



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0024001

(51)⁷ A61K 9/00

(13) B

(21) 1-2012-00518

(22) 28/07/2010

(86) PCT/EP2010/060930 28/07/2010

(87) WO2011/012637 03/02/2011

(30) 09167025.7 31/07/2009 EP

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/07/2012 292A

(73) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Basel (CH)

(72) ADLER, Michael (DE); GRAUSCHOPF, Ulla (DE); MAHLER, Hanns-Christian (DE); STAUCH, Oliver Boris (DE)

(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) CHẾ PHẨM DƯỢC ỔN ĐỊNH CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG HER-2, THIẾT BỊ TIÊM VÀ KIT CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm dược ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 có hoạt tính dược, ví dụ như Trastuzumab (HERCEPTINTM), Pertuzumab hoặc T-DM1, hoặc hỗn hợp của các phân tử kháng thể này để tiêm dưới da. Đặc biệt, sáng chế đề xuất các chế phẩm bao gồm, ngoài một lượng thích hợp của kháng thể kháng HER2, còn có một lượng hữu hiệu của ít nhất một enzym hyaluronidaza làm chế phẩm hỗn hợp hoặc để sử dụng dưới dạng đồng chế phẩm. Các chế phẩm này còn bao gồm ít nhất một chất đệm, ví dụ như chất đệm histidin, chất ổn định hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất ổn định (ví dụ sacarit, như α , α -trehaloza dihydrat hoặc sucroza chẳng hạn, và tùy ý methionin làm chất ổn định thứ hai), chất hoạt động bề mặt không ion và một lượng hữu hiệu của ít nhất một enzym hyaluronidaza. Các phương pháp để bào chế các chế phẩm này cũng được đề xuất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất các chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 có hoạt tính được hoặc hỗn hợp của các phân tử kháng thể này để tiêm dưới da. Chế phẩm này bao gồm, ngoài các lượng cao của kháng thể kháng HER2 hoặc hỗn hợp của chúng, chất đệm, chất ổn định hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất ổn định, chất hoạt động bề mặt không ion và một lượng hữu hiệu của ít nhất một enzym hyaluronidaza. Sáng chế còn đề xuất quy trình để tạo ra chế phẩm đã nêu và tới việc sử dụng chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc sử dụng các kháng thể được đã gia tăng trong các năm qua. Trong nhiều trường hợp các kháng thể này được tiêm trong tĩnh mạch (IV). Đáng tiếc là lượng kháng thể mà có thể được tiêm qua tĩnh mạch bị hạn chế bởi các đặc tính hóa sinh của kháng thể, đặc biệt bởi tính tan và tính ổn định của nó trong chế phẩm lỏng ổn định và bởi thể tích của chất lỏng truyền. Các đường sử dụng khác là tiêm dưới da hoặc trong cơ. Các đường sử dụng đó cần nồng độ protein cao trong dung dịch cuối cùng để tiêm (Shire, S.J., Shahrokh, Z. et al., “Challenges in the development of high protein concentration formulations”, J. Pharm. Sci. 2004; 93(6): 1390-1402; Roskos, L.K., Davis C.G. et al., “The clinical pharmacology of therapeutic antibodies”, Drug Development Research 2004; 61(3): 108-120). Để làm tăng thể tích, và nhờ đó liều chữa bệnh, mà có thể sử dụng an toàn và tiện lợi dưới da, dự tính sử dụng (các) enzym glycosaminoglycanaza để làm tăng khoảng kẽ để chế phẩm kháng thể có thể được tiêm vào (WO2006/091871; US2006/0104968).

Các ví dụ về các chế phẩm ổn định chứa các kháng thể có hoạt tính được đề sử dụng chữa bệnh hiện có trên thị trường như sau:

HERCEPTIN™ (Trastuzumab) là kháng thể đơn dòng trực tiếp kháng thụ thể HER2 (kháng thể kháng HER2) hiện được bán ở châu Âu dưới dạng 150 mg bột đông khô (chứa kháng thể, α, α -trehaloza dihydrat, L-histidin và L-histidin hydroclorua và polysorbat 20) mà sẽ được hoàn nguyên để truyền với nước tiêm nhằm thu được liều tiêm khoảng 21 mg/ml. Ở Hoa Kỳ và nhiều quốc gia khác có bán lọ đa liều chứa 440 mg Trastuzumab.

AVASTIN™ (Bevacizumab) là kháng thể đơn dòng trực tiếp kháng thụ thể nhân tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF) hiện được bán ở châu Âu dưới dạng chế phẩm lỏng trong hai loại lọ: a) 100 mg Bevacizumab trong 4 ml và b) 400 mg Bevacizumab trong 16 ml tương ứng, cung cấp nồng độ cuối cùng là 25 mg/ml trong nước tiêm chứa các tá dược dưới đây: trehaloza dihydrat, natri phosphat và polysorbat 20.

Trong khi các chế phẩm kháng thể nêu trên được cho là thích hợp để sử dụng trong tĩnh mạch thì có mong muốn là đưa ra các chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa các kháng thể có hoạt tính chữa bệnh để tiêm dưới da. Lợi ích của các việc tiêm dưới da là nó cho phép thầy thuốc tiến hành ở bệnh nhân với sự can thiệp ngắn hơn. Ngoài ra bệnh nhân có thể được tập luyện để tự tiêm dưới da. Việc tự sử dụng này là đặc biệt có lợi khi sử dụng thuốc duy trì vì không cần đến sự chăm sóc của bệnh viện (giảm việc sử dụng nguồn lực y tế). Thông thường, việc tiêm dưới da được giới hạn ở khoảng 2 ml. Đối với các bệnh nhân cần nhiều liều, một vài chế phẩm liều đơn vị có thể được tiêm tại nhiều điểm của bề mặt cơ thể.

Hai sản phẩm kháng thể dưới đây để sử dụng dưới da đã có bán trên thị trường.

HUMIRA™ (Adalimumab) là kháng thể đơn dòng trực tiếp kháng nhân tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) hiện được bán ở châu Âu dưới dạng liều 40 mg trong thể tích 0,8 ml để sử dụng dưới da (nồng độ: 50 mg kháng thể/ml thể tích tiêm).

XOLAIR™ (Omalizumab) là kháng thể đơn dòng trực tiếp kháng globulin miễn dịch E (kháng thể kháng IgE) hiện được bán trên thị trường dưới dạng 150 mg bột đông khô (chứa kháng thể, sucroza, histidin và histidin hydroclorua monohydrat và polysorbat 20) mà sẽ được hoàn nguyên với nước tiêm để thu được liều tiêm 125 mg/ml.

Không có chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 nào thích hợp để sử dụng dưới da hiện đang có bán trên thị trường. Vì vậy mong muốn có các chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa các kháng thể có hoạt tính chữa bệnh để tiêm dưới da.

Việc tiêm các dược chất sử dụng ngoài đường tiêu hóa vào lớp dưới da thường bị giới hạn ở các thể tích ít hơn 2 ml do tính chịu đàn hồi với độ dẫn nước ở mô dưới da (SC), do áp lực ngược phát sinh khi tiêm (Aukland K. and Reed R., “Interstitial-Lymphatic Mechanisms in the control of Extracellular Fluid Volume”, *Physiology Reviews*”, 1993; 73:1-78), cũng như do các cảm nhận đau.

Việc bào chế các chế phẩm protein nồng độ cao là một thách thức lớn và cần điều chỉnh từng chế phẩm theo các protein cụ thể sử dụng do mỗi protein có đặc tính kết tụ khác nhau. Các thể kết tụ bị nghi ngờ là nguyên nhân gây ra tính tạo miễn dịch của các protein chữa bệnh trong ít nhất một số trường hợp. Phản ứng tạo miễn dịch kháng các thể kết tụ protein hoặc kháng thể có thể tạo ra các kháng thể trung hòa mà có thể làm cho protein hoặc kháng thể chữa bệnh không hiệu quả. Dường như là tính tính sinh miễn dịch của thể kết tụ protein hầu như mơ hồ khi tiêm dưới da, do đó việc sử dụng nhắc lại làm tăng nguy cơ đáp ứng miễn dịch.

Trong khi các kháng thể có cấu trúc tổng thể rất giống nhau thì các kháng thể này lại khác nhau trong chế phẩm axit amin (đặc biệt ở các vùng CDR tạo ra gắn kết với kháng nguyên) và mẫu glycosyl hóa. Ngoài ra, có thể còn có các cải biến sau dịch mã như các thể biến dị tích điện và glycosyl hóa. Đối với trường hợp đặc biệt là các kháng thể kháng HER2 thì các cải biến sau dịch mã này có

thể được mô tả, ví dụ đối với kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người humMAb4D5-8 (= Trastuzumab). Các phương pháp tinh chế đặc biệt để loại bỏ các thể biến dị axit chẳng hạn đã được triển khai và các chế phẩm chứa lượng giảm của các thể biến dị axit (các thể biến dị phần lớn đã loại nhóm amit trong đó một hoặc nhiều gốc asparagin của polypeptit đầu tiên được chuyển hóa thành aspartat, tức là chuỗi mạch bên amit trung tính được chuyển hóa thành gốc có đặc tính axit toàn phần) trước tiên được đề xuất bởi Basey, C.D and Blank, G.S. trong WO99/57134.

Các chế phẩm kháng thể đông khô ổn định chứa chất bảo vệ đông khô, chất đệm và chất hoạt động bề mặt được mô tả bởi Andya và cộng sự (WO 97/04801 và US 6,267,958, US 6,685,940, US 6,821,151 và US 7,060,268).

WO 2006/044908 đề xuất các chế phẩm kháng thể, bao gồm các kháng thể đơn dòng được bào chế trong chất đệm histidin-axetat, pH 5,5 đến 6,5, tốt hơn là 5,8 đến 6,2.

US 2007/071675 đề xuất các protein gắn kết đa đặc hiệu và đa trị được xử lý kỹ thuật di truyền và được phẩm thích hợp để cung cấp ngoài ruột.

WO 2008/150949 đề xuất các kháng thể được làm tương thích với người với globulome A β (20-42) và cụ thể là các kháng thể và các phân kháng thể được hợp nhất trong được phẩm thích hợp để cung cấp ngoài ruột.

Vì vậy vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế là đề xuất các chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 có hoạt tính được hoặc hỗn hợp của các phân tử kháng thể này để tiêm dưới da. Các chế phẩm này bao gồm, ngoài các lượng kháng thể kháng HER2 lớn hoặc hỗn hợp của chúng, còn có chất đệm, chất ổn định hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất ổn định, chất hoạt động bề mặt không ion và một lượng hữu hiệu của ít nhất một enzym hyaluronidaza. Việc bào chế các chế phẩm kháng thể nồng độ cao là một thách thức do độ nhớt tăng mạnh khi protein ở nồng độ protein cao và sự gia tăng mạnh về độ kết tụ protein, hiện tượng đó lại phụ thuộc vào chính bản thân nồng độ. Độ nhớt cao tác động không tốt tới khả năng xử lý (ví dụ các bước bơm và

lọc) các chế phẩm kháng thể và cách sử dụng (khả năng tiêm). Trong một số trường hợp, vấn đề này giải quyết bằng cách bổ sung tá dược để làm giảm độ nhớt cao. Việc kiểm soát và phân tích thể kết tụ protein là một thách thức tăng dần. Thể kết tụ là vấn đề thường gặp phải trong nhiều bước của quá trình xử lý, nó bao gồm quá trình lên men, tinh chế, bào chế và quá trình bảo quản. Các nhân tố khác, như nhiệt độ, nồng độ protein, áp lực khuấy trộn, các tác động của việc làm đông lạnh và làm tan đông, dung môi và chất hoạt động bề mặt, và các cải biến hóa học, có thể ảnh hưởng tới trạng thái kết tụ của protein chữa bệnh. Trong quá trình phát triển chế phẩm chứa kháng thể nồng độ cao thì xu hướng kết tụ của protein phải được kiểm soát và điều chỉnh bằng cách bổ sung các tá dược và các chất hoạt động bề mặt khác nhau (Kiese S. et al., J. Pharm. Sci., 2008; 97(10); 4347-4366). Yêu cầu để bào chế chế phẩm dược ổn định, nồng độ cao thích hợp chứa kháng thể kháng HER2 có hoạt tính dược theo sáng chế tăng bởi thực tế là hai protein khác nhau cần được bào chế thành chế phẩm lỏng theo cách mà chế phẩm vẫn ổn định trong một vài tuần và các hoạt chất dược vẫn có hoạt tính trong quá trình bảo quản thích hợp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm dược ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 có hoạt tính dược hoặc hỗn hợp của các phân tử kháng thể này để tiêm dưới da, sẵn sàng để sử dụng.

Cụ thể chế phẩm dược ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 có hoạt tính dược theo sáng chế bao gồm:

- khoảng từ 50 đến 350 mg/ml kháng thể kháng HER2;
- khoảng từ 1 đến 100 mM chất đệm tạo ra độ pH = $5,5 \pm 2,0$;
- khoảng từ 1 đến 500 mM chất ổn định hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất ổn định, nhờ đó methionin tùy ý có mặt như chất ổn định thứ hai, ví dụ với nồng độ từ 5 đến 25 mM;
- 0,01 đến 0,1% chất hoạt động bề mặt không ion; và

- một lượng hữu hiệu của ít nhất một enzym hyaluronidaza.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng chế phẩm để bào chế thuốc sử dụng điều trị bệnh hoặc rối loạn có thể điều trị được bằng kháng thể kháng HER2 như bệnh ung thư hoặc bệnh không ác tính ở đối tượng bao gồm việc cung cấp chế phẩm mô tả theo sáng chế cho đối tượng với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn đã nêu. Kháng thể kháng HER2 có thể được sử dụng đồng thời hoặc liên tiếp với tác nhân hóa liệu pháp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp để điều trị bệnh hoặc rối loạn, mà có thể điều trị được bằng kháng thể kháng HER2 (ví dụ bệnh ung thư hoặc bệnh không ác tính), ở đối tượng bao gồm việc cung cấp chế phẩm theo sáng chế cho đối tượng với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn đã nêu. Bệnh ung thư hoặc bệnh không ác tính thường sẽ liên quan đến các tế bào biểu hiện HER2, sao cho kháng thể HER2 trong chế phẩm được chữa bệnh SC theo sáng chế có thể gắn kết với các tế bào tác động.

Sáng chế còn đề xuất các chế phẩm được gồm có chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 có hoạt tính được hoặc hỗn hợp của kháng thể này và một lượng thích hợp của ít nhất một enzym hyaluronidaza dưới dạng kit bao gồm các thành phần tiêm và các chỉ dẫn thích hợp để sử dụng dưới da.

Khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất các thiết bị tiêm bao gồm chế phẩm được ổn định, nồng độ cao theo sáng chế. Chế phẩm này có thể gồm có kháng thể kháng HER2 có hoạt tính được hoặc hỗn hợp của các phân tử kháng thể này và các tá dược thích hợp như nêu dưới đây và có thể còn bao gồm glycoprotein hyaluronidaza hòa tan hoặc dưới dạng chế phẩm kết hợp hoặc dưới dạng chế phẩm riêng rẽ để cùng sử dụng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các ví dụ được minh họa thêm bằng các hình vẽ kèm theo, chúng thể hiện các kết quả thử nghiệm dưới đây:

Fig.1: Độ ổn định của các chế phẩm A đến F (xem Bảng 1 dưới đây) sau 8 tuần với loại phân tử lượng thấp (LMW) được phát hiện bằng Size Exclusion-HPLC. Như thể hiện trên hình vẽ này các chế phẩm PS20 A, C và E có độ ổn định cao hơn chút ít so với các chế phẩm PS80 B, D và F khi bảo quản ở 30°C.

