抗 Her2 抗体药物偶联物药物制剂

技术领域

本发明涉及一种抗 Her2 抗体药物偶联物药物制剂，属于抗肿瘤药物领域。

背景技术

[01]肿瘤靶向生物治疗在癌症的治疗研究中受到了越来越多的关注。其中单克隆抗体治疗靶点特异性高、副作用低，但是单独使用，其疗效比较有限。目前抗肿瘤的单抗药物最成功是针对淋巴细胞肿瘤，如非霍奇金淋巴瘤（NHL），慢性淋巴细胞肿瘤（CLL）等。

[02]ErbB2，又名 Her2/neu，是 EGFR 家族的第二个成员，ErbB2 通过与 EGFR 家族中其它三位成员构成异源二聚体，从而发挥生物学作用。编码 ErbB2 的 neu 基因最早从大鼠神经母细胞瘤中分离得到。人类体细胞内 neu 基因的同源基因，称为 Her2，位于 17 号染色体的长臂(17q21.1)，编码的产物 ErbB2 由 1255 个氨基酸组成，分子量约为 185kDa，其中 720-987 位属于酪氨酸激酶活性域。ErbB2 除了通过 PI3K 及 MAPK 信号通路发挥作用，还可降低细胞周期蛋白(cyclin)D 及 c-myc 的表达，进而降低细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependentkinase，cdk)抑制剂 p27kipl 的表达，cdk2 的活性受抑制而导致细胞的增殖。随着研究的不断扩大和深入，发现 HER2 在多种肿瘤中表达和过度表达，因此临床上亟需靶向 HER2 的有效药物来治疗恶性肿瘤，目前已上市的以 Her2 为靶点的单抗有三种（见表 1）。

[03] 表 1 FDA 批准上市的 Her2 靶点单抗药物

商品名	通用名	所属公司	靶点	适应症	FDA获批日期
Herceptin	Trastuzumab	罗氏	Her-2	乳腺癌	1998
Perjeta	Pertuzumab	Genentech	Her-2	乳腺癌	2012

ogivri	trastuzumab-dkst	Mylan 和 Biocon 公司	Her-2	乳腺癌，转移性胃癌	2017

[04] 基于抗体靶向性特点，出现了新一代的生物靶向药物——抗体药物偶联物（Antibody Drug Conjuate，ADC），ADC 由三部分组成：抗体，细胞毒素与连接两者的连接头。将单克隆抗体与细胞毒素偶联后，抗体药物偶联物利用单克隆抗体的靶向性，特异性地识别癌细胞表面的受体，并与受体结合，然后进入到细胞内部，利用细胞内的蛋白酶释放细胞毒物阻止癌细胞繁殖与杀灭癌细胞。现有技术一般采用哺乳动物细胞培养生产表达抗体，经过高度纯化后的抗体与细胞毒素 MMAE 通过连接子偶联，获得抗体药物偶联物（Antibody Drug Conjuate, ADC）。抗体药物偶联技术使小分子毒素药物与生物蛋白融为一体，兼具二者之长，成为新一代治疗产品，在极大增强药效的同时减少毒副作用。目前美国 FDA 批准有四种 ADC 上市药品（见表 2）。

[05] 表 2 四种 ADC 上市药品

商品名	通用名	所属公司	靶点	适应症	FDA 获批日期
Mylotarg	Gemtuzumab Ozogamicin	辉瑞	CD33	急性骨髓性白血病	2000/2017
Adcetris	Brentuximab Vedotin	西雅图遗传	CD30	霍奇金淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤	2011

Kadcyla	Ado-Trastuzumab Emtansine	罗氏	Her-2	乳腺癌	2013
Besponsa	Inotuzumab Ozogamicin	辉瑞	CD22	急性淋巴细胞白血病	2017

[06] 与其他生物大分子药物一样，ADC 药物易于降解例如氧化，脱酰胺和片段化以及形成微粒和聚集体。此外，由于药物偶联本身可降低稳定性和改变抗体的物理化学性质。例如， DM1 与抗-HER2 抗体曲妥单抗的偶联导致抗体的 CH2 结构域失去稳定性(文献 1： Physicochemical Stability of the Antibody−Drug Conjugate Trastuzumab-DM1: Changes due to Modification and Conjugation Processes. Aditya A. Wakankar 等, Bioconjugate Chemistry 2010: 21 (9), 1588-1595)。ADC 药物通常是疏水的，ADC 作为整体可能比未偶联的抗体更加不溶，因此变得更加易于聚集，形成微粒和表面吸附。为提供在运输和贮藏期间稳定的 ADC 药物，因此必须谨慎选择药物制剂中的各辅料成份。目前已上市的 ADC 药物的辅料成份见表 3。由于目前上市的 ADC 制剂中所使用的辅料成分种类还非常有限，而相关的制剂成分选择又非常多，因此要开发一种提供在运输和贮藏期间稳定的 ADC 辅料制剂组合，涉及到对大量的辅料制剂成分筛选及合适浓度的确定工作，需要投入较大的精力和较长的时间。

