



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113967194 A

(43) 申请公布日 2022. 01. 25

(21) 申请号 202111089810.5	A61K 47/42 (2017.01)
(22) 申请日 2010.07.28	A61K 39/395 (2006.01)
(30) 优先权数据	A61K 38/47 (2006.01)
09167025.7 2009.07.31 EP	A61K 47/20 (2006.01)
(62) 分案原申请数据	A61K 9/19 (2006.01)
201080043414.2 2010.07.28	A61P 35/00 (2006.01)
(71) 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司	A61P 35/04 (2006.01)
地址 瑞士巴塞尔	A61K 47/26 (2006.01)
(72) 发明人 M.阿德勒 U.格劳肖普夫	A61M 5/178 (2006.01)
H-C.马勒 O.B.斯托赫	
(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494	
代理人 岑晓东	
(51) Int. Cl.	
A61K 9/08 (2006.01)	
A61K 47/18 (2006.01)	

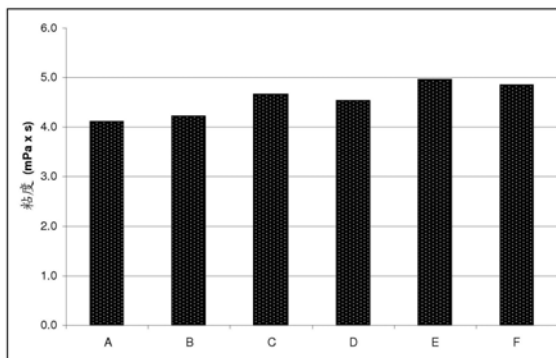
权利要求书1页 说明书56页 附图2页

(54) 发明名称

皮下抗HER2抗体配制剂

(57) 摘要

本发明涉及皮下抗HER2抗体配制剂。本发明涉及供皮下注射用的药理学活性抗HER2抗体,诸如例如曲妥单抗(HERCEPTIN™)、帕妥珠单抗或T-DM1,或此类抗体分子的混合物的高度浓缩的稳定的药物配制剂。特别地,本发明涉及在合适量的抗HER2抗体外包含作为组合配制剂或以共配制形式使用的有效量的至少一种透明质酸酶酶的配制剂。所述配制剂另外包含至少一种缓冲剂,诸如例如组氨酸缓冲液、稳定剂或两种或更多种稳定剂的混合物(例如,糖类,诸如例如二水合 $\alpha$ ,  $\alpha$ -海藻糖或蔗糖,和任选地作为第二稳定剂的甲硫氨酸)、非离子型表面活性剂和有效量的至少一种透明质酸酶酶。还提供了用于制备此类配制剂的方法及其用途。



1. 药学活性抗HER2抗体的高度浓缩的稳定的药物配制剂,其包含:
  - a. 约50至350mg/ml抗HER2抗体;
  - b. 约1至100mM缓冲剂,其提供pH  $5.5 \pm 2.0$ ;
  - c. 约1至500mM稳定剂或两种或更多种稳定剂的混合物;
  - d. 约0.01至0.08%非离子型表面活性剂;和
  - e. 有效量的至少一种透明质酸酶酶。
2. 一种注射装置,其包含依照权利要求1的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂。
3. 依照权利要求1的配制剂用于制备可用于治疗受试者中适合于用抗HER2抗体治疗的疾病或病症,诸如例如癌症或非恶性疾病的药物的用途,包括以有效治疗所述疾病或病症的量对受试者施用本文中所描述的配制剂。
4. 一种治疗受试者中适合于用抗HER2抗体治疗的疾病或病症,诸如癌症或非恶性疾病的方法,包括以有效治疗所述疾病或病症的量对受试者施用依照权利要求1的配制剂。
5. 一种试剂盒,其包含装有依照权利要求1的配制剂的一个或多个管形瓶和关于对患者皮下施用所述配制剂的指令。
6. 如本文中所描述的发明。

## 皮下抗HER2抗体配制剂

[0001] 本申请是申请日为2010年07月28日、中国申请号为201510673057.2、发明名称为“皮下抗HER2抗体配制剂”的分案申请的再分案申请(原申请号为201080043414.2)。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及供皮下注射用的药学活性抗HER2抗体,或此类抗体分子的混合物的高度浓缩的稳定的药物配制剂。在较高量的抗HER2抗体或其混合物外,此类配制剂包含缓冲剂、稳定剂或两种或更多种稳定剂的混合物、非离子型表面活性剂和有效量的至少一种透明质酸酶。本发明还涉及用于制备所述配制剂的方法及此类配制剂的用途。

### 背景技术

[0003] 抗体的药学用途在过去数年里已经增加。在许多情况中,经由静脉内(IV)路径注射此类抗体。不幸地,可以经由静脉内路径注射的抗体量受限于抗体的物理-化学特性,特别地受限于其在合适的液体配制剂中的溶解度和稳定性及受限于输注液体的体积。备选的施用途径是皮下或肌肉内注射。这些注射途径要求要注射的最终溶液中的高蛋白质浓度[Shire,S.J.,Shahrokh,Z.等,“Challenges in the development of high protein concentration formulations”,J.Pharm.Sci.2004;93(6):1390-1402;Roskos,L.K.,Davis C.G.等,“The clinical pharmacology of therapeutic antibodies”,Drug Development Research 2004;61(3):108-120]。为了增加体积,及由此增加治疗剂量(其可以安全且舒适地皮下施用),已经提出了使用糖胺聚糖酶以可以增加注射抗体配制剂的间质空间[W02006/091871]。

[0004] 目前出售的治疗用途的药学活性抗体的稳定的配制剂的例子如下:

[0005] HERCEPTIN™(曲妥单抗(Trastuzumab))是一种针对HER2受体的单克隆抗体(抗HER2抗体),其目前在欧洲以150mg冻干粉末(含有抗体、二水合 $\alpha$ , $\alpha$ -海藻糖、L-组氨酸和盐酸L-组氨酸和聚山梨酯20)形式销售,所述冻干粉末应当为了输注用注射用水重建以产生约21mg/ml的注射剂量。在美国和许多其它国家,销售含有440mg曲妥单抗的多剂管形瓶。

[0006] AVASTIN™(贝伐单抗(Bevacizumab))是一种针对血管内皮生长因子(VEGF)的单克隆抗体,其目前在欧洲以两类管形瓶中的液体配制剂销售:分别为a) 4ml中的100mg贝伐单抗和b) 16ml中的400mg贝伐单抗,提供含有下列赋形剂的注射用水中的25mg/ml终浓度:二水合海藻糖、磷酸钠和聚山梨酯20。

[0007] 虽然已经发现了上述抗体配制剂适合于静脉内施用,但是期望提供供皮下注射用的治疗活性抗体的高度浓缩的稳定的药物配制剂。皮下注射的优点在于它容许医学从业人员在对患者相当短的干预中将其实施。此外,可以训练患者自己实施皮下注射。此类自身施用在维持剂量给药期间特别有用,因为不需要医院护理(医学资源利用降低)。通常,经由皮下路径的注射限于约2ml。对于需要多剂的患者,可以在身体表面的多个部位注射多个单位剂量配制剂。

[0008] 皮下施用的下列两种抗体产品已经出售。

[0009] HUMIRA™ (阿达木单抗 (Adalimumab)) 是一种针对肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 的单克隆抗体,其目前在欧洲以皮下应用的0.8ml注射体积中的40mg剂量形式销售(浓度:50mg抗体/ml注射体积)。

[0010] XOLAIR™ (奥马珠单抗 (Omalizumab)) 是一种针对免疫球蛋白E的单克隆抗体(抗IgE抗体),其目前以150mg冻干粉末(含有抗体、蔗糖、组氨酸和一水合盐酸组氨酸和聚山梨酯20)形式销售,所述冻干粉末应当用皮下注射用水重建以产生125mg/ml注射剂量。

[0011] 目前在市场上不可购得适合于皮下施用的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂。因此,期望提供皮下注射的治疗活性抗体的此类高度浓缩的稳定的药物配制剂。

[0012] 对皮下注射胃肠外药物一般限于小于2ml的体积,这是由于注射后产生的反压力所致皮下(SC)组织中对水力传导的粘弹性阻力[Auckland K.和Reed R.,“Interstitial-Lymphatic Mechanisms in the control of Extracellular Fluid Volume”,*Physiology Reviews*,1993;73:1-78],及由于疼痛的感觉。

[0013] 高浓度蛋白质配制剂的制备是相当有挑战性的,并且需要使每种配制剂适合于所使用的特定蛋白质,因为每种蛋白质具有不同的聚集行为。怀疑聚集体至少在一些情况中引起治疗性蛋白质的免疫原性。针对蛋白质或抗体聚集体的免疫原性反应可以导致中和性抗体,其可以使治疗性蛋白质或抗性无效。似乎蛋白质聚集体的免疫原性在与皮下注射的关联中最成问题,其中重复施用增加免疫应答的风险。

[0014] 虽然抗体具有非常相似的总体结构,但是此类抗体在氨基酸组成(特别是在负责结合抗原的CDR区中)和糖基化样式方面有所不同。此外,另外可以有翻译后修饰,诸如电荷和糖基化变体。在抗HER2抗体的特定情况中,已经对例如人源化单克隆抗体humMAb4D5-8(=曲妥单抗)描述了此类翻译后修饰。已经开发出用于除去例如酸性变体的特定的纯化方法,并且Basey,C.D和Blank,G.S.于W099/57134已经第一次提供了包含减少量的酸性变体(主要为脱酰胺化的变体,其中已经将初始多肽的一个或多个天冬酰胺残基转化成天冬氨酸,即已经将中性酰胺侧链转化成具有总体酸性特征的残基)的组合物。

[0015] Andya等(WO 97/04801和美国专利No.6,267,958,6,685,940,6,821,151和7,060,268)已经描述了包含冻干保护剂(lyoprotectant)、缓冲液和表面活性剂的稳定的冻干抗体配制剂。

[0016] WO 2006/044908提供了抗体配制剂,其包含组氨酸-乙酸盐缓冲液,pH 5.5至6.5,优选地5.8至6.2中配制的单克隆抗体。

[0017] 因此,本发明要解决的问题是提供皮下注射的药学活性抗HER2抗体或此类抗体分子的混合物的新颖的高度浓缩的稳定的药物配制剂。在较高量的抗HER2抗体或其混合物外,此类配制剂包含缓冲剂、稳定剂或两种或更多种稳定剂的混合物、非离子型表面活性剂和有效量的至少一种透明质酸酶。高度浓缩的抗体配制剂的制备是有挑战性的,这是由于较高蛋白质浓度的粘性的潜在升高和蛋白质聚集的潜在升高,即一种本质上浓度依赖性的现象。高粘性负面地影响抗体配制剂的工艺能力(例如,抽吸和过滤步骤)和施用(例如注射器能力)。通过添加赋形剂,可以在一些情况下降低高粘性。对蛋白质聚集的控制和分析越来越多有挑战。在制造工艺的各个步骤(其包括发酵、纯化、配制)期间和贮存期间潜在地遇到聚集。不同因素,诸如温度、蛋白质浓度、搅动应力、冷冻和融化、溶剂和表面活性剂效应、和化学修饰可以影响治疗性蛋白质的聚集行为。在高度浓缩的抗体配制剂的开发期间,

必须监测蛋白质的聚集趋势,并通过添加各种赋形剂和表面活性剂来控制[Kiese S.等, J.Pharm.Sci.,2008;97(10);4347-4366]。制备依照本发明的药学活性抗HER2抗体的合适的高度浓缩的稳定的药物配制剂的挑战由于以下实情而提高,即必须以如下的方式在一种液体配制剂中配制两种不同蛋白质,使得配制剂在数周里仍然稳定,并且药学活性成分在适当的贮存期间仍然有活性。

## 发明内容

[0018] 在第一方面,本发明提供了准备好使用的皮下注射的药学活性抗HER2抗体或此类抗体分子的混合物的高度浓缩的稳定的药物配制剂。

[0019] 更具体地,本发明的药学活性抗HER2抗体配制剂的高度浓缩的稳定的药物配制剂包含:

[0020] -约50至350mg/ml抗HER2抗体;

[0021] -约1至100mM缓冲剂,其提供pH  $5.5 \pm 2.0$ ;

[0022] -约1至500mM稳定剂或两种或更多种稳定剂的混合物,其中任选地,甲硫氨酸作为第二稳定剂存在,例如浓度为5至25mM;

[0023] -约0.01至0.1%非离子型表面活性剂;和

[0024] -有效量的至少一种透明质酸酶酶。

[0025] 在又一方面,本发明提供了配制剂用于制备可用于治疗受试者中适合于用抗HER2抗体治疗的疾病或病症,诸如例如癌症或非恶性疾病的药物的用途,包括以有效治疗所述疾病或病症的量对受试者施用本文中所描述的配制剂。可以与化疗剂伴随或序贯共施用抗HER2抗体。

[0026] 在本发明的另一方面,提供了治疗受试者中适合于用抗HER2抗体治疗的疾病或病症(例如癌症或非恶性疾病)的方法,包括以有效治疗所述疾病或病症的量对受试者施用本文中所描述的配制剂。癌症或非恶性疾病一般会牵涉HER2表达细胞,使得依照本发明的治疗性药物SC配制剂中的HER2抗体能够结合受影响的细胞。

[0027] 本发明还提供了包含注射组分和适合于其皮下施用的指令两者的试剂盒形式的药物组合物,其由药学活性抗HER2抗体或此类抗体的混合物的高度浓缩的稳定的药物配制剂和适合量的至少一种透明质酸酶酶组成。

[0028] 本发明的又一方面涉及注射装置,其包含依照本发明的高度浓缩的稳定的药物配制剂。此类配制剂可以由药学活性抗HER2抗体或此类抗体分子的混合物和如下文概述的合适的赋形剂组成,并且另外可以包含可溶性透明质酸酶糖蛋白作为组合配制剂或共施用的分开配制剂。

[0029] 本发明的药学活性抗HER2抗体配制剂的高度浓缩的稳定的药物配制剂可以以液体形式提供或者可以以冻干形式提供。依照WO 97/04801中的教导,可以通过重建冻干的配制剂以提供比冻干步骤前混合物中的蛋白质浓度大约2-40倍的重建配制剂中的蛋白质浓度,来增加重建配制剂中的抗体浓度。

[0030] 抗HER2抗体浓度是100至150mg/ml,例如 $120 \pm 18$ mg/ml、约110mg/ml、约120mg/ml或约130mg/ml。

[0031] 提供pH  $5.5 \pm 2.0$ 的缓冲剂的浓度是1至50mM,例如10至30mM或约20mM。各种缓冲

剂是本领域技术人员已知的,如下文进一步概述的。缓冲剂可以是组氨酸缓冲液,例如L-组氨酸/HCl。在一个具体的实施方案中,L-组氨酸/HCl缓冲液的pH是约5.5或约6.0。

[0032] 例如,稳定剂(在本专利说明书中与术语“稳定化剂”同义使用)是权力机构准许作为药物配制剂中的合适添加剂或赋形剂的碳水化合物或糖类或糖,例如二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖或蔗糖。稳定剂的浓度是15至250mM,或150至250mM,或约210mM。配制剂可以含有第二稳定剂,其中此第二稳定剂可以是甲硫氨酸,例如浓度为5至25mM或浓度为5至15mM(例如浓度为约5mM、约10mM或约15mM的甲硫氨酸)。

[0033] 药学可接受表面活性剂的合适的例子包括聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯(Tween)、聚乙烯-聚丙二醇、聚氧乙烯-硬脂酸酯、聚氧乙烯烷基醚,例如聚氧乙烯单月桂基醚、烷基苯基聚氧乙烯醚(Triton-X)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(Poloxamer,Pluronic)、和十二烷基硫酸钠(SDS)。最合适的聚氧乙烯山梨聚糖-脂肪酸酯是聚山梨酯20(以商标Tween 20<sup>TM</sup>出售)和聚山梨酯80(以商标Tween 80<sup>TM</sup>出售)。最合适的聚乙烯-聚丙烯共聚物是那些以名称Pluronic®F68或Poloxamer 188<sup>TM</sup>出售的。最合适的聚氧乙烯烷基醚是那些以商标Brij<sup>TM</sup>出售的。最合适的烷基酚聚氧乙烯醚以商品名Triton-X出售。非离子型表面活性剂可以是聚山梨酯,例如选自聚山梨酯20、聚山梨酯80和聚乙烯-聚丙烯共聚物的组。非离子型表面活性剂的浓度是0.01至0.1% (w/v)、或0.01至0.08% (w/v)、或0.025至0.075% (w/v)、或更具体地约0.02、0.04或0.06% (w/v)。

[0034] 透明质酸酶酶的浓度取决于依照本发明的配制剂的制备中使用的实际透明质酸酶酶。基于下文进一步的公开内容,本领域技术人员可以容易地确定透明质酸酶酶的有效量。它应当以足够量提供,使得共施用的抗HER2抗体的分散和吸收升高是有可能的。透明质酸酶酶的最小量是大于150个U/ml。更具体地,透明质酸酶酶的有效量是约1' 000至16' 000个U/ml,其中基于假定的比活100' 000个U/mg,所述量对应于约0.01mg至0.16mg蛋白质。或者,透明质酸酶酶的浓度是约1' 500至12' 000个U/ml,或更具体地,约2' 000个U/ml或约12' 000个U/ml。前文规定的量对应于最初对配制剂添加的透明质酸酶酶量。如例示性配制剂中证明的,最终配制剂中测量的透明质酸酶酶浓度可以在某个范围内变化。如此,例如刚好在添加12' 000个U/ml酶后测量的实际测量透明质酸酶酶(HE)浓度显示12355个U/ml至15178个U/ml间的变化(见表1配制剂A至F和表3配制剂H)。透明质酸酶酶以组合的最终配制剂存在或者供共施用使用,例如作为如下文进一步概述的共配制剂。依照本发明的配制剂的重要问题是在它准备好使用和/或注射时,它具有如所附权利要求书中所列的组成。透明质酸酶酶对抗HER2抗体的比率(w/w)的范围为1:1' 000至1:8' 000,或范围为1:4' 000至1:5' 000或约1:6' 000。

[0035] 透明质酸酶酶可以自动物、人样品衍生或者基于如下文进一步描述的重组DNA技术制造。

[0036] 在一些实施方案中,依照本发明的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂具有下列组成之一:

[0037] a) 100至150mg/ml抗HER2抗体,例如选自下组:曲妥单抗、帕妥珠单抗和T-DM1;1至50mM组氨酸缓冲液,例如L-组氨酸/HCl (pH为约5.5);15至250mM稳定剂,其是例如二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖和任选地浓度5至25mM的甲硫氨酸作为第二稳定剂;约0.01至0.08%非离子型表面活性剂;和大于150至16' 000个U/ml,更具体地1' 000至16' 000个U/ml透明质酸酶酶,诸如

例如rHuPH20,例如浓度为约2' 000个U/ml或约12' 000个U/ml。

[0038] b) 120±18mg/ml抗HER2抗体,例如选自下组:曲妥单抗、帕妥珠单抗和T-DM1;10至30mM,或约20mM组氨酸缓冲液,诸如例如L-组氨酸/HCl (pH为约5.5);150至250mM或约210mM稳定剂,其是例如二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖和任选地浓度5至25mM,或5至15mM,或约10mM的甲硫氨酸作为第二稳定剂;约0.01至0.08%非离子型表面活性剂;和1' 000至16' 000个U/ml,或1' 500至12' 000个U/ml,约2' 000个U/ml或约12' 000个U/ml透明质酸酶酶,诸如例如rHuPH20。