Fig.2: Độ ổn định của các chế phẩm A đến F (xem Bảng 1 dưới đây) sau 8 tuần với loại phân tử lượng cao (HMW) được phát hiện bằng Size Exclusion-HPLC. Như thể hiện trên hình vẽ này các chế phẩm A và B chứa trehaloza không bổ sung natri clorua có các HMW tăng ít hơn sau thời gian bảo quản 8 tuần.

Fig.3: Độ ổn định sau 8 tuần liên quan đến độ đục. Như thể hiện trên hình vẽ này các chế phẩm A và B chứa trehaloza có độ đục thấp; trong khi các chế phẩm C đến F chứa NaCl có độ đục cao hơn nhiều. Các chế phẩm E và F chứa trehaloza cũng như NaCl có độ đục trung bình. Không có sự gia tăng đáng kể được thấy khi bảo quản trong 8 tuần.

Fig.4: Độ nhớt của các chế phẩm lỏng A đến F (xem Bảng 1 dưới đây) như được đo bằng cách sử dụng phép đo độ nhớt đĩa hình côn ở nhiệt độ môi trường. Tất cả các chế phẩm trong giới hạn độ nhớt thấp dự tính để tiêm dưới da.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 có hoạt tính được theo sáng chế có thể được đề xuất dưới dạng lỏng hoặc có thể được đề xuất dưới dạng đông khô. Theo các chỉ dẫn trong WO 97/04801 nồng độ kháng thể trong chế phẩm hoàn nguyên có thể tăng bằng cách hoàn nguyên chế phẩm đông khô để tạo ra nồng độ protein trong chế phẩm hoàn nguyên lớn hơn 2-40 lần nồng độ protein trong hỗn hợp trước bước làm đông khô.

Nồng độ kháng thể kháng HER2 là từ 100 đến 150 mg/ml, ví dụ 120 ± 18 mg/ml, khoảng 110 mg/ml, khoảng 120 mg/ml hoặc khoảng 130 mg/ml.

Nồng độ của chất đệm tạo ra độ pH = $5,5 \pm 2,0$ là từ 1 đến 50 mM, ví dụ từ 10 đến 30 mM hoặc khoảng 20 mM. Các chất đệm khác nhau là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật như nêu thêm nữa dưới đây.

Chất đệm có thể là chất đệm histidin, ví dụ L-histidin/HCl. Theo một phương án đặc biệt, độ pH của chất đệm L-histidin/HCl là khoảng 5,5 hoặc khoảng 6,0.

Chất ổn định (được sử dụng đồng nghĩa với thuật ngữ “tác nhân làm ổn định” trong mô tả sáng chế), ví dụ là carbohydrat hoặc sacarit hoặc đường được chấp thuận bởi cơ quan có thẩm quyền dưới dạng phụ gia hoặc tá dược trong các chế phẩm dược, ví dụ α,α -trehaloza dihydrat hoặc sucroza. Nồng độ của chất ổn định là từ 15 đến 250 mM, hoặc 150 đến 250 mM, hoặc khoảng 210 mM. Chế phẩm có thể chứa chất ổn định thứ hai, theo đó chất ổn định thứ hai này có thể là methionin, ví dụ với nồng độ từ 5 đến 25 mM hoặc với nồng độ từ 5 đến 15 mM (ví dụ methionin với nồng độ khoảng 5mM, khoảng 10 mM hoặc khoảng 15 mM).

Các ví dụ thích hợp về các chất hoạt động bề mặt thích hợp về mặt dược bao gồm các este của axit béo polyoxyetylen-sorbitan (Tween), các glycol polyetylen-polypropylen, các polyoxyetylen-stearat, các polyoxyetylen alkyl ete, polyoxyetylen monolauryl ete, các alkylphenylpolyoxyetylen ete (Triton-X), polyoxyetylen-polyoxypropylen copolyme (Poloxamer, Pluronic), và natri dodexyl sulphat (SDS). Các este của axit béo-polyoxyetylen-sorbitan thích hợp nhất là polysorbat 20, (được bán dưới tên thương mại Tween 20™) và polysorbat 80 (được bán dưới tên thương mại Tween 80™). Các polyetylen-polypropylen copolymer thích hợp nhất là các loại được bán dưới tên Pluronic® F68 hoặc Poloxamer 188™. Các polyoxyetylen alkyl ete thích hợp nhất là các loại được bán dưới tên thương mại Brij™. Các alkylphenolpolyoxyetylen ete thích hợp nhất được bán dưới tên thương mại Triton-X. Chất hoạt động bề mặt không ion có thể là polysorbat, ví dụ được chọn từ nhóm gồm có polysorbat 20, polysorbat 80 và polyetylen-polypropylen copolyme. Nồng độ của chất hoạt động bề mặt không ion là từ 0,01 đến 0,1% (khối lượng/thể tích), hoặc 0,01 đến 0,08% (khối lượng/thể tích), hoặc 0,025 đến 0,075% (khối lượng/thể tích), hoặc đặc biệt hơn là khoảng 0,02, 0,04 hoặc 0,06% (khối lượng/thể tích).

Nồng độ của enzym hyaluronidaza phụ thuộc vào enzym hyaluronidaza thực tế sử dụng trong quá trình bào chế chế phẩm theo sáng chế. Lượng hữu hiệu của enzym hyaluronidaza có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật dựa vào phân mô tả thêm nữa dưới đây. Nó sẽ được cung cấp với lượng đủ sao cho có thể làm tăng độ phân tán và hấp thụ của kháng thể kháng HER2 cùng sử dụng. Lượng tối thiểu của enzym hyaluronidaza là > 150 U/ml. Đặc biệt hơn lượng hữu hiệu của enzym hyaluronidaza là khoảng 1.000 đến 16.000 U/ml, theo đó lượng này tương ứng với khoảng 0,01 mg đến 0,16 mg protein dựa vào hoạt tính riêng giả thiết của 100.000 U/mg. Theo cách khác nồng độ của enzym hyaluronidaza là khoảng từ 1.500 đến 12.000 U/ml, hoặc đặc biệt hơn là khoảng 2.000 U/ml hoặc khoảng 12.000 U/ml. Các lượng chỉ định trên đây tương ứng với lượng enzym hyaluronidaza ban đầu thêm vào chế phẩm. Như được chứng minh trong các chế phẩm ví dụ các nồng độ enzym hyaluronidaza xác định trong chế phẩm cuối cùng có thể thay đổi trong một vài giới hạn. Vì vậy, ví dụ nồng độ enzym hyaluronidaza xác định thực tế (HE) ngay sau khi bổ sung là 12.0000 U/ml enzyme thể hiện sự biến đổi trong khoảng 12355 U/ml và 15178 U/ml (xem các Bảng 1 các chế phẩm A đến F và Bảng 3 chế phẩm H). Enzym hyaluronidaza có mặt hoặc dưới dạng chế phẩm hỗn hợp cuối cùng hoặc để sử dụng đồng thời, ví dụ dưới dạng đồng chế phẩm như được mô tả thêm dưới đây. Vấn đề quan trọng đối với chế phẩm theo sáng chế là ở thời gian nó sẵn sàng để sử dụng và/hoặc được tiêm nó có thành phần như nêu trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo. Tỷ lệ (khối lượng/khối lượng) enzym hyaluronidaza với kháng thể kháng HER2 nằm trong khoảng 1:1.000 và 1:8.000, hoặc trong khoảng 1:4.000 và 1:5.000 hoặc khoảng 1:6.000.

Enzym hyaluronidaza có thể thu được từ động vật, các mẫu người hoặc được tạo ra dựa vào kỹ thuật tái tổ hợp ADN như được mô tả thêm dưới đây.

Theo một số phương án, các chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo sáng chế có một trong các thành phần dưới đây:

a) 100 đến 150 mg/ml kháng thể kháng HER2, ví dụ được chọn từ nhóm gồm có Trastuzumab, Pertuzumab và T-DM1; 1 đến 50 mM chất đệm histidin, ví dụ L-histidin/HCl với độ pH khoảng 5,5; 15 đến 250 mM chất ổn định, ví dụ là α,α -trehaloza dihydrat, và tùy ý methionin làm chất ổn định thứ hai với nồng độ từ 5 đến 25 mM; khoảng 0,01 đến 0,08% chất hoạt động bề mặt không ion; và >150 đến 16.000 U/ml, đặc biệt hơn 1.000 đến 16.000 U/ml enzym hyaluronidaza, như rHuPH20 chẳng hạn, ví dụ với nồng độ khoảng 2.000 U/ml hoặc khoảng 12.000 U/ml.

b) 120 ± 18 mg/ml kháng thể kháng HER2, ví dụ được chọn từ nhóm gồm có Trastuzumab, Pertuzumab và T-DM1; 10 đến 30 mM, hoặc khoảng 20 mM chất đệm histidin, như L-histidin/HCl chẳng hạn với độ pH khoảng 5,5; 150 đến 250 mM hoặc khoảng 210 mM chất ổn định, ví dụ là α,α -trehaloza dihydrat, và tùy ý methionin làm chất ổn định thứ hai với nồng độ từ 5 đến 25 mM, hoặc từ 5 đến 15 mM, hoặc khoảng 10 mM; khoảng từ 0,01 đến 0,08% chất hoạt động bề mặt không ion; và 1.000 đến 16.000 U/ml, hoặc từ 1.500 đến 12.000 U/ml, khoảng 2.000 U/ml hoặc khoảng 12.000 U/ml enzym hyaluronidaza, ví dụ như rHuPH20.

c) Khoảng 120 mg/ml kháng thể kháng HER2, ví dụ được chọn từ nhóm gồm có Trastuzumab, Pertuzumab và T-DM1; 10 đến 30 mM, hoặc khoảng 20 mM chất đệm histidin, như L-histidin/HCl chẳng hạn với độ pH khoảng 5,5; 150 đến 250 mM, ví dụ khoảng 210 mM chất ổn định, ví dụ là α,α -trehaloza dihydrat, và tùy ý methionin làm chất ổn định thứ hai với nồng độ từ 5 đến 25 mM, hoặc từ 5 đến 15 mM, hoặc khoảng 10 mM; khoảng 0,01 đến 0,08% chất hoạt động bề mặt không ion; và 1.000 đến 16.000 U/ml, hoặc 1.500 đến 12.000 U/ml, hoặc đặc biệt hơn là khoảng 2.000 U/ml hoặc khoảng 12.000 U/ml enzym hyaluronidaza, ví dụ như rHuPH20.

d) Khoảng 120 mg/ml kháng thể kháng HER2, ví dụ được chọn từ nhóm gồm có Trastuzumab, Pertuzumab và T-DM1; khoảng 20 mM chất đệm histidin, như L-histidin/HCl chẳng hạn với độ pH khoảng 5,5; khoảng 210 mM α,α -

trehaloza dihydrat, và tùy ý khoảng 10 mM methionin làm chất ổn định thứ hai; 0,04 hoặc 0,06% polysorbat 20; và khoảng 12.000 U/ml enzym hyaluronidaza như rHuPH20; và đặc biệt là Chế phẩm A chỉ định dưới đây.

e) Khoảng 120 mg/ml kháng thể kháng HER2, ví dụ được chọn từ nhóm gồm có Trastuzumab, Pertuzumab và T-DM1; khoảng 20 mM chất đệm histidin, như L-histidin/HCl chẳng hạn với độ pH khoảng 5,5; khoảng 210 mM α,α -trehaloza dihydrat, và tùy ý 10 mM methionin làm chất ổn định thứ hai; 0,04 hoặc 0,06% polysorbat 20; và khoảng 2.000 U/ml enzym hyaluronidaza như rHuPH20; và đặc biệt là chế phẩm X chỉ định dưới đây.

f) Chế phẩm đông khô bao gồm 120 mg/ml kháng thể kháng HER2, ví dụ được chọn từ nhóm gồm có Trastuzumab, Pertuzumab và T-DM1; 20 mM chất đệm histidin, như L-histidin/HCl chẳng hạn với độ pH khoảng 5,5; 210 mM α,α -trehaloza dihydrat và tùy ý 10 mM methionin làm chất ổn định thứ hai; khoảng 0,04 đến 0,06% chất hoạt động bề mặt không ion; và đặc biệt là Chế phẩm Y chỉ định dưới đây. Các chế phẩm đó có thể được hoàn nguyên với 1.000 đến 16.000 U/ml, hoặc 1.500 đến 12.000 U/ml, hoặc đặc biệt hơn là khoảng 2.000 U/ml hoặc khoảng 12.000 U/ml enzym hyaluronidaza, như rHuPH20 chẳng hạn.

Theo một phương án khác, các chế phẩm được chứa kháng thể kháng HER2 ổn định, nồng độ cao theo sáng chế có một trong các thành phần chỉ định trong Bảng 1, 3 và 4, theo đó các chế phẩm C, D, E và F là ít được ưu tiên do các đặc tính ít mong muốn như nêu trong các Ví dụ và trong Bảng 1.

Nó được đưa ra để tạo thuận tiện cho việc tiêm dưới da các protein và kháng thể chữa bệnh bằng cách sử dụng các lượng nhỏ glycoprotein hyaluronidaza hòa tan (sHASEGPs); xem WO2006/091871. Chúng tỏ rằng việc bổ sung các glycoprotein hyaluronidaza hòa tan này (hoặc dưới dạng chế phẩm hỗn hợp hoặc bằng cách đồng sử dụng) tạo thuận tiện cho quá trình đưa được chất chữa bệnh vào lớp dưới da. Bằng cách nhanh chóng khử polyme hóa hyaluronan HA trong khoảng ngoại bào sHASEGP giảm độ nhớt của khoảng kẽ, nhờ đó làm độ dẫn thủy lực và cho phép các thể tích lớn hơn được đưa vào mô

dưới da một cách an toàn và tiện lợi. Độ dẫn thủy lực cao bị kích thích bởi sHASEGP do độ nhớt kế giảm có tính đến độ phân tán lớn hơn nhiều, có khả năng làm tăng tính sinh khả dụng hệ thống của dược chất chữa bệnh sử dụng SC.

Các chế phẩm được ổn định, nồng độ cao theo sáng chế bao gồm glycoprotein hyaluronidaza hòa tan nên đặc biệt thích hợp để tiêm dưới da. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật biết rõ rằng chế phẩm này bao gồm kháng thể kháng HER2 và glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được cung cấp để sử dụng dưới dạng một chế phẩm hỗn hợp đơn hoặc theo cách khác dưới dạng hai chế phẩm riêng biệt mà có thể được trộn ngay trước khi tiêm dưới da. Theo cách khác kháng thể kháng HER2 và glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được sử dụng bằng các lần tiêm riêng biệt tại các điểm khác nhau của cơ thể, tốt hơn là tại các điểm liên sát ngay nhau. Cũng có thể tiêm các tác nhân chữa bệnh có mặt trong chế phẩm theo sáng chế bằng các lần tiêm liên tiếp, ví dụ trước tiên tiêm glycoprotein hyaluronidaza hòa tan tiếp theo là tiêm chế phẩm chứa kháng thể kháng HER2. Các lần tiêm đó cũng có thể được tiến hành theo thứ tự đảo ngược, nghĩa là trước tiên tiêm chế phẩm chứa kháng thể kháng HER2 tiếp theo là tiêm glycoprotein hyaluronidaza hòa tan. Trong trường hợp kháng thể kháng HER2 và glycoprotein hyaluronidaza hòa tan được sử dụng bằng cách tiêm riêng rẽ, một hoặc cả hai protein phải được cung cấp với chất đệm, (các) chất ổn định và chất hoạt động bề mặt không ion với các nồng độ như nêu trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo nhưng ngoại trừ enzym hyaluronidaza. Sau đó enzym hyaluronidaza có thể được cung cấp, ví dụ trong chất đệm L-histidin/HCl với độ pH khoảng 6,5, 100 đến 150 mM NaCl và 0,01 đến 0,1% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20 hoặc polysorbat 80. Đặc biệt enzym hyaluronidaza được cung cấp trong 20 mM chất đệm L-histidin/HCl với độ pH 6,5, 130 mM NaCl, 0,05% (khối lượng/thể tích) polysorbat 80 như ví dụ cụ thể trong Chế phẩm G của Bảng 1 dưới đây.