[07] 表 3 上市 ADC 药物辅料成份

商品名	通用名	辅料成份

Mylotarg	Gemtuzumab Ozogamicin	Dextran 40 （右旋糖酐 40） Sucrose （蔗糖） Sodium chloride （氯化钠） Monobisic sodium phosphate monohydrate （磷酸二氢钠一水合物） Dibasic sodium phosphate anhydrous （无水磷酸氢二钠）
Adcetris	Brentuximab Vedotin	Citric acid monohydrate(柠檬酸一水化合物) Sodium citrate dihydrate（柠檬酸钠二水合物） α，α-Trehalose dihydrate（α，α-海藻糖二水合物） Polysorbate 80（吐温 80）
Kadcyla	Ado-Trastuzumab Emtansine	Sucrose（蔗糖） Succinic Acid（琥珀酸） Polysorbate20（吐温 20） Sodium hydroxide（氢氧化钠）
Besponsa	Inotuzumab Ozogamicin	Sucrose （蔗糖） Polysorbate 80 （吐温 80） Sodium chloride （氯化钠） Tromethamine （氨丁三醇）

[08] 从上述四种 ADC 制剂辅料成分中也能看出，每一种制剂均具有其独特性。源于单克隆抗体类药物脆弱的稳定性和结构复杂性，导致制造和储存这类药物具有极大的挑战。由于抗体的异质性结构，特别是互补决定区（CDR）和 Fc 糖基化，不同单克隆抗体的制剂开发每一项都是需要基于个案开展（文献 2：Monoclonal antibodies: formulations of marketed products and recent advances in novel delivery system ，Yanan Cui 等，Drug

Development and Industrial Pharmacy,第 43 卷，第 4 期，第 519—530 页，2017 年）。而 ADC 药物由于进一步涉及到偶联及毒素分子，因此其制剂开发的独特性更高。

[09]专利申请（CN105008398A 或 WO2015074528A1）公开了一种人源化 RC48 抗体药物偶联物，其中人源化 RC48 抗体为一种靶向 Her2 的单克隆抗体（保藏编号 C2013170 保藏于中国典型培养物保藏中心的保藏仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)所分泌的抗体或者衍生自其的抗体），毒物选自 Monomethyl AuristatinE（MMAE），该毒物属于海兔毒素肽的衍生物。接头选择 Maleimido-Caproyl-Valine-Citrulline-p-AminoBenzyloxy (mc-VC-PAB)，重组人源化抗 Her2 单抗-MMAE 偶联物中的单抗与 MMAE 通过半胱氨酸与连接头相连组成。该药物针对 Her2 阳性肿瘤取得了良好的治疗效果。

[10] 前期试验中显示：通过偶联得到的重组人源化抗 Her2 单抗-MMAE 偶联物，经过纯化以后，在常规的缓冲液中溶解度不好，会出现肉眼可见的不溶性微粒，不符合注射液的标准，但是如果要达到临床上的有效治疗剂量，蛋白浓度需要达到 5mg/ml 以上，因此如何在保证一定担保浓度的前提下解决不溶性颗粒的问题，需要进一步的研究。此外，对蛋白溶液进行真空冷冻干燥时，需要添加冻干保护剂，保护蛋白在冻干过程中不被破坏，同时又要保证冻干粉有良好的外观。为了避免蛋白冻干粉在长期保存过程中发生的缓慢降解，需要添加适当的蛋白稳定剂。如何确定合适的蛋白稳定剂，也需要通过大量的试验进行开发确定。

[11]因此，本发明的目的在于：通过对生物制剂可用辅料进行大范围的筛选和浓度范围研究，得到一种抗 Her2 单抗-MMAE 偶联物的辅料组合，实现以下技术效果：使抗 Her2 单抗-MMAE 偶联物能够在冻干前后溶解良好，不溶性微粒和可见异物符合人用注射液标准，同时使偶联物在冻干和保存过程中长期保持稳定，重建后也不易发生聚合或降解，保持良好的生物活性。

发明内容

[12] 本发明提供了一种抗体药物偶联物的含水液体药物制剂，所述制剂包含抗体药物偶联物、非还原糖、氨基酸、促溶剂；所述非还原糖选自甘露醇、蔗糖、海藻糖或其组合；所述氨基酸选自组氨酸、丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、谷氨酸或其组合；所述促溶剂选自甘油、Tween80 或其组合。

[13] 在一些实施方案中，其中所述甘露醇浓度为：100-300mmol/L，优选 190-300mmol/L，更优选 200-260mmol/L，最优选 240-260mmol/L；所述蔗

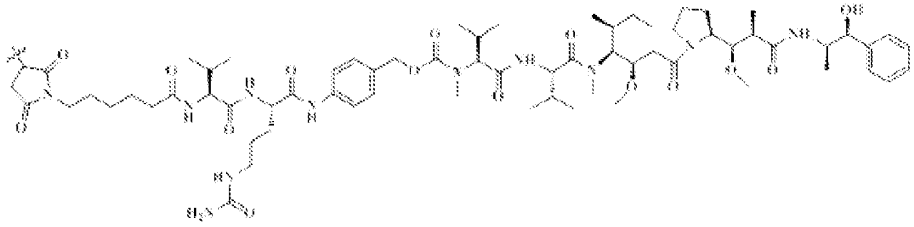
糖浓度为：0-100mmol/L，优选 40-100mmol/L，更优选 60-100mmol/L，最优选 40 -60mmol/L。

[14] 在一些实施方案中，所述组氨酸为盐酸组氨酸，其浓度为：0-100mmol/L，优选 5-50mmol/L，更优选 5-20mmol/L，最优选 10mmol/L；所述精氨酸为盐酸精氨酸，其浓度为：0-160mmol/L，优选 20-100mmol/L、更优选 30-90mmol/L，最优选约 35mmol/L。