[0039] c) 约120mg/ml抗HER2抗体,例如选自下组:曲妥单抗、帕妥珠单抗和T-DM1;10至30mM,或约20mM组氨酸缓冲液,诸如例如L-组氨酸/HCl (pH为约5.5);150至250mM,例如约210mM稳定剂,其是例如二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖和任选地浓度5至25mM,或5至15mM,或约10mM的甲硫氨酸作为第二稳定剂;约0.01至0.08%非离子型表面活性剂;和1' 000至16' 000个U/ml,或1' 500至12' 000个U/ml,或更具体地约2' 000个U/ml或约12' 000个U/ml透明质酸酶酶,诸如例如rHuPH20。

[0040] d) 约120mg/ml抗HER2抗体,例如选自下组:曲妥单抗、帕妥珠单抗和T-DM1;约20mM组氨酸缓冲液,诸如例如L-组氨酸/HCl (pH为约5.5);约210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖和任选地约10mM甲硫氨酸作为第二稳定剂;0.04或0.06%聚山梨酯20;和约12' 000个U/ml透明质酸酶酶,诸如rHuPH20;及特别地下文规定的配制剂A。

[0041] e) 约120mg/ml抗HER2抗体,例如选自下组:曲妥单抗、帕妥珠单抗和T-DM1;约20mM组氨酸缓冲液,诸如例如L-组氨酸/HCl (pH为约5.5);约210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖和任选地10mM甲硫氨酸作为第二稳定剂;0.04或0.06%聚山梨酯20;和约2' 000个U/ml透明质酸酶酶,诸如rHuPH20;及特别地下文规定的配制剂X。

[0042] f) 冻干配制剂,其包含120mg/ml抗HER2抗体,例如选自下组:曲妥单抗、帕妥珠单抗和T-DM1;20mM组氨酸缓冲液,诸如例如L-组氨酸/HCl (pH为约5.5);210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖和任选地10mM甲硫氨酸作为第二稳定剂;约0.04至0.06%非离子型表面活性剂;及特别地下文规定的配制剂Y。可以与1' 000至16' 000个U/ml,或1' 500至12' 000个U/ml,或更具体地约2' 000个U/ml或约12' 000个U/ml透明质酸酶酶,诸如例如rHuPH20一起重建这些配制剂。

[0043] 在另一个实施方案中,依照本发明的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂具有表1、3和4中规定的组成之一,其中配制剂C、D、E和F由于不太想要的特性而不太优选,如实施例和表1中所概述的。

[0044] 已经提出了通过使用少量可溶性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP)来促进治疗性蛋白质和抗体的皮下注射;见W02006/091871。已经显示了,此类可溶性透明质酸酶糖蛋白(作为组合的配制剂或者通过共施用)的添加促进对上皮施用治疗性药物。通过快速解聚胞外空间中的乙酰透明质酸HA,sHASEGP降低间质的粘性,由此提高水力传导,并且容许安全且舒适地将较大体积施用入皮下组织中。经由降低的间质粘性由sHASEGP诱导的升高的水力传导容许更大的分散,这潜在地提高SC施用的治疗性药物的系统生物利用度。

[0045] 因此,包含可溶性透明质酸酶糖蛋白的本发明的高度浓缩的稳定的药物配制剂特别适合于皮下注射。本领域技术人员清楚地理解,可以提供包含抗HER2抗体和可溶性透明质酸酶糖蛋白的此类配制剂来以一种单一组合配制剂形式或备选地以可以在临皮下注射前混合的两种分开的配制剂形式施用。或者,可以将抗HER2抗体和可溶性透明质酸酶糖蛋白以分开注射在身体的不同部位,优选地在彼此紧密相邻的部位施用。也有可能以连续注

射形式注射依照本发明的配制剂中存在的治疗剂,例如首先是可溶性透明质酸酶糖蛋白,接着注射抗HER2抗体配制剂。这些注射也可以以相反的次序实施,即通过首先注射抗HER2抗体配制剂,接着注射可溶性透明质酸酶糖蛋白来进行。在以分开注射施用抗HER2抗体和可溶性透明质酸酶糖蛋白的情况中,必须给蛋白质中的一种或两者提供如所附权利要求书中所规定浓度的缓冲剂、稳定剂和非离子型表面活性剂,但是排除透明质酸酶。然后,可以在例如L-组氨酸/HCl缓冲液(pH为约6.5)、100至150mM NaCl和0.01至0.1% (w/v) 聚山梨酯20或聚山梨酯80中提供透明质酸酶。具体地,在20mM L-组氨酸/HCl缓冲液(pH 6.5)、130mM NaCl、0.05% (w/v) 聚山梨酯80中提供透明质酸酶,如下文表1的配制剂G中明确例示的。

[0046] 如上文记录的,可以认为可溶性透明质酸酶糖蛋白是抗HER2配制剂中的别的赋形剂。可溶性透明质酸酶糖蛋白可以在制造抗HER2配制剂时添加至抗HER2配制剂或者可以在注射前不久添加。或者,可以以分开注射提供可溶性透明质酸酶糖蛋白。在后一种情况中,可溶性透明质酸酶糖蛋白可以在分开的管形瓶中或在皮下注射发生前必须用合适的稀释剂重建的冻干形式提供,或者可以由制造商以液体配制剂提供。抗HER2配制剂和可溶性透明质酸酶糖蛋白可以以分开的实体获得或者也可以以包含注射组分和适合于其皮下注射的指令两者的试剂盒提供。还可以提供适合于重建和/或施用配制剂中的一种或两者的指令。

[0047] 因此,本发明还以包含注射组分和适合于其皮下施用的指令两者的试剂盒形式提供了药物组合物,其由药学活性抗HER2抗体或此类抗体的混合物的高度浓缩的稳定的药物配制剂和合适量的至少一种透明质酸酶组成。

[0048] 本发明的又一方面涉及包含依照本发明的高度浓缩的稳定的药物配制剂的注射装置。此类配制剂可以由药学活性抗HER2抗体或此类抗体分子的混合物和如下文所概述的合适的赋形剂组成,并且另外可以包含可溶性透明质酸酶糖蛋白作为组合配制剂或作为共施用的分开配制剂。

[0049] 多种抗HER2抗体是现有技术中已知的。优选地,此类抗体是单克隆抗体。它们可以是所谓的嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体。它们可以是全长抗HER2抗体;具有相同生物学活性的抗HER2抗体片段;包括此类抗体或片段的氨基酸序列变体和/或糖基化变体。人源化抗HER2抗体的例子以INN名称曲妥单抗和帕妥珠单抗已知。另一种合适的抗HER2抗体是T-DM1,其是一种由huMAb4D5-8 (HERCEPTIN<sup>TM</sup>) 和美登木素生物碱类(maytansinoid) (即DM1 = N<sup>2</sup>-脱乙酰基-N<sup>2</sup>-(3-巯基-1-氧丙基)-美登素;即一种高度有力的抗微管剂) 组成的抗体-毒素缀合物,该缀合物(具有MCC接头) 目前开发用于转移性乳腺癌。具有各种特性的其它HER2抗体已经记载于Tagliabue等, *Int. J. Cancer*, 47:933-937 (1991); McKenzie等, *Oncogene*, 4:543-548 (1989); Cancer Res., 51:5361-5369 (1991); Bacus等, *Molecular Carcinogenesis*, 3:350-362 (1990); Stancovski等, *PNAS (USA)*, 88:8691-8695 (1991); Bacus等, *Cancer Research*, 52:2580-2589 (1992); Xu等, *Int. J. Cancer*, 53:401-408 (1993); W094/00136; Kasprzyk等, *Cancer Research*, 52:2771-2776 (1992); Hancock等, *Cancer Res.*, 51:4575-4580 (1991); Shawver等, *Cancer Res.*, 54:1367-1373 (1994); Arteaga等, *Cancer Res.*, 54:3758-3765 (1994); Harwerth等, *J. Biol. Chem.*, 267:15160-15167 (1992); 美国专利No. 5,783,186; 及 Klapper等, *Oncogene*, 14:2099-2109 (1997)。最成功的治疗性抗HER2抗体是由Genentech Inc. 和F. Hoffmann-La Roche Ltd以商品名HERCEPTIN<sup>TM</sup>出售的曲妥单抗。关于HER2抗原及针对其的抗体的更多详情记载于许多专利和

非专利出版物(关于合适的概述,见美国专利No.5,821,337和WO 2006/044908)。

[0050] 抗HER2抗体选自例如曲妥单抗、帕妥珠单抗和T-DM1的组,并且也可以由抗HER2抗体的混合物,诸如例如曲妥单抗和帕妥珠单抗或T-DM1和帕妥珠单抗组成。已经发现了帕妥珠单抗和曲妥单抗的组合在先前曲妥单抗疗法期间已经经历进展的转移性HER2阳性乳腺癌患者中是有活性的且耐受良好[见例如Baselga, J.等, *Journal of Clin. Oncol.* 第28卷(7) 2010: 第1138页-第1144页]。依照本发明的配制剂在本文中以抗HER2抗体曲妥单抗例示。术语“曲妥单抗”、“帕妥珠单抗”和“T-DM1”涵盖在选自美国、欧洲和日本的国家或地区中满足获得作为相同或生物相似产品的销售授权必需的要求的所有相应抗HER2抗体。曲妥单抗具有EP-B-590058中限定的CDR区。帕妥珠单抗具有WO 01/00245中限定的CDR区。已经发现了BT-474抗增殖测定法[Nahta, R.等, “The HER-2-targeting antibodies Trastuzumab and Pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells”, *Cancer Res.* 2004;64:2343.2346]中的曲妥单抗活性在 $0.7-1.3 \times 10^4$ 个U/mg间。T-DM1记载于WO 2005/117986。

[0051] HERCEPTIN™(曲妥单抗)已经在EU得到批准,用于如下治疗具有过表达HER2的肿瘤的转移性乳腺癌(MBC)患者:

[0052] -作为单一疗法以治疗已经接受针对其转移性疾病的至少两种化学疗法方案的患者。先前的化学疗法必须已经至少包含蒽环类抗生素和紫杉烷(taxane),除非患者不适合这些治疗。激素受体阳性患者也必须是激素疗法已经失败,除非患者不适合这些治疗。

[0053] -与帕利他塞(paclitaxel)组合以治疗尚未接受针对其转移性疾病的化学疗法且不适合蒽环类抗生素的那些患者。

[0054] -与多西他赛(docetaxel)组合以治疗尚未接受针对其转移性疾病的化学疗法的那些患者。

[0055] -与芳香酶抑制剂组合以治疗先前没用曲妥单抗治疗的具有激素受体阳性MBC的绝经后患者。

[0056] 曲妥单抗也已经在EU得到批准,用于治疗具有过表达HER2的肿瘤的MBC患者,用于在手术、化学疗法(新辅助或辅助)和放射疗法(若可适用的话)后治疗HER2阳性早期乳腺癌(EBC)患者。

[0057] 此外,曲妥单抗目前开发用于治疗胃癌。

[0058] 目前对曲妥单抗批准两种剂量给药方案(表1);对于转移性乳腺癌(MBC)和早期乳腺癌(EBC)两者均为一周一次(q1w)和每3周一次(q3w)。在q1w剂量给药方案中,加载剂量是4mg/kg,接着是2mg/kg的后续剂量。在q3w剂量给药方案中,加载剂量是8mg/kg,接着是6mg/kg的后续剂量。

[0059] 如上文所记录的,静脉内施用的HERCEPTIN™(曲妥单抗)目前以管形瓶中的冻干形式出售。在欧洲出售的配制剂中,每个管形瓶装含有在冻干填充体积6.25ml无菌水溶液后获得的干残留物,所述无菌水溶液含有下列组分:150mg曲妥单抗(有效的156.3mg以确保可以在重建后自最终产物取出150mg的名义数量)、3.50mg盐酸L-组氨酸、2.25mg L-组氨酸、141.9mg  $\alpha, \alpha$ -二水合海藻糖、0.63mg聚山梨酯20。溶解的冻干物含有约24mg/ml曲妥单抗、5mM L-组氨酸/HCl pH 6.0、60mM二水合 $\alpha, \alpha$ -海藻糖、0.01%聚山梨酯20。然后,将溶液添加至输注溶液,然后在90分钟里对患者施用输注(若耐受良好的话,可以在MBC中在30分钟里

给予后续的输注)。

[0060] 许多可溶性透明质酸酶糖蛋白是现有技术中已知的。为了进一步限定此类可溶性透明质酸酶糖蛋白的功能、作用机制和特性,提供了以下背景信息。

[0061] SC(皮下)间质基质由糖胺聚糖的粘弹性凝胶内包埋的纤维状蛋白质的网络构成。乙酰透明质酸(HA),即一种非硫酸化重复线性二糖是SC组织的主要糖胺聚糖。HA由成纤维细胞以一种高分子量兆道尔顿粘性聚合物分泌入间质中,随后,其在局部、在淋巴中、及在肝中经由溶酶体透明质酸酶和外切糖苷酶的作用降解。身体中的约50%乙酰透明质酸是由SC组织生成的,其中它以约0.8mg/gm湿重组织找到[Auckland K.和Reed R.,见上文]。估计平均70kg成人含有15克HA,其中30%每天周转(合成和降解)[Laurent L.B.等,“Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally,in lymph nodes and liver”,Exp.Physiol.1991;76:695-703]。作为皮下基质的凝胶样组分的主要成分,HA显著促成其粘性。

[0062] 糖胺聚糖(GAG)是胞外基质(ECM)的复杂线性多糖。GAG以N-取代的氨基己酸和糖醛酸(在乙酰透明质酸(HA)、硫酸软骨素(CS)、软骨素(C)、硫酸皮肤素(DS)、硫酸乙酰肝素(HS)、和肝素(H)的情况中),或半乳糖(在硫酸角质素(KS)的情况中)的重复二糖结构为特征。除了HA外,所有都以与核心蛋白共价结合方式存在。GAG及其核心蛋白在结构上称为蛋白聚糖(PG)。

[0063] 在哺乳动物中,主要在结缔组织、皮肤、软骨中,及在滑液中找到乙酰透明质酸(HA)。乙酰透明质酸也是眼的玻璃体的主要组分。在结缔组织中,与乙酰透明质酸有关的水合水产生组织间的水合基质。乙酰透明质酸在与细胞运动性有关的生物学现象,包括快速发育、再生、修复、胚胎发生、胚胎学发育、伤口愈合、血管发生、和肿瘤发生中发挥关键的作用(Toole,Cell Biol.Extracell.Matrix,Hay(编),Plenum Press,New York,1991;第1384页-第1386页;Bertrand等,Int.J.Cancer 1992;52:1-6;Knudson等,FASEB J.1993;7:1233-1241]。另外,乙酰透明质酸水平与肿瘤攻击性相关联[Ozello等,Cancer Res.1960;20:600-604;Takeuchi等,Cancer Res.1976;36:2133-2139;Kimata等,Cancer Res.1983;43:1347-1354]。

[0064] 在许多细胞的胞外基质中,特别地在软结缔组织中找到HA。已经给HA分配各种生理学功能,诸如在水和血浆蛋白质稳态中[Laurent T.C.等,FASEB J.,1992;6:2397-2404]。HA生成在增殖细胞中增加,并且可以在有丝分裂中发挥作用。它还已经牵涉行进和细胞迁移。HA似乎在细胞调节、发育、和分化中发挥重要的作用[Laurent等,见上文]。

[0065] 已经在临床医学中广泛使用HA。其组织保护和流变学特性已经证明为可用于眼科手术(例如以在白内障手术期间保护角膜内皮)。血清HA是肝疾病和各种炎性状况,诸如类风湿性关节炎的诊断。由HA积累引起的间质性水肿可以引起各个器官的功能障碍[Laurent等,见上文]。

[0066] 乙酰透明质酸蛋白质相互作用也牵涉胞外基质或“基质”的结构。

[0067] 透明质酸酶是遍及动物界找到的一组一般中性或酸性活性酶。透明质酸酶就底物特异性和作用机制而言有所变化(WO 2004/078140)。存在着三大类透明质酸酶:

[0068] 1.哺乳动物型透明质酸酶(EC 3.2.1.35),其是以四糖和六糖作为主要终产物的内-β-N-乙酰基己糖胺酶。它们具有水解和转糖苷酶活性两者,并且可以降解乙酰透明质酸

和硫酸软骨素 (CS), 一般地C4-S和C6-S。

[0069] 2. 细菌透明质酸酶 (EC 4.2.99.1) 降解乙酰透明质酸及以各种程度降解CS和DS。它们是内- $\beta$ -N-乙酰基己糖胺酶, 其通过主要生成二糖终产物的 $\beta$ 消除反应运行。

[0070] 3. 来自水蛭、其它寄生物、和甲壳动物的透明质酸酶 (EC 3.2.1.36) 是经由水解 $\beta$  1-3连接生成四糖和六糖终产物的内- $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶。

[0071] 哺乳动物透明质酸酶可以进一步分成两组: 中性活性和酸性活性酶。人基因组中存在着6种透明质酸酶样基因, 即HYAL1、HYAL2、HYAL3、HYAL4、HYALP1和PH20/SPAM1。HYALP1是一种假基因, 并且尚未显示HYAL3拥有针对任何已知底物的酶活性。HYAL4是一种软骨素酶, 并且展现出很少的针对乙酰透明质酸的活性。HYAL1是原型酸性活性酶, 而PH20是原型中性活性酶。一般地, 酸性活性透明质酸酶, 诸如HYAL1和HYAL2在中性pH (即pH 7) 缺乏催化活性。例如, HYAL1在体外超过pH 4.5具有很少的催化活性[Frost I.G.和Stern,R., “A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents”, *Anal. Biochemistry*, 1997; 251: 263-269]。HYAL2是一种在体外具有非常低的比活的酸性活性酶。

[0072] 透明质酸酶样酶也可以以那些一般经由糖基磷脂酰肌醇锚锁定质膜的酶, 诸如人HYAL2和人PH20 [Danilkovitch-Miagkova等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100 (8) : 4580-4585; Phelps等, *Science* 1988; 240 (4860) : 1780-1782], 和那些一般可溶的酶, 诸如人HYAL1 [Frost, I.G.等, “Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 236 (1) : 10-15] 为特征。然而, 存在着物种间的变化: 例如牛PH20非常松散地附着于质膜, 并且没有经由磷脂酶敏感性锚来锚定 [Lalancette等, *Biol. Reprod.*, 2001; 65 (2) : 628-36]。牛透明质酸酶的此独特特征已经容许使用可溶性牛睾丸透明质酸酶酶作为临床使用的提取物 (Wydase<sup>TM</sup>, Hyalase<sup>TM</sup>)。其它PH20种类是脂质锚定的酶, 其一般在不使用去污剂或脂肪酶的情况中是不可溶的。例如, 人PH20经由GPI锚而锚定于质膜。尝试生成人PH20, 不会将脂质锚引入多肽中的DNA构建体生成无催化活性的酶, 或不溶性的酶 [Arming等, *Eur. J. Biochem.*, 1997; 247 (3) : 810-4]。以可溶性和膜结合形式两者找到天然存在的猕猴精子透明质酸酶。虽然64kDa膜结合形式在pH 7.0拥有酶活性, 但是54kDa形式仅在pH 4.0有活性 [Cherr等, *Dev. Biol.*, 1996; 10; 175 (1) : 142-53]。如此, PH20的可溶性形式经常缺乏中性条件下的酶活性。