Như nêu trên glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được coi như là một tá dược khác trong chế phẩm kháng HER2. Glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được thêm vào chế phẩm kháng HER2 vào thời điểm bào chế chế

phẩm kháng HER2 hoặc có thể được thêm ngay trước khi tiêm. Theo cách khác, glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được cung cấp dưới dạng chế phẩm tiêm riêng biệt. Đối với trường hợp cuối cùng glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được cung cấp trong lọ riêng biệt hoặc dưới dạng đông khô cần phải hoàn nguyên với các chất pha loãng thích hợp trước khi tiến hành tiêm dưới da, hoặc có thể được cung cấp dưới dạng chế phẩm lỏng nhà sản xuất. Chế phẩm kháng HER2 và glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể có thể dưới dạng các đối tượng riêng biệt hoặc có thể còn được cung cấp dưới dạng các kit bao gồm cả các hợp phần tiêm và các hướng dẫn thích hợp để tiêm dưới da. Các hướng dẫn thích hợp để hoàn nguyên và/hoặc sử dụng một hoặc cả hai chế phẩm cũng có thể được cung cấp.

Vì vậy sáng chế cũng đề xuất các chế phẩm được bao gồm chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 có hoạt tính được hoặc hỗn hợp của kháng thể này và một lượng thích hợp của ít nhất một enzym hyaluronidaza dưới dạng kit bao gồm cả các hợp phần tiêm và các hướng dẫn thích hợp để tiêm dưới da.

Khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất các thiết bị tiêm bao gồm chế phẩm được ổn định, nồng độ cao theo sáng chế. Chế phẩm này có thể còn bao gồm kháng thể kháng HER2 có hoạt tính được hoặc hỗn hợp của các phân tử kháng thể này và các tá dược thích hợp như nêu dưới đây và có thể còn bao gồm glycoprotein hyaluronidaza hòa tan hoặc dưới dạng chế phẩm hỗn hợp hoặc dưới dạng chế phẩm riêng biệt để cùng sử dụng.

Các kháng thể kháng HER2 khác nhau là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Tốt hơn nếu các kháng thể này là các kháng thể đơn dòng. Chúng hoặc có thể còn được gọi là các kháng thể dạng khảm, các kháng thể được làm tương thích với người hoặc các kháng thể người hoàn toàn. Chúng hoặc là các kháng thể kháng HER2 có độ dài đầy đủ; các phần kháng thể kháng HER2 có cùng hoạt tính sinh học; bao gồm các biến thể trình tự axit amin và/hoặc các biến thể glycosyl hóa của các kháng thể hoặc các phần kháng thể đó. Các ví dụ về các

kháng thể kháng HER2 được làm tương thích với người đã được biết dưới các tên INN Trastuzumab và Pertuzumab. Kháng thể kháng HER2 thích hợp khác là T-DM1, nó là thể tiếp hợp kháng thể-toxin bao gồm huMAb4D5-8 (HERCEPIN™) và maytansinoit (tức là DM1 = N^{2'}-deaxetyl-N^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansin; tác nhân chống vi cấu trúc hình ống rất hiệu nghiệm) thể tiếp hợp đó (với liên kết MCC) hiện đang phát triển cho bệnh ung thư vú di căn. Các kháng thể HER2 khác với các đặc tính khác nhau đã được mô tả trong tài liệu Tagliabue et al., *Int. J. Cancer*, 47:933-937 (1991); McKenzie et al., *Oncogene*, 4:543-548 (1989); *Cancer Res.*, 51:5361-5369 (1991); Bacus et al., *Molecular Carcinogenesis*, 3:350-362 (1990); Stancovski et al., *PNAS (USA)*, 88:8691-8695 (1991); Bacus et al., *Cancer Research*, 52:2580-2589 (1992); Xu et al., *Int. J. Cancer*, 53:401-408 (1993); WO94/00136; Kasprzyk et al., *Cancer Research*, 52:2771-2776 (1992); Hancock et al., *Cancer Res.*, 51:4575-4580 (1991); Shawver et al., *Cancer Res.*, 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al., *Cancer Res.*, 54:3758-3765 (1994); Harwerth et al., *J. Biol. Chem.*, 267:15160-15167 (1992); U.S. Pat. No. 5,783,186; và Klapper et al., *Oncogene*, 14:2099-2109 (1997). Kháng thể kháng HER2 chữa bệnh thành công nhất là Trastuzumab được bán bởi Genentech Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd dưới tên thương mại HERCEPIN™. Ngoài ra các chi tiết khác về kháng nguyên và các kháng thể HER2 được mô tả trong nhiều công bố patent và non-patent (để mô tả chung thích hợp, xem US 5,821,337 và WO 2006/044908).

Kháng thể kháng HER2 ví dụ được chọn từ nhóm gồm có Trastuzumab, Pertuzumab và T-DM1 và có thể còn gồm có hỗn hợp của các kháng thể kháng HER2 ví dụ như Trastuzumab và Pertuzumab hoặc T-DM1 và Pertuzumab. Đã phát hiện ra rằng tổ hợp của Pertuzumab và Trastuzumab có hiệu lực và dung nạp tốt ở các bệnh nhân bị ung thư vú di căn dương tính với HER2 vẫn phải chịu đựng sự tiến triển của bệnh trong khi điều trị bằng trastuzumab trước đó (xem ví dụ Baselga, J. et al., *Journal of Clin. Oncol.* Vol 28 (7) 2010: pp. 1138-1144). Chế phẩm theo sáng chế được minh họa ở đây bằng kháng thể kháng HER2 Trastuzumab. Các thuật ngữ “Trastuzumab”, “Pertuzumab” và “T-DM1” bao

gồm tất cả các kháng thể kháng HER2 tương ứng mà đáp ứng đủ mọi yêu cầu cần thiết để đạt được quyền thương mại hóa như một sản phẩm đồng nhất hoặc tương tự sinh học ở quốc gia hoặc khu vực được chọn từ nhóm gồm có các quốc gia bao gồm Hoa Kỳ, châu Âu và Nhật Bản. Trastuzumab có các vùng CDR được xác định trong EP-B-590058. Pertuzumab có các CDR được xác định trong WO 01/00245. Hoạt tính của Trastuzumab trong thử nghiệm chống tăng sinh BT-474. (Nahta, R. et al., “The HER-2-targeting antibodies Trastuzumab and Pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells”, Cancer Res. 2004; 64:2343.2346) được thấy trong khoảng $0,7 - 1,3 \times 10^4$ U/mg. T-DM1 được mô tả trong WO 2005/117986.

HERCEPIN™ (Trastuzumab) đã được chấp thuận ở EU để điều trị cho các bệnh nhân bị ung thư vú di căn (MBC) có các khối u biểu hiện quá mức HER2 như sau:

- Như liệu pháp đơn để điều trị cho các bệnh nhân đã nhận ít nhất hai chế độ trị liệu bằng hóa liệu pháp cho bệnh di căn. Quá trình hóa liệu pháp trước phải bao gồm ít nhất một antraxyclin và taxan trừ khi các bệnh nhân không thích hợp với các điều trị đó. Các bệnh nhân dương tính với thụ thể hormon còn phải thất bại với liệu pháp hormon, trừ khi các bệnh nhân không thích hợp với các điều trị đó.

- Kết hợp với paclitaxel để điều trị cho các bệnh nhân chưa điều trị bệnh ung thư di căn bằng hóa liệu pháp và đối với họ antraxyclin không thích hợp.

- Kết hợp với docetaxel để điều trị cho các bệnh nhân chưa điều trị bệnh ung thư di căn bằng hóa liệu pháp.

- Kết hợp với chất ức chế aromataza để điều trị cho các bệnh nhân sau mãn kinh bị MBC dương tính với thụ thể hormon mà trước đó chưa điều trị bằng Trastuzumab.

Trastuzumab cũng được chấp thuận ở EU để điều trị cho các bệnh nhân bị MBC có các khối u biểu hiện quá mức HER2 để điều trị cho các bệnh nhân bị ung thư vú giai đoạn sớm dương tính với HER2 (EBC) sau khi phẫu thuật, hóa

liệu pháp (chất phụ trợ mới hoặc chất phụ trợ) và liệu pháp bức xạ (nếu thích hợp).

Ngoài ra Trastuzumab hiện nay được phát triển để điều trị bệnh ung thư dạ dày.

Hai chế độ trị liệu theo liều hiện được chấp thuận đối với Trastuzumab (Bảng 1); tuần một lần (q1w) và 3 tuần một lần (q3w) cho bệnh ung thư vú di căn (MBC) bệnh ung thư vú giai đoạn sớm (EBC). Theo chế độ liều q1w thì liều sử dụng là 4 mg/kg tiếp theo là liều sau với 2 mg/kg. Theo chế độ liều q3w thì liều sử dụng là 8 mg/kg tiếp theo là liều sau với 6 mg/kg.

Như nêu trên HERCEPIN™ (Trastuzumab) để tiêm tĩnh mạch hiện được bán dưới dạng đông khô chứa trong các lọ. Đối với chế phẩm bán ở châu Âu mỗi lọ chứa phần khô thu được sau khi làm đông khô thể tích đầy là 6,25 ml dung dịch nước tiệt trùng chứa các thành phần dưới đây: 150 mg Trastuzumab (156,3 mg có tác dụng bảo đảm rằng lượng danh định 150 mg có thể lấy ra từ sản phẩm cuối cùng sau khi hoàn nguyên), 3,50 mg L-histidin hydroclorua, 2,25 mg L-histidin, 141,9 mg α,α -trehaloza dihydrat, 0,63 mg Polysorbat 20. Chất đông khô hòa tan chứa khoảng 24 mg/ml Trastuzumab, 5 mM L-histidin/HCl pH 6,0, 60 mM α,α -trehaloza dihydrat, 0,01% polysorbat 20. Sau đó dung dịch được thêm vào dung dịch truyền và tiếp theo dung dịch truyền được cung cấp cho bệnh nhân trong 90 phút (các lần truyền tiếp theo có thể được tiến hành trong 30 phút đối với MBC, nếu dung nạp tốt).

Số lượng glycoprotein hyaluronidaza hòa tan là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Để xác định thêm chức năng, cơ chế hoạt động và các đặc tính của các glycoprotein hyaluronidaza hòa tan này các thông tin cơ sở dưới đây được cung cấp.

Cơ chất kẽ SC (dưới da) bao gồm mạng lưới của các protein có thớ bao lấy trong gel đàn hồi của các glycosaminoglycan. Hyaluronan (HA), disacarit mạch thẳng lặp lại không sulfat hóa, là glycosaminoglycan đáng chú ý của mô SC. HA được tiết xuất vào kẽ bằng các nguyên bào sợi với phân tử lượng cao,

megadalton polyme nhớt sau đó bị thoái biến cục bộ, trong bạch huyết, và trong gan, nhờ tác động của các hyaluronidaza thể sinh tan và các exoglycosidaza. Khoảng 50% hyaluronan trong cơ thể được tạo ra bởi mô SC, trong đó nó được phát hiện với khoảng 0,8 mg/gm trọng lượng mô ướt (Aukland K. and Reed R., nêu trên). Dự đoán rằng người trưởng thành nặng trung bình 70 kg chứa 15 g HA, trong đó 30 phần trăm chuyển giao mỗi ngày (tổng hợp và thoái biến) (Laurent L.B., et al., "Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in các hạch bạch huyết and liver", Exp. Physiol. 1991; 76: 695-703). Như thành phần chính của thành phần tương tự gel của cơ chất dưới da, HA góp phần đáng kể vào độ nhớt của nó

Các glycosaminoglycan (GAGs) là các polysacarit phức hệ mạch thẳng của cơ chất ngoại bào (ECM). Các GAG được đặc trưng bởi các cấu trúc disacarit lặp lại của hexosamin được thế tại N và axit uronic (đối với trường hợp là hyaluronan (HA), chondroitin sulfat (CS), chondroitin (C), dermatan sulfat (DS), heparan sulfat (HS), và heparin (H)), hoặc galactoza (đối với trường hợp là keratan sulfat (KS)). Ngoại trừ HA, thì tất cả hiện có liên kết cộng hóa trị với các protein nhân. Các GAG với các protein nhân về mặt cấu trúc được đề cập tới như các proteoglycan (PGs).

Hyaluronan (HA) được thấy ở động vật có vú chủ yếu trong các mô liên kết, da, sụn, và trong hoạt dịch. Hyaluronan cũng là thành phần chính của thủy tinh mắt. Trong mô liên kết, nước hydrat hóa kết hợp với hyaluronan tạo ra các cơ chất hydrat hóa giữa các mô. Hyaluronan đóng vai trò quan trọng trong hiện tượng sinh học liên quan đến tính vận động tế bào bao gồm phát triển nhanh, tái sinh, hồi phục, phát sinh phôi, phát triển phôi sinh học, làm lành vết thương, hình thành mạch, và hình thành khối u (Toole, Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed), Plenum Press, New York, 1991; pp. 1384-1386; Bertrand et al., Int. J. Cancer 1992; 52:1-6; Knudson et al., FASEB J. 1993; 7:1233-1241). Ngoài ra, các mức hyaluronan liên quan đến tính xâm lấn khối u (Ozello et al., Cancer Res. 1960; 20:600-604; Takeuchi et al., Cancer Res. 1976; 36:2133-2139; Kimata et al., Cancer Res. 1983; 43:1347-1354).

HA được thấy trong cơ chất ngoại bào của nhiều tế bào, đặc biệt ở các mô liên kết mềm. HA được ấn định các chức năng sinh lý học khác nhau, như trong nước và nội cân bằng protein trong huyết tương (Laurent T.C. et al., FASEB J., 1992; 6: 2397-2404). Quá trình hình thành HA làm gia tăng các tế bào tăng sinh và có thể đóng vai trò trong sự gián phân. Nó còn liên quan đến sự vận động và di trú tế bào. HA dường như đóng các vai trò quan trọng trong quá trình điều chỉnh, phát triển, và biệt hóa tế bào (Laurent et al., nêu trên).

HA được sử dụng rộng rãi trong y học lâm sàng. Các tính chất lưu biến và bảo vệ mô của nó được chứng minh có tác dụng trong phẫu thuật mắt (ví dụ để bảo vệ nội mô giác mạc trong quá trình phẫu thuật bệnh đục nhân mắt). HA trong huyết thanh để chẩn đoán bệnh gan và các tình trạng viêm nhiễm khác nhau, như viêm khớp dạng thấp. Chứng phù nề do sự tích tụ HA gây ra có thể làm rối loạn chức năng của nhiều cơ quan khác nhau (Laurent et al., nêu trên).

Các tương tác hyaluronan protein cũng liên quan đến cấu trúc của cơ chất ngoại bào hoặc “chất nền”.