[15] 在一些实施方案中，所述甘油含量为：0-1%，优选 0.2-0.5%（w/v）；所述 Tween80 质量百分比为：0-0.02%（w/v）。

[16] 进一步的，所述抗体药物偶联物中所述抗体为抗 HER2 单克隆抗体；抗体所偶联的药物为 MMAE 或 MMAF 及其衍生物或 DM1、DM4 及其衍生物。

[17] 进一步的，所述抗 HER2 抗体药物偶联物为抗 HER2 单克隆抗体-vc-MMAE，所述抗 HER2 单克隆抗体和 MMAE 通过接头 vc 连接，其中所述接头与 MMAE 连接后的结构为：



。

[18] 进一步的，所述抗 HER2 单克隆抗体包含重链和轻链，

（i）所述重链包含 CDR1-3，其中所述 CDR1-3 的氨基酸序列分别具有如 SEQ ID NO:1、2 和 3 所示的氨基酸序列；和/或

（ii）所述轻链包含 CDR1-3，其中所述 CDR1-3 的氨基酸序列分别具有如 SEQ ID NO:4、5 和 6 所示的氨基酸序列；

[19] 进一步的，所述单克隆抗体优选为嵌合抗体或人源化抗体。

[20] 在一些实施方案中，其中所述抗 HER2 单克隆抗体-vc -MMAE 的浓度为 5-30mg/ml。

[21] 在一些实施方案中，所述非还原性糖为 240-260mmol/L 的甘露醇和/或

40mmol/L-60mmol/L 蔗糖、所述氨基酸为 8-12mmol/L 的盐酸组氨酸，所述促溶剂为 0-0.02%（w/v）的 Tween 80。

[22] 在一些实施方案中，其中所述非还原性糖为约 260mmol/L 的甘露醇和约 40mmol/L 蔗糖、所述氨基酸为约 10mmol/L 的盐酸组氨酸，所述抗体药物偶联物的浓度约 10mg/ml，所述促溶剂为约 0.02%（w/v）的 Tween 80。

[23] 在一些实施方案中，其中所述非还原性糖为约 240mmol/L 的甘露醇和约 60mmol/L 蔗糖、所述氨基酸为约 10mmol/L 的盐酸组氨酸， 所述抗体药物偶联物的浓度约 10mg/ml，所述促溶剂为约 0.02%（w/v）的 Tween 80。

[24] 进一步的，所述制剂的 pH 4.5－7，优选 5.6－6.8、更优选 5.6－6.5，5.6-6.4，5.6－6.3，6.1－6.4，6.1－6.3。

[25] 所述制剂的 pH 采用 NaOH 或盐酸调节。

[26] 在一些实施方案中，所述冻干药物制剂通过冷冻干燥上述含水液体药物制剂获得。

[27] 进一步的，药物冻干前的含水液体药物制剂含有约 260mmol/L 的甘露醇、约 40mmol/L 蔗糖、约 10mmol/L 的盐酸组氨酸、约 0.02%（w/v）的 Tween 80、约 10mg/ml 的抗 HER2 单克隆抗体-vc-MMAE，pH 为 5.6－6.8。

[28] 进一步的，药物冻干前的含水液体药物制剂含有约 240mmol/L 的甘露醇、约 60mmol/L 蔗糖、约 10mmol/L 的盐酸组氨酸、0.02%的 Tween 80，约 10mg/ml 的抗 HER2 单克隆抗体-vc-MMAE，pH 为 5.6－6.8。

[29] 进一步的，药物冻干前的含水液体药物制剂含有的所述非还原性糖为甘露醇和蔗糖，其浓度分别约 47.36mg/ml 和约 13.69mg/ml，所述氨基酸为盐酸组氨酸，其浓度为约 2.10mg/ml，所述促溶剂为 Tween 80，其含量约 0.02%（w/v）。

[30] 进一步的，药物冻干前的含水液体药物制剂含有的所述非还原性糖为甘露醇和蔗糖，其浓度分别为约 43.72mg/ml 和约 20.54mg/ml、所述氨基酸为盐酸组氨酸，其浓度为约 2.10mg/ml，所述促溶剂为 Tween 80，其含量为约 0.02%（w/v）。

[31] 本发明进一步提供了上述药物制剂在制备治疗 Her2 异常表达导致的疾病药物中的用途，所述异常表达导致的疾病进一步优选为癌症；所述癌症进一步优选为 Her2 阳性癌症；所述 Her2 阳性癌症进一步优选为乳腺癌、卵巢癌、胃癌、尿路上皮癌、胃食管癌、食道癌、子宫内膜癌、肺癌或膀胱癌（参

见文献 3 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers:Overexpression and Therapeutic Implications，Nida Iqbal and Naveed Iqbal，Molecular Biology International，Volume 2014，Article ID 852748；文献 4：CN201810998055.4）。

[32] 本发明进一步提供了一种制备抗体药物偶联物药物制剂的方法，包括：

（1）制备上述任一项的制剂；

（2）评估该制剂中 抗体药物偶联物的稳定性。

[33] 附图说明

[34] 图 1：纯化后裸抗体 SDS-PAGE 电泳，其中，1-2:抗体非还原电泳 3-4:抗体还原电泳，图 1 的结果表明：实验获得的单抗纯度符合进一步实验的要求；