[0073] 如上文所记录的且依照W02006/091871中的教导, 可以将少量可溶性透明质酸酶糖蛋白 (sHASEGP) 引入配制剂中以便于将治疗性药物施用入下皮中。通过快速解聚胞外空间中的HA, sHASEGP降低间质的粘性, 由此提高水力传导, 并且容许安全且舒适地将较大体积施用入SC组织中。经由降低的间质粘性由sHASEGP诱导的升高的水力传导容许更大的分散, 这潜在地提高SC施用的治疗性药物的系统生物利用度。

[0074] 在下皮中注射时, sHASEGP对HA的解聚定位于SC组织中的注射部位。实验证据显示sHASEGP在小鼠中以半衰期13至20分钟在间质空间中局部失活, 在CD-1小鼠中静脉内单剂后在血液中没有可检出的系统吸收。在血管区室内, sHASEGP在多至0.5mg/kg剂量的情况中在小鼠和猕猴中分别表明2.3和5分钟的半衰期。与HA底物在SC组织中的连续合成组合, sHASEGP快速清除导致其它共注射分子的瞬时的且局部有活性的渗透增强, 该效应在施用后24至48小时内完全可逆 [Bywaters G.L.等, “Reconstitution of the dermal barrier

to dye spread after Hyaluronidase injection”, Br. Med. J., 1951; 2(4741): 1178-1183]。

[0075] 在其对局部液体分散的影响外, sHASEGP还充当吸收增强剂。大于16千道尔顿(kDa)的大分子大多排除在经由扩散通过毛细管的吸收之外, 并且大多经由引流淋巴结吸收。因此, 皮下施用的大分子, 诸如例如治疗性抗体(分子量约150kDa) 必须穿过间质基质, 之后到达引流淋巴系统, 随后吸收入血管区室中。通过提高局部分散, sHASEGP增加许多大分子的吸收速率( $K_a$ )。相对于在没有sHASEGP的情况中的SC施用, 这导致升高的峰血液水平( $C_{max}$ ), 而且潜在地导致升高的生物利用度[Bookbinder L.H., 等, “A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics”, J. Control. Release 2006; 114: 230-241]。

[0076] 动物起源的透明质酸酶产品已经在临床上使用超过60年, 主要用于提高其它共施用的药物的分散和吸收及用于皮下输液(大体积的流体的SC注射/输注) [Frost G.I., “Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration”, Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4: 427-440]。关于透明质酸酶作用机制的详情已经详细记载于下列出版物: Duran-Reynolds F., “A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action”, CR Soc Biol Paris, 1938; 69-81; Chain E., “A mucolytic enzyme in testes extracts”, Nature 1939; 977-978; Weissmann B., “The transglycosylative action of testicular hyaluronidase”, J. Biol. Chem., 1955; 216: 783-94; Tammi, R., Saamanen, A.M., Maibach, H.I., Tammi M., “Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture”, J. Invest. Dermatol. 1991; 97: 126-130; Laurent, U.B.G., Dahl, L.B., Reed, R.K., “Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver”, Exp. Physiol. 1991; 76: 695-703; Laurent, T.C. 和 Fraser, J.R.E., “Degradation of Bioactive Substances: Physiology and Pathophysiology”, Henriksen, J.H. (Ed) CRC Press, Boca Raton, FL; 1991. 第249页-第265页; Harris, E.N. 等, “Endocytic function, glycosaminoglycan specificity, and antibody sensitivity of the recombinant human 190-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE)”, J. Biol. Chem. 2004; 279: 36201-36209; Frost, G.I., “Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration”, Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4: 427-440。在EU国家得到批准的透明质酸酶产品包括Hyalase® “Dessau” 和Hyalase®。在美国得到批准的动物起源的透明质酸酶产品包括Vitrane™、Hydase™、和Amphadase™。

[0077] 已经广泛建立了透明质酸酶产品的安全性和功效。所鉴定的最重大的安全性风险是超敏感性和/或变应原性, 认为其与动物衍生的制备物的纯度缺乏相关[Frost, G.I., “Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration”, Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4: 427-440]。应当注意, 在英国、德国与美国间就动物衍生的透明质酸酶的批准剂量而言有差异。在英国, 作为皮下或肌肉内注射佐剂的常用剂量是对注射直接添加的1500个

单位。在美国,出于此目的使用的常用剂量是150个单位。在皮下输液中,使用透明质酸酶来帮助相对大体积的流体的皮下施用。在英国,一般以皮下使用的每500至1000ml流体给予1500个单位的透明质酸酶。在美国,认为150个单位对于每升皮下输液溶液是足够的。在德国,认为150至300个单位对于此目的是足够的。在英国,通过添加1500个单位来加速局部麻醉剂的扩散。在德国和美国,认为150个单位对于此目的是足够的。虽然有剂量差异(在英国的剂量比在美国高10倍),但是已经报告了分别在美国和英国销售的动物衍生的透明质酸酶产品的安全性概况没有明显差异。

[0078] 在2005年12月2日,Halozyne Therapeutics Inc.收到来自FDA的关于重组人透明质酸酶的可注射配制剂rHuPH20 (HYLENEX™)的批准。FDA批准150个单位的剂量的HYLENEX™用于下列适应症的SC施用:

[0079] -作为佐剂以提高其它注射药物的吸收和分散

[0080] -用于皮下输液

[0081] -作为SC尿路造影术中的辅助物以改善不透射线剂的吸收。

[0082] 作为所述管理审阅的一部分,建立的是,rHuPH20与先前批准的动物衍生的透明质酸酶制备物拥有增强其它注射药物分散和吸收的相同特性,但是具有改善的安全性概况。具体地,与动物衍生的透明质酸酶相比,重组人透明质酸酶(rHuPH20)的使用使被动物病原体和传染性海绵状脑病污染的潜在风险最小化。

[0083] 可溶性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP)、其制备方法及其在药物组合物中的用途已经记载于W0 2004/078140。已经在W0 2006/091871中提及与多种例示性抗体,诸如例如曲妥单抗组合使用可溶性透明质酸酶糖蛋白。

[0084] 如下文进一步概述的详细实验工作已经显示了,令人惊讶地,本发明的配制剂具有有利的贮存稳定性,而且满足健康权力机构批准的所有必需要求。

[0085] 本发明的配制剂中的透明质酸酶增强抗HER2抗体对系统循环的投递,例如通过增加活性物质的吸收来实现(它充当渗透增强剂)。透明质酸酶还通过可逆水解乙酰透明质酸(即SC间质组织的一种胞外组分)来提高治疗性抗HER2抗体经由皮下应用路径对系统循环的投递。下皮中的乙酰透明质酸水解暂时打开SC组织的间质空间中的通道,并且由此改善治疗性抗HER2抗体对系统循环的投递。另外,施用显示了人的疼痛降低和SC组织的体积衍生的肿胀较小。

[0086] 透明质酸酶在局部施用时在局部具有其全部效应。换言之,透明质酸酶在数分钟中局部失活并代谢,而且尚未注意到具有系统或长期效应。在透明质酸酶进入血流时它在数分钟内快速失活排除在不同透明质酸酶产品间实施可比较的生物分布研究的实际能力。此特性还使任何潜在的系统安全性忧虑最小化,这是因为透明质酸酶产品不能在远离的部位起作用。

[0087] 所有透明质酸酶的统一特征是其解聚乙酰透明质酸的能力,不管化学结构、物种来源、组织来源、或源自相同物种和组织的药物产品的批次的差异。它们的与众不同之处在于,尽管具有不同结构,它们的活性是相同的(除了效力外)。

[0088] 依照本发明的配制剂的透明质酸酶赋形剂以对本文中所描述的稳定的药物配制剂中的抗HER2抗体的分子完整性没有不利影响为特征。此外,透明质酸酶仅仅修饰抗HER2抗体对系统循环的投递,但是不拥有可以提供或促成系统吸收的抗HER2抗体的治疗效

果的任何特性。透明质酸酶不是系统生物利用的,并且在依照本发明的稳定的药物配制剂的推荐贮存条件没有不利地影响抗HER2抗体的分子完整性。因此,它被认为是依照本发明的抗HER2抗体配制剂中的赋形剂。因为它不施加治疗效果,所以它代表除治疗活性抗HER2抗体外的药学形式组分。

[0089] 依照本发明的许多合适的透明质酸酶自现有技术已知。优选的酶是人透明质酸酶,最优选地称为rHuPH20的酶。rHuPH20是通过水解N-乙酰基葡糖胺的C<sub>1</sub>位置与葡糖醛酸的C<sub>4</sub>位置间的β-1,4连接来解聚乙酰透明质酸的中性和酸性活性β-1,4糖基水解酶家族成员。乙酰透明质酸是一种在结缔组织,诸如皮下间质组织,和某些特化组织,诸如脐带和玻璃体液的胞内基质中找到的多糖。乙酰透明质酸的水解暂时地降低间质组织的粘性,并且促进注射流体或局部漏出液或渗出物的分散,如此便于其吸收。透明质酸酶的效果是局部的,并且在24至48小时内发生的组织乙酰透明质酸完全重建的情况中可逆[Frost,G.I.,“Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20):an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration”,Expert Opinion on Drug Delivery, 2007;4:427-440]。经由水解乙酰透明质酸的结缔组织渗透性升高与透明质酸酶在其提高共施用分子的分散和吸收能力方面的功效相关联。

[0090] 人基因组含有数种透明质酸酶基因。仅PH20基因产物拥有生理学胞外条件下的有效透明质酸酶活性,并且充当铺展剂,而酸性活性透明质酸酶没有此特性。

[0091] rHuPH20是目前可用于治疗用途的第一种且唯一的重组人透明质酸酶。天然存在的人PH20蛋白具有将其锚定于质膜的附着于羧基端氨基酸的脂质锚。由Halozyme开发的rHuPH20酶是一种截短的删除变体,其缺乏负责脂质附着的羧基端的此类氨基酸。这生成与牛睾丸制备物中找到的蛋白质相似的可溶性中性pH活性酶。rHuPH20蛋白与35个氨基酸的信号肽一起合成,所述信号肽在分泌过程期间自N端除去。成熟的rHuPH20蛋白含有与一些牛透明质酸酶制备物中找到的N端氨基酸序列直向同源的真实N端氨基酸序列。

[0092] PH20透明质酸酶(包括动物衍生的PH20和重组人rHuPH20)通过水解N-乙酰基葡糖胺的C<sub>1</sub>位置与葡糖醛酸的C<sub>4</sub>位置间的β-1,4连接来解聚乙酰透明质酸。四糖是最小的消化产物[Weissmann,B.,“The transglycosylative action of testicular hyaluronidase”,J.Biol.Chem.,1955;216:783-94]。此N-乙酰基葡糖胺/葡糖醛酸结构未在重组生物学产物的N连接的聚糖中找到,并且因此,rHuPH20不会影响与其一起配制的抗体,诸如例如曲妥单抗的糖基化。rHuPH20酶自身拥有每个分子6个N连接的聚糖,其中核心结构与单克隆抗体中找到的核心结构相似。如预期的,这些N连接的结构不随时间变化,确认rHuPH20对这些N连接的聚糖结构的酶活性的缺乏。rHuPH20的短半衰期和乙酰透明质酸的持续合成导致酶对组织的短的且局部的作用。

[0093] 可以通过使用重组DNA技术来制备作为依照本发明的皮下配制剂中的赋形剂的透明质酸酶。因此,确保始终获得相同蛋白质(相同的氨基酸序列),并且避免例如由自组织提取期间共纯化的污染性蛋白质引起的变应性反应。如本文中例示的配制剂中使用的透明质酸酶是人酶,即rHuPH20。

[0094] rHuPH20 (HYLENEX™)的氨基酸序列是公知的,并且以CAS登记号75971-58-7可获得。近似的分子量是61kDa。

[0095] 已经在天然来源的哺乳动物透明质酸酶与来自人和其它哺乳动物的PH-20 cDNA

克隆间实施多重结构和功能比较。PH-20基因是重组产物rHuPH20使用的基因；然而，重组药物产物是一种由PH-20基因编码的完整蛋白质的447个氨基酸的截短型式。就氨基酸序列而言的结构相似性在任何比较中很少超过60%。功能比较显示rHuPH20的活性与先前批准的透明质酸酶产品的活性非常相似。此信息与过去50年期间的临床发现一致，即不管透明质酸酶来源，透明质酸酶的临床安全性和单位功效是等同的。

[0096] rHuPH20在依照本发明的抗HER2抗体SC配制剂中的使用容许施用较高体积的药物产物，并且潜在地增强皮下施用的曲妥单抗吸收入系统循环中。

[0097] 依照本发明的稳定的药物配制剂的摩尔渗透压浓度是 $330 \pm 50 \text{mOsm/kg}$ 。

[0098] 依照本发明的稳定的药物配制剂基本上没有可见的（人眼检查）颗粒。亚-可见的颗粒（如通过光遮蔽测量的）应当满足下列标准：

[0099] -每个管形瓶 $\geq 10\mu\text{m}$ 颗粒的最大数目 -  $> 6000$

[0100] -每个管形瓶 $\geq 25\mu\text{m}$ 颗粒的最大数目 -  $> 600$

[0101] 在又一方面，本发明提供了配制剂用于制备可用于治疗受试者中适合于用抗HER2抗体治疗的疾病或病症，诸如例如癌症或非恶性疾病的药物的用途，包括以有效治疗所述疾病或病症的量对受试者施用本文中所描述的配制剂。可以与化疗剂伴随或序贯共施用抗HER2抗体。

[0102] 在又一方面，本发明提供了治疗受试者中适合于用抗HER2抗体治疗的疾病或病症（例如癌症或非恶性疾病）的方法，包括以有效治疗所述疾病或病症的量对受试者施用本文中所描述的配制剂。癌症或非恶性疾病一般会牵涉HER2表达细胞，使得依照本发明的治疗性药物SC配制剂中的HER2抗体能够结合受影响的细胞。下文的定义部分中进一步列出了可以用依照本发明的配制剂治疗的各种癌症或非恶性疾病。

[0103] 可以将依照本发明的药学活性抗HER2抗体的稳定的药物配制剂作为皮下注射施用，其中以3周时间间隔（q3w）重复施用几次。在大多数情况中在1至10分钟，优选地2至6分钟，最优选地 $3 \pm 1$ 分钟的时间段内施用注射流体的整个体积。在佐剂EBC患者中及接受曲妥单抗单一疗法的MBC患者（其中没有给予其它静脉内（IV）化疗剂）中，此类皮下施用导致患者便利增加及在家自身施用的潜力。这导致改善的顺从性，并且降低/消除与IV施用有关的成本（即，IV施用的护理成本、躺椅租费、患者出行等）。依照本发明的皮下施用最可能会与输注相关反应的频率和/或强度降低有关。

[0104] 对配制剂添加透明质酸酶容许增加可以安全且舒适地皮下施用的注射体积。在正常的情况下，注射体积是1至15ml。已经观察到依照本发明的配制剂的施用提高治疗性抗体的分散、吸收和生物利用度。经由SC路径施用的大分子（即大于16kDa）经由引流淋巴液优先吸收入血管区室中 [Supersaxo, A. 等, “Effect of Molecular Weight on the Lymphatic Absorption of Water-Soluble Compounds Following Subcutaneous Administration”, 1990; 2: 167-169; Swartz, M.A., “Advanced Drug Delivery Review, The physiology of the lymphatic system”, 2001; 50: 3-20]。如此，这些大分子引入系统循环的速率相对于静脉内输注是减缓的，因此潜在地导致输注相关反应的频率/强度降低。

[0105] 依照本发明的皮下曲妥单抗配制剂的生成要求制造工艺的最终纯化步骤中的高抗体浓度（约120mg/ml）。因此，将额外的工艺步骤（超滤/渗滤）添加至曲妥单抗的常规制造工艺。依照WO 97/04801中的教导，依照本发明的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂

也可以以稳定化的蛋白质配制剂提供,所述稳定化的蛋白质配制剂可以用合适的稀释剂重建以生成高抗HER2抗体浓度重建的配制剂。

[0106] 主要使用依照本发明的HER2抗体SC配制剂来治疗癌症。其中,术语“癌症”和“癌性”指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理学状况。癌症的例子包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、母细胞瘤(包括髓母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)、肉瘤(包括脂肪肉瘤和滑膜细胞肉瘤)、神经内分泌肿瘤(包括类癌瘤、胃泌素瘤、和胰岛细胞癌)、间皮瘤、神经鞘瘤(schwannoma)(包括听神经瘤)、脑膜瘤、腺癌、黑素瘤、和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌瘤、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、睾丸癌、食管癌、胆管肿瘤、及头和颈癌。

[0107] 如本专利说明书中所使用的,术语“约”意指规定所提供的特定数值可以以某种程度变化,诸如例如意指给定数值中包括范围为 $\pm 10\%$ ,优选地 $\pm 5\%$ ,最优选地 $\pm 2\%$ 的变化。

[0108] “过表达”HER受体的癌症是与相同组织类型的非癌性细胞相比在其细胞表面上具有显著更高水平的HER受体,诸如HER2的癌症。此类过表达可以由基因扩增或由转录或翻译升高引起。可以在诊断或预后测定法中通过评估细胞表面上存在的HER蛋白的水平升高(例如经由免疫组织化学测定法;IHC进行)来测定HER受体过表达。或者/另外,可以例如经由荧光原位杂交(FISH;见W098/45479)、Southern印迹、或聚合酶链式反应(PCR)技术,诸如实时定量PCR(RT-PCR)来测量细胞中的HER编码核酸的水平。也可以通过测量生物学流体,诸如血清中的脱落抗原(例如,HER胞外域)来研究HER受体过表达[见例如1990年6月12日公告的美国专利No.4,933,294;1991年4月18日公布的W091/05264;1995年3月28日公告的美国专利5,401,638;及Sias等,J.Immunol.Methods 1990;132:73-80]。除了上述测定法外,各种体内测定法是熟练从业人员可用的。例如,可以将患者身体内的细胞暴露于任选地用可检测标记物,例如放射性同位素标记的抗体,并且可以例如通过外部扫描放射性或者通过分析自先前暴露于抗体的患者采集的活组织检查来评估抗体对患者中的细胞的结合。

[0109] 相反地,“不过表达HER2受体”的癌症是与相同组织类型的非癌性细胞相比不表达比正常水平高的HER2受体的癌症。

[0110] “过表达”HER配体的癌症是与相同组织类型的非癌性细胞相比生成显著更高水平的所述配体的癌症。此类过表达可以由基因扩增或由转录或翻译升高引起。可以通过评估患者中,例如肿瘤活组织检查中的配体(或其编码核酸)的水平或者通过各种诊断测定法,诸如IHC、FISH、Southern印迹、PCR或本领域中公知的体内测定法来诊断性测定HER配体的过表达。