Các hyaluronidaza là nhóm các enzym có hoạt tính axit hoặc trung tính được thấy trong toàn bộ giới động vật. Các hyaluronidaza thay đổi liên quan đến tính đặc hiệu nền, và cơ chế hoạt động (WO 2004/078140). Có ba loại hyaluronidaza chung: 1. Các hyaluronidaza điển hình của động vật có vú (EC 3.2.1.35) là các endo-beta-N-acetylhexosaminidaza với các tetrasacarit và hexasacarit là các sản phẩm cuối chính. Chúng có cả hoạt tính thủy phân và transglycosidaza, và có thể làm thoái biến hyaluronan và các chondroitin sulfat (CS), thường là C4-S và C6-S. 2. Các hyaluronidaza vi khuẩn (EC 4.2.99.1) làm thoái biến hyaluronan và CS và DS với các chừng mực khác nhau. Chúng là các endo-beta-N-acetylhexosaminidaza mà có thể hoạt động bởi phản ứng loại beta để tạo ra các sản phẩm cuối disacarit đầu tiên. 3. Các hyaluronidaza (EC 3.2.1.36) từ địa, các vật ký sinh ăn bám khác, và các loại giáp xác là các endo-beta-glucuronidaza mà tạo ra các sản phẩm cuối tetrasacarit và hexasacarit nhờ thủy phân liên kết beta 1-3.

Các hyaluronidaza của động vật có vú có thể còn được chia thành hai nhóm: các enzym có hoạt tính axit và trung tính. Có sáu gen tương tự hyaluronidaza trong hệ gen người, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 và PH20/SPAM1. HYALP1 là gen giả, và HYAL3 không thể hiện có hoạt tính enzym đối với bất kỳ chất nền đã biết nào. HYAL4 là chondroitinaza và có hoạt tính không nhiều đối với hyaluronan. HYAL1 là enzym có hoạt tính axit nguyên mẫu và PH20 là enzym có hoạt tính trung tính nguyên mẫu. Các hyaluronidaza có hoạt tính axit, như HYAL1 và HYAL2 thường không có hoạt tính xúc tác ở độ pH trung tính (tức là pH = 7). Ví dụ HYAL1 có hoạt tính xúc tác *in vitro* không nhiều ở độ pH = 4,5 (Frost I.G. and Stern, R., “A microtiter-based assay for hyaluronidaza activity not requiring specialized reagents”, Anal. Biochemistry, 1997; 251:263-269). HYAL2 là enzym có hoạt tính axit với hoạt tính đặc hiệu *in vitro* rất thấp.

Các enzym tương tự hyaluronidaza cũng có thể đặc trưng bởi các loại thường ăn khớp với màng sinh chất qua neo glycosylphosphatidyl inositol như HYAL2 và PH20 người (Danilkovitch-Miagkova et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 2003; 100(8):4580-4585; Phelps et al., Science 1988; 240(4860): 1780-1782), và các loại thường hòa tan như HYAL1 người (Frost, I.G. et al., “Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidaza”, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997; 236(1):10-15). Tuy nhiên, có các biến đổi từ loài đến loài: chẳng hạn PH20 bò gắn kết rất lỏng lẻo với màng sinh chất và không dính bám qua neo nhạy phospholipaza (Lalancette et al., Biol. Reprod., 2001; 65(2):628- 36). Điểm đặc trưng duy nhất này của hyaluronidaza bò cho phép sử dụng enzym hyaluronidaza tinh hoàn bò hòa tan làm chất chiết cho sử dụng lâm sàng (Wydase™, Hyalase™). Loài PH20 khác là các enzym dính bám lipid mà thường không tan trừ khi sử dụng các chất tẩy hoặc các lipaza. Ví dụ PH20 người được neo vào màng sinh chất qua neo GPI. Các cố gắng để tạo ra các cấu trúc ADN PH20 người mà sẽ không đưa neo lipid vào polypeptit làm cho enzym không có hoạt tính xúc tác, hoặc enzym không hòa tan (Arming et al., Eur. J. Biochem., 1997; 247(3):810-4). Hyaluronidaza tinh trùng khỉ xuất hiện

tự nhiên được thấy ở cả hai dạng liên kết màng và hòa tan. Trong khi dạng liên kết màng 64 kDa có hoạt tính enzym ở độ pH= 7,0, dạng 54 kDa chỉ có hoạt tính ở pH =4,0 (Cherr et al., Dev. Biol., 1996;10; 175(l): 142-53). Vì vậy, các dạng tan của PH20 thường không có hoạt tính enzym trong các trạng thái trung tính.

Như đã mô tả ở trên và theo các chỉ dẫn trong WO2006/091871 thì một lượng nhỏ các glycoprotein hyaluronidaza hòa tan (sHASEGPs) có thể được đưa vào chế phẩm để tạo thuận tiện cho việc đưa được chất chữa bệnh vào lớp dưới da. Bằng cách khử polyme hóa nhanh HA sHASEGP làm giảm độ nhớt của kẽ, nhờ đó làm tăng độ dẫn thủy lực và có tính đến các thể tích lớn hơn cần được cung cấp một cách an toàn và tiện lợi vào mô SC. Độ dẫn thủy lực tăng được kích thích bởi sHASEGP nhờ độ nhớt kẽ giảm có tính đến độ phân tán lớn hơn nhiều, có khả năng làm tăng tính sinh khả dụng hệ thống của được chất chữa bệnh sử dụng SC.

Khi được tiêm ở lớp dưới da, quá trình khử polyme hóa HA bằng sHASEGP được khoan vùng ở điểm tiêm trong mô SC. Bằng chứng thử nghiệm chứng tỏ rằng sHASEGP bất hoạt cục bộ trong khoảng kẽ với thời gian bán thải từ 13 đến 20 phút ở chuột, mà không có sự hấp thụ hệ thống được phát hiện trong máu sau liều tiêm trong tĩnh mạch ở chuột CD-1. Trong ngăn mạch sHASEGP thể hiện thời gian bán thải là 2,3 và 5 phút ở chuột và khi Cynomolgus tương ứng với các liều tới 0,5 mg/kg. Độ thanh thải nhanh của sHASEGP, kết hợp với quá trình tổng hợp liên tục của chất HA trong mô, làm tăng độ thẩm hoạt động cục bộ và tạm thời đối với các phân tử cùng tiêm khác, các hiệu quả của chúng đảo ngược hoàn toàn trong 24 đến 48 giờ sau khi sử dụng (Bywaters G.L., et al., "Reconstitution of the dermal barrier to dye spread after Hyaluronidaza injection", Br. Med. J., 1951; 2 (4741): 1178-1183).

Ngoài các tác động của nó đối với sự phân tán dịch cục bộ thì sHASEGP còn có tác dụng như chất tăng cường hấp thụ. Các đại phân tử lớn hơn 16 kilodalton (kDa) bị loại trừ không hấp thụ ở mức độ cao nhờ các mao dẫn qua phân tán và hầu hết được hấp thu qua các hạch bạch huyết thoát nước. Vì vậy

đại phân tử sử dụng dưới da như kháng thể chữa bệnh chẳng hạn (phân tử lượng khoảng 150 kDa) phải vượt qua cơ chất kẽ trước khi đi đến các mạch bạch huyết thoát nước cho quá trình hấp thu tiếp theo vào ngăn mạch. Bằng cách làm tăng sự phân tán cục bộ, sHASEGP làm tăng tốc độ hấp thu (K_a) của nhiều đại phân tử. Điều này làm tăng các mức cao nhất trong máu (C_{max}) và có khả năng làm tăng tính sinh khả dụng liên quan đến cách sử dụng SC khi không có sHASEGP (Bookbinder L.H., et al., “A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics”, *J. Control. Release* 2006; 114: 230-241).

Các sản phẩm hyaluronidaza có nguồn gốc động vật đã được sử dụng lâm sàng hơn 60 năm, trước tiên để tăng độ phân tán và hấp thu của các dược chất cùng sử dụng khác và đối với truyền dịch dưới da (tiêm/truyền dịch SC với thể tích lớn) (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). Các chi tiết về cơ chế hoạt động của các hyaluronidaza đã được mô tả chi tiết trong các công bố dưới đây: 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 hyaluronidaza”, *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. and Fraser, J.R.E., “Degradation of Bioactive Substances: Physiology and Pathophysiology”, Henriksen, J.H. (Ed) CRC Press, Boca Raton, FL; 1991. pp. 249-265; Harris, E.N., et al., “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

hyaluronidaza (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration”, Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4: 427-440. Hyaluronidaza products approved in EU countries include Hylase® “Dessau” and Hyalase®. Hyaluronidaza products of animal origin approved in the US include Vitrase™, Hydase™, và Amphadase™.

Độ an toàn và hiệu quả của các sản phẩm hyaluronidaza đã được chứng minh rộng rãi. Rủi ro về độ an toàn đáng kể nhất được nhận biết là tính quá mẫn và/hoặc tính gây dị ứng, nó được cho là có liên quan đến sự thiếu độ tinh khiết của các chế phẩm thu được từ động vật (Frost, G.I., “Recombinant human hyaluronidaza (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration”, Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4 : 427-440). Sẽ cần lưu ý rằng có các khác biệt về các liều đã được chấp thuận của các hyaluronidaza thu được từ động vật tại Anh, Đức và Hoa Kỳ. Ở Anh, liều thông thường như chất phụ trợ để tiêm dưới da hoặc trong cơ là 1500 đơn vị, được thêm trực tiếp vào thuốc tiêm. Ở Hoa Kỳ, liều thông thường sử dụng cho mục đích này là 150 đơn vị. Khi truyền dịch dưới da, hyaluronidaza được sử dụng để hỗ trợ sử dụng dưới da các thể tích dịch lớn tương đối. Ở Anh, 1500 đơn vị hyaluronidaza thường được đưa vào với mỗi 500 đến 1000 ml dịch để sử dụng dưới da. Ở Hoa Kỳ, 150 đơn vị được cho là tương xứng với mỗi lit dung dịch truyền dưới da. Ở Đức, 150 đến 300 đơn vị được cho là thỏa đáng cho mục đích này. Ở Anh, việc khuếch tán để gây mê cục bộ được gia tốc bằng cách bổ sung 1500 đơn vị. Ở Đức và Hoa Kỳ 150 đơn vị được cho là tương xứng cho mục đích này. Tuy vậy các khác biệt liều (liều ở Anh nhiều hơn gấp mười lần ở Hoa Kỳ), không có các khác biệt rõ ràng nào về các mức độ an toàn của các sản phẩm hyaluronidaza có nguồn gốc động vật bán trên thị trường ở Hoa Kỳ và Anh tương ứng, được báo cáo.

Vào ngày 02/12/2005, Halozyme Therapeutics Inc. đã nhận được sự chấp thuận của FDA về chế phẩm có thể tiêm chứa hyaluronidaza người tái tổ hợp, rHuPH20 (HYLENEX™). FDA phê chuẩn HYLENEX™ với liều bằng 150 đơn vị để sử dụng SC theo các chỉ dẫn dưới đây:

- làm chất phụ trợ để tăng sự hấp thu và phân tán của các dược chất tiêm khác;
- để truyền dịch dưới da;
- làm chất phụ trợ để chụp niệu SC nhằm cải thiện sự tái hấp thu của các tác nhân chặn bức xạ.

Như là một phần của tài liệu điều chỉnh nó xác minh rằng rHuPH20 có các đặc tính tăng cường sự phân tán và hấp thu tương tự của các dược chất tiêm khác như các chế phẩm hyaluronidaza có nguồn gốc động vật đã được chấp thuận trước đó, nhưng với mức độ an toàn cao. Đặc biệt, việc sử dụng hyaluronidaza người tái tổ hợp (rHuPH20) so với các hyaluronidaza có nguồn gốc động vật giảm thiểu nguy cơ lây nhiễm các tác nhân gây bệnh từ động vật và các bệnh não dạng xốp có thể dẫn truyền.

Các hyaluronidaza glycoprotein hòa tan (sHASEGP), quy trình để tạo ra chúng và việc sử dụng chúng trong các chế phẩm dược được mô tả trong WO 2004/078140. Việc sử dụng các hyaluronidaza glycoprotein hòa tan kết hợp với nhiều kháng thể ví dụ khác nhau, như Trastuzumab chẳng hạn, được nêu trong WO 2006/091871.

Quá trình thử nghiệm chi tiết như nêu thêm nữa dưới đây chứng tỏ rằng các chế phẩm theo sáng chế có tính ổn định trong bảo quản bất ngờ và đáp ứng hoàn toàn tất cả các yêu cầu cần thiết được được chấp thuận bởi các chuyên gia y tế.

Enzym hyaluronidaza trong các chế phẩm theo sáng chế tăng cường khả năng cấp kháng thể kháng HER2 tới hệ tuần hoàn, ví dụ bằng cách tăng sự hấp thu hoạt chất (nó hoạt động như chất tăng cường thẩm thấu). Enzym hyaluronidaza còn làm gia tăng khả năng cấp kháng thể kháng HER2 chữa bệnh vào hệ tuần hoàn bằng cách sử dụng dưới da nhờ quá trình thủy phân nghịch đảo hyaluronan, thành phần ngoại bào của mô kẽ SC. Việc thủy phân hyaluronan ở lớp dưới da tạm thời mở ra các rãnh trong khoảng kẽ của mô SC và nhờ đó tăng cường khả năng cấp kháng thể kháng HER2 chữa bệnh vào hệ tuần hoàn. Ngoài

ra, cách sử dụng thể hiện sự đau đớn giảm ở người và sự bồi đắp mô SC có thể tích nhỏ hơn.

Hyaluronidaza, khi sử dụng khu trú thì hiệu quả của nó hoàn toàn cục bộ. Nói cách khác hyaluronidaza bất hoạt và chuyển hóa cục bộ trong nhiều phút và không nhận thấy các hiệu quả hệ thống hoặc kéo dài.

Quá trình khử hoạt hóa nhanh hyaluronidaza trong nhiều phút khi nó đi vào dòng máu ngăn ngừa khả năng thực để thực hiện các nghiên cứu phân bố sinh học có thể so sánh giữa các sản phẩm hyaluronidaza khác nhau. Đặc tính này cũng giảm thiểu bất kỳ lo lắng tiềm tàng nào về độ an toàn hệ thống do sản phẩm hyaluronidaza không thể hoạt động tại các điểm xa.

Đặc điểm thống nhất của các tất cả các enzym hyaluronidaza là khả năng để khử polyme hóa hyaluronan của nó, bất kể các khác biệt về cấu trúc hóa học, nguồn gốc loài, về nguồn mô, hoặc về các mẻ sản phẩm thuốc có nguồn gốc từ loài và mô giống nhau. Chúng bất thường ở chỗ hoạt tính của chúng là giống nhau (ngoại trừ về hiệu lực) mặc dù có các cấu trúc khác nhau.

Tá dược enzym hyaluronidaza theo chế phẩm của sáng chế đặc trưng bởi không có tác dụng xấu đối với tính toàn vẹn phân tử của kháng thể kháng HER2 trong chế phẩm được ổn định mô tả theo sáng chế. Ngoài ra, enzym hyaluronidaza chỉ làm thay đổi việc cấp kháng thể kháng HER2 tới hệ tuần hoàn mà không có bất kỳ đặc tính nào có thể cung cấp hoặc tạo ra các hiệu quả chữa bệnh của kháng thể kháng HER2 đã hấp thu hệ thống. Enzym hyaluronidaza không có tính sinh khả dụng hệ thống và không có tác dụng xấu tới tính toàn vẹn phân tử của kháng thể kháng HER2 trong các điều kiện bảo quản đề xuất cho chế phẩm được ổn định theo sáng chế. Vì vậy nó được coi là một tá dược trong chế phẩm chứa kháng thể kháng HER2 theo sáng chế này. Khi nó được sử dụng mà không có tác dụng chữa bệnh thì được thể hiện là phần tử của dạng dược tách rời kháng thể kháng HER2 có hoạt tính chữa bệnh.

