應一致。

雖然本發明已參考其較佳實施例進行特別展示及描述，但熟習此項技術者應瞭解，可在不悖離由隨附申請專利範圍涵蓋之本發明之範疇的情況下在其中作出形式及細節之各種改變。

表59：序列

SEQ ID NO:	所示序列	描述
1	圖1	編碼人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白之重鏈之DNA
2	圖1	人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白之重鏈之胺基酸序列
3	圖2	編碼人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白之輕鏈之DNA
4	圖2	人類化抗- $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白之輕鏈之胺基酸序列
5	圖3	LDP-02之成熟人類化輕鏈
6	圖4	同屬人類 $\kappa$ 輕鏈恆定區
7	圖4	同屬鼠類 $\kappa$ 輕鏈恆定區
8	參考第31頁 SYWMH	重鏈小鼠ACT-1抗體之CDR1
9	參考第31頁 EIDPSEsNTNYNQKFKG	重鏈小鼠ACT-1抗體之CDR2
10	參考第31頁 GGYDGWDYAIDY	重鏈小鼠ACT-1抗體之CDR3
11	參考第31頁 RSSQSLAKSYGNTYLS	輕鏈小鼠ACT-1抗體之CDR1
12	參考第31頁 GISNRFS	輕鏈小鼠ACT-1抗體之CDR2
13	參考第31頁 LQGTHQPYT	輕鏈小鼠ACT-1抗體之CDR3
14	圖7	人類GM607 CL抗體 $\kappa$ 輕鏈可變區
15	圖7	人類21/28 CL抗體重鏈可變區