[0111] 涵盖的是,也可以使用依照本发明的HER2抗体SC配制剂来治疗各种非恶性疾病或病症,其包括自身免疫性疾病(例如银屑病);子宫内膜异位症;硬皮病;再狭窄;息肉,诸如结肠息肉、鼻息肉或胃肠息肉;纤维腺瘤;呼吸系统疾病;胆囊炎;神经纤维瘤病;多囊肾病;炎性疾病;皮肤病症,包括银屑病和皮炎;血管疾病;牵涉血管上皮细胞的异常增殖的状况;胃肠溃疡;门内特里埃(Menetrier)氏病、分泌型腺瘤或蛋白质损失综合征(protein loss

syndrome);肾病症;血管生成性病征(angiogenic disorder);眼病,诸如年龄相关黄斑变性、推测的眼组织胞浆菌病综合征、来自增殖性糖尿病视网膜病变的视网膜新血管化、视网膜血管化、糖尿病视网膜病变、或年龄相关黄斑变性;骨相关病理学,诸如骨关节炎、佝偻病和骨质疏松;脑缺血事件后的损伤;纤维变性或水肿疾病,诸如肝硬变、肺纤维化、结节病(carcoidosis)、甲状腺炎(throiditis)、系统性高粘滞综合征(hyperviscosity syndrome systemic)、Osier Weber-Rendu疾病、慢性阻塞性肺疾病(occlusive pulmonary disease)、或烧伤、创伤、辐射、中风、缺氧或缺血后的水肿;皮肤的超敏感性反应;糖尿病视网膜病和糖尿病肾病;格-巴二氏综合征(Guillain-Barre syndrome);移植物抗宿主病或移植排斥;佩吉特(Paget)氏病;骨或关节炎;光老化(例如由对人皮肤的UV辐射引起的);良性前列腺肥大;某些微生物感染,包括选自下组的微生物病原体:腺病毒、汉坦病毒、布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、耶尔森氏菌(*Yersinia spp.*)和百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*);由血小板聚集引起的血栓;生殖状况,诸如子宫内膜异位症、卵巢过度刺激综合征、先兆子痫、功能障碍性子官出血、或月经频多;滑膜炎;粥样斑;急性和慢性肾病(包括增殖性肾小球肾炎和糖尿病诱导的肾病);湿疹;肥厚性瘢痕形成;内毒素性休克和真菌感染;家族性腺瘤病息肉病;神经变性性疾病(例如阿耳茨海默(Alzheimer)氏病、AIDS相关痴呆、帕金森(Parkinson)氏病、肌萎缩侧索硬化、视网膜色素变性、脊柱性肌萎缩(spinal muscular atrophy)和小脑变性);骨髓增生异常综合征;再生障碍性贫血;缺血性损伤;肺、肾或肝的纤维化;T细胞介导的超敏感性疾病;婴儿肥大性幽门狭窄;泌尿阻塞综合征(urinary obstructive syndrome);银屑病关节炎;和桥本(Hasimoto)氏甲状腺炎。本文中的疗法的例示性非恶性适应症包括银屑病、子宫内膜异位症、硬皮病、血管疾病(例如再狭窄、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、或高血压)、结肠息肉、纤维腺瘤或呼吸系统疾病(例如,哮喘、慢性支气管炎、支气管扩张或囊性纤维化病)。

[0112] 在适应症是癌症的情况中,可以用抗体配制剂和化疗剂的组合治疗患者。联合施用包括共施用或同时施用(其使用分开的配制剂或单一药物配制剂进行)和以任意次序的连续施用,其中优选地,存在着所有活性剂同时施加其生物学活性的时间段。如此,可以在施用依照本发明的抗体配制剂之前、或之后施用化疗剂。在此实施方案中,化疗剂的至少一次施用与依照本发明的抗体配制剂的至少一次施用间的时机优选地是约1个月或更小,且最优选地约2周或更小。或者,可以在单一配制剂或分开的配制剂中对患者同时施用化疗剂和依照本发明的抗体配制剂。

[0113] 用所述抗体配制剂的治疗会导致癌症或疾病的体征或症状的改善。例如,在所治疗的疾病是癌症的情况中,此类疗法可以导致存活(总体存活和/或无进展存活)的改善和/或可以导致客观临床响应(部分的或完全的)。此外,用化疗剂和抗体配制剂的组合治疗可以对患者产生协同或大于叠加的治疗益处。

[0114] 通常,所施用配制剂中的抗体是裸抗体。然而,所施用的抗体可以与细胞毒剂缀合。然后,免疫缀合物和/或其结合的抗原被细胞内在化,导致免疫缀合物在杀死其结合的癌细胞方面的治疗功效升高。在一个实施方案中,细胞毒剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。此类细胞毒剂的例子包括美登木素生物碱类、加利车霉素(calioheamicin)、核糖核酸酶和DNA内切核酸酶。临床上最先进的免疫缀合物是曲妥单抗-美登木素生物碱类免疫缀合物(T-DM1),如它们记载于WO 2003/037992的,特别是免疫缀合物T-MCC-DM1,其化学名称是N<sup>2</sup>-脱

乙酰基-N<sup>2</sup>-(3-巯基-1-氧丙基)-美登素-4-马来酰亚胺基甲基-环己基-1-羧基-曲妥单抗。  
[0115] 对于皮下投递,可以经由合适的装置,诸如(但不限于)注射器;注射装置(例如 INJECT-EASE™和GENJECT™装置);输注泵(诸如例如Accu-Chek™);注射笔(诸如GENPEN™;一种无针装置(例如MEDDECTOR™和BIOJECTOR™);或者经由皮下贴片投递系统来施用配制剂。适合于依照本发明的配制剂的投递系统记载于W0 2010/029054。此类装置包含约5至约15ml或更具体地5ml依照本发明的液体配制剂。

[0116] 对于预防或治疗疾病,抗体的合适剂量会取决于要治疗的疾病类型(如上文所限定的)、疾病的严重性和过程、抗体是出于预防还是治疗目的施用、先前的疗法、患者的临床史及他对抗体的响应、和主治内科医生的判断。在一次或一系列治疗里对患者适当地施用抗体。根据疾病的类型和严重性,约1μg/kg至50mg/kg体重或更具体地约0.1mg/kg至20mg/kg体重的抗HER2抗体是对患者施用的候选初始剂量,其例如通过一次或多次分开的施用,或者通过连续输注来进行。更具体地,抗体的剂量会在约0.05mg抗HER2抗体/kg体重至约10mg抗HER2抗体/kg体重的范围中。若施用化疗剂,因此它通常以已知的剂量施用,或者任选地由于药物的组合作用或可归因于化疗剂施用的负面副作用而降低。可以依照制造商的指令或如熟练从业人员凭经验确定的那样使用此类化疗剂的制备和剂量给药日程表。此类化学疗法的制备和剂量给药日程表也记载于Chemotherapy Service Ed.,M.C.Perry, Williams&Wilkins,Baltimore,MD(1992)。

[0117] 其它治疗方案可以与抗体组合,包括但不限于第二(第三、第四等)化疗剂(换言之,不同化疗剂的“混合物(cocktail)”;另一种单克隆抗体;生长抑制剂;细胞毒剂;化疗剂;EGFR靶向药物;酪氨酸激酶抑制剂;抗血管生成剂;和/或细胞因子等;或其任何合适的组合。

[0118] 在上述治疗方案外,患者可以进行癌细胞的手术除去和/或放射疗法。

[0119] 在本发明的另一个实施方案中,提供了制品,其含有本发明的药物配制剂且提供其使用指令。此制品包含容器。合适的容器包含例如瓶、管形瓶(例如多或双室管形瓶)、注射器(诸如多或双室注射器)和试管。容器可以自多种材料诸如玻璃或塑料形成。容器容纳配制剂,并且容器上或与容器结合的标签可以指示使用指导。容纳配制剂的容器可以是多次使用管形瓶,其容许重建配制剂的重复施用(例如2至6次施用)。制品可以进一步包含从商业和用户观点看期望的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针、注射器、和具有使用指令的包装插页。

[0120] 术语“药物配制剂”指处于使得容许活性成分的生物学活性有效的形式,且不含对于会接受配制剂施用的受试者具有不可接受的毒性的别的组分的制剂。此类配制剂是无菌的。

[0121] “无菌”配制剂是无菌的或没有所有活的微生物及其孢子。

[0122] “稳定的”配制剂是其中的所有蛋白质在于预期的贮存温度,例如2-8℃贮存后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的配制剂。期望的是,配制剂在贮存后基本上保留其物理和化学稳定性,及其生物学活性。一般地,基于配制剂的预期保存期选择贮存期。此外,配制剂在冷冻(至例如-70℃)和融化配制剂后,例如1、2或3个循环的冷冻和融化后应当是稳定的。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术在本领域中是可用的,并且综述见例如Peptide and Protein Drug Delivery,247-301,Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991)和Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993)。可以于选定的温度对稳定性测量选定的时间段。可以以多种不同方

式定性和/或定量评估稳定性,包括评估聚集体形成(例如使用大小排阻层析,通过测量浊度,和/或通过目视检查进行);使用阳离子交换层析或毛细管区带电泳通过评估电荷异质性;氨基端或羧基端序列分析;质谱分析;SDS-PAGE分析以比较缩小的和完整的抗体;肽图(例如胰蛋白酶消化或LYS-C)分析;评估抗体的生物学活性或抗原结合功能等。不稳定性可以牵涉下列任何一项或多项:聚集、脱酰胺化(例如Asn脱酰胺化)、氧化(例如Met氧化)、异构化(例如Asp异构化)、剪裁(clipping)/水解/片段化(例如铰链区片段化)、琥珀酰亚胺形成、不成对的半胱氨酸、N端延伸、C端加工、糖基化变化等。本文中的“脱酰胺化”单克隆抗体是其中已经通过翻译后修饰将其一个或多个天冬酰胺残基修饰为例如天冬氨酸或异天冬氨酸的。

[0123] 如本文中所使用的,术语“提供pH  $5.5 \pm 2.0$ 的缓冲剂”指通过其酸/碱共轭组分的作用提供包含其的溶液抵抗pH变化的试剂。依照本发明的配制剂中使用的缓冲液具有范围为约5.0至约7.0,或约5.0至约6.5,或约5.3至约5.8的pH。已经发现了pH约5.5是最合适的。会控制此范围中的pH的缓冲剂的例子包括乙酸盐、琥珀酸盐、葡糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐、双甘氨酸和其它有机酸缓冲液。依照本发明的最合适的缓冲液是组氨酸缓冲液,诸如例如L-组氨酸/HCl。

[0124] “组氨酸缓冲液”是包含氨基酸组氨酸的缓冲液。组氨酸缓冲液的例子包括盐酸组氨酸、乙酸组氨酸、磷酸组氨酸、硫酸组氨酸。实施例中鉴定为最合适的组氨酸缓冲液是盐酸组氨酸缓冲液。通过用稀释的氢氯酸滴定L-组氨酸(游离碱,固体)来制备此类盐酸组氨酸缓冲液。具体地,组氨酸缓冲液或盐酸组氨酸缓冲液为pH  $5.5 \pm 0.6$ ,更具体地为pH约5.3至约5.8,且最具体地具有pH 5.5。

[0125] “等张的”意指感兴趣的配制剂与人血液具有基本上相同的渗透压。等张配制剂一般会具有约250至350mOsm的渗透压。可以使用蒸汽压或凝固点降低型渗透压计来测量等渗压性。

[0126] 本文中的“糖类”包含通用组成 $(CH_2O)_n$ 及其衍生物,包括单糖、二糖、三糖、多糖、糖醇、还原糖、非还原糖等。本文中糖类的例子包括葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、果糖、麦芽糖、右旋糖苷、甘油、右旋糖苷、赤藓糖醇、甘油、阿拉伯糖醇、木糖醇(sylitol)、山梨糖醇、甘露糖醇、蜜二糖(melibiose)、松三糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖(stachyose)、麦芽糖、乳糖(lactulose)、麦芽酮糖(maltulose)、葡糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、异麦芽酮糖等。特别地,本文中所描述的配制剂包含非还原性二糖作为稳定剂,诸如选自下组的糖类:海藻糖(例如为二水合 $\alpha, \alpha$ -海藻糖形式)和蔗糖。

[0127] 在本文中,“表面活性剂”指一种表面-活性剂,例如非离子型表面活性剂。本文中的表面活性剂的例子包括聚山梨酯(例如聚山梨酯20和聚山梨酯80);Poloxamer(例如Poloxamer 188);Triton;十二烷基硫酸钠(SDS);月桂基硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油酰(linoleyl-)、或硬脂酰-磺基甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油酰基或硬脂酰基-肌氨酸;亚油酰基-、肉豆蔻基-、或鲸蜡基-甜菜碱;月桂酰胺基丙基-、椰油酰胺基丙基-、亚油酰胺基丙基-、肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰胺基丙基(palimidopropyl)-、或异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱(例如月桂酰胺基丙基);肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰胺基丙基-、或异硬脂酰胺基丙基-二甲胺;甲基椰油酰基(cocoyl)牛磺酸钠、或甲基油烯基牛磺酸二钠;和MONAQU AT™系列(Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey);聚乙二醇、聚丙二醇、

和乙烯和丙二醇的共聚物(例如Pluronic、PF68等)等。已经分别发现了聚山梨酯20(PS20)和聚山梨酯80(PS80)在本文中所描述的配制剂中是特别合适的。

[0128] 本文中的术语“抗体”以最广义使用,并且明确涵盖全长单克隆抗体、多克隆抗体、自至少两种全长抗体形成的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、及抗体片段,只要它们展现出期望的生物学活性。

[0129] 如本文中所使用的,术语“单克隆抗体”指自基本上同质的抗体群体获得的抗体,即除了可以在单克隆抗体的生成期间生成的可能的变体(此类变体一般以少量存在)外,构成群体的抗体个体相同和/或结合相同表位。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。在其特异性外,单克隆抗体的有利之处在于它们不受其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”指示抗体为自基本上同质的抗体群体获得的特征,并且不应解释为要求通过任何特定的方法生成抗体。例如,可以通过第一次由Köhler等,Nature,256:495(1975)描述的杂交瘤方法来生成,或者可以通过重组DNA方法(见例如美国专利No.4,816,567)来生成要依照本发明使用的单克隆抗体。也可以使用Clarkson等,Nature,352:624-628(1991)和Marks等,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)中所描述的技术自噬菌体抗体文库分离“单克隆抗体”。

[0130] “抗体片段”包含全长抗体的一部分,特别地包含其抗原结合或可变区。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;和自抗体片段形成的多特异性抗体。

[0131] “全长抗体”是包含抗原结合可变区及轻链恒定域(CL)和重链恒定域、CH1、CH2和CH3的抗体。恒定域可以是天然序列恒定域(例如人天然序列恒定域)或其氨基酸序列变体。特别地,全长抗体具有一种或多种效应器功能。

[0132] 本文中的“氨基酸序列变体”抗体是具有与主要种类抗体不同的氨基酸序列的抗体。通常,氨基酸序列变体会拥有与主要种类抗体至少约70%的同源性,且优选地,它们会与主要种类抗体至少约80%,更优选地至少约90%同源。氨基酸序列变体在主要种类抗体的氨基酸序列内或附近的某些位置拥有替代、删除、和/或添加。本文中的氨基酸序列变体的例子包括酸性变体(例如脱酰胺化的抗体变体)、碱性变体、在其一条或两条轻链上具有氨基端前导延伸(例如VHS-)的抗体、在其一条或两条重链上具有C端赖氨酸残基的抗体等,并且包括对重和/或轻链的氨基酸序列的改变的组合。相对于主要种类抗体,本文中特别感兴趣的抗体变体是包含在其一条或两条轻链上的氨基端前导延伸,任选地进一步包含其它氨基酸序列和/或糖基化差异的抗体。

[0133] 本文中的“糖基化变体”抗体是具有与附着于主要种类抗体的一个或多个碳水化合物模块不同的其附着的一个或多个碳水化合物模块的抗体。本文中的糖基化变体的例子包括具有附着于其Fc区的G1或G2寡糖结构,而不是G0寡糖结构的抗体、具有附着于其一条或两条轻链的一个或两个碳水化合物模块的抗体、没有附着于抗体的一条或两条重链的碳水化合物的抗体等,及糖基化变化的组合。此外,术语“糖基化变体”还包括糖工程化改造抗体诸如那些记载于EP 1'331'266和USP 7'517'670的。

[0134] 抗体“效应器功能”指那些可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的生物学活性。抗体效应器功能的例子包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬;细胞表面受体(例如B细胞受体;

BCR)的下调,等等。

[0135] 根据全长抗体重链恒定域的氨基酸序列,它可以归入不同“类”。存在着5类主要的全长抗体:IgA、IgD、IgE、IgG、和IgM,这些中的几种可以进一步分成“亚类”(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、和IgA2。对应于不同类抗体的重链恒定域分别称作 $\alpha$ [阿尔法]、 $\beta$ [德耳塔]、 $\epsilon$ [厄普西隆]、 $\gamma$ [伽马]、和 $\mu$ [谬]。不同类免疫球蛋白的亚基结构和三维结构是公知的。

[0136] 在本文中,单克隆抗体的“生物学活性”指抗体结合抗原,并且产生可以在体外或在体内测量的可测量生物学应答的能力。此类活性可以是拮抗的(例如在抗体是HER2抗体的情况中)或激动的。在帕妥珠单抗的情况中,在一个实施方案中,生物学活性指配制的抗体抑制人乳腺癌细胞系MDA-MB-175-VII增殖的能力。

[0137] 本文中的术语“单克隆抗体”明确包括所谓的嵌合抗体,其中重和/或轻链的一部分与自特定物种衍生的或属于特定抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与自另一物种衍生的或属于另一抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(美国专利No.4,816,567;及Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。本文中感兴趣的嵌合抗体包括“灵长源化(primatized)”抗体,其包含自非人灵长类(例如旧世界猴(Old World Monkey)、猿等)衍生的可变域抗原结合序列和人恒定区序列。

[0138] 非人(例如啮齿类)抗体的“人源化”形式指最低限度包含自非人免疫球蛋白衍生的序列的嵌合抗体。大体上,人源化抗体指来自接受体的高变区残基用来自具有期望特异性、亲和力和性能的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、家兔或非人灵长类的高变区的残基替换的人免疫球蛋白(接受抗体)。在有些情况中,将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可以包含在接受抗体或供体抗体中没有找到的残基。做出这些修饰以进一步改进抗体性能。一般地,人源化抗体会包含至少一个、通常为两个基本上整个可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的FR。任选地,人源化抗体还会包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。关于更多详情,见Jones等,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等,Nature 332:323-329(1988);及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。

[0139] 人源化HER2抗体包括huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7和huMAb4D5-8或曲妥单抗(HERCEPTIN<sup>TM</sup>),如美国专利5,821,337的表3中所描述的;人源化520C9(W093/21319)和人源化2C4抗体,诸如帕妥珠单抗,如下文中进一步描述的。

[0140] 出于本文中的目的,“曲妥单抗”、“HERCEPTIN<sup>TM</sup>”和“huMAb4D5-8”指针对4D5表位的抗HER2抗体。优选地,此类抗体包含例如WO 2006/044908的图14中所披露的轻链和重链氨基酸序列。

[0141] “表位4D5”是HER2的胞外域中抗体4D5(ATCC CRL 10463)和曲妥单抗结合的区域。此表位接近HER2的跨膜域,并且在HER2的IV域内。为了筛选结合4D5表位的抗体,可以实施诸如记载于Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow和David Lane(1988)的常规交叉阻断测定法。或者,可以实施表位定位以评估抗体