[35] 图 2：偶联后 ADC 10%SDS-PAGE 电泳，其中，Na:非还原电泳；Nb:抗体被 TCEP 还原后非还原电泳；Ra:RC48-vc-MMAE 还原电泳 Rb: TCEP 抗体还原后还原电泳；图 2 的结果表明：获得的偶联后 ADC 纯度符合进一步实验的要求；

[36] 具体实施方式

[37] 实施例 1：抗体纯化

[38]基于专利申请（CN105008398A 或 WO2015074528A1）实施例公开的相关方法获得了鼠源单克隆抗体 mRC48 以及相关人源化抗体 RC48，其包含人 IgG1κ 重链恒定区和重链可变区 RC48-VH，以及人 IgG1κ 轻链恒定区和轻链可变区 RC48-VL，将上述扩增到的各片段分别亚克隆到表达载体 pcDNA3.0 上。将构建的不同质粒转染到悬浮 CHO 细胞(Invitrogen)中。在标准条件下培养，待培养基中的营养物质耗尽、细胞不再进一步生长时放罐，采用离心或过滤的方法将细胞分离出去，取上清液，抗体蛋白存在于上清液中，上 Protein A 亲和层析柱进行第一步纯化，洗脱下来的目的蛋白，上阳离子填料层析柱进行第二步纯化，收集目的蛋白峰，然后上第三步柱以目的蛋白穿透模式进行第三步纯化，纯化后的蛋白经过各项指标检测合格后，然后进行超滤浓缩，蛋白浓度达到约 20-30mg/ml，此即为抗体蛋白原液，可在 -80°C 长期保存。

其中 RC48 抗体的 CDR 序列如下：

表 4 RC48 抗体的 CDR 序列

	重链 (VH)	轻链(VL)
CDR1	DYYIH (SEQ ID NO. 1)	KASQDVGTAVA (SEQ ID NO. 4)
CDR2	RVNPDHGDSYYNQKFKD (SEQ ID NO. 2)	WASIRHT (SEQ ID NO. 5)
CDR3	ARNYLFDHW (SEQ ID NO. 3)	HQFATYT (SEQ ID NO. 6)

实施例 2：抗体和 MMAE 偶联

[39]人源化抗体 RC48 与药物分子的偶联

[40]将 TCEP(Tris-2-carboxyethyl-phosphine)、DTPA(Diethylene triamine pentacetate acid) 母液分别溶于偶联缓冲液中，先用偶联缓冲液稀释，与单克隆抗体按照体积比 1：1（v:v=1：1）混合，TCEP 与抗体的终浓度摩尔比 1.9：1，DTPA 终浓度 1mmol/L，于 25℃搅拌反应 2.5h。TCEP 还原可重复性好，还原后自由巯基数可以达到 3.5-4.5。

[41]TCEP 还原后抗体可直接进行后续偶联。配制 10mmol/L 药物（vc-MMAE、vc-MMAF、mc-MMAF）溶于 DMSO（dimethyl sulfoxide，二甲亚砜），按照药物与巯基的摩尔比 1.1:1 缓慢加药，于 25℃搅拌反应 2h。用 DTNB 法于 412nm 检测自由巯基浓度（接近 0），纯化除去残余未反应药物以及 DMSO 等游离小分子，SDS-PAGE 电泳及 SEC、HPLC 法检测偶联情况。偶联反应可重复性好，打开的自由巯基可以偶联完全，偶联度在 3.5-4.5。

实施例 3：pH 对重组人源化抗 Her-2 单抗-MMAE 偶联物（RC48-vc-MMAE）溶解及纯度作用的研究

[42] 实验条件：注射用重组人源化抗 Her2 单抗-MMAE 偶联物蛋白 2g

超滤透析到 0.1mol/L 柠檬酸、0.02mol/L 三羟甲基氨基甲烷、0.02mol/L 磷酸二氢钠、0.15mol/L 氯化钠缓冲液中，透析倍数不低于 10^4 倍，平均分成 13 份，每份分别用孔径为 30kD 的离心超滤管浓缩至蛋白浓度 10mg/ml，分别用盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH 值至 4.2、4.6、5.0、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.4，观察澄清度情况、检测浓

度变化（结果如表 1 所示），将样品在超净台内分别用无菌的膜孔径为 0.22 微米针头滤器过滤至无菌的 20ml 西林瓶内，每个 pH 值 3 支，用灭菌胶塞封口，扎铝盖。置于 25℃保存，按照 0 小时、1 天、3 天、7 天用无菌注射器取样，进行 SEC-HPLC 纯度检查（结果如表 6 所示）。

[43]研究发现，在实验条件下改变蛋白的 pH 对蛋白的溶解情况影响很大，pH5.4 以下蛋白沉淀，pH5.6 以上，蛋白溶解性良好，pH6.8 以下存放 3 天时蛋白聚合体没有增加，存放 7 天时稍有增加，pH7.0 以上，聚合体随时间的延长而增加，pH 越高，聚合体增加的越多（具体结果见表 5，表 6）。