Số các enzym hyaluronidaza thích hợp theo sáng chế là đã biết từ tình trạng kỹ thuật. Enzym ưu tiên là enzym hyaluronidaza người, tốt nhất là enzym đã biết

như rHuPH20. rHuPH20 là thành viên của họ gồm các β -1,4 glycosyl hydrolaza có hoạt tính axit và trung tính khử polyme hóa hyaluronan bằng cách thủy phân liên kết β -1,4 giữa vị trí C₁ của N-acetyl glucosamin và vị trí C₄ của axit glucuronic. Hyaluronan là polysacarit được thấy ở chất nền nội bào của mô liên kết, như mô kẽ dưới da, và của một số mô chuyên hóa, như dây rốn và dịch thủy tinh. Việc thủy phân hyaluronan làm giảm tạm thời độ nhớt của mô kẽ và thúc đẩy sự phân tán của các dịch tiêm hoặc của các chất rỉ ra hoặc các chất dò rỉ cục bộ, vì vậy làm tăng sự hấp thụ của chúng. Hiệu quả của hyaluronidaza là cục bộ và nghịch đảo với sự hoàn nguyên hoàn toàn của hyaluronan trong mô xuất hiện trong 24 đến 48 giờ (Frost, G.I., "Recombinant human hyaluronidaza (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4:427-440). Sự gia tăng độ thấm của mô liên kết nhờ thủy phân hyaluronan liên quan đến hiệu quả của hyaluronidaza về khả năng của chúng để làm tăng độ phân tán và hấp thụ của các phân tử đồng sử dụng.

Hệ gen người chứa một vài gen hyaluronidaza. Chỉ sản phẩm gen PH20 có hoạt tính hyaluronidaza hữu hiệu trong các điều kiện sinh lý ngoại bào và hoạt động như tác nhân phân bố, trong khi các hyaluronidaza hoạt tính axit không có đặc tính này.

rHuPH20 là enzym hyaluronidaza đầu tiên và duy nhất có thể sử dụng để chữa bệnh. PH20 protein người xuất hiện tự nhiên có neo lipit gắn vào axit amin đầu carboxy mà neo nó vào màng sinh chất. Enzym rHuPH20 được phát triển bởi Halozyme là thể biến dị đoạn khuyết được làm cùn đầu không có các axit amin này ở đầu carboxy tạo ra gắn kết lipit. Điều này làm cho enzym hoạt tính pH trung tính, hòa tan tương tự với protein được thấy trong các chế phẩm tinh hoàn bò. rHuPH20 protein được tổng hợp bằng peptit tín hiệu 35 axit amin mà bị loại bỏ khỏi đầu N trong quá trình tiết xuất. rHuPH20 protein trưởng thành chứa trình tự axit amin đầu N xác thực tiến hóa thẳng tới trình tự được thấy ở một số chế phẩm hyaluronidaza bò.

Các PH20 hyaluronidaza, bao gồm PH20 có nguồn gốc động vật và rHuPH20 người tái tổ hợp, hyaluronan khử polyme hóa bằng cách thủy phân liên kết β -1,4 giữa vị trí C₁ của N-acetyl glucosamin và vị trí C₄ của axit glucuronic. Tetrasacarit là sản phẩm cắt nhỏ nhất (Weissmann, B., “The transglycosylative action of testicular hyaluronidaza”, J. Biol. Chem., 1955; 216: 783-94). Cấu trúc N-acetyl glucosamin/axit glucuronic này được thấy trong các glycan liên kết tại N của các sản phẩm sinh học tái tổ hợp và vì vậy rHuPH20 sẽ không tác động đến quá trình glycosyl hóa của các kháng thể được bào chế với, ví dụ Trastuzumab chẳng hạn. Bản thân enzym rHuPH20 có sáu glycan liên kết tại N trên phân tử với các cấu trúc nhân tương tự với loại được thấy trong các kháng thể đơn dòng. Có vẻ bất ngờ là các cấu trúc liên kết tại N này không thay đổi theo thời gian, khẳng định sự thiếu hụt hoạt tính enzym của rHuPH20 đối với các cấu trúc glycan liên kết tại N. Thời gian bán thải ngắn của rHuPH20 và quá trình tổng hợp ổn định hyaluronan làm cho tác động của enzym đối với các mô ngắn và cục bộ.

Enzym hyaluronidaza là tá dược trong chế phẩm sử dụng dưới da theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp ADN. Theo cách này đảm bảo rằng luôn luôn thu được protein tương tự (trình tự axit amin đồng nhất) và tránh được phản ứng dị ứng, ví dụ do các protein ô nhiễm gây ra được cùng tinh chế trong quá trình chiết từ mô. Enzym hyaluronidaza sử dụng trong chế phẩm như được minh họa theo sáng chế là enzym người, tức là rHuPH20.

Trình tự axit amin của rHuPH20 (HYLENEX™) là đã biết rõ và có thể sử dụng dưới số hiệu lưu giữ CAS Registry No. 75971-58-7. Phân tử lượng khoảng 61 kDa.

Nhiều so sánh cấu trúc và chức năng đã được tiến hành giữa các hyaluronidaza động vật có vú nguồn gốc tự nhiên và các dòng vô tính PH-20 ADN hỗ trợ đối với người và động vật có vú. Gen PH-20 là gen được sử dụng cho sản phẩm tái tổ hợp rHuPH20; tuy nhiên sản phẩm được chất tái tổ hợp là biến thể 447 axit amin được làm cùn đầu của protein đầy đủ mã hóa bằng gen

PH-20. Các tính đồng dạng cấu trúc với các trình tự axit amin ít khi vượt quá 60% ở bất kỳ so sánh nào. Các so sánh chức năng thể hiện rằng hoạt tính của rHuPH20 là rất giống với hoạt tính của các sản phẩm hyaluronidaza đã được chấp thuận trước đó. Dữ liệu này phù hợp với các phát hiện lâm sàng trong 50 năm qua bất kể nguồn gốc của hyaluronidaza, độ an toàn và hiệu quả lâm sàng của các đơn vị hyaluronidaza là tương đương.

Việc sử dụng rHuPH20 trong chế phẩm chứa kháng thể kháng HER2 SC theo sáng chế cho phép sử dụng các khối lượng sản phẩm được cao hơn và tăng cường hữu hiệu độ hấp thu Trastuzumab sử dụng dưới da vào hệ tuần hoàn.

Nồng độ molal đồng thẩm áp dung dịch chế phẩm được ổn định theo sáng chế là 330 ± 50 mOsm/kg.

Chế phẩm được ổn định theo sáng chế về cơ bản không phải là các hạt có thể nhìn thấy được (kiểm tra bằng mắt người). Các hạt dưới mức có thể nhìn thấy (như được xác định bằng cách che khuất ánh sáng) sẽ đáp ứng đầy đủ các tiêu chuẩn dưới đây:

- số lượng hạt tối đa $\geq 10\mu\text{m}/\text{lọ}$ -> 6000

số lượng hạt tối đa $\geq 25\mu\text{m}/\text{lọ}$ -> 600

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng chế phẩm để bào chế thuốc sử dụng điều trị bệnh hoặc rối loạn có thể điều trị được bằng kháng thể kháng HER2 ví dụ như bệnh ung thư hoặc bệnh không ác tính ở đối tượng bao gồm việc cung cấp chế phẩm mô tả theo sáng chế cho đối tượng với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn đã nêu. Kháng thể kháng HER2 có thể được cùng sử dụng đồng thời hoặc liên tiếp với tác nhân hóa liệu pháp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn mà có thể điều trị được bằng kháng thể kháng HER2 (ví dụ bệnh ung thư hoặc bệnh không ác tính) ở đối tượng bao gồm việc cung cấp chế phẩm mô tả theo sáng chế cho đối tượng với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn đã nêu. Bệnh ung thư hoặc bệnh không ác tính sẽ thường liên quan đến Các tế

bào biểu hiện HER2, sao cho kháng thể HER2 chế phẩm được chữa bệnh SC theo sáng chế có thể gắn kết với các tế bào gây bệnh. Các bệnh ung thư hoặc bệnh không ác tính khác mà có thể được điều trị bằng chế phẩm theo sáng chế được liệt kê trong phần xác định thêm dưới đây

Chế phẩm được ổn định chứa kháng thể kháng HER2 có hoạt tính được theo sáng chế có thể được cung cấp dưới dạng thuốc, nhờ đó việc sử dụng nhắc lại vài lần trong các khoảng thời gian 3 tuần (q3w). Thể tích đầy đủ của dịch tiêm thường sử dụng trong khoảng thời gian từ 1 đến 10 phút, tốt hơn là từ 2 đến 6 phút, tốt nhất là 3 ± 1 phút. Trong số các bệnh nhân sử dụng chất phụ trợ EBC và trong số các bệnh nhân sử dụng liệu pháp đơn Trastuzumab MBC, trong đó không có các tác nhân hóa liệu pháp nào khác được sử dụng trong tĩnh mạch (IV), cách dùng dưới da này làm cho bệnh nhân có thể dễ dàng tự sử dụng tại nhà hơn. Điều này giúp việc tuân thủ chế độ điều trị cao và giảm/loại bỏ các chi phí để sử dụng IV (tức là, các chi phí điều dưỡng để sử dụng IV, tiền thuê giường, bệnh nhân đi lại...). Cách sử dụng dưới da theo sáng chế sẽ rất có khả năng liên quan đến tần số và/hoặc cường độ của các phản ứng gắn liền với việc truyền giảm.

Quá trình bổ sung hyaluronidaza vào chế phẩm cho phép gia tăng thể tích thuốc tiêm có thể sử dụng dưới da một cách an toàn và tiện lợi. Trong các trường hợp bình thường thì thể tích thuốc tiêm là từ 1 đến 15 ml. Đã thấy rằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế làm gia tăng độ phân tán, hấp thu và tính sinh khả dụng của kháng thể chữa bệnh. Các phân tử lớn (tức là > 16 kDa) có thể được qua cách SC được hấp thu tốt hơn vào ngăn mạch qua các dịch mạch bạch huyết dẫn lưu (Supersaxo, A., et al., “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). Vì vậy tốc độ đưa các phân tử lớn đó vào hệ tuần hoàn là khá chậm so với với truyền trong tĩnh mạch, cho nên có khả năng làm cho tần số/cường độ của các phản ứng liên quan đến truyền giảm.

Quá trình bào chế chế phẩm Trastuzumab sử dụng dưới da theo sáng chế cần các nồng độ kháng thể cao (khoảng 120 mg/ml) ở bước tinh chế cuối cùng của quá trình sản xuất. Cho nên bước xử lý khác (siêu lọc/lọc kép) được đưa vào quá trình sản xuất Trastuzumab. Theo các chỉ dẫn trong WO 97/04801 chế phẩm được chứa kháng thể kháng HER2 ổn định, nồng độ cao theo sáng chế có thể được cung cấp dưới dạng chế phẩm protein ổn định có thể hoàn nguyên với chất pha loãng thích hợp để tạo ra chế phẩm hoàn nguyên chứa kháng thể kháng HER2 nồng độ cao.

Chế phẩm chứa kháng thể HER2 SC theo sáng chế này chủ yếu được sử dụng để điều trị bệnh ung thư. Theo đó các thuật ngữ “bệnh ung thư” và “ung thư” để cập hoặc mô tả tình trạng sinh lý ở động vật có vú thường đặc trưng bởi sự phát triển tế bào không điều chỉnh. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm, nhưng không giới hạn ở, canxinom, u bạch huyết, u nguyên bào (bao gồm u nguyên tủy bào và u nguyên bào võng mạc), sacom (bao gồm sacom mỡ và sacom tế bào hoạt dịch), các khối u thần kinh nội tiết (bao gồm các khối u caxinoit, bệnh ung thư do tiết xuất quá nhiều gastrin và tế bào tiểu đảo), u trung biểu mô, u bao sợi thần kinh (bao gồm u dây thần kinh thính giác), u màng não, ung thư tuyến, khối u ác tính, và bệnh bạch cầu hoặc khối u ác tính dạng bạch huyết. Các ví dụ cụ thể hơn về các bệnh ung thư này bao gồm bệnh ung thư tế bào có vảy (ví dụ bệnh ung thư tế bào biểu mô lát), bệnh ung thư phổi bao gồm bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư tuyến phổi và canxinom có vảy phổi, bệnh ung thư màng bụng, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư thuộc dạ dày hoặc dạ dày bao gồm bệnh ung thư dạ dày-ruột, bệnh ung thư tuyến tụy, u nguyên bào xộp, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, ung thư gan, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư ruột kết trực tràng, canxinom nội mạc tử cung hoặc dạ con, canxinom tuyến nước bọt, bệnh ung thư thận hoặc gần thận, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư âm hộ, bệnh ung thư tuyến giáp, canxinom gan, canxinom hậu môn, canxinom

ương vật, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư thực quản, các khối u đường dẫn mật, cũng như bệnh ung thư đầu và cổ.

Thuật ngữ “khoảng” như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế có nghĩa định rõ là giá trị cụ thể đề xuất có thể thay đổi tới một mức độ nhất định, ví dụ như có nghĩa là các biến đổi trong giới hạn $\pm 10\%$, tốt hơn là $\pm 5\%$, tốt nhất là $\pm 2\%$ nằm trong giá trị đã cho.

Bệnh ung thư mà “biểu hiện quá mức” thụ thể HER là bệnh có các mức thụ thể HER cao hơn đáng kể, như HER2, tại bề mặt tế bào của chúng, so với tế bào không ung thư của loại mô tương tự. Sự biểu hiện quá mức này có thể do quá trình khuếch đại gen gây ra hoặc bởi sự phiên mã hoặc dịch mã tăng gây ra. Biểu hiện quá mức thụ thể HER có thể được xác định trong thử nghiệm chẩn đoán hoặc dự báo bằng cách đánh giá các mức HER protein tăng có mặt trên bề mặt của tế bào (ví dụ qua thử nghiệm hóa học mô miễn dịch; IHC). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, có thể xác định các axit nucleic mã hóa HER trong tế bào, ví dụ bằng quá trình lai hóa huỳnh quang tại chỗ (FISH; see WO98/45479), phương pháp thấm tách Western, hoặc các kỹ thuật phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), như PCR định lượng thời gian thực (RT-PCR). Cũng có thể nghiên cứu sự biểu hiện quá mức thụ thể HER bằng cách xác định kháng nguyên tung ra (ví dụ miền ngoại bào HER) trong dịch sinh chất như huyết thanh (xem, ví dụ US 4,933,294 công bố ngày 12/6/1990; WO 91/05264 công bố ngày 18/4/1991; US 5,401,638 công bố ngày 28/3/1995; và Sias et al., J. Immunol. Methods 1990; 132: 73-80). Ngoài các thử nghiệm nêu trên, các thử nghiệm *in vivo* khác nhau có thể dùng được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, có thể cho các tế bào trong cơ thể của bệnh nhân tiếp xúc với kháng thể mà có thể được đánh dấu tùy ý bằng chất đồng vị đánh dấu có thể phát hiện được, ví dụ chất đồng vị phóng xạ, và gắn kết kháng thể với các tế bào ở bệnh nhân có thể được đánh giá, ví dụ bằng cách quét bên ngoài về độ phóng xạ hoặc bằng cách phân tích sinh thiết lấy ở bệnh nhân trước khi tiếp xúc với kháng thể.

Ngược lại, bệnh ung thư “không biểu hiện quá mức thụ thể HER2” là bệnh ung thư không biểu hiện các mức bình thường của thụ thể HER2 cao hơn so với tế bào không ung thư của loại mô tương tự.