是否结合HER2的4D5表位(例如HER2的约残基529至约残基625的区域中的任何一个或多个残基(包括端点))。“表位7C2/7F3”是HER2的胞外域的I域内7C2和/或7F3抗体结合的氨基端区域。为了筛选结合7C2/7F3表位的抗体,可以实施诸如记载于“Antibodies, A Laboratory Manual”(Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow和David Lane (1988))的常规交叉阻断测定法。或者,可以实施表位定位以建立抗体是否结合HER2上的7C2/7F3表位(例如HER2的约残基22至约残基53的区域中的任何一个或多个残基)。

[0142] 在本文中,“帕妥珠单抗”和“rhuMAb 2C4”指结合2C4表位,并且优选地包含W0 2006/044908中所披露的可变轻和可变重氨基酸序列的抗体,更具体地W0 2006/044908的表2中所披露的人源化2C4型式574。

[0143] “表位2C4”是HER2的胞外域中抗体2C4结合的区域。为了筛选结合2C4表位的抗体,可以实施诸如记载于Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow和David Lane (1988)的常规交叉阻断测定法。或者,可以实施表位定位以评估抗体是否结合HER2的2C4表位。表位2C4包含来自HER2的胞外域中的II域的残基。2C4和帕妥珠单抗在I、II和III域接合处结合HER2的胞外域(Franklin等Cancer Cell 5:317-328 (2004))。

[0144] “生长抑制剂”在本文中使用时指在体外或在体内抑制细胞,尤其是表达HER的癌细胞生长的化合物或组合物。如此,生长抑制剂可以是显著降低处于S期的表达HER的细胞的百分比的。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进(处于S期以外的位置)的药剂,诸如诱导G1阻滞和M期阻滞的药剂。经典的M期阻断剂包括长春药类(长春新碱和长春碱)、紫杉烷(taxane)、和拓扑异构酶II抑制剂,诸如多柔比星、表柔比星、柔红霉素、依托泊苷、和博来霉素。那些阻滞G1的药剂也溢出进入S期停滞,例如DNA烷化剂类诸如他莫昔芬(tamoxifen)、泼尼松(prednisone)、达卡巴嗪(dacarbazine)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、顺铂(cisplatin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)和ara-C。更多信息可见“The Molecular Basis of Cancer”, Mendelsohn和Israel编,第1章,题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”, Murakami等(WB Saunders: Philadelphia, 1995), 尤其是第13页。

[0145] “生长抑制性”抗体的例子是那些结合HER2并抑制过表达HER2的癌细胞生长的抗体。优选的生长抑制性HER2抗体在约0.5至30 $\mu$ g/ml的抗体浓度时将细胞培养物中的SK-BR-3乳腺肿瘤细胞的生长抑制大于20%,且优选地大于50%(例如约50%至约100%),其中在将SK-BR-3细胞暴露于抗体后6天测定生长抑制(见1997年10月14日公告的美国专利No. 5,677,171)。优选的生长抑制性抗体是鼠单克隆抗体4D5的人源化变体,例如曲妥单抗。

[0146] “治疗/处理”指治疗性处理和防范性或预防性措施两者。需要治疗的对象包括那些已经患有疾病的对象及那些要预防疾病的对象。因此,本文中要治疗的患者可以已经诊断为患有疾病或者可以有疾病的素因或者对疾病易感。

[0147] 如本文中所使用的,术语“细胞毒剂”指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括放射性同位素(例如At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>和Lu的放射性同位素)、化疗剂、和毒素诸如细菌、真菌、植物或动物起源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体。

[0148] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类

(alkylating agents), 诸如塞替派(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide)(CYTOXAN<sup>TM</sup>); 磺酸烃基酯类(alkyl sulfonates), 诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan); 氮丙啶类(aziridines), 诸如苯佐替派(benzodepa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedpa)和乌瑞替派(uredepa); 乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines), 包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine); 番荔枝内酯类(acetogenin)(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));  $\delta$ -9-四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚(dronabinol), MARINOL<sup>TM</sup>);  $\beta$ -拉帕醌(lapachone); 拉帕醇(lapachol); 秋水仙素类(colchicines); 白桦脂酸(betulinic acid); 喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物托泊替康(topotecan)(HYCAMTIN<sup>TM</sup>)、CPT-11(伊立替康(irinotecan), CAMPTOSAR<sup>TM</sup>)、乙酰喜树碱、东莨菪亭(scopoletin)和9-氨基喜树碱); 苔藓抑素(bryostatin); callystatin; CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物); 鬼臼毒素(podophyllotoxin); 鬼臼酸(podophyllinic acid); 替尼泊昔(teniposide); 隐藻素类(cryptophycins)(特别是隐藻素1和隐藻素8); 多拉司他汀(dolastatin); duocarmycin(包括合成类似物, KW-2189和CB1-TM1); 艾榴塞洛素(eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素(spongistatin); 氮芥类(nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard); 亚硝脲类(nitrosoureas), 诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine); 抗生素类, 诸如烯二炔类抗生素(enediyne)(例如加利车霉素(calicheamicin), 尤其是加利车霉素 $\gamma$ 11和加利车霉素 $\omega$ 11(见例如Angew, Chemie Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994))); 蒽环类抗生素(dynemicin), 包括蒽环类抗生素A; 埃斯波霉素(esperamicin); 以及新制癌素(neocarzinostatin)发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(anthracycline)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、carabicin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin)(包括ADRIAMYCIN<sup>TM</sup>、吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星和盐酸多柔比星脂质体注射液(DOXIL<sup>TM</sup>)、脂质体多柔比星TLC D-99(MYOCET<sup>TM</sup>)、PEG化的脂质体多柔比星(CAELYX<sup>TM</sup>)、和脱氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)诸如丝裂霉素C、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、

potfiromycin、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨蝶呤、吉西他滨 (gemcitabine) (GEMZAR<sup>TM</sup>)、替加氟 (tegafur) (UFTORAL<sup>TM</sup>)、卡培他滨 (capecitabine) (XELODA<sup>TM</sup>)、埃博霉素 (epothilone) 和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨蝶呤、蝶酰三谷氨酸 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine); 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸 (folinic acid); 醋葡醛内酯 (aceglatone); 醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺 (defofamine); 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); elfornithine; 依利醋铵 (elliptinium acetate); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidainine); 美登木素生物碱类 (maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocin); 米托胍脘 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidamol); 二胺硝吡啶 (nitracrine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 2-乙基酰肼 (ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); PSK<sup>TM</sup> 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西索菲兰 (sizofiran); 螺旋锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类 (trichothecenes) (尤其是 T-2 毒素、疣孢菌素 (verrucarin) A、杆孢菌素 (roridin) A 和蛇行菌素 (anguidin)); 乌拉坦 (urethan); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露醇氮芥 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinoside) (“Ara-C”); 塞替派 (thiotepa); 类紫杉醇 (taxoid), 例如帕利他塞 (paclitaxel) (TAXOL<sup>TM</sup>)、清蛋白改造的纳米颗粒剂型帕利他塞 (ABRAXANE<sup>TM</sup>) 和多西他塞 (doxetaxel) (TAXOTERE<sup>TM</sup>); 苯丁酸氮芥 (chloranbucil); 6-硫鸟嘌呤 (thioguanine); 巯基嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨蝶呤 (methotrexate); 铂剂, 诸如顺铂 (cisplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin) 和卡铂 (carboplatin); 长春药类 (vincas) (其阻止微管蛋白聚合形成微管), 包括长春碱 (vinblastine) (VELBAN<sup>TM</sup>)、长春新碱 (vincristine) (ONCOVIN<sup>TM</sup>)、长春地辛 (vindesine) (ELDISINE<sup>TM</sup>)、FILDESIN<sup>TM</sup>、和长春瑞滨 (vinorelbine) (NAVELBINE<sup>TM</sup>); 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 亚叶酸 (leucovorin); 能灭瘤 (novantrone); 依达曲沙 (edatrexate); 道诺霉素 (daunomycin); 氨基蝶呤 (aminopterin); 伊本膦酸盐 (ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类视黄酸 (retinoids), 诸如视黄酸 (retinoic acid), 包括贝沙罗汀

(bexarotene) (TARGRETIN<sup>TM</sup>); 二膦酸盐类(bisphosphonates), 诸如氯膦酸盐(clodronate) (例如BONEFOS<sup>TM</sup>或OSTAC<sup>TM</sup>)、依替膦酸钠(etidronate) (DIDROCAL<sup>TM</sup>)、NE-58095、唑来膦酸/唑来膦酸盐(zoledronic acid/zoledronate) (ZOMETA<sup>TM</sup>)、阿伦膦酸盐(alendronate) (FOSAMAJX<sup>TM</sup>)、帕米膦酸盐(pamidronate) (AREDIA<sup>TM</sup>)、替鲁膦酸盐(tiludronate) (SKELID<sup>TM</sup>)或利塞膦酸盐(risedronate) (ACTONEL<sup>TM</sup>); 曲沙他滨(troxacitabine) (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是抑制牵涉异常(abherent) 细胞增殖的信号传导途径中的基因表达的反义寡核苷酸, 诸如例如PKC- $\alpha$ 、Raf、H-Ras和表皮生长因子受体(EGF-R); 疫苗, 诸如THERATOPE<sup>TM</sup>疫苗和基因疗法疫苗, 例如ALLOVECTIN<sup>TM</sup>疫苗、LEUVECTIN<sup>TM</sup>疫苗和VAXID<sup>TM</sup>疫苗; 拓扑异构酶1抑制剂(例如LURTOTECAN<sup>TM</sup>); rmRH(例如ABARELIX<sup>TM</sup>); BAY439006(索拉非尼(sorafenib); Bayer); SU-11248(Pfizer); 哌立福辛(perifosine)、COX-2抑制剂(例如塞来考昔(celecoxib)或依托昔布(etoricoxib))、蛋白体抑制剂(例如PS341); 保特佐米(bortezomib) (VELCADE<sup>TM</sup>); CCI-779; 替吡法尼(tipifarnib) (R1 1577); orafenib、ABT510; Bcl-2抑制剂诸如奥利默森钠(oblimersen sodium) (GENASENSE<sup>TM</sup>); pixantrone; EGFR抑制剂(见下文定义); 酪氨酸激酶抑制剂(见下文定义); 及任何上述物质的药学可接受盐、酸或衍生物; 以及两种或更多种上述物质的组合, 诸如CHOP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写)和FOLFOX(奥沙利铂(ELOXATIN<sup>TM</sup>)联合5-FU和亚叶酸的治疗方案的缩写)。

[0149] 该定义还包括作用为调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂, 诸如具有混合的激动剂/拮抗剂概况的抗雌激素, 包括他莫昔芬(tamoxifen) (NOLVADEX<sup>TM</sup>)、4-羟基他莫昔芬、托瑞米芬(toremifene) (FARESTON<sup>TM</sup>)、艾多昔芬(idoxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、雷洛昔芬(raloxifene) (EVTSTA<sup>TM</sup>)、曲沃昔芬(trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、和选择性雌激素受体调节剂类(SERM) 诸如SERM3; 没有激动剂特性的纯抗雌激素, 诸如氟维司群(fulvestrant) (FASLODEX<sup>TM</sup>)、和EM800(此类药剂可以阻断雌激素受体(ER) 二聚化、抑制DNA结合、提高ER周转、和/或阻抑ER水平); 芳香酶抑制剂, 包括类固醇芳香酶抑制剂诸如福美坦(formestane)和依西美坦(exemestane) (AROMASIN<sup>TM</sup>)、和非类固醇芳香酶抑制剂诸如阿那曲唑(anastrozole) (ARIMIDEX<sup>TM</sup>)、来曲唑(letrozole) (FEMARA<sup>TM</sup>)和氨鲁米特(aminoglutethimide)、和其它芳香酶抑制剂, 包括伏罗唑(vorozole) (RIVISOR<sup>TM</sup>)、醋酸甲地孕酮(megestrol acetate) (MEGASE<sup>TM</sup>)、法倔唑(fadrozole)、咪唑; 促黄体生成激素释放激素激动剂, 包括醋酸亮丙瑞林(leuprolide) (LUPRON<sup>TM</sup>和ELIGARD<sup>TM</sup>)、戈舍瑞林(goserelin)、布舍瑞林(buserelin)、和曲普瑞林(triptorelin); 性类固醇, 包括妊娠素(progestines) 诸如醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)和醋酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate)、雌激素诸如己烯雌酚(diethylstilbestrol)和倍美力(premarin)、和雄激素/类视黄醇诸如氟甲睾酮、全反视黄酸(transretionic acid)和芬维A胺(fenretinide); 奥那司酮(onapristone); 抗孕酮; 雌激素受体下调剂(ERD); 抗雄激素诸如氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)和比卡米特(bicalutamide); 睾内酯(testolactone); 及任何上述物质的药学可接受盐、酸或衍生物; 以及两种或更多种上述物质的组合。

[0150] 如本文中所使用的, 术语“EGFR靶向药物”指结合EGFR并任选地抑制EGFR活化的治疗剂。此类药剂的例子包括结合EGFR的抗体和小分子。结合EGFR的抗体的例子包括单抗579

(ATCC CRL HB 8506)、单抗455(ATCC CRL HB8507)、单抗225(ATCC CRL 8508)、单抗528(ATCC CRL8509)(见美国专利No.4,943,533,Mendelsohn等)及其变体,诸如嵌合化225(C225或西妥昔单抗(Cetuximab);ERBITUX<sup>TM</sup>)和重构人225(H225)(见WO 96/40210,Imclone Systems Inc.);结合II型突变体EGFR的抗体(美国专利No.5,212,290);结合EGFR的人源化的和嵌合的抗体,如美国专利No.5,891,996中所描述的;和结合EGFR的人抗体,诸如ABX-EGF(见W098/50433,Abgenix)。抗EGFR抗体可以与细胞毒剂缀合,如此生成免疫缀合物(见例如EP-A-659439,Merck Patent GmbH)。结合EGFR的小分子的例子包括ZD 1839或吉非替尼(Gefitinib)(IRESSA<sup>TM</sup>;Astra Zeneca)、CP-358774或盐酸厄洛替尼(Erlotinib HCl)(TARCEVA<sup>TM</sup> Genentech/Roche/OSI)和AG1478,AG1571(SU 5271;Sugen)。

[0151] “酪氨酸激酶抑制剂”指以某种程度抑制酪氨酸激酶诸如HER受体的酪氨酸激酶活性的分子。此类抑制剂的例子包括上一段中记录的EGFR靶向药物及小分子HER2酪氨酸激酶抑制剂诸如可获自Takeda的TAK165、优先结合EGFR但抑制HER2和EGFR二者过表达细胞的双重HER抑制剂诸如EKB-569(可获自Wyeth)、GW572016(可获自Glaxo),一种口服HER2和EGFR酪氨酸激酶抑制剂、和PKI-166(可获自Novartis);泛HER(pan-HER)抑制剂诸如卡奈替尼(canertinib)(CI-1033;Pharmacia);Raf-1抑制剂,诸如可获自ISIS Pharmaceuticals的、抑制Raf-1信号传导的反义剂ISIS-5132;非HER靶向TK抑制剂,诸如可获自Novartis的甲磺酸伊马替尼(Imatinib mesylate)(Gleevec<sup>TM</sup>);MAPK胞外调节激酶I抑制剂CI-1040(可获自Pharmacia);喹唑啉类,诸如PD 153035,4-(3-氯苯胺基)喹唑啉;吡啶并嘧啶类;嘧啶并嘧啶类;吡咯并嘧啶类,诸如CGP 59326、CGP 60261和CGP 62706;吡啶并嘧啶类,4-(苯氨基)-7H-吡咯[2,3-d]嘧啶;姜黄素(二阿魏酰甲烷,4,5-双(4-氟苯胺基)-酞亚胺);含硝基噻吩模块的tyrphostines;PD-0183805(Warner-Lambert);反义分子(例如那些结合HER编码核酸的反义分子);喹啉类(美国专利No.5,804,396);tryphostins(美国专利No.5,804,396);ZD6474(Astra Zeneca);PTK-787(Novartis/Schering AG);泛HER抑制剂,诸如CI-1033(Pfizer);Affinitac(ISIS 3521;Isis/Lilly);PKI 166(Novartis);GW2016(Glaxo SmithKline);CI-1033(Pfizer);EKB-569(Wyeth);司马沙尼(Semaxinib)(Sugen);ZD6474(AstraZeneca);PTK-787(Novartis/Schering AG);INC-IC11(Imclone);或任何如下专利出版物中所记载的:美国专利No.5,804,396;W099/09016(American Cyanamid);W098/43960(American Cyanamid);W097/38983(Warner Lambert);W099/06378(Warner Lambert);W099/06396(Warner Lambert);W096/30347(Pfizer, Inc);W096/33978(Zeneca);W096/3397(Zeneca);及W096/33980(Zeneca)。

[0152] “抗血管生成剂”指以某种程度阻断或干扰血管形成的化合物。例如,抗血管生成因子可以是结合牵涉促进血管发生的生长因子或生长因子受体的小分子或抗体。本文中优选的抗血管生成因子是结合血管内皮生长因子(VEGF)的抗体,诸如贝伐单抗(AVASTIN<sup>TM</sup>)。

[0153] 术语“细胞因子”指由一种细胞群体释放的作为细胞间介导体对另一细胞起作用的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子是淋巴因子、单核因子、和传统的多肽激素。细胞因子中包括生长激素诸如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素、和牛生长激素、甲状旁腺素、甲状腺素、胰岛素、胰岛素原、松弛素;松弛素原、糖蛋白激素诸如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)、和黄体生成素(LH)、肝生长因子;成纤维细胞生长因子、促乳素、胎盘催乳素、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和 $\beta$ 、Mullerian抑制物质、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素;激活蛋白、血

管内皮生长因子、整联蛋白、血小板生成素(TPO)、神经生长因子诸如NGF- $\beta$ 、血小板生长因子;转化生长因子(TGF)诸如TGF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ 、胰岛素样生长因子-I和-II、红细胞生成素(EPO)、骨诱导因子;干扰素诸如干扰素- $\alpha$ 、- $\beta$ 和- $\gamma$ 、集落刺激因子(CSF)诸如巨噬细胞-CSF(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF)、和粒细胞-CSF(G-CSF)、白介素(IL)诸如IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, 肿瘤坏死因子诸如TNF- $\alpha$ 或TNF- $\beta$ , 及其它多肽因子, 包括LIF和kit配体(KL)。如本文中所使用的, 术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物学活性等同物。

[0154] 术语“有效量”指提供期望效果的量。在配制剂成分诸如依照本发明的透明质酸酶酶的情况下, 有效量是以如下方式提高共施用的抗HER2抗体的分散和吸收, 使得抗HER2抗体能以治疗有效方式起作用必需的量, 如上文所概述的。在药用药物物质的情况中, 它是活性成分有效治疗患者中的疾病的量。在疾病是癌症的情况中, 药物的有效量可以降低癌细胞的数目;降低肿瘤大小;抑制(即以某种程度减缓且优选地停止)癌细胞浸润入周围器官中;抑制(即以某种程度减缓且优选地停止)肿瘤转移;以某种程度抑制肿瘤生长;和/或以某种程度减轻一种或多种与癌症有关的症状。就药物可以阻止生长和/或杀死存在的癌细胞的程度而言, 它可以是细胞抑制的和/或细胞毒性的。有效量可以延长无进展存活, 产生客观响应(包括部分响应PR或完全响应CR), 增加总体存活时间, 和/或改善一种或多种癌症症状。