[44] 表 5 澄清度与浓度结果

pH	0 小时		1 天		3 天		7 天	
	澄清度	浓度（mg/ml）	澄清度	浓度（mg/ml）	澄清度	浓度（mg/ml）	澄清度	浓度（mg/ml）
4.2	大量沉淀	6.34	大量沉淀	5.67	大量沉淀	5.21	大量沉淀	4.40
4.6	大量沉淀	6.63	大量沉淀	5.53	大量沉淀	5.46	大量沉淀	4.82
5.0	轻微沉淀	8.82	轻微沉淀	8.17	轻微沉淀	7.98	轻微沉淀	7.64
5.4	轻微沉淀	8.99	轻微沉淀	8.78	轻微沉淀	8.45	轻微沉淀	8.10
5.6	澄清	9.99	澄清	10.01	澄清	10.00	澄清	9.96
5.8	澄清	10.03	澄清	10.00	澄清	9.98	澄清	9.97
6.0	澄清	9.97	澄清	9.99	澄清	10.01	澄清	10.00
6.2	澄清	10.00	澄清	9.98	澄清	9.97	澄清	9.98
6.4	澄清	9.95	澄清	9.97	澄清	9.98	澄清	10.00
6.6	澄清	9.97	澄清	9.96	澄清	10.02	澄清	9.95
6.8	澄清	10.05	澄清	10.01	澄清	9.96	澄清	9.97
7.0	澄清	10.02	澄清	10.01	澄清	10.00	澄清	10.03
7.4	澄清	10.00	澄清	10.03	澄清	9.99	澄清	9.97

[45] **表 6 纯度结果**

pH	0 小时(%)			1 天(%)			3 天(%)			7 天(%)		
	纯度	聚合体	降解	纯度	聚合体	降解	纯度	聚合体	降解	纯度	聚合体	降解
5.6	99.6	0.4	0	99.5	0.5	0	99.2	0.8	0	98.5	1.5	0
5.8	99.5	0.5	0	99.7	0.3	0	99.1	0.9	0	98.3	1.7	0
6.0	99.4	0.6	0	99.5	0.5	0	99.1	0.9	0	98.4	1.6	0
6.2	99.6	0.4	0	99.3	0.7	0	99.0	1.0	0	98.5	1.5	0
6.4	99.5	0.5	0	99.3	0.7	0	99.2	0.8	0	98.3	1.7	0
6.6	99.5	0.5	0	99.4	0.6	0	99.2	0.8	0	98.3	1.7	0
6.8	99.6	0.4	0	99.5	0.5	0	99.0	1.0	0	98.2	1.8	0
7.0	99.5	0.5	0	99.1	0.9	0	98.6	1.4	0	97.1	2.9	0
7.4	99.6	0.4	0	98.3	1.7	0	97.2	2.8	0	96.4	3.6	0

实施例 4：辅料筛选

[46]通过前期的大量信息分析及试验筛选，初步确定出蔗糖、甘露醇、甘油、组氨酸、精氨酸、聚山梨酯 80（即吐温 80，Tween80）等辅料作为进一步的筛选候选辅料，并进一步开展如下测试。

[47]表 7 注射用 RC48-vc -MMAE 辅料筛选

配方编号	盐酸组氨酸 (mmol/Lol/L)	精氨酸 (mmol/Lol/L)	蔗糖 (mmol/Lol/L)	甘露醇 (mmol/Lol/L)	甘油（%）	Tween80（%）	蛋白 (mg/ml)	pH
A1	10	35	0	240	0	0	10	6.3
A 2	10	35	0	240	0	0.02	10	6.3
A 3	10	0	60	240	0	0	10	6.3
A 4	10	0	60	240	0	0.02	10	6.3
A 5	10	0	0	200	1.0	0	10	6.3
A 6	10	0	0	200	1.0	0.02	10	6.3

A 7	10	0	0	300	0	0	10	6.3
A 8	10	0	0	300	0	0.02	10	6.3

[48]表 8 注射用 RC48-vc -MMAE 偶联物蛋白澄清度情况

配方编号	0 时	1 天	3 天	7 天
A1	++	++	++	++
A 2	-	-	-	-
A 3	++	++	++	++
A 4	-	-	-	-
A 5	-	-	-	-
A 6	-	-	-	-
A 7	++	++	++	++
A 8	-	-	-	-

[49]说明：“-”表示白点少于 3 个，“+”表示白点数介于 3-5 个，“++”表示白点数大于 5 个。

[50]表 9 注射用 RC48-vc -MMAE 蛋白纯度情况

配方编号	0 时(%)	1 天(%)	3 天(%)	7 天(%)
A1	99.5	99.2	99.0	98.2
A 2	99.6	99.1	98.8	98.3
A 3	99.5	99.6	99.5	99.5
A 4	99.7	99.6	99.6	99.6
A 5	99.4	99.1	98.7	98.2
A 6	99.5	98.9	98.6	98.3
A 7	99.6	99.0	98.6	98.0
A 8	99.5	98.9	98.3	98.2

[51]从以上结果可以看出，添加精氨酸对改善蛋白的可见异物情况没有明显的作用。添加蔗糖、甘油与聚山梨酯 80 均可以改善蛋白的情况。所以选择在制剂配方中添加适量的蔗糖对蛋白进行保护，添加甘油与聚山梨酯 80 对

蛋白进行促溶。

实施例 5：真空冷冻干燥方法

[52]将蛋白原液从-80℃ 冰箱内取出融化，用“1×制剂缓冲液”准确稀释至蛋白浓度 10mg/ml，用无菌、无热源的标准 20ml 冻干西林瓶分装，每支 6ml，进行真空冷冻干燥。