Bệnh ung thư "biểu hiện quá mức" phối tử HER là bệnh mà có thể tạo ra các lượng phối tử đó cao hơn đáng kể so với tế bào không ung thư của loại mô tương tự. Việc biểu hiện quá mức này có thể do quá trình khuếch đại gen gây ra hoặc bởi quá trình phiên mã hoặc dịch mã tăng gây ra. Việc biểu hiện quá mức phối tử HER có thể được xác định bằng cách chẩn đoán nhờ đánh giá các mức của phối tử (hoặc axit nucleic mã hóa nó) ở bệnh nhân, ví dụ trong sinh thiết khối u hoặc bằng các thử nghiệm chẩn đoán khác nhau như IHC, FISH, phương pháp tách Western, PCR hoặc trong các thử nghiệm *in vivo* đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Đã dự tính rằng chế phẩm chứa kháng thể HER2 SC theo sáng chế này có thể cũng được sử dụng để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn không ung thư khác nhau, như bệnh tự miễn dịch (ví dụ bệnh vẩy nến); bệnh lạc nội mạc tử cung; bệnh xơ cứng bì; tái phát hẹp van tim; các polyp như polyp ruột kết, các polyp mũi hoặc các polyp dạ dày-ruột; u tuyến xơ; bệnh hô hấp; viêm túi mật; bệnh u xơ thần kinh; bệnh thận đa u nang; các bệnh viêm; các rối loạn da bao gồm bệnh vẩy nến và chứng viêm da; bệnh mạch; các tình trạng liên quan đến quá trình tăng sinh bất thường của các tế bào biểu mô mạch; loét dạ dày-ruột; bệnh Menetrier, các u tuyến tiết hoặc hội chứng mất protein; các rối loạn thận; các rối loạn tạo mạch; bệnh mắt như thoái hóa điểm liên quan đến tuổi, hội chứng nấm Histoplasma mắt giả định, hình thành mạch mới võng mạc xuất phát từ bệnh võng mạc tăng sinh do tiểu đường, tạo mạch võng mạc, bệnh võng mạc do tiểu đường, hoặc thoái hóa điểm liên quan đến tuổi; các bệnh lý liên quan đến xương như bệnh viêm xương khớp, bệnh còi xương và chứng loãng xương; tổn thương sau tác động thiếu máu cục bộ não; các bệnh hóa xơ hoặc phù như bệnh cơ gan, chứng xơ hóa phổi, bệnh sacoid, viêm tuyến giáp, hội chứng tăng độ nhớt hệ thống, bệnh Osier Weber-Rendu, bệnh tắc phổi mãn tính, hoặc chứng phù sau bọng, chấn thương, bức xạ, đột quỵ, giảm oxy huyết hoặc chứng thiếu

máu cục bộ; phản ứng nhạy quá mức của da; bệnh vồng mạc do tiểu đường và bệnh thận do tiểu đường; hội chứng Guillain-Barre; bệnh mảnh ghép bị cơ thể vật chủ kháng hoặc đào thải; bệnh Paget; viêm xương hoặc khớp; lão hóa sớm (ví dụ do bức xạ tử ngoại da người gây ra); chứng phì đại tuyến tiền liệt lành tính; một số lây nhiễm vi khuẩn kể cả các tác nhân gây bệnh vi khuẩn được chọn từ adenovirut, hantavirut, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp. và chứng ho gà *Bordetella*; cục đông do kết tụ tiểu cầu gây ra; các bệnh sinh sản như bệnh lạc nội mạc tử cung, hội chứng tăng kích thích buồng trứng, tiền sản giật, chảy máu tử cung do rối loạn chức năng, hoặc đa kinh kéo dài; viêm màng hoạt dịch; bệnh vữa động mạch; bệnh thận cấp tính và mãn tính (bao gồm viêm thận tiểu cầu tăng sinh và bệnh thận do tiểu đường gây ra); bệnh chàm bội nhiễm; hình thành sẹo phì đại; sốc do nội độc tố và lây nhiễm nấm; bệnh polip đa u tuyến di truyền; các bệnh thoái hóa thần kinh (bệnh Alzheimer; sa sút trí tuệ liên quan đến AIDS, bệnh Parkinson, xơ cứng cột bên teo cơ, bệnh vồng mạch đui mù, bệnh teo cơ xương sống và thoái hóa tiểu não); các hội chứng loạn sản tử; thiếu máu không tái tạo; tổn thương do thiếu máu cục bộ; chứng xơ hóa phổi, thận hoặc gan, bệnh tăng nhạy do tế bào T gây ra; chứng hẹp môn vị phình trướng ở trẻ em; hội chứng tắc nghẽn đường tiết niệu; chứng viêm khớp vảy nến; và viêm tuyến giáp Hashimoto. Các chỉ định không ác tính ví dụ để điều trị theo sáng chế bao gồm bệnh vảy nến, bệnh lạc nội mạc tử cung, bệnh xơ cứng bì, bệnh mạch (ví dụ tái phát hẹp van tim, xơ vữa động mạch, bệnh động mạch vành, hoặc chứng tăng huyết áp), các polip ruột kết, u tuyến xơ hoặc bệnh hô hấp (ví dụ bệnh hen, bệnh viêm phế quản mãn tính, hoặc giãn phế quản hoặc chứng xơ nang).

Trong đó chỉ định là bệnh ung thư, bệnh nhân có thể được điều trị bằng tổ hợp của chế phẩm kháng thể, và tác nhân hóa liệu pháp. Các sử dụng kết hợp bao gồm cùng sử dụng hoặc sử dụng đồng thời, sử dụng các chế phẩm riêng biệt hoặc chế phẩm được đơn, và sử dụng liên tiếp theo hoặc thứ tự, trong đó tốt hơn là có khoảng thời gian trong khi cả hai (hoặc tất cả) các hoạt chất đồng thời tạo ra các hoạt tính sinh học của chúng. Vì vậy, tác nhân hóa liệu pháp có thể được cung cấp trước, hoặc sau khi sử dụng chế phẩm kháng thể theo sáng chế. Theo

phương án này, tốt hơn nếu việc định thời giữa ít nhất một lần sử dụng tác nhân hóa liệu pháp và ít nhất một lần sử dụng chế phẩm kháng thể theo sáng chế là khoảng 1 tháng hoặc ít hơn, và tốt nhất là khoảng 2 tuần hoặc ít hơn. Theo cách khác, tác nhân hóa liệu pháp và chế phẩm kháng thể theo sáng chế được cho bệnh nhân sử dụng đồng thời dưới dạng chế phẩm đơn hoặc các chế phẩm riêng biệt.

Cách điều trị bằng chế phẩm kháng thể này sẽ nâng cao các dấu hiệu hoặc các triệu chứng của bệnh ung thư hoặc bệnh. Ví dụ, trong đó bệnh cần được điều trị là bệnh ung thư, liệu pháp này có thể làm tăng sự sống sót (sự sống sót toàn diện và/hoặc sống sót mà bệnh không tiến triển) và/hoặc có thể tạo ra đáp ứng lâm sàng khách quan (một phần hoặc hoàn toàn). Ngoài ra, cách điều trị bằng tổ hợp của tác nhân hóa liệu pháp và chế phẩm kháng thể có thể tạo ra lợi ích điều trị, bổ sung lớn hơn hoặc hiệp đồng cho bệnh nhân.

Thông thường kháng thể trong chế phẩm sử dụng là kháng thể trần. Tuy nhiên, kháng thể sử dụng có thể được kết hợp với tác nhân gây độc tế bào. Sau đó thể tiếp hợp miễn dịch và/hoặc kháng nguyên mà được gắn kết với nó được đồng hóa bằng tế bào, làm tăng hiệu quả điều trị của thể tiếp hợp miễn dịch lên bằng cách giết tế bào ung thư gắn kết với nó. Theo một phương án, tác nhân gây độc tế bào nhằm vào hoặc gây cản trở axit nucleic trong tế bào ung thư. Các ví dụ về các tác nhân gây độc tế bào này bao gồm các maytansinoid, các ribonucleaza và endonucleaza ADN. Các thể tiếp hợp miễn dịch tân tiến nhất về mặt lâm sàng là các thể tiếp hợp miễn dịch Trastuzumab-maytansinoid (T-DM1) như được mô tả trong WO 2003/037992, đặc biệt là thể tiếp hợp miễn dịch T-MCC-DM1, tên hóa học của chúng là *N*^{2'}-deaxetyl-*N*^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansin-4-maleimidomethyl-xyclohexyl-1-carboxyl-Trastuzumab.

Để sử dụng dưới da, chế phẩm có thể được cung cấp bằng một thiết bị thích hợp, như (nhưng không giới hạn ở), bơm tiêm; thiết bị tiêm (ví dụ thiết bị INJECT-EASE™ và GENJECT™); bơm truyền (ví dụ như Accu-Chek™); bút kim phun (như GENPEN™; thiết bị không kim (ví dụ MEDDECTOR™ và

BIOJECTOR™); hoặc qua hệ phân phối dưới da bằng miếng dán. Hệ phân phối thích hợp cho các chế phẩm theo sáng chế được mô tả trong WO 2010/029054. Thiết bị này bao gồm khoảng từ 5 đến 15 ml hoặc đặc biệt tốt hơn là 5 ml chế phẩm lỏng theo sáng chế.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều kháng thể thích hợp sẽ tùy thuộc vào loại bệnh cần điều trị, như được xác định ở trên, mức độ nghiêm trọng và tiến trình bệnh, dù kháng thể được sử dụng cho các mức đích phòng ngừa hay điều trị, tùy thuộc vào liệu pháp trước, lược sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng của họ với kháng thể, và sự suy xét của bác sỹ điều trị. Kháng thể được sử dụng một cách thích hợp cho bệnh nhân một lần hoặc trong các đợt điều trị. Tùy thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1 µg/kg đến 50 mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc đặc biệt hơn là khoảng 0,1 mg/kg đến 20 mg/kg trọng lượng cơ thể kháng thể kháng HER2 là liều sử dụng ban đầu đề xuất cho bệnh nhân, hoặc ví dụ bằng một hoặc nhiều cách sử dụng riêng biệt, hoặc bằng cách truyền liên tục. Đặc biệt hơn liều kháng thể sẽ nằm trong khoảng từ 0,05 mg kháng thể kháng HER2/kg trọng lượng cơ thể đến 10 mg kháng thể kháng HER2/kg trọng lượng cơ thể. Vì vậy nếu tác nhân hóa liệu pháp được sử dụng, nó thường được sử dụng với các liều đã biết, hoặc tùy ý giảm xuống do tác động kết hợp của các dược chất hoặc các tác dụng phụ bị vô hiệu có thể là do sử dụng tác nhân hóa liệu pháp. Sơ đồ điều chế và định liều cho các tác nhân hóa liệu pháp này có thể được sử dụng theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất hoặc như được xác định theo kinh nghiệm của thầy thuốc có kỹ năng. Sơ đồ điều chế và định liều cho liệu pháp hóa học này cũng được mô tả trong tài liệu Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

Chế độ điều trị khác có thể được kết hợp với kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở (các) tác nhân hóa liệu pháp thứ hai (ba, bốn, v.v..) (nói theo cách khác là “dung dịch hỗn hợp thuốc” của các tác nhân hóa liệu pháp khác nhau); kháng thể đơn dòng khác; chất ức chế sinh trưởng; tác nhân gây độc tế bào; tác nhân hóa liệu pháp; EGFR-dược chất đích; chất ức chế tyrosin kinaza;

và/hoặc tác nhân chống tạo mạch; xytokin, v.v.; hoặc hỗn hợp thích hợp bất kỳ của chúng.

Ngoài các chế độ điều trị nêu trên, bệnh nhân có thể được loại bỏ các tế bào ung thư bằng cách phẫu thuật và/hoặc liệu pháp chiếu xạ.

Theo một phương án khác theo sáng chế, vật dụng được đề xuất chứa chế phẩm được theo sáng chế và cung cấp các hướng dẫn để sử dụng nó. Vật dụng này bao gồm một hộp. Các hộp thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ (ví dụ các lọ hai hoặc nhiều ngăn), bơm tiêm (như các bơm tiêm hai hoặc nhiều ngăn) và các ống thử nghiệm. Hộp đó có thể được tạo ra từ nhiều loại vật liệu như thủy tinh hoặc chất dẻo. Hộp chứa chế phẩm và nhãn hiệu trên, hoặc kết hợp với, hộp có thể chỉ ra các hướng dẫn để sử dụng. Hộp chứa chế phẩm có thể là lọ đa dụng, nó có tính đến việc sử dụng lặp lại (ví dụ từ 2 đến 6 sử dụng) chế phẩm hoàn nguyên. Vật dụng có thể còn bao gồm các chất khác mong muốn cho quan điểm sử dụng và thương mại, bao gồm các chất đệm khác, các chất pha loãng, các bộ lọc, kim, bơm tiêm, và bao gói gắn với các hướng dẫn sử dụng.

Thuật ngữ "chế phẩm được" đề cập đến chế phẩm dưới dạng này để cho phép hoạt tính sinh học của hoạt chất có tác dụng, và nó không chứa các thành phần khác gây độc không thể chấp nhận được cho đối tượng được cung cấp chế phẩm. Các chế phẩm này là vô trùng.

Chế phẩm "vô trùng" là vô khuẩn hoặc không có tất cả các vi sinh vật sống và các bào tử của chúng.

Chế phẩm "thích hợp" là chế phẩm trong đó toàn bộ protein về cơ bản vẫn giữ được độ ổn định vật lý của chúng và/hoặc độ ổn định hóa học và hoạt tính sinh học khi lưu trữ ở nhiệt độ bảo quản đã định, ví dụ 2 – 8°C. Mong muốn là chế phẩm đó về cơ bản giữ được độ ổn định vật lý và hóa học của nó, cũng như hoạt tính sinh học khi lưu trữ. Thời gian lưu trữ thường được chọn dựa vào thời hạn sử dụng dự tính của chế phẩm. Ngoài ra, chế phẩm sẽ phải ổn định sau khi làm lạnh (tối, ví dụ -70° C) và làm đông tan chế phẩm, ví dụ sau 1, 2 hoặc 3 chu trình làm lạnh và đông tan. Các kỹ thuật phân tích khác nhau để xác định độ ổn

định protein sẵn có để sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật và được xem trong tài liệu Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993) chẳng hạn. Độ ổn định có thể được xác định ở nhiệt độ đã chọn trong khoảng thời gian đã chọn. Độ ổn định có thể được đánh giá bằng cách định lượng và/hoặc định lượng theo các cách khác nhau, bao gồm đánh giá sự hình thành kết tụ (ví dụ nhờ sử dụng phép sắc ký loại trừ kích cỡ, bằng cách đo độ đục, và/hoặc bằng kiểm tra bằng mắt); bằng cách đánh giá tính không đồng nhất điện tích nhờ sử dụng phép sắc ký trao đổi cation hoặc điện di vùng mao mạch; phân tích trình tự đầu amino hoặc carboxy; phân tích quang phổ khối; phân tích SDS-PAGE để so sánh kháng thể giảm và nguyên vẹn; phân tích bản đồ peptit (ví dụ trypsin hoặc LYS-C); đánh giá hoạt tính sinh học hoặc chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể; Độ không ổn định có thể liên quan đến một hoặc nhiều vấn đề bất kỳ: kết tụ, khử amit hóa (ví dụ khử amit hóa Asn), oxy hóa (ví dụ oxy hóa Met), đồng phân hóa (ví dụ đồng phân hóa Asp), xén/thủy phân/phân đoạn (ví dụ phân đoạn vùng bản lề), hình thành succinimit, (các) xystein không ghép cặp, mở rộng đầu N, xử lý đầu C, các biến đổi glycosyl hóa, v.v.. Kháng thể đơn dòng “khử amit hóa” theo sáng chế là loại trong đó một hoặc nhiều gốc asparagin của chúng được cải biến, ví dụ đối với axit aspartic hoặc axit iso-aspartic bằng cải biến sau dịch mã.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ “chất đệm tạo ra độ pH = $5,5 \pm 2,0$ ” đề cập đến tác nhân tạo ra dung dịch để phản ứng lại các thay đổi độ pH bằng tác động của các thành phần kết hợp axit/bazơ của nó. Chất đệm sử dụng trong các chế phẩm theo sáng chế có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0, hoặc khoảng từ 5,0 đến 6,5, hoặc khoảng từ 5,3 đến 5,8. Độ pH khoảng 5,5 phải được thấy là thích hợp nhất. Các ví dụ về các chất đệm sẽ điều chỉnh độ pH trong giới hạn này bao gồm các chất đệm axetat, gluconat, histidin, xitrat, glyxylglyxin và các chất đệm axit hữu cơ khác. Chất đệm thích hợp nhất theo sáng chế là chất đệm histidin, ví dụ như L-histidin/HCl.