[0155] 依照本发明配制的抗体优选是基本上纯的, 且期望地基本上同质的(即没有污染性蛋白质等, 其中认为依照本发明的配制剂中的透明质酸酶酶不是依照本发明的抗HER2单克隆抗体的污染性蛋白质)。“基本上纯的”抗体意指包含至少约90%(按重量计), 优选地至少约95%(按重量计)的抗体(基于组合物的总重量)的组合物。“基本上同质的”抗体意指包含至少约99%(按重量计)的抗体(基于组合物的总重量)的组合物。

[0156] 本发明通过参照以下实施例会得到更完整的理解。然而, 它们不应解释为限制本发明的范围。通过提及而将所有文献和专利引用收入本文。

[0157] 附图简述

[0158] 通过附图进一步例示实施例, 附图显示以下实验结果:

[0159] 图1: 就通过大小排阻-HPLC检出的低分子量(LMW)种类而言配制剂A至F(见下文表1)在8周后的稳定性。如此图中所显示的, 在于30°C贮存后, PS20配制剂A、C和E比PS80配制剂B、D和F显示略好的稳定性。

[0160] 图2: 就通过大小排阻-HPLC检出的高分子量(HMW)种类而言配制剂A至F(见下文表1)在8周后的稳定性。如此图中所显示的, 含有海藻糖而没有添加氯化钠的配制剂A和B在8周贮存时间后显示较小的HMW增加。

[0161] 图3: 就浊度而言在8周后的稳定性。如此图中所显示的, 含有海藻糖的配制剂A和B显示低浊度;而含有NaCl的配制剂C至F显示高得多的浊度。含有海藻糖及NaCl的配制剂E和F显示中间的浊度。在贮存8周后没有观察到显著升高。

[0162] 图4: 液体配制剂A至F(见下文表1)的粘度, 如通过于周围温度使用板-锥(plate-cone)粘度测定法所测量的。所有配制剂在容许皮下注射的低粘度范围内。

## 实施例

[0163] 使用如下文所概述的通用制备和分析方法和测定法,基于如下文所提供的实验结果开发依照本发明的供皮下施用的抗HER2配制剂。

[0164] A) 制备配制剂的组分

[0165] 通过一般已知用于生成重组蛋白的技术来制造曲妥单抗。自母细胞库将如在EP-B-590058中所描述的那样制备的经遗传工程改造的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)系在细胞培养物中扩充。自细胞培养物流体收获曲妥单抗单克隆抗体,并使用固定化的蛋白A亲和层析、阳离子交换层析(例如SP-Sepharose FF)、除去病毒污染的过滤步骤(例如PVDF膜(由Milipore以名称Virosolve滤器销售)),接着进行阴离子交换层析(例如Q-Sepharose FF)和超滤/渗滤步骤来纯化。为了制备依照这些实施例的配制剂,在20mM组氨酸缓冲液(pH约6.0)中以约100mg/ml的浓度提供曲妥单抗。

[0166] 通过一般已知用于生成重组蛋白的技术制造rHuPH20。该方法以自工作细胞库(WCB)或母细胞库(MCB)融化细胞开始,并经由在一系列转瓶中细胞培养来扩充,接着在生物反应器中扩充。在完成生产阶段后,通过过滤使细胞培养物液体澄清,然后用溶剂/去污剂处理以使病毒灭活。然后,通过一系列柱层析工艺来纯化蛋白质以除去工艺和产品相关杂质。实施病毒过滤步骤,然后将过滤后的散剂浓缩,配制入最终的缓冲液:20mM L-组氨酸/HCl缓冲液,pH 6.5、130mM NaCl、0.05% (w/v) 聚山梨酯80中的10mg/mL rHuPH20。将rHuPH20散剂在-70°C之下贮存。

[0167] 依照本发明的配制剂的其它赋形剂在实践中广泛使用,并且是本领域技术人员已知的。因此,不需要在这里详细解释它们。

[0168] 如下开发依照本发明的供皮下施用的液体药物产品配制剂。

[0169] 实施例1:液体配制剂的制备

[0170] 为了制备液体配制剂,将曲妥单抗针对含有预期的缓冲液组成的渗滤缓冲液进行缓冲液交换,并且在需要时,通过渗滤浓缩成约150mg/ml的抗体浓度。完成渗滤操作后,将赋形剂(例如海藻糖、rHuPH20)以储备溶液添加至抗体溶液。然后,以50至200倍储备溶液添加表面活性剂。最后,用缓冲液将蛋白质浓度调节至约110mg/ml、120mg/ml或130mg/ml的最终曲妥单抗浓度,如下文进一步的特定配制剂中规定的。

[0171] 将所有配制剂无菌过滤通过0.22 $\mu$ m低蛋白质结合滤器,并在无菌条件下填充入无菌6ml玻璃管形瓶中,用经ETFE(乙烯和四氟乙烯的共聚物)包被的橡胶塞和Alucrimp帽密封。填充体积是约3.0ml。将这些配制剂在不同气候条件(5°C、25°C和30°C)贮存不同时间间隔,并通过摇动(于5°C和25°C以200min<sup>-1</sup>的摇动频率持续1周)和冷冻-融化压力法来施压。在应用压力测试之前和之后通过下列分析方法来分析样品:

[0172] 1) UV分光光度法;

[0173] 2) 大小排阻层析(SEC);

[0174] 3) 通过离子交换层析(IEC);

[0175] 4) 通过溶液的浊度;

[0176] 5) 在可见颗粒方面;及

[0177] 6) 在rHuPH20活性方面。

[0178] 在Perkin Elmer $\lambda$ 35UV分光光度计上以240nm至400nm的波长范围实施用于测定蛋

白质含量的UV分光术。用相应的配制剂缓冲液将纯的蛋白质样品稀释至约0.5mg/ml。依照等式1计算蛋白质浓度。

[0179] 等式1:

$$\text{蛋白质含量} = \frac{A(280) - A(320) \times \text{稀释因子}}{\epsilon \left( \frac{\text{cm}^2}{\text{mg}} \right) \times d \langle \text{cm} \rangle}$$

[0180] 针对320nm的光散射校正280nm的UV光吸收,并乘以稀释因子(其自纯样品和稀释缓冲液的加权质量和密度确定)。用分子除以比色皿的路径长度d和消光系数 $\epsilon$ 的乘积。

[0181] 使用大小排阻层析(SEC)来检测配制剂中的可溶性高分子量种类(聚集体)和低分子量水解产物(LMW)。在具有Waters W2487双吸光度检测仪并装备有2个行内TosoHaas TSK凝胶SuperSW3000,4,6x300mm柱的Waters Alliance 2695 HPLC仪上实施该方法。使用50mM磷酸钠、420mM高氯酸钠,pH 7.0作为流动相通过等度洗脱概况来分开完整的单体、聚集体和水解产物,并于280nm的波长检测。

[0182] 实施离子交换层析(IEC)以检测配制剂中改变曲妥单抗的净电荷的化学降解产物。出于此目的,用羧肽酶B消化曲妥单抗。该方法使用装备有UV检测仪(检测波长214nm)和Dionex ProPac™ WCX-10分析用阳离子交换柱(4x250mm)的合适的HPLC仪。分别使用H<sub>2</sub>O中的10mM磷酸钠缓冲液pH 7.5和10mM磷酸钠缓冲液pH 7.5和100mM NaCl作为流动相A和B,流动速率为0.8ml/分钟。

[0183] 为了测定浊度,于室温使用HACH 2100AN浊度计以FTU(浊度单位)测量乳光。

[0184] 通过使用Seidenader V90-T目视检查仪对样品分析可见颗粒。

[0185] 使用rHuPH20作为透明质酸酶的体外酶测定法作为活性测定法。该测定法基于在乙酰透明质酸(透明质酸钠)结合阳离子沉淀剂时形成不溶性沉淀物。通过将rHuPH20与乙酰透明质酸底物一起温育,然后用酸化的血清清蛋白(马血清)沉淀未消化的乙酰透明质酸来测量酶活性。以640nm的波长测量浊度,并且源自对乙酰透明质酸底物的酶活性的浊度降低是酶活性的测量。使用用rHuPH20测定参照标准品的稀释物产生的标准曲线运行该规程,并自曲线阅读样品活性。

[0186] 实施进一步的实验,包括下列变化:

[0187] -约5.0至约6.0的pH变化

[0188] -约110mg/ml至约130mg/ml的蛋白质含量变化

[0189] -约0.02%至约0.06%的表面活性剂变化

[0190] -约5mM至约15mM的稳定剂(甲硫氨酸)变化

[0191] 下文表1中提供了液体抗HER-2药物产品配制剂(配制剂A至X)的组成和稳定性测试的结果,其中使用下列缩写:

[0192] ffp:=没有颗粒;effp:=基本上没有颗粒;wafp:=具有少许颗粒

[0193] F/T:=冷冻/融化;skg:=摇动;nd:=未测定

[0194] 下文规定的配制剂显示了,有可能提供具有高浓度的两种不同蛋白质的液体配制剂。可以比冻干配制剂以更大的便利且更低的成本制备此类配制剂。此外,此类配制剂更易于处理,因为不需要溶解冻干的终产物(重建)(准备好使用)。已经发现了,表1、3和4中规定的配制剂也适合于配制缺乏透明质酸酶酶的药学活性抗HER2抗体的高度浓缩的稳定的药物配制剂。因此,在一方面,本发明还涉及具有规定的成分,但是缺乏透明质酸酶酶的配制剂。

[0195]

表1: 依照本发明的液体抗HER2药物配制剂的组成和稳定性数据

配制剂A是一种具有组成120mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.5、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、10mM甲硫氨酸、0.04%聚山梨酯20、12'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			浊度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	111	0.4	98.9	0.7	60	15	10	5.0	ffp	13613
5°C	1周	nd	0.4	98.7	0.9	nd	nd	nd	5.2	ffp	13775
5°C	1周	nd	0.4	98.7	0.9	60	11	12	5.7	ffp	12053
5°C	F/T (5个循环)	nd	0.4	98.7	0.9	nd	nd	nd	6.0	effp	12558
5°C	8周	105	0.4	98.5	1.1	60	15	11	4.8	ffp	13204
5°C	21周	nd	0.4	98.7	0.8	62	12	11	5.3	ffp	14940
5°C	36周	nd	0.4	98.7	0.8	59	11	12	3.8	ffp	12613
5°C	8周	106	0.5	98.3	1.2	53	8	19	4.7	ffp	12176
25°C	21周	nd	0.6	97.7	1.7	42	7	26	5.2	ffp	13976
25°C	36周	nd	0.7	97.2	2.1	33	7	34	3.8	ffp	12348
30°C	8周	105	0.6	97.8	1.6	45	6	26	4.4	ffp	13294
30°C	21周	107	0.8	96.3	2.9	33	6	25	5.5	ffp	nd

[0196]

**配制剂B**是一种具有组成120mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.5、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、10mM甲硫氨酸、0.06%聚山梨酯80、12'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			浊度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	111	0.4	98.9	0.7	59	15	10	4.4	ffp	13293
Skgs 5°C	1周	nd	0.4	98.7	0.9	nd	nd	nd	5.2	ffp	13530
Skgs 25°C	1周	nd	0.4	98.7	0.8	61	12	12	5.2	ffp	9390
F/T	(5个循环)	nd	0.4	98.7	0.9	nd	nd	nd	5.5	ffp	12532
5°C	8周	109	0.4	98.7	0.9	60	15	11	5.1	ffp	13508
	21周	nd	0.5	98.8	0.8	nd	nd	nd	5.3	ffp	nd
	36周	nd	0.4	98.8	0.8	nd	nd	nd	4.5	ffp	nd
25°C	8周	109	0.5	98.2	1.3	53	8	19	4.6	ffp	nd
	21周	nd	0.7	97.6	1.8	nd	nd	nd	5.2	effp	nd
	36周	nd	0.8	97.1	2.1	nd	nd	nd	5.3	ffp	nd
30°C	8周	109	0.6	97.7	1.7	45	6	26	4.8	ffp	13394
	21周	107	0.9	96.2	2.9	nd	nd	nd	5.3	ffp	nd

[0197]

**配制剂C**是一种具有组成120mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCL pH 5.5、130mM氯化钠、10mM甲硫氨酸、0.04%聚山梨酯20、12'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	129	0.5	98.8	0.7	59	15	10	24.2	ffp	12355
Skg 5°C	1周	nd	0.5	98.6	0.9	nd	nd	nd	26.0	ffp	13123
Skg 25°C	1周	nd	0.5	98.5	0.9	60	12	11	25.3	ffp	12209
F/T	(5个循环)	nd	0.5	98.6	0.9	nd	nd	nd	24.8	ffp	12576
5°C	8周	126	0.5	98.7	0.8	60	15	11	25.4	ffp	12463
	21周	nd	0.6	98.4	1.0	62	13	9	23.6	ffp	15409
	36周	nd	0.6	98.6	0.8	59	12	12	26.3	ffp	13218
25°C	8周	125	0.7	98.0	1.3	54	9	18	25.0	ffp	13038
	21周	nd	0.9	97.5	1.6	42	9	22	24.3	ffp	14972
	36周	nd	1.0	97.0	2.1	32	9	31	25.7	ffp	12028
30°C	8周	125	0.8	97.6	1.6	46	8	25	23.0	ffp	12751
	21周	125	1.2	96.3	2.6	32	8	29	25.7	ffp	nd

[0198]

**配制剂D**是一种具有组成120mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.5、130mM氯化钠、10mM甲硫氨酸、0.06%聚山梨酯80、12'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	128	0.4	98.9	0.7	59	15	10	25.1	ffp	15178
Skg 5°C	1周	nd	0.5	98.6	0.9	nd	nd	nd	24.1	effp	12201
Skg 25°C	1周	nd	0.6	98.5	0.9	60	12	11	25.4	effp	8311
F/T	(5个循环)	nd	0.5	98.6	0.9	nd	nd	nd	24.8	effp	11906
5°C	8周	125	0.5	98.7	0.8	60	15	11	25.0	ffp	13238
	21周	nd	0.6	98.5	1.0	nd	nd	nd	24.3	ffp	nd
	36周	nd	0.6	98.6	0.8	nd	nd	nd	26.1	ffp	nd
25°C	8周	125	0.7	98.1	1.2	54	9	18	23.4	ffp	12661
	21周	nd	0.9	97.3	1.8	nd	nd	nd	24.5	ffp	nd
	36周	nd	1.1	96.8	2.1	nd	nd	nd	26.6	ffp	nd
30°C	8周	124	0.9	97.5	1.7	45	8	25	23.7	ffp	12182
	21周	125	1.3	96.1	2.6	nd	nd	nd	24.2	effp	nd

[0199]

**配制剂E**是一种具有组成120mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.5、105mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、65mM氯化钠、10mM甲硫酸、0.04%聚山梨酯20、12'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC				离子交换-HPLC				油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)					
-	初始	128	0.4	98.9	0.7	59	15	10	16.6	ffp	13475		
Skg 5°C	1周	nd	0.5	98.6	0.9	nd	nd	nd	17.2	ffp	12363		
Skg 25°C	1周	nd	0.5	98.5	1.0	60	12	11	17.2	effp	12793		
F/T	(5个循环)	nd	0.5	98.6	0.9	nd	nd	nd	16.5	effp	12374		
5°C	8周	125	0.5	98.7	0.8	60	15	11	16.9	ffp	13086		
	21周	nd	0.5	98.6	0.9	61	13	11	16.4	ffp	14896		
	36周	nd	0.5	98.7	0.8	59	12	12	16.5	ffp	13321		
25°C	8周	125	0.7	98.1	1.2	53	9	18	15.4	ffp	nd		
	21周	nd	0.8	97.5	1.7	41	8	29	19.2	ffp	14730		
	36周	nd	0.9	97.0	2.1	32	9	32	17.4	ffp	12028		
30°C	8周	124	0.8	97.7	1.5	45	8	25	15.7	ffp	11745		
	21周	123	1.1	96.3	2.6	32	8	24	17.4	ffp	nd		

[0200]

**配制剂F**是一种具有组成120mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.5、105mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、65mM氯化钠、10mM甲磺氨酸、0.06%聚山梨酯80、12'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	127	0.4	98.9	0.7	59	15	10	16.7	effp	13069
5°C	1周	nd	0.5	98.6	0.9	nd	nd	nd	16.0	ffp	13188
5°C	1周	nd	0.5	98.6	0.9	60	12	11	15.8	ffp	9764
F/T	(5个循环)	nd	0.5	98.7	0.8	nd	nd	nd	18.5	ffp	11769
5°C	8周	125	0.5	98.7	0.8	60	15	11	16.5	ffp	nd
	21周	nd	0.6	98.6	0.9	nd	nd	nd	16.6	ffp	nd
	36周	nd	0.6	98.7	0.8	nd	nd	nd	17.2	ffp	nd
25°C	8周	125	0.7	98.1	1.2	53	9	18	17.4	ffp	13570
	21周	nd	0.9	97.4	1.7	nd	nd	nd	16.4	ffp	nd
	36周	nd	1.0	96.9	2.1	nd	nd	nd	18.3	ffp	nd
30°C	8周	124	0.8	97.5	1.7	45	8	25	16.2	ffp	11860
	21周	123	1.8	95.6	2.9	nd	nd	nd	16.1	ffp	nd

[0201]

**配制剂G**是一种具有组成120mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.5、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、10mM甲硫酸、0.04%聚山梨酯20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			浊度 (FTU)	可见颗粒
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)		
-	初始	122	0.3	99.7	nd	71	11	7	4.2	ffp
	4周	nd	0.3	99.6	nd	60	11	11	nd	nd
5°C	12周	118	0.4	99.6	<0.3	70	10	7	4.8	ffp
	24周	121	0.4	99.5	nd	68	9	9	4.1	ffp
	36周	nd	0.5	99.5	0.1	67	8	10	nd	nd
	4周	nd	0.4	99.6	nd	70	10	7	nd	nd
15°C	12周	121	0.5	99.4	<0.3	66	8	11	4.3	ffp
	24周	121	0.5	99.3	<0.3	59	7	17	4.4	ffp
	36周	nd	0.6	99.2	0.2	53	7	22	nd	nd
	4周	nd	0.5	99.5	<0.3	66	7	11	nd	nd
25°C	12周	121	0.6	97.2	2.1	53	6	22	4.2	ffp
	24周	122	0.7	98.0	1.4	39	6	32	4.2	ffp

及来自具有下列组成的散剂的rHuPH20在注射前添加:

20mM His/组氨酸 HCl, pH 6.5、130mM NaCl、0.05% (w/v) 聚山梨酯80中的10mg/ml rHuPH20

[0202]

**配制剂H**是一种具有组成110mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.0、210mM二水合 $\alpha_3\alpha_5$ -海藻糖、5mM甲硫氨酸、0.02%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			浊度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	111	0.6	98.7	0.8	69	12	6	3.9	ffp	2081
Skgs 5°C	1周	nd	0.6	98.7	0.7	68	12	6	3.9	ffp	2406
Skgs 25°C	1周	nd	0.7	98.6	0.7	68	10	7	3.8	ffp	nd
F/T	(5个循环)	nd	0.7	98.7	0.7	68	12	6	3.8	ffp	2167
5°C	8周	nd	0.6	98.8	0.6	69	10	8	4.0	ffp	2235
	12周	110	0.6	98.7	0.7	66	10	9	3.9	ffp	1970
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	0.7	98.3	1.0	57	5	15	4.1	ffp	1891
	12周	111	0.7	97.8	1.5	50	4	20	3.8	ffp	2079
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.4	94.1	4.5	31	3	30	4.1	ffp	nd
	12周	111	1.6	92.5	5.9	28	5	35	4.7	ffp	nd