[53]冻干条件：

[54]预冻：温度-45℃，时间 5 小时；

[55]一次干燥：温度-26℃，时间 40 小时，真空度 10-15Pa；

[56]二次干燥：温度 25℃，时间 10 小时，真空度 10-15Pa。

[57]冻干后在真空状态下压胶塞，从冻干机中取出后扎铝盖。

实施例 6：配方筛选

[58]根据表 10 设计的配方进行配方制剂冻干粉的外观及成型稳定性考查。冻干后样品置于 4℃、37℃保存，分别在 0、1、3、7 天观察外观情况，筛选出外观成型较好的制剂配方，结果见表 11。

[59]表 10 注射用 RC48-vc -MMAE 制剂缓冲液配方筛选表

配方编号	盐酸组氨酸 (mmol/Lol/L)	蔗糖 (mmol/Lol/L)	甘露醇 (mmol/Lol/L)	甘油 （%）	Tween80 （%）	蛋白 (mg/ml)	pH
B1	10	40	260	0	0	10	6.3
B 2	10	40	260	0	0.02	10	6.3
B 3	10	60	240	0	0	10	6.3
B 4	10	60	240	0	0.02	10	6.3
B 5	10	100	200	0	0	10	6.3
B 6	10	100	200	0	0.02	10	6.3
B 7	10	40	240	0.2	0	10	6.3
B 8	10	40	240	0.2	0.02	10	6.3
B 9	10	60	190	0.5	0	10	6.3
B 10	10	60	190	0.5	0.02	10	6.3
B 11	10	100	100	1.0	0	10	6.3

B 12	10	100	100	1.0	0.02	10	6.3

[60] 表 11 冻干粉外观检查结果

配方编号	外观							
	4℃				37℃			
	0 小时	1 天	3 天	7 天	0 小时	1 天	3 天	7 天
B1	++	++	++	++	++	++	++	++
B 2	++	++	++	++	++	++	++	++
B 3	++	++	++	++	++	++	++	++
B 4	++	++	++	++	++	++	++	++
B 5	++	++	++	++	++	++	++	++
B 6	++	++	++	++	++	++	++	++
B 7	++	++	++	++	++	+	+	-
B 8	++	++	++	++	++	+	+	-
B 9	++	++	++	++	++	+	+	-
B 10	++	++	++	++	++	+	+	-
B 11	++	++	++	++	++	+	+	-
B 12	++	++	++	++	++	+	+	-

[61]说明：1）“- -”表示团块萎缩至冻干前体积的一半以下；“-”表示有萎缩，但团块的体积大于冻干前的一半；“+”表示仅仅边缘部分有轻微萎缩，团块体积与冻干前基本相同；“++”表示完全无萎缩，团块体积与冻干前相同。2）冻干粉外观合格标准：颜色均匀，孔隙致密，保持冻干前的体积、形状基本不变，呈块状或海绵状团块结构。由表 11 可以看出含有甘油的制剂配方，37℃放置一天就出现轻微萎缩，放置七天后外观萎缩、塌陷明显，所以排除甘油作为 ADC 制剂辅料种类。

实施例 7. 冻干粉处方确定及稳定性考察

[62]冻干粉外观检查淘汰配方 B7-B12，通过水分含量检查、可见异物和不溶性微粒检查及留样稳定性考察进行进一步的辅料筛选（配方 B1—B6）。

[63]将各个配方的冻干粉分别置于 37、25 和 4°C 保存，在不同的时间取样

进行 SDS-PAGE、反相 HPLC、配体结合法生物活性、水分含量、外观、pH 值、可见异物和不溶性微粒等项目的检查。

[64]表 12 冻干粉外观检查结果

配方编号	B1	B2	B3	B4	B5	B6
外观	++	++	++	++	++	++

[65]说明：“--”表示团块萎缩至冻干前体积的一半以下；“-”表示有萎缩，但团块的体积大于冻干前的一半；“+”表示仅仅边缘部分有轻微萎缩，团块体积与冻干前基本相同；“++”表示完全无萎缩，团块体积与冻干前相同。

[66]从表 12 中可以看出，配方 B1-B6 冻干粉外观均符合要求。

[67]每个配方抽取 3 支样品，按照规定方法测定水分含量，取平均值，结果如表 12。

[68]表 12 冻干粉水分含量测定结果

配方编号	B1	B2	B3	B4	B5	B6
含水量(%)	0.658	0.586	0.557	0.606	0.571	0.560

[69]配方 B1、B2、B3、B4、B5、B6 的水分含量均＜3%，合格。

[70]每个配方随机抽样 5 支，按照规定方法复溶后检查可见异物，抽取其中的 3 支，按照规定方法测定不溶性微粒，结果如表 13 所示。

[71]表 13 冻干粉复溶后可见异物和不溶性微粒检查结果

配方编号	可见异物 (平均斑点数)	不溶性微粒数(>10μm)
B1	4.3	7542
B 2	0.6	642
B 3	5.0	6792
B 4	0.5	650
B 5	7.7	9168
B 6	1.2	926

[72]从以上结果可以看出，可见异物和不溶性微粒检查，配方 B1、B3、B5 不符合规定，淘汰。

[73]表 14 37℃保存 1 个月稳定性考察结果

配方编号	SEC-HPLC (%)	HIC-HPLC 平均偶联率	结合力活性 (IC50)(pM)	细胞活性 (IC50)(pM)	含水量 (%)	外观	可见异物数量	pH	不溶性微粒 (>10μm)	不溶性微粒 (>25μm)
B2	99.02	3.98	15.23	65.2	0.889	++	1	6.30	669	9.0
B4	99.18	3.99	12.59	57.6	0.896	++	0	6.30	645	6.0
B6	99.12	3.96	14.77	57.8	0.902	++	6	6.30	6418	692.0