"Chất đệm histidin" là chất đệm bao gồm axit amin histidin. Các ví dụ về các chất đệm histidin bao gồm histidin clorua, histidin axetat, histidin phosphat, histidin sulfat. Chất đệm histidin được nhận biết trong các ví dụ như thích hợp nhất là chất đệm histidin clorua. Chất đệm histidin clorua này được điều chế bằng cách chuẩn độ L-histidin (không bazơ, chất rắn) với axit clohydric pha loãng. Đặc biệt chất đệm histidin hoặc histidin clorua có độ pH = $5,5 \pm 0,6$, đặc biệt hơn là ở độ pH khoảng từ 5,3 đến 5,8, và tốt nhất là có độ pH = 5,5.

Bằng "đẳng trương" có nghĩa là chế phẩm xem xét về cơ bản có áp suất thẩm thấu tương tự như máu người. Các chế phẩm đẳng trương thường sẽ có áp suất thẩm thấu khoảng từ 250 đến 350 mOsm. Độ đẳng trương có thể được đo nhờ sử dụng áp suất chân không hoặc thẩm áp kế loại giảm áp điểm đông.

Thuật ngữ "sacarit" theo sáng chế bao gồm chế phẩm tổng hợp $(CH_2O)_n$ và các dẫn xuất của chúng, bao gồm các monosacarit, disacarit, trisacarit, polysacarit, các rượu đường, các đường khử, các đường không khử, v.v.. Các ví dụ về các sacarit theo sáng chế bao gồm glucoza, sucroza, trehaloza, lactoza, fructoza, maltoza, dextran, glyxerin, dextran, erythritol, glyxerol, arabitol, sylitol, sorbitol, mannitol, mellibioza, melexitoza, raffinosa, mannotrioza, stáchyosa, maltoza, lactuloza, maltuloza, glucitol, maltitol, lactitol, iso-maltuloza, v.v.. Đặc biệt là các chế phẩm mô tả ở đây bao gồm disacarit không khử như tác nhân làm ổn định, như sacarit được chọn từ nhóm gồm có trehaloza (ví dụ dưới dạng α, α -trehaloza dihydrat) và sucroza.

Theo sáng chế, "chất hoạt động bề mặt" đề cập đến chất có hoạt tính bề mặt, ví dụ chất hoạt động bề mặt không ion. Các ví dụ về chất hoạt động bề mặt ở đây bao gồm polysorbat (ví dụ polysorbat 20 và polysorbat 80); poloxamer (ví dụ poloxamer 188); Triton; natri dodexyl sulfat (SDS); natri laurel sulfat; natri octyl glycosit; lauryl-, myristyl-, linoleyl-, hoặc stearyl-sulfobetain; lauryl-, myristyl-, linoleyl- hoặc stearyl-sarcosin; linoleyl-, myristyl-, hoặc xetyl-betain; lauroamidopropyl-, cocamidopropyl-, linoleamidopropyl-, myristamidopropyl-, palmidopropyl-, hoặc isostearamidopropyl-betain (ví dụ lauroamidopropyl);

myristamidopropyl-, palmidopropyl-, hoặc isostearamidopropyl-dimetylamin; natri metyl cocoyl-, hoặc dinatri metyl oleyl-taurat; và chuỗi MONAQU AT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey); polyetyl glycol, polypropyl glycol, và các copolymer của etylen và propylene glycol (ví dụ Pluronic, PF68...); Polysorbat 20 (PS20) và Polysorbat 80 (PS80), tương ứng được thấy là đặc biệt thích hợp trong các chế phẩm mô tả theo sáng chế.

Thuật ngữ "kháng thể" theo sáng chế theo nghĩa rộng nhất và đặc biệt bao gồm các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa đặc hiệu có độ dài đầy đủ (ví dụ các kháng thể đặc hiệu kép) hình thành từ ít nhất hai kháng thể có độ dài đầy đủ, và các phần kháng thể, với điều kiện là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" theo sáng chế đề cập đến kháng thể thu được từ nhóm các kháng thể về cơ bản đồng nhất, tức là các kháng thể riêng biệt bao gồm nhóm đồng nhất và/hoặc gắn kết với cùng epitop, ngoại trừ các thể biến dị có thể mà có thể xuất hiện trong quá trình tạo ra kháng thể đơn dòng, các thể biến dị này thường có mặt với các lượng rất nhỏ. Ngược lại với các chế phẩm kháng thể đa dòng thường bao gồm các kháng thể khác nhau trực tiếp kháng các yếu tố di truyền khác nhau (các epitop), mỗi kháng thể đơn dòng trực tiếp kháng yếu tố di truyền nhờ vào kháng nguyên. Ngoài tính đặc hiệu của chúng, các kháng thể đơn dòng có lợi ở chỗ chúng không bị nhiễm bệnh bằng các globulin miễn dịch khác. Gen sửa đổi "đơn dòng" biểu thị đặc tính của kháng thể khi thu được từ nhóm các kháng thể về cơ bản đồng nhất, và không được phối hợp khi cần tạo ra kháng thể bằng bất kỳ phương pháp nào. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra trước tiên bằng phương pháp lai được mô tả bởi Köhler et al, Nature, 256:495 (1975), hoặc có thể được tạo ra bằng các phương pháp tái tổ hợp ADN (xem, ví dụ US 4,816,567). "Các kháng thể đơn dòng" còn có thể được phân lập từ các thư viện kháng thể thực khuẩn thể nhờ các kỹ thuật mô tả trong tài liệu Clarkson et al., Nature, 352:624-628 (1991) và Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

"Phần kháng thể" bao gồm một phần của kháng thể có độ dài đầy đủ, đặc biệt bao gồm vùng biến đổi hoặc gắn kết kháng nguyên của chúng. Các ví dụ về các phần kháng thể bao gồm các phần Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv; các thể địa-; các kháng thể mạch thẳng; các phân tử kháng thể chuỗi đơn; và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ (các) phần kháng thể.

"Kháng thể có độ dài đầy đủ" là một kháng thể bao gồm vùng biến đổi gắn kết kháng nguyên cũng như miền ổn định chuỗi nhẹ (CL) và các miền ổn định chuỗi nặng, CH1, CH2 và CH3. Các miền ổn định có thể là các miền ổn định trình tự nguyên thể (ví dụ các miền ổn định trình tự nguyên thể người) hoặc các thể biến dị trình tự axit amin của chúng. Đặc biệt là kháng thể có độ dài đầy đủ có một hoặc nhiều chức năng tác động.

Kháng thể "dạng biến dị trình tự axit amin" theo sáng chế là kháng thể với trình tự axit amin khác với kháng thể dạng chính. Nói chung, các thể biến dị trình tự axit amin sẽ có ít nhất khoảng 70% tương đồng với kháng thể dạng chính, và tốt hơn là chúng có ít nhất khoảng 80%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 90% tương đồng với kháng thể dạng chính. Các thể biến dị trình tự axit amin có các thay thế, khuyết đoạn, và/hoặc xen đoạn tại một số vị trí trong hoặc gần kề với trình tự axit amin của kháng thể dạng chính. Các ví dụ về các thể biến dị trình tự axit amin ở đây bao gồm thể biến dị axit (ví dụ thể biến dị khử amit hóa), thể biến dị bazơ, kháng thể với phần mở rộng chính đầu amino (ví dụ VHS-) trên một hoặc hai chuỗi nhẹ của chúng, kháng thể với gốc lysin đầu C trên một hoặc hai chuỗi nặng của chúng v.v., và bao gồm tổ hợp của các biến đổi cho các trình tự axit amin của các chuỗi nặng và/hoặc nhẹ. Thể biến dị kháng thể đặc biệt quan tâm ở đây là kháng thể bao gồm phần mở rộng chính đầu amino trên một hoặc hai chuỗi nhẹ của chúng, tùy ý còn bao gồm trình tự axit amin khác và/hoặc các khác biệt glycosyl hóa tương đối với kháng thể dạng chính.

Kháng thể "dạng biến dị glycosyl hóa" theo sáng chế là kháng thể với một hoặc nhiều gốc carbohydrat gắn với chúng khác với một hoặc nhiều gốc carbohydrat gắn với kháng thể dạng chính. Các ví dụ về các biến thể glycosyl

hóa ở đây bao gồm kháng thể với cấu trúc oligosacarit G1 hoặc G2, thay cho cấu trúc oligosacarit G0, gắn với vùng Fc của nó, kháng thể với một hoặc nhiều gốc carbohydrat gắn với một hoặc hai chuỗi nhẹ của nó, kháng thể không có carbohydrat gắn với một hoặc hai chuỗi nặng của kháng thể, v.v., và các tổ hợp của các biến đổi glycosyl hóa. Ngoài ra thuật ngữ "thể biến dị glycosyl hóa" bao gồm các kháng thể được biến đổi di truyền bằng glycogen như các loại được mô tả trong EP 1.331.266 và USP 7.517.670.

"Các chức năng tác động" kháng thể đề cập đến các hoạt tính sinh học được cho là do vùng Fc (vùng trình tự Fc nguyên thể hoặc vùng trình tự axit amin Fc biến thể) của kháng thể. Các ví dụ về các chức năng tác động kháng thể bao gồm gắn kết C1q; tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC); gắn kết thụ thể Fc; tính gây độc tế bào do tế bào tạo ra phụ thuộc kháng thể (ADCC); sự thực bào; quá trình điều chỉnh giảm của các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B; BCR), v.v..

Tùy thuộc vào trình tự axit amin thuộc vùng ổn định của các chuỗi nặng của chúng, các kháng thể có độ dài đầy đủ được chia thành "các loại" khác nhau. Có năm loại chính của các kháng thể có độ dài đầy đủ IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, và một vài loại trong số đó có thể được chia thành các kiểu phụ (các isotyp), ví dụ như IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, IgA và IgA2. Các vùng ổn định chuỗi nặng tương ứng với các loại khác nhau của các kháng thể được lần lượt gọi là α (alpha), δ (delta), ϵ (epsilon), γ (gamma), và μ (mu). Các cấu trúc siêu phân tử và các cấu hình ba chiều của các loại khác nhau của các globulin miễn dịch là đã biết rõ.

Theo sáng chế, "hoạt tính sinh học" của kháng thể đơn dòng đề cập đến khả năng của kháng thể để gắn kết với kháng nguyên và tạo ra đáp ứng sinh học có thể đo được mà có thể đo được *in vitro* hoặc *in vivo*. Hoạt tính này có thể là đối kháng (ví dụ trong đó kháng thể là kháng thể HER2) hoặc chủ vận. Đối với trường hợp là Pertuzumab, theo một phương án, hoạt tính sinh học đề cập đến

khả năng của kháng được tạo ra để ức chế quá trình tăng sinh của dòng tế bào ung thư vú người MDA-MB-175-VII.

Thuật ngữ “các kháng thể đơn dòng” theo sáng chế đặc biệt bao gồm các kháng thể dạng khảm trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là đồng nhất với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ loại đặc biệt hoặc thuộc loại hoặc kiểu phụ kháng thể đặc biệt, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi là đồng nhất với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ loại hoặc thuộc kiểu phụ kháng thể khác, cũng như các phần của các kháng thể này, với điều kiện là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn (US 4,816,567; và Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Các kháng thể dạng khảm quan tâm theo sáng chế bao gồm các kháng thể “được làm tương thích với động vật linh trưởng” chứa các trình tự gắn kết kháng nguyên của miền biến đổi thu được từ động vật linh trưởng không phải người (ví dụ Old World Monkey, Ape...) và các trình tự vùng ổn định người.

Các dạng "được làm tương thích với người" của các kháng thể không phải người (ví dụ, loài gặm nhấm) là các kháng thể dạng khảm chứa trình tự tối thiểu thu được từ globulin miễn dịch không phải người. Phần nhiều, các kháng thể được làm tương thích với người là các globulin miễn dịch người (kháng thể cho) trong đó các gốc từ vùng siêu biến của thể nhận được thay thế bằng các gốc từ vùng vùng siêu biến của loài không phải người ((kháng thể cho) như chuột nhắt, chuột, thỏ hoặc động vật linh trưởng không phải người có tính đặc hiệu, ái lực, và khả năng mong muốn. Đối với một số trường hợp, các gốc vùng khung (FR) của globulin miễn dịch người được thay thế bằng các gốc không phải người tương ứng. Ngoài ra, các kháng thể được làm tương thích với người có thể bao gồm các gốc mà không được thấy ở kháng thể nhận hoặc ở kháng thể cho. Các cải biến đó được tạo ra để sàng lọc hơn nữa tính tính năng của kháng thể. Nói chung, kháng thể được làm tương thích với người về cơ bản sẽ bao gồm toàn bộ của ít nhất một, và thường là hai miền biến đổi, trong đó toàn bộ hoặc về cơ bản là toàn bộ các vòng siêu biến tương ứng với các vòng siêu biến của globulin

miễn dịch không phải người và toàn bộ hoặc về cơ bản là toàn bộ các FR là các FR của trình tự globulin miễn dịch người. Kháng thể được làm tương thích với người tùy ý cũng sẽ bao gồm ít nhất một phần của vùng ổn định globulin miễn dịch (Fc), thường là của globulin miễn dịch người. Để chi tiết hơn, xem tài liệu Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); và Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Các kháng thể được làm tương thích với người HER2 bao gồm huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 và huMAb4D5-8 hoặc Trastuzumab (HERCEPTIN™) như được mô tả trong Bảng 3 của US 5,821,337; các kháng thể 520C9 được làm tương thích với người (WO93/21319) và các kháng thể 2C4 được làm tương thích với người, như Pertuzumab đã được mô tả thêm dưới đây.

Đối với các mục đích này, "Trastuzumab", "HERCEPTIN™" và "huMAb4D5-8" đề cập đến kháng thể kháng HER2 trực tiếp kháng epitop 4D5. Tốt hơn là kháng thể này bao gồm các trình tự axit amin chuỗi nhẹ và nặng được đề xuất trong Fig.14 của WO 2006/044908 chẳng hạn.

"Epitop 4D5" là vùng ở miền ngoại bào của HER2 mà với nó kháng thể 4D5 (ATCC CRL 10463) và Trastuzumab gắn kết. Epitop này gần với miền màng chuyển tiếp của HER2, và trong miền IV của HER2. Để sàng lọc các kháng thể gắn kết với epitop 4D5, thử nghiệm phong bế chéo thông thường như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), có thể được tiến hành. Theo cách khác, việc vẽ bản đồ epitop có thể được tiến hành để đánh giá liệu kháng thể có gắn kết với epitop 4D5 của HER2 hay không (ví dụ một hoặc nhiều gốc bất kỳ ở vùng khoảng từ gốc 529 đến bao gồm cả gốc 625, của HER2). "Epitop 7C2/7F3" là vùng tại đầu amino, trong Miền I, của miền ngoại bào của HER2 mà các kháng thể 7C2 và/hoặc 7F3 gắn kết với nó. Để sàng lọc các kháng thể gắn kết với epitop 7C2/7F3, thử nghiệm phong bế chéo thông thường như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu (*Antibodies, A Laboratory Manual*) (Cold

Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)) có thể được tiến hành. Theo cách khác, việc vẽ bản đồ epitop có thể được tiến hành để chứng minh liệu kháng thể có gắn kết với epitop 7C2/7F3 trên HER2 hay không (ví dụ một hoặc nhiều gốc bất kỳ trong vùng khoảng từ gốc 22 đến gốc 53 của HER2).