[0203]

**配制剂I**是一种具有组成110mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 6.0、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、5mM甲硫氨酸、0.02%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			浊度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	111	0.8	98.5	0.7	69	12	7	4.7	effp	1948
Skg 5°C	1周	nd	0.8	98.6	0.7	68	12	7	5.1	ffp	2672
Skg 25°C	1周	nd	0.8	98.6	0.7	67	11	8	4.7	ffp	1724
F/T	(5个循环)	nd	0.8	98.6	0.7	68	12	7	4.5	ffp	2507
5°C	8周	nd	0.8	98.6	0.6	68	11	8	4.5	ffp	1911
	12周	112	0.8	98.5	0.7	65	11	10	4.7	ffp	2034
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	0.9	98.1	1.0	53	12	18	4.8	effp	1910
	12周	111	1.0	97.8	1.2	45	12	21	4.9	ffp	2157
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.6	95.3	3.1	26	9	26	5.0	ffp	nd
	12周	112	1.9	93.9	4.3	20	9	22	5.7	ffp	nd

[0204]

**配制剂J**是一种具有组成110mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.0、210mM二水合 $\alpha_1$ -海藻糖、5mM甲硫氨酸、0.06%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			浊度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	111	0.6	98.7	0.7	69	12	6	3.7	ffp	2198
Sk 5°C	1周	nd	0.6	98.6	0.7	68	12	6	4.3	effp	2528
Sk 25°C	1周	nd	0.6	98.6	0.8	68	10	7	4.0	effp	1993
F/T	(5个循环)	nd	0.7	98.7	0.7	68	12	6	3.7	ffp	2256
5°C	8周	nd	0.6	98.8	0.6	68	10	8	4.1	ffp	2263
	12周	111	0.6	98.6	0.8	66	10	9	3.9	ffp	2337
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	0.7	98.3	1.0	56	5	15	4.0	ffp	1931
	12周	111	0.7	97.9	1.4	50	4	20	4.0	ffp	2291
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.3	94.5	4.2	30	3	35	4.2	ffp	nd
	12周	111	1.6	92.4	6.0	27	5	35	4.2	ffp	nd

[0205]

**配制剂K**是一种具有组成110mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 6.0、210mM二水合 $\alpha_3\alpha_5$ -海藻糖、5mM甲硫氨酸、0.06%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	111	0.8	98.6	0.7	69	12	7	4.7	ffp	2258
Skg 5°C	1周	nd	0.8	98.6	0.7	68	12	7	5.0	ffp	2680
Skg 25°C	1周	nd	0.8	98.5	0.7	67	11	8	4.6	effp	2049
F/T	(5个循环)	nd	0.8	98.6	0.7	69	12	7	4.8	ffp	2316
5°C	8周	nd	0.8	98.5	0.7	68	12	8	4.5	ffp	2132
	12周	112	0.8	98.5	0.7	65	12	9	5.2	ffp	2260
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	0.9	98.3	0.8	53	12	18	4.5	ffp	1863
	12周	112	1.0	97.9	1.2	46	12	21	4.7	ffp	1917
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.5	95.4	3.1	26	10	26	5.2	ffp	nd
	12周	112	1.9	93.9	4.3	28	8	22	6.2	ffp	nd

[0206]

**配制剂L**是一种具有组成110mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.0、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、15mM甲硫氨酸、0.02%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	111	0.6	98.7	0.7	69	12	6	3.5	effp	2301
5°C	1周	nd	0.6	98.7	0.7	69	12	6	4.1	ffp	2574
5°C	1周	nd	0.6	98.7	0.7	68	10	7	4.1	ffp	nd
5°C	(5个循环)	nd	0.7	98.5	0.8	68	12	7	3.6	ffp	2435
5°C	8周	nd	0.6	98.8	0.6	68	10	7	3.8	ffp	2263
5°C	12周	111	0.6	98.7	0.7	67	10	8	3.8	ffp	1857
5°C	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	0.7	98.4	1.0	56	5	15	3.8	ffp	1919
25°C	12周	111	0.7	97.9	1.4	50	4	19	3.8	ffp	2106
25°C	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.3	94.2	4.5	31	4	34	3.9	ffp	nd
40°C	12周	111	1.5	92.6	6.0	28	4	35	4.2	ffp	nd

[0207]

**配制剂M**是一种具有组成110mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 6.0、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、15mM甲硫氨酸、0.02%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			浊度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	110	0.7	98.6	0.7	69	12	7	4.4	effp	2203
Sk <sub>g</sub> 5°C	1周	nd	0.7	98.6	0.6	69	12	7	5.2	ffp	2169
Sk <sub>g</sub> 25°C	1周	nd	0.7	98.6	0.7	67	11	8	4.9	ffp	1661
F/T	(5个循环)	nd	0.7	98.6	0.6	68	12	7	4.6	ffp	2183
5°C	8周	nd	0.7	98.6	0.7	68	12	8	4.5	ffp	2188
	12周	111	0.8	98.6	0.7	66	12	9	4.9	effp	2028
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	0.9	98.1	1.1	53	12	18	4.5	ffp	1900
	12周	111	0.9	98.0	1.2	46	12	21	4.7	ffp	1936
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.5	95.0	3.5	26	10	26	5.4	ffp	nd
	12周	111	1.7	94.1	4.2	27	8	22	5.5	ffp	nd

[0208]

**配制剂N**是一种具有组成110mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.0、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、15mM甲硫氨酸、0.06%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			浊度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	111	0.6	98.7	0.7	69	12	7	3.8	effp	2410
Skg 5°C	1周	nd	0.6	98.6	0.7	69	12	6	4.0	effp	2559
Skg 25°C	1周	nd	0.6	98.6	0.8	68	10	7	3.7	ffp	2086
F/T	(5个循环)	nd	0.7	98.7	0.7	68	12	6	4.0	ffp	2457
5°C	8周	nd	0.6	98.8	0.7	69	10	7	3.9	ffp	2102
	12周	111	0.6	98.8	0.7	67	10	8	3.6	effp	2037
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	0.7	98.2	1.1	57	5	15	3.8	ffp	2215
	12周	111	0.7	97.9	1.4	50	4	19	3.7	ffp	2050
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.3	94.7	4.1	30	4	34	4.0	ffp	nd
	12周	111	1.5	92.5	6.0	28	4	35	4.5	ffp	nd

[0209]

**配制剂O**是一种具有组成110mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 6.0、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、15mM甲硫氨酸、0.06%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	111	0.8	98.6	0.7	69	12	7	4.5	ffp	2153
Skg 5°C	1周	nd	0.7	98.6	0.7	69	12	7	4.7	ffp	1846
Skg 25°C	1周	nd	0.7	98.5	0.7	67	11	8	4.9	effp	2192
F/T	(5个循环)	nd	0.7	98.6	0.7	69	12	7	4.3	effp	2323
5°C	8周	nd	0.7	98.7	0.6	68	12	8	4.8	ffp	2049
	12周	112	0.8	98.5	0.7	66	12	9	4.6	ffp	1903
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	0.9	98.2	0.9	53	12	18	4.8	ffp	2002
	12周	112	0.9	97.9	1.2	46	13	21	4.8	ffp	2216
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.5	95.6	2.9	26	10	25	5.2	ffp	nd
	12周	112	1.9	94.0	4.3	27	8	22	6.1	ffp	nd

[0210]

**配制剂P**是一种具有组成130mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.0、210mM二水合 $\alpha_3$ -海藻糖、5mM甲硫氨酸、0.02%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC				离子交换-HPLC				浊度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)					
-	初始	128	0.7	98.7	0.7	69	12	6	3.8	ffp	2035		
Sk 5°C	1周	nd	0.7	98.7	0.7	69	12	6	3.4	ffp	2728		
Sk 25°C	1周	nd	0.7	98.6	0.7	68	10	7	3.9	ffp	nd		
F/T	(5个循环)	nd	0.7	98.7	0.7	69	12	6	3.7	ffp	2559		
5°C	8周	nd	0.6	98.8	0.6	69	10	7	3.6	ffp	2217		
	12周	129	0.6	98.7	0.7	67	11	9	3.8	ffp	1878		
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
25°C	8周	nd	0.8	98.2	1.0	57	5	15	3.5	ffp	2091		
	12周	128	0.8	97.8	1.4	51	4	19	4.3	ffp	1887		
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
40°C	8周	nd	1.6	94.2	4.2	31	4	35	3.9	ffp	nd		
	12周	129	1.9	92.1	5.9	28	5	35	4.5	ffp	nd		

[0211]

**配制剂Q**是一种具有组成130mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 6.0、210mM二水合 $\alpha_3\alpha_5$ -海藻糖、5mM甲硫氨酸、0.02%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	131	0.8	98.5	0.7	69	12	7	4.4	effp	2309
Skg 5°C	1周	nd	0.8	98.5	0.7	69	12	7	4.4	ffp	2522
Skg 25°C	1周	nd	0.9	98.4	0.7	67	11	8	4.8	ffp	1787
F/T	(5个循环)	nd	0.8	98.5	0.6	69	12	6	4.8	ffp	2312
5°C	8周	nd	0.9	98.6	0.6	68	12	8	5.1	ffp	2131
	12周	132	0.9	98.4	0.7	66	11	9	4.9	effp	1931
25°C	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	8周	nd	1.1	97.8	1.1	54	12	18	5.1	ffp	1888
40°C	12周	132	1.1	97.8	1.1	46	12	21	4.7	ffp	1912
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.8	95.2	3.0	27	10	27	5.6	effp	nd
	12周	132	2.2	93.4	4.4	28	8	22	6.1	ffp	nd

[0212]

**配制剂R**是一种具有组成130mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.0、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、5mM甲硫氨酸、0.06%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	131	0.7	98.6	0.7	69	12	6	3.7	effp	2096
Skg 5°C	1周	nd	0.7	98.7	0.6	69	12	6	3.7	effp	1856
Skg 25°C	1周	nd	0.7	98.5	0.8	68	10	7	4.3	effp	1958
F/T	(5个循环)	nd	0.7	98.7	0.6	69	12	6	3.8	effp	2371
5°C	8周	nd	0.7	98.7	0.6	69	10	7	3.5	effp	2075
	12周	131	0.6	98.6	0.7	67	10	8	3.6	effp	2350
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	0.9	98.2	1.0	58	5	15	3.5	effp	1989
	12周	131	0.9	97.7	1.4	51	4	20	3.9	effp	1999
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.6	94.3	4.1	32	4	35	4.2	ffp	nd
	12周	132	2.0	92.0	6.0	29	5	35	4.6	effp	nd

[0213]

**配制剂S**是一种具有组成130mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 6.0、210mM二水合 $\alpha_3$ -海藻糖、5mM甲硫氨酸、0.06%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	131	0.8	98.5	0.7	69	12	7	4.6	effp	2406
Skg 5°C	1周	nd	0.8	98.5	0.7	69	12	7	4.8	wafp	2808
Skg 25°C	1周	nd	0.9	98.4	0.7	67	11	8	4.9	ffp	2141
F/T	(5个循环)	nd	0.8	98.5	0.6	69	12	6	4.7	ffp	2487
5°C	8周	nd	0.8	98.5	0.7	69	12	8	4.8	effp	2076
	12周	132	0.9	98.4	0.7	66	12	9	4.8	effp	1897
25°C	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	8周	nd	1.1	97.8	1.1	55	12	18	5.0	ffp	1956
40°C	12周	131	1.1	97.7	1.2	47	12	21	4.9	ffp	2094
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.9	95.2	3.0	27	9	27	5.7	ffp	nd
	12周	133	2.2	93.5	4.3	21	9	22	6.1	ffp	nd

[0214]

**配制剂T**是一种具有组成130mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.0、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、15mM甲硫氨酸、0.02%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			浊度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	131	0.7	98.7	0.7	69	12	6	3.7	effp	2311
Skg 5°C	1周	nd	0.7	98.7	0.7	69	12	6	3.7	ffp	2397
Skg 25°C	1周	nd	0.7	98.5	0.8	68	10	7	4.0	effp	nd
F/T	(5个循环)	nd	0.7	98.7	0.6	68	12	6	3.7	ffp	2277
5°C	8周	nd	0.6	98.8	0.5	67	10	7	3.5	ffp	2167
	12周	131	0.6	98.6	0.7	69	10	7	3.7	ffp	2070
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	0.8	98.2	1.0	56	5	15	3.6	ffp	2122
	12周	131	0.8	97.8	1.4	52	4	19	3.7	ffp	2138
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.5	94.3	4.2	31	4	34	4.0	ffp	nd
	12周	132	1.8	92.2	6.0	29	4	35	4.1	ffp	nd

[0215]

**配制剂U**是一种具有组成130mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 6.0、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、15mM甲硫氨酸、0.02%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	131	0.8	98.5	0.7	69	12	7	4.5	effp	2768
Skg 5°C	1周	nd	0.8	98.6	0.7	68	12	7	4.7	effp	2884
Skg 25°C	1周	nd	0.8	98.5	0.7	68	11	8	6.0	effp	2044
F/T	(5个循环)	nd	0.8	98.6	0.6	68	12	7	4.6	ffp	2617
5°C	8周	nd	0.8	98.5	0.7	67	12	8	4.3	ffp	2571
	12周	132	0.8	98.5	0.7	67	12	8	4.5	ffp	2164
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	1.0	98.0	1.0	52	12	18	4.9	ffp	2116
	12周	131	1.0	97.7	1.3	47	13	21	5.0	effp	1990
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.7	95.4	2.9	24	10	24	5.4	ffp	nd
	12周	132	2.0	93.7	4.3	19	9	20	5.7	ffp	nd

[0216]

**配制剂 V**是一种具有组成130mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.0、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、15mM甲硫氨酸、0.06%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	131	0.7	98.7	0.7	68	12	6	3.7	effp	2323
Sk <sub>g</sub> 5°C	1周	nd	0.7	98.6	0.7	69	12	6	3.7	ffp	2646
Sk <sub>g</sub> 25°C	1周	nd	0.7	98.5	0.8	68	10	7	3.8	ffp	2056
F/T	(5个循环)	nd	0.7	98.7	0.7	68	12	6	3.5	effp	2498
5°C	8周	nd	0.6	98.9	0.5	67	10	7	3.5	effp	2179
	12周	132	0.6	98.6	0.8	69	10	7	3.7	ffp	2119
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	0.8	98.1	1.1	56	5	15	3.6	ffp	2072
	12周	132	0.8	97.8	1.4	52	4	19	3.9	effp	2348
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.5	94.2	4.3	31	4	34	3.9	ffp	nd
	12周	132	1.8	92.3	5.9	30	5	34	4.3	ffp	nd

[0217]

**配制剂W**是一种具有组成130mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 6.0、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、15mM甲硫氨酸、0.06%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	131	0.8	98.5	0.7	69	12	7	4.7	ffp	2018
Skg 5°C	1周	nd	0.8	98.5	0.7	69	12	7	4.6	ffp	1790
Skg 25°C	1周	nd	0.8	98.5	0.7	67	11	8	4.9	ffp	1918
F/T	(5个循环)	nd	0.8	98.6	0.7	69	12	7	4.7	ffp	2379
5°C	8周	nd	0.8	98.7	0.5	67	11	8	4.4	ffp	2028
	12周	131	0.8	98.4	0.8	67	12	8	4.7	effp	1964
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	1.0	98.0	1.0	53	12	18	4.3	ffp	2198
	12周	131	1.0	97.8	1.2	47	13	20	5.0	ffp	1894
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.7	95.4	3.0	24	9	25	5.0	ffp	nd
	12周	132	2.0	93.7	4.4	27	9	20	5.8	effp	nd

[0218]

**配制剂 X**是一种具有组成120mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸/HCl pH 5.5、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、10mM甲硫氨酸、0.04%聚山梨酯20、2'000个U/ml rHuPH20的液体配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC			离子交换-HPLC			油度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)			
-	初始	121	0.8	98.5	0.7	69	12	7	4.2	effp	2277
Skg 5°C	1周	nd	0.8	98.6	0.7	69	12	6	4.2	ffp	1855
Skg 25°C	1周	nd	0.8	98.5	0.7	68	11	7	4.8	ffp	2070
F/T	(5个循环)	nd	0.8	98.6	0.7	69	12	6	4.5	ffp	2477
5°C	8周	nd	0.8	98.6	0.6	68	10	8	4.3	ffp	2447
	12周	122	0.7	98.6	0.7	67	10	9	4.3	ffp	2189
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8周	nd	0.9	98.2	1.0	57	7	18	4.5	ffp	2030
	12周	122	0.9	97.8	1.3	50	7	23	4.5	ffp	2030
	36周	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8周	nd	1.4	95.3	3.3	34	6	33	4.8	ffp	nd
	12周	122	1.7	93.6	4.6	32	7	31	5.1	ffp	nd

[0219] 实施例2:冻干配制剂的制备

[0220] 如上文关于液体配制剂所描述的那样制备约60mg/ml曲妥单抗的溶液。已经以上

文提及的液体配制剂浓度的一半添加所有赋形剂。将配制剂无菌过滤通过0.22 $\mu$ m滤器,并在无菌条件下以等量分配入无菌20ml玻璃管形瓶中。将管形瓶用适合于在冻干工艺中使用的ETFE(乙烯和四氟乙烯的共聚物)包被的橡胶塞部分密封,并使用表2中报告的冷冻-干燥循环来冻干。

[0221] 表2:冷冻-干燥循环

步骤	货架温度 (°C)	斜坡速率 (°C/分钟)	保持时间 (分钟)	真空设定点 ( $\mu$ bar)
[0222] 预冷却	5°C	0.0	60	-
冷冻	-40°C	1.0	120	-
一级干燥	-25°C	0.5	4560	80
二级干燥	+25°C	0.2	300	80

[0223] 首先将产物自室温冷却至约5°C(预冷却),接着以约1°C/分钟的板冷却速率于-40°C进行冷冻步骤,接着于-40°C进行保持步骤约2小时。于约-25°C的板温度和约80 $\mu$ bar的室压力实施第一个干燥步骤达约76小时。随后,自-25°C至25°C以0.2°C/分钟的温度斜坡开始第二个干燥步骤,接着于25°C的保持步骤以约80 $\mu$ bar的室压力持续至少5小时。

[0224] 在Usifroid SMH-90 LN2冷冻干燥器(Usifroid, Maurepas, France)或LyoStar II冷冻干燥器(FTS Systems, Stone Ridge, NY, USA)中实施冻干。将冷冻干燥的样品于不同气候条件(5°C、25°C和30°C)贮存不同时间间隔。用注射用水(WFI)将冻干的管形瓶重建至终体积2.65ml,产生具有约120mg/ml抗体浓度的等张配制剂。冷冻干燥的饼的重建时间是10分钟左右。于周围温度在重建液体样品的24小时温育期后实施对重建样品的分析。

[0225] 通过上文所描述的下列分析方法再次分析样品:

[0226] 1) UV分光光度法;

[0227] 2) 大小排阻层析(SEC);

[0228] 3) 离子交换层析(IEC);

[0229] 4) 溶液的浊度;及

[0230] 5) 在可见颗粒方面。

[0231] 下文表3中提供了配制剂Y的稳定性测试的结果,其中使用下列缩写:

[0232] ffp: =没有颗粒;