[74]表 15 25℃保存 3 个月稳定性考察结果

配方编号	SEC-HPLC (%)	HIC-HPLC 平均偶联率	结合力活性 (IC50)(pM)	细胞活性 (IC50)(pM)	含水量 (%)	外观	可见异物数量	pH	不溶性微粒 (>10μm)	不溶性微粒 (>25μm)
B2	99.12	4.03	13.27	55.2	0.789	++	0	6.30	300	12.0
B4	99.25	4.05	12.68	56.1	0.796	++	0	6.30	315	6.0
B6	99.34	4.05	12.91	55.6	0.806	++	6	6.30	6209	646.0

[75]表 16 4℃保存 6 个月稳定性考察结果

配方编号	SEC-HPLC (%)	HIC-HPLC 平均偶联率	结合力活性 (IC50)(pM)	细胞活性 (IC50)(pM)	含水量 (%)	外观	可见异物数量	pH	不溶性微粒 (>10μm)	不溶性微粒 (>25μm)
B2	99.45	4.01	13.23	55.4	0.560	++	0	6.30	618	6.0
B4	99.48	3.99	12.19	57.1	0.579	++	0	6.30	672	0.0
B6	99.21	3.95	13.30	56.5	0.589	++	4	6.30	6120	610.0

说明：外观标准：“- -”表示团块萎缩至冻干前体积的一半以下；“-”表示有萎缩，但团块的体积大于冻干前的一半；“+”表示仅仅边缘部分有轻微萎缩，团块体积与冻干前基本相同；“++”表示完全无萎缩，团块体积与冻干前相同。

[76] 根据以上结果可以看出配方 B2 和配方 B4 在不同温度（4℃、25℃、37℃）下的稳定性较好，配方 B6 的不溶性颗粒过多，淘汰。通过上述检测，配方 B2 和配方 B4 在冻干粉外观检查、冻干粉水分含量测定、冻干粉复溶后可见异物和不溶性微粒检查以及稳定性方面均达到了优良的水平。

[77]综合以上实验证据可知：非还原性糖、氨基酸、促溶剂大类物质中具体辅料的选择对于最终制剂的影响结果是难以预期的，针对本发明的 Her2 单克隆抗体药物偶联物，需要通过大量的试验针对各种性能方面的检测，才能最终获得一个良好的制剂组合方案。例如：添加精氨酸对改善蛋白的可见异物情况没有明显的作用。添加蔗糖、甘油与聚山梨酯 80 均可以改善蛋白凝聚的情况；但甘油的添加，又会使得冻干产品复建后容易出现复建水溶液外观萎缩、塌陷明显。此外，蔗糖浓度过高或甘露糖浓度过低均会导致复建后的不溶物的增多。这些结果均是本领域技术人员在进行相关试验之前难以预料到，且由于 ADC 制剂涉及多种辅料的组合运用，还涉及长时间的稳定性测试等因素，使得开发一种 ADC 制剂存在相当的难度。我们通过大量的试验，确定了各方面性能优良的 Her2 ADC 制剂组合，抗 Her2 单抗-MMAE 偶联物能够在冻干前后溶解良好，不溶性微粒和可见异物符合人用注射液标准，同时使偶联物在冻干和保存过程中长期保持稳定，尤其是在 25℃或 37℃的高温条件下长期放置，仍然保持了良好的稳定性，所述的 ADC 制剂在重建后也不易发生聚合或降解，保持良好的生物活性。

权 利 要 求 书

1. 一种抗体药物偶联物的含水液体药物制剂，所述制剂包含抗体药物偶联物、非还原糖、氨基酸、促溶剂；所述非还原糖选自甘露醇、蔗糖、海藻糖或其组合；所述氨基酸选自组氨酸、丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、谷氨酸及上述氨基酸盐酸盐或其组合；所述促溶剂选自甘油、Tween80 或其组合。

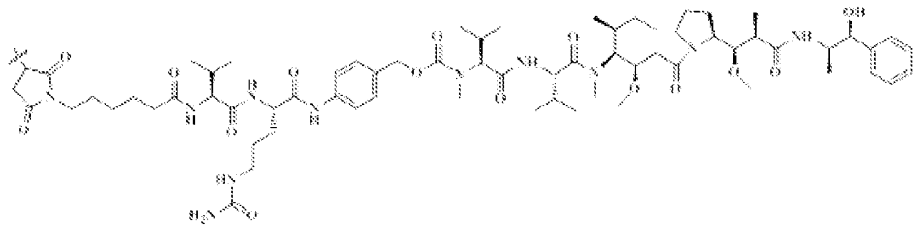
2. 权利要求 1 所述的含水液体药物制剂，其中所述甘露醇浓度为：100-300mmol/L，优选 190-300mmol/L，更优选 200-260mmol/L，最优选 240-260mmol/L；所述蔗糖浓度为：0-100mmol/L，优选 40-100mmol/L，更优选 60-100mmol/L，最优选 40 -60mmol/L。

3. 权利要求 1 或 2 所述的含水液体药物制剂，其中所述组氨酸为盐酸组氨酸，其浓度为：0-100mmol/L，优选 5-50mmol/L，更优选 5-20mmol/L，最优选 10mmol/L；所述精氨酸为盐酸精氨酸，其浓度为：0-160mmol/L，优选 20-100mmol/L、更优选 30-90mmol/L，最优选 35mmol/L。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的含水液体药物制剂，其中所述甘油含量为：0-1%，优选 0.2-0.5%（w/v）；所述 Tween80 质量百分比为：0-0.02%（w/v）。

5. 权利要求 1-4 中任一项所述的含水液体药物制剂，所述抗体药物偶联物中所述抗体为抗 HER2 单克隆抗体；抗体所偶联的药物为 MMAE 或 MMAF 及其衍生物或 DM1、DM4 及其衍生物。

6. 权利要求 5 所述的含水液体药物制剂，所述抗 HER2 抗体药物偶联物为抗 HER2 单克隆抗体-vc-MMAE，所述抗 HER2 单克隆抗体和 MMAE 通过接头 vc 连接，其中所述接头与 MMAE 连接后的结构为：



。

7. 权利要求 5 或 6 所述的含水液体药物制剂，所述抗 HER2 单克隆抗体包含重链和轻链，

（i）所述重链包含 CDR1-3，其中所述 CDR1-3 的氨基酸序列分别具

有如 SEQ ID NO:1、2 和 3 所示的氨基酸序列；和/或

（ii）所述轻链包含 CDR1-3，其中所述 CDR1-3 的氨基酸序列分别具有如 SEQ ID NO:4、5 和 6 所示的氨基酸序列；

所述单克隆抗体优选为嵌合抗体或人源化抗体。

8. 权利要求 1-7 任一项所述的含水液体药物制剂，其中所述抗 HER2 单克隆抗体-vc -MMAE 的浓度为 5-30mg/ml。

9. 权利要求 8 所述的含水液体药物制剂，所述非还原性糖为 240-260mmol/L 的甘露醇和/或 40mmol/L-60mmol/L 蔗糖、所述氨基酸为 8-12mmol/L 的盐酸组氨酸，所述促溶剂为 0-0.02%（w/v）的 Tween80。

10. 权利要求 9 所述的含水液体药物制剂，其中所述非还原性糖为约 260mmol/L 的甘露醇和约 40mmol/L 蔗糖、所述氨基酸为约 10mmol/L 的盐酸组氨酸，所述抗体药物偶联物的浓度约 10mg/ml, 所述促溶剂为 0.02%（w/v）的 Tween 80。

11. 权利要求 10 所述的含水液体药物制剂，其中所述非还原性糖为约 240mmol/L 的甘露醇和约 60mmol/L 蔗糖、所述氨基酸为约 10mmol/L 的盐酸组氨酸， 所述抗体药物偶联物的浓度约 10mg/ml, 所述促溶剂为约 0.02%（w/v）的 Tween 80。

12. 权利要求 1-11 任一项所述的含水液体药物制剂，所述制剂的 pH 4.5－7，优选 5.6－6.8、更优选 5.6－6.5，5.6-6.4，5.6－6.3，6.1－6.4，6.1－6.3。

13. 一种抗体药物偶联物的冻干药物制剂，所述冻干药物制剂通过冷冻干燥权利要求 1-12 中任一项所述的含水液体药物制剂获得。

14. 权利要求 13 所述的冻干药物制剂，其中所述含水液体药物制剂含有约 260mmol/L 的甘露醇、约 40mmol/L 蔗糖、约 10mmol/L 的盐酸组氨酸、约 0.02%（w/v）的 Tween 80、约 10mg/ml 的抗 HER2 单克隆抗体-vc-MMAE，pH 为 5.6－6.8 。

15. 权利要求 13 所述的冻干药物制剂，其所述含水液体药物制剂含有约 240mmol/L 的甘露醇、约 60mmol/L 蔗糖、约 10mmol/L 的盐酸组氨酸、约 0.02%的 Tween 80，约 10mg/ml 的抗 HER2 单克隆抗体-vc-MMAE，pH 为 5.6－6.8。

16. 权利要求 13 所述的冻干药物制剂，所述含水液体药物制剂含有的所

述非还原性糖为甘露醇和蔗糖，其浓度分别约 47.36mg/ml 和约 13.69mg/ml，所述氨基酸为盐酸组氨酸，其浓度约 2.10mg/ml，所述促溶剂为 Tween 80，其含量约 0.02%（w/v）。

17. 权利要求 13 所述的冻干药物制剂，所述含水液体药物制剂含有的所述非还原性糖为甘露醇和蔗糖，其浓度分别约 43.72mg/ml 和约 20.54mg/ml、所述氨基酸为盐酸组氨酸，其浓度约 2.10mg/ml，所述促溶剂为 Tween 80，其含量约 0.02%（w/v）。

18. 权利要求 1-17 中任一项所述的药物制剂在制备治疗 Her2 异常表达导致的疾病药物中的用途，所述异常表达导致的疾病进一步优选为癌症；所述癌症进一步优选为 Her2 阳性癌症；所述 Her2 阳性癌症进一步优选为乳腺癌、卵巢癌、胃癌、尿路上皮癌、胃食管癌、食道癌、子宫内膜癌、肺癌或膀胱癌。

19.制备一种抗体药物偶联物药物制剂的方法，包括：

（1）制备权利要求 1-17 中任一项的制剂；

（2）评估该制剂中 抗体药物偶联物的稳定性。