[0233] effp: =基本上没有颗粒;

[0234] nd: =未测定

[0235]

表3: 依照本发明的冻干的抗HER2药物配制剂的组成和稳定性数据

配制剂Y是一种重建后具有组成120mg/ml曲妥单抗、20mM L-组氨酸HCl pH 5.5、210mM二水合 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、10mM 甲硫氨酸、0.04%聚山梨酯20、12'000个U/ml rHuPH20的冻干的配制剂。

贮存条件	贮存时间	蛋白质浓度 (mg/ml)	大小排阻-HPLC				离子交换-HPLC				浊度 (FTU)	可见颗粒	HE 活性 (U/ml)
			HMW (%)	单体 (%)	LMW (%)	主峰 (%)	峰1 (%)	峰4 (%)					
-	初始	129	0.5	98.8	0.8	59	15	10	7.1	ffp	12451		
	8周	124	0.6	98.6	0.9	59	16	10	5.7	effp	13380		
	21周	nd	0.8	98.6	0.7	62	15	8	5.9	effp	14927		
	36周	nd	0.8	98.5	0.7	59	16	10	6.0	ffp	13744		
25°C	8周	120	1.3	97.8	0.8	59	16	11	6.1	effp	13162		
	21周	nd	2.1	96.7	1.2	61	15	8	5.7	effp	15396		
	36周	nd	2.7	96.6	0.7	58	15	11	6.0	ffp	13673		
30°C	8周	121	1.9	97.5	0.9	58	16	11	5.7	effp	13425		
	21周	126	3.2	96.0	0.8	60	14	8	6.0	effp	nd		
	36周	nd	3.9	95.4	0.7	57	14	11	5.9	ffp	15034		

[0236] 以下表4中汇总了所提供的上述配制剂的特性:

F	Tr mg/ml	His		tre mM	NaCl mM	Meth mM	PS		rHu U/ml
		mM	pH				20 %	80 %	
A	120	20	5.5	210		10	0.04		12'000
B	120	20	5.5	210		10		0.06	12'000
C	120	20	5.5		130	10	0.04		12'000
D	120	20	5.5		130	10		0.06	12'000
E	120	20	5.5	105	65	10	0.04		12'000
F	120	20	5.5	105	65	10		0.06	12'000
G	120	20	5.5	210		10	0.04		
H	110	20	5.0	210		5	0.02		2'000
I	110	20	6.0	210		5	0.02		2'000
J	110	20	5.0	210		5		0.06	2'000
K	110	20	6.0	210		5	0.06		2'000
L	110	20	5.0	210		15	0.02		2'000
M	110	20	6.0	210		15	0.02		2'000
N	110	20	5.0	210		15	0.06		2'000
O	110	20	6.0	210		15	0.06		2'000
P	130	20	5.0	210		5	0.02		2'000
Q	130	20	6.0	210		5	0.02		2'000
R	130	20	5.0	210		5	0.06		2'000
S	130	20	6.0	210		5	0.06		2'000
T	130	20	5.0	210		15	0.02		2'000
U	130	20	6.0	210		15	0.02		2'000
V	130	20	5.0	210		15	0.06		2'000
W	130	20	6.0	210		15	0.06		2'000
X	120	20	5.5	210		10	0.04		2'000
Y	120	20	5.5	210		10	0.04		12'000

[0237]

[0238] F=配制剂

Tr=曲妥单抗

[0239] His=L-组氨酸/HCl

tre=二水合 $\alpha, \alpha$ -海藻糖

[0240] NaCl=氯化钠

met=甲硫氨酸

[0241] PS=以% (w/v) 计的聚山梨酯

rHu=rHuPH20

[0242] \*) =重建后

[0243] 本申请涉及下述实施方案。

[0244] 1. 药学活性抗HER2抗体的高度浓缩的稳定的药物配制剂, 其包含:

[0245] a. 约50至350mg/ml抗HER2抗体;

[0246] b. 约1至100mM缓冲剂, 其提供pH  $5.5 \pm 2.0$ ;

[0247] c. 约1至500mM稳定剂或两种或更多种稳定剂的混合物;

- [0248] d. 约0.01至0.08%非离子型表面活性剂;和
- [0249] e. 有效量的至少一种透明质酸酶酶。
- [0250] 2. 依照实施方案1的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其中所述抗HER2抗体浓度分别是100至150mg/ml、 $120 \pm 18$ mg/ml、约110mg/ml、约120mg/ml、或约130mg/ml。
- [0251] 3. 依照实施方案1或2的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其分别包含大于150至约16'000个U/ml、约2'000个U/ml、或约12'000个U/ml透明质酸酶酶。
- [0252] 4. 依照实施方案1至3中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其中所述缓冲剂的浓度为1至50mM。
- [0253] 5. 依照实施方案1至4中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其中所述缓冲剂提供pH  $5.5 \pm 0.6$ 。
- [0254] 6. 依照实施方案1至5中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其中所述缓冲剂是组氨酸缓冲液,例如20mM组氨酸/HCl。
- [0255] 7. 依照实施方案1至6中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其中所述稳定剂是糖类,诸如例如二水合 $\alpha, \alpha$ -海藻糖或蔗糖。
- [0256] 8. 依照实施方案1至7中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其中所述稳定剂的浓度分别是15至250mM或约210mM。
- [0257] 9. 依照实施方案7或8的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其中甲硫氨酸作为第二稳定剂使用,例如浓度为5至25mM。
- [0258] 10. 依照实施方案1至9中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其中所述非离子型表面活性剂是聚山梨酯,其选自下组:聚山梨酯20、聚山梨酯80、和聚乙烯-聚丙烯共聚物。
- [0259] 11. 依照实施方案10的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其中所述聚山梨酯的浓度分别是0.02% (w/v)、0.04% (w/v) 或0.06% (w/v)。
- [0260] 12. 依照实施方案1至11中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其中所述抗HER2抗体选自下组:曲妥单抗、帕妥珠单抗和T-DM1或此类抗体的组合。
- [0261] 13. 依照实施方案1至12中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其在冷冻和融化后是稳定的。
- [0262] 14. 依照实施方案1至13中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其中所述透明质酸酶酶是rHuPH20。
- [0263] 15. 依照实施方案1至13中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其缺乏所述透明质酸酶酶。
- [0264] 16. 依照实施方案1至14中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其用于皮下或肌肉内施用。
- [0265] 17. 依照实施方案1至16中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其为液体形式。
- [0266] 18. 依照实施方案1至16中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其为冻干形式。
- [0267] 19. 依照实施方案1至18中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂,其用于治疗适合于用抗HER2抗体治疗的疾病或病症,诸如例如癌症或非恶性疾病。

[0268] 20. 一种注射装置,其包含依照实施方案1至19中任一项的高度浓缩的稳定的药物抗HER2抗体配制剂。

[0269] 21. 依照实施方案1至19中任一项的配制剂用于制备可用于治疗受试者中适合于用抗HER2抗体治疗的疾病或病症,诸如例如癌症或非恶性疾病的药物的用途,包括以有效治疗所述疾病或病症的量对受试者施用本文中所描述的配制剂。

[0270] 22. 依照实施方案20的注射装置或依照实施方案21的用途,其中与化疗剂伴随或序贯共施用所述配制剂。

[0271] 23. 一种治疗受试者中适合于用抗HER2抗体治疗的疾病或病症,诸如癌症或非恶性疾病的方法,包括以有效治疗所述疾病或病症的量对受试者施用依照实施方案1至19中任一项的配制剂。

[0272] 24. 一种试剂盒,其包含装有依照实施方案1至19中任一项的配制剂的一个或多个管形瓶和关于对患者皮下施用所述配制剂的指令。

[0273] 25. 依照实施方案24的试剂盒,其进一步包含用于对患者皮下施用所述配制剂的注射装置。

[0274] 26. 如本文中所描述的发明。

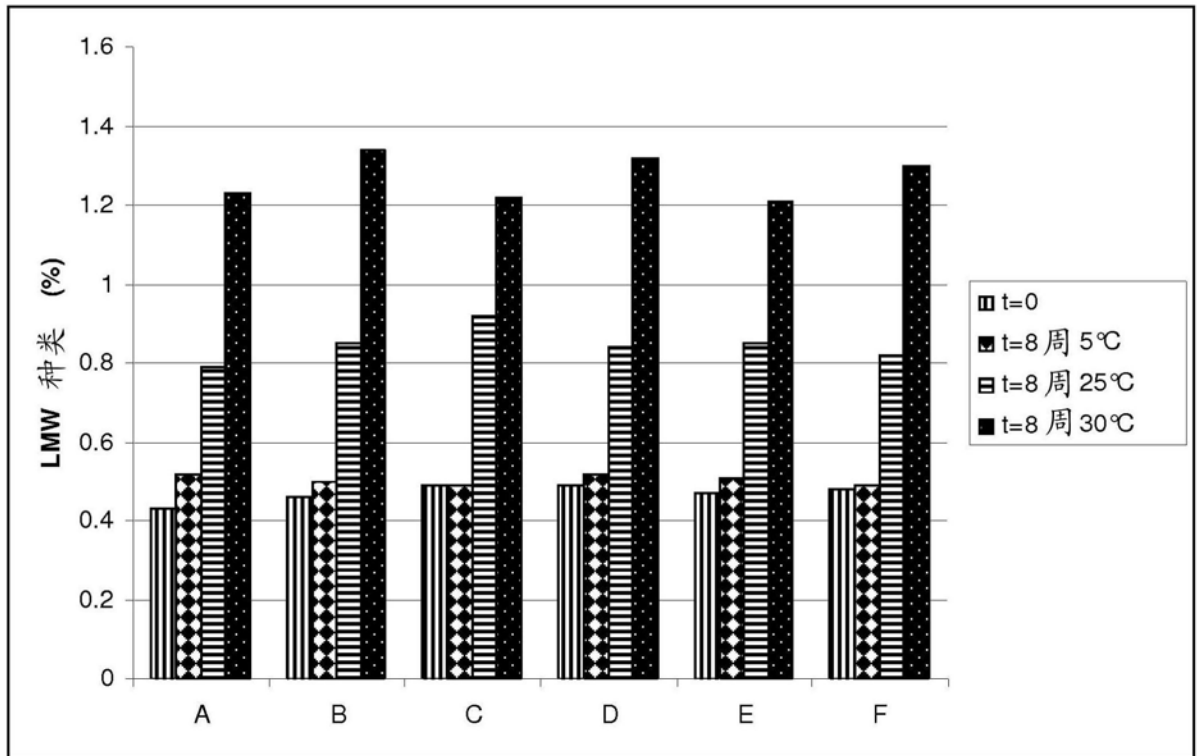


图1

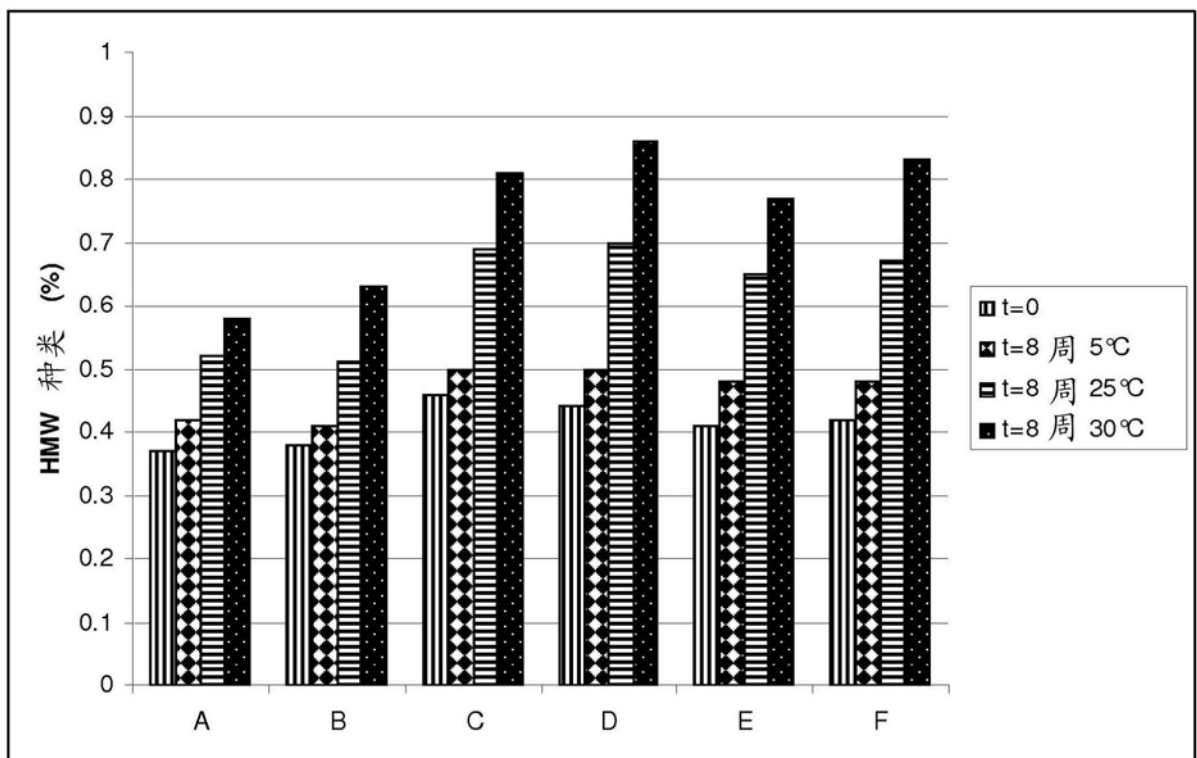


图2

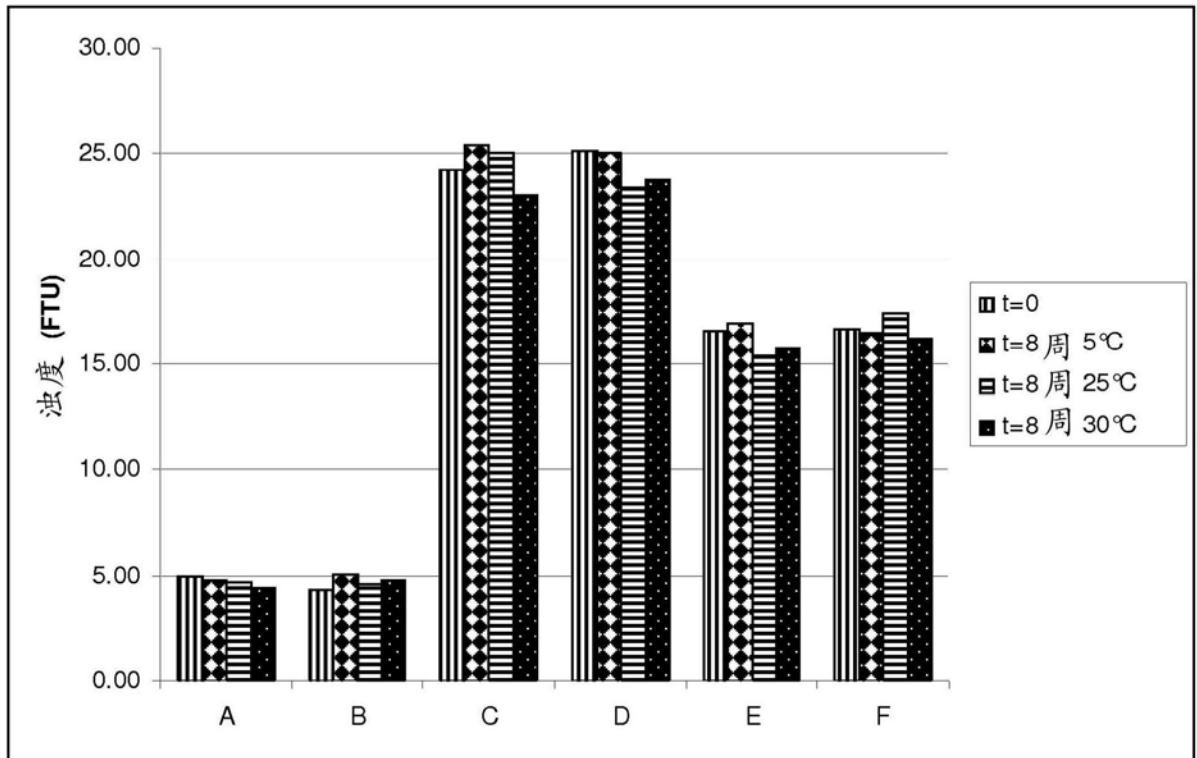


图3

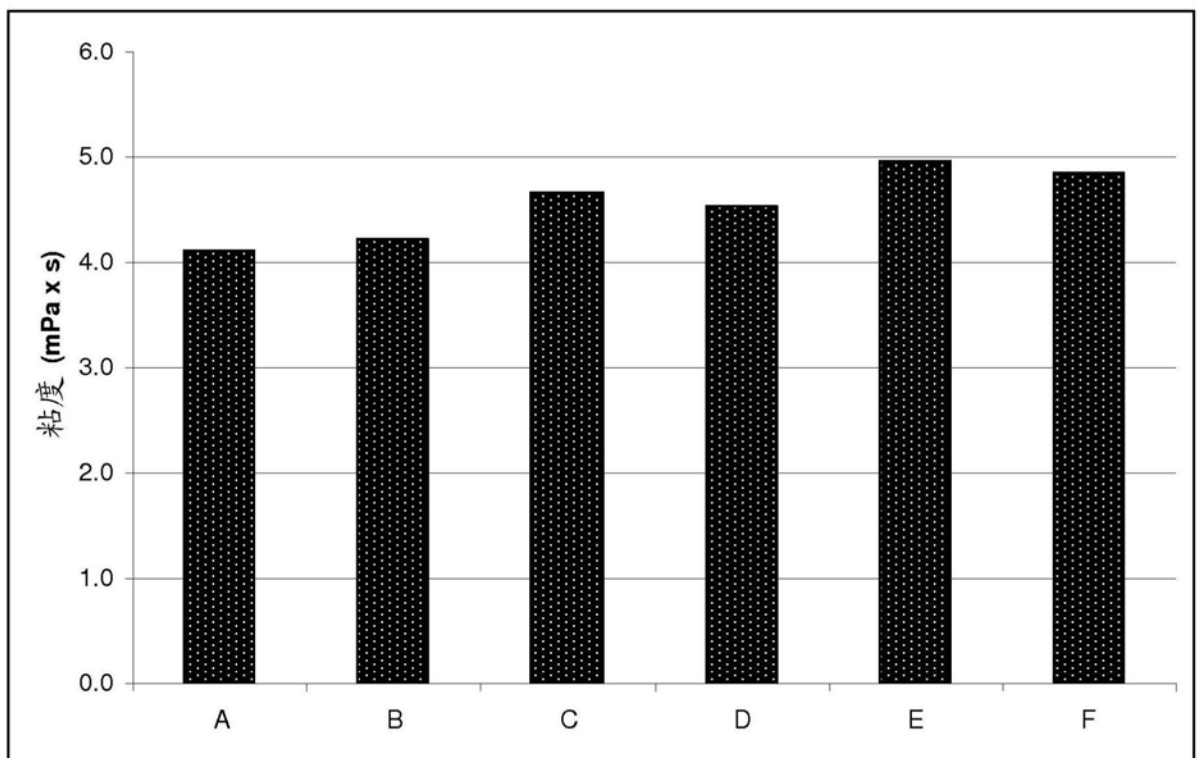


图4