Theo sáng chế, "Pertuzumab" và "rhuMAb 2C4" đề cập đến kháng thể gắn kết với epitop 2C4 và tốt hơn bao gồm các trình tự axit amin chuỗi nhẹ và chuỗi nặng biến đổi đề cập trong WO 2006/044908, đặc biệt hơn là kiểu 2C4 được làm tương thích với người đề cập trong Fig.2 của WO 2006/044908.

"Epitop 2C4" là vùng ở miền ngoại bào của HER2 mà với nó kháng thể 2C4 gắn kết. Để sàng lọc các kháng thể gắn kết với epitop 2C4, thử nghiệm phong bế chéo thông thường như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), có thể được tiến hành. Theo cách khác, việc vẽ bản đồ epitop có thể được tiến hành để đánh giá liệu kháng thể có gắn kết với epitop 2C4 của HER2 hay không. Epitop 2C4 bao gồm các gốc từ miền II ở miền ngoại bào của HER2. 2C4 và Pertuzumab gắn kết với miền ngoại bào của HER2 tại mạch nối tiếp của các miền I, II và III (Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)).

"Chất ức chế sinh trưởng" khi sử dụng theo sáng chế đề cập đến hợp chất hoặc chế phẩm ức chế sự sinh trưởng của tế bào, đặc biệt là tế bào ung thư biểu hiện HER hoặc *in vitro* hoặc *in vivo*. Vì vậy, chất ức chế sinh trưởng có thể là chất làm giảm đáng kể tỷ lệ của các tế bào biểu hiện HER trong pha S. Các ví dụ về các chất ức chế sinh trưởng bao gồm các chất phong bế cấp số chu trình tế bào (tại vị trí khác pha S), như các chất kích thích ngừng G1 và ngừng pha M. Các chất phong bế pha M cổ điển bao gồm các chất ức chế vinca (vincristin và vinblastin), các taxan, và topo II như doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposid, và bleomycin. Các chất đó giữ G1 cũng tràn vào phần giữ pha S, ví dụ các chất alkyl hóa ADN như tamoxifen, prednison, dacarbazin, mecloetamin, cisplatin, metotrexat, 5-fluoraxil, và ara-C. Thông tin khác có thể được thấy

trong tài liệu "The Molecular Basis of Cancer", Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, tiêu đề "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" của Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), cụ thể là được mô tả trong trang 13.

Các ví dụ về các kháng thể "ức chế sinh trưởng" là các kháng thể gắn kết với HER2 và ức chế sự sinh trưởng của các tế bào ung thư biểu hiện quá mức HER2. Các kháng thể ức chế sinh trưởng ưu tiên HER2 ức chế sự sinh trưởng của các tế bào u vú SK-BR-3 trong dịch nuôi cấy tế bào tới nhiều hơn 20%, và tốt hơn là nhiều hơn 50% (ví dụ khoảng từ 50% đến 100%) với nồng độ kháng thể khoảng từ 0,5 đến 30 $\mu\text{g/ml}$, trong đó sự ức chế sinh trưởng được xác định sáu ngày sau khi cho các tế bào SK-BR-3 tiếp xúc với kháng thể (xem US 5,677,171 công bố 14/10/1997). Kháng thể ức chế sinh trưởng ưu tiên là thể biến dị của kháng thể đơn dòng chuột 4D5 được làm tương thích với người, ví dụ Trastuzumab.

"Điều trị" đề cập tới cả hai phương pháp chữa bệnh và phòng bệnh hoặc ngăn ngừa. Đối tượng cần điều trị bao gồm đối tượng đã bị bệnh cũng như đối tượng trong đó bệnh đã bị ngăn chặn. Do đó, bệnh nhân cần điều trị theo sáng chế có thể đã được chẩn đoán có bệnh hoặc có thể dẫn đến hoặc dễ mắc bệnh.

Thuật ngữ "chất gây gây độc tế bào" như sử dụng theo sáng chế đề cập đến chất ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng của các tế bào và/hoặc làm cho các tế bào bị hủy diệt. Thuật ngữ dự tính bao gồm các chất đồng vị phóng xạ (ví dụ At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² và các chất đồng vị phóng xạ của Lu), các tác nhân hóa liệu pháp, và các độc tố như các độc tố phân tử nhỏ hoặc các độc tố có hoạt tính enzyme của có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, kể cả các phân và/hoặc các thể biến dị của chúng.

"Tác nhân hóa liệu pháp" là hợp chất hóa học được sử dụng để điều trị bệnh ung thư. Các ví dụ về các tác nhân hóa liệu pháp bao gồm các chất alkyl hóa như thiotepa và xyclophosphamid (CYTOXANTM); các alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; các aziridin như benzodopa, carboquon,

meturedopa, và uredopa; các etylenimin và các metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenephosphoramit, triethylenethiophosphoramit và trimetylolomelarnin; các axetogenin (đặc biệt là bulataxin và bulataxinon); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARENOL™); beta-lapachone; lapachol; các colchicin; axit betulinic; camptothecin (bao gồm chất tương tự topotecan (HYCAMTIN™), CPT-11 (irinotecan, C AMPTOSAR™), axetylcamptothecin, scopolectin, và 9-aminocamptothecin); bryostatin; calystatin; CC-1065 (bao gồm các chất tương tự adozelesin, carzelesin và bizelesin tổng hợp của nó); podophylotoxin; axit podophylinic; teniposit; các cryptoplhyxin (đặc biệt là cryptophyxin 1 và cryptophycin 8); dolastatin; duocarmyxin (bao gồm các chất tương tự tổng hợp, KW-2189 và CBI-TMI); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; các hơi cay nitơ như clorambuxil, clonaphazin, cholophosphamit, estramustin, ifosfamid, meclotamin, meclotamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfa[pi]nit, hơi cay uraxil; các nitrosure như carmustin, clozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin, và ranirnnustin; các thuốc kháng sinh như các thuốc kháng sinh enediyn (ví dụ calicheamicin, đặc biệt là calicheamicin gamma 11 và calicheamicin omega 11 (xem, ví dụ tài liệu Angew, Chemie Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dynemixin, bao gồm dynemixin A; esperamixin; cũng như các nhóm mang màu neocarzinostatin và các nhóm mang màu kháng sinh protein màu enediyn), các aclacinomysin, actinomyxin, autramyxin, azaserin, các bleomyxin, cactinornyxin, carabixin, carminomyxin, carzinophilin, các myxini màu, dactinomyxin, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, doxorubixin (bao gồm ADRIAMYCIN™, morpholino-doxorubixin, xyanomorpholino-doxorubixin, 2-pyrrolino-doxorubixin, thuốc tiêm doxorubixin HCl liposom (DOXIL™), doxorubixin liposom TLC D-99 (MYOCET™), doxorubixin liposom peglyl hóa (CAELYX™), và deoxydoxorubixin), epirubixin, esorubixin, idarubixin, marxenomyxin, các mitomycin như mitomyxin C, axit mycophenolic, nogalamyxin, các olivomyxin, peplomyxin, potfiromyxin, puromyxin,

quelamyxin, rodorubixin, streptonigrin, streptozoxin, tubexidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; các chất chống chuyển hóa như metotrexat, gemxitabin (GEMZAR™), tegafur (UFTORAL™), capexitabin (XELODA™), epothilon, và 5-flouraxil (5-FU); các chất tương tự axit folic như denopterin, metotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất tương tự purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; các chất tương tự pyrimidin như anxitabin, azacitidin, 6-azauridin, carmofur, cytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enocitabin, floxuridin; các chất kháng thượng thận như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; các chất độn axit folic như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamit glycosit; axit aminolevulinic; eniluraxil; amsacrin; bestrabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolxin; diaziqun; elfornithin; eliptini axetat; etoglucit; gali nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidainin; các maytansinoit như maytansin và các ansamitocin; mitoguazon; mitoxantron; mopidanmol; nitraerin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; losoxantron; 2-etylhydrazit; procarbazin; phức chất PSKL™ polysacarit (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxan; rhizoxin; sizofiran; spirogermarai; axit tenuazonic; triaziqun; 2,2',2"-triclortrietylamin; các trichothecen (đặc biệt là độc tố T-2, veracurin A, roridin A và anguidin); uretan; dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gaxytosin; arabinosit ("Ara-C"); thiotepa; taxoit, ví dụ paclitaxel (TAXOL™), chế phẩm dạng hạt nano xử lý di truyền bằng albumin chứa paclitaxel (ABRAXANE™), và docetaxel (TAXOTERE™); cloranbuxil; 6-thioguanin; mercaptopurin; metliotrexat; các chất platin như cisplatin, oxaliplatin, và carboplatin; các vinca, chúng ngăn chặn quá trình polyme hóa tubulin khởi hình thành các vi cấu trúc hình ống, bao gồm vinblastin (VELBAN™), vincristin (ONCOVIN™), vindesin (ELDISINE™), FILDESIN™, và vinorelbin (NAVELBINE™); etoposit (VP-16); ifosfamit; mitoxantron; leucovovin; novantron; edatrexat; daunomyxin; aminopterin; ibandronat; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflometylornithin (DMFO); các retinoit như axit retinoic, bao gồm bexaroten (TARGRETIN™); các bisphosphonat như clodronat (ví dụ BONEFOS™ hoặc OSTAC™), etidronat (DIDROCAL™),

NE-58095, axit zoledronic/zoledronat (ZOMETA™), alendronat (FOSAMAJX™), pamidronat (AREDIA™), tiludronat (SKELID™), hoặc risedronat (ACTONEL™); troxacitabin (chất tương tự 1,3-dioxolan nucleosit xytosin); các oligonucleotit đối mã, đặc biệt là các chất ức chế biểu hiện của các gen theo các đường truyền tín hiệu liên quan đến quá trình tăng sinh tế bào khác thường như PKC-alpha, Raf, H-Ras chẳng hạn, và thụ thể nhân tố sinh trưởng biểu bì (EGF-R); các vaccin như vaccin THERATOPE™ và các vaccin chữa bệnh gen như vaccin ALLOVECTIN™, vaccin LEUVECTIN™, vaccin VAXID™ chẳng hạn; chất ức chế topoisomeraza 1 (ví dụ LURTOTECAN™); rmRH (ví dụ ABARELIX™); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosin, chất ức chế COX-2 (ví dụ celecoxib hoặc etoricoxib), chất ức chế proteosome (ví dụ PS341); bortezomib (VELCADE™); CCI-779; tipifarnib (RI 1577); orafenib, ABT510; chất ức chế Bcl-2 như oblimersen natri (GENASENSE™); pixantron; các chất ức chế EGFR (xem định nghĩa dưới đây); các chất ức chế tyrosin kinaza (xem định nghĩa dưới đây); và các muối, các axit hoặc các dẫn xuất được dụng của bất kỳ loại nào nêu trên; cũng như tổ hợp của hai hoặc nhiều loại nêu trên như CHOP, chữ viết tắt cho liệu pháp kết hợp xyclophosphamit, doxorubicin, vincristin, và prednisolon, và FOLFOX, chữ viết tắt cho chế độ điều trị bằng oxaliplatin (ELOXATIN™) kết hợp với 5-FU và leucovovin.

Ngoài ra nằm trong định nghĩa này là các tác nhân kháng nội tiết tố hoạt động điều chỉnh hoặc ức chế hoạt động của hormone đối với các khối u như các kháng estrogen với profil chủ vận/đối kháng, bao gồm tamoxifen (NOLVADEX™), 4-hydroxytamoxifen, toremifen (FARESTON™), idoxifen, droloxifen, raloxifen (EVTSTA™), trioxifen, keoxifen và các chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (SERMs) như SERM3; các kháng estrogen tinh khiết không có các đặc tính chủ vận, như fulvestrant (FASLODEX™), và EM800 (các chất này có thể phong bế quá trình dime hóa thụ thể estrogen (ER), ức chế gắn kết ADN, tăng vòng tuần hoàn ER, và/hoặc ức chế các mức ER); các chất ức chế aromataza, bao gồm các chất ức chế aromataza steroid như formestan và

exemestan (AROMASIN™), và các chất ức chế aromataza không steroid như anastrozol (ARIMIDEX™), letrozol (FEMARA™) và aminoglutethimide, và các chất ức chế aromataza khác bao gồm vorozol (RIVISOR™), megestrol axetat (MEGASE™), fadrozol, imidazol; các chất chủ vận hormone giải phóng hormone tạo hoàng thể, bao gồm leuprolide (LUPRON™ và ELIGARD™), goserelin, buserelin, và triptorelin; các steroid sinh dục, bao gồm các progestin như megestrol axetat và medroxyprogesteron axetat, các estrogen như diethylstilbestrol và premarin, và các androgen/các retinoid như floxymesteron, toàn bộ axit transretionic và fenretinide; onapristone; các kháng progesteron; các chất điều chỉnh giảm thụ thể estrogen (ERDs); các kháng androgen như flutamide, nilutamide và bicalutamide; testolactone; và các muối, các axit hoặc các dẫn xuất được dùng của bất kỳ loại nào nêu trên; cũng như tổ hợp của hai hoặc nhiều loại nêu trên.

Theo sáng chế, thuật ngữ "dược chất hướng EGFR" chỉ chất chữa bệnh gắn kết với EGFR và, tùy ý ức chế quá trình hoạt hóa EGFR. Các ví dụ về các chất này bao gồm các kháng thể và các phân tử nhỏ gắn kết với EGFR. Các ví dụ về các kháng thể gắn kết với EGFR bao gồm MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (xem US 4.943. 533, Mendelsohn et al.) và các thể biến dị của chúng, như 225 dạng khảm (C225 hoặc Cetuximab; ERBITUX™) và 225 người tái tạo dạng (H225) (xem WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); các kháng thể gắn kết với EGFR đột biến typ II (US 5.212.290); các kháng thể được làm tương thích với người và dạng khảm gắn kết với EGFR như được mô tả trong US 5.891.996; và các kháng thể người gắn kết với EGFR, như ABX-EGF (xem WO98/50433, Abgenix). Kháng thể kháng EGFR có thể kết hợp với tác nhân gây độc tế bào, nhờ đó tạo ra thể tiếp hợp miễn dịch (xem ví dụ EP-A-659439, Merck Patent GmbH). Các ví dụ về các phân tử nhỏ gắn kết với EGFR bao gồm ZD 1839 hoặc Gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca), CP-358774 hoặc Erlotinib HCl (TARCEVA™ Genentech/Roche/OSI) và AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen).

"Chất ức chế tyrosin kinaza" là phân tử ức chế hoạt tính tyrosin kinaza của tyrosin kinaza tới một mức độ nhất định như thụ thể HER. Các ví dụ về các chất ức chế này bao gồm các dược chất hướng EGFR được thấy trong đoạn trên cũng như chất ức chế tyrosin kinaza HER2 phân tử nhỏ như TAKI 65 do Takeda cung cấp, các chất ức chế HER kép như EKB-569 (do Wyeth cung cấp) mà tốt hơn là gắn kết với EGFR nhưng ức chế các tế bào biểu hiện quá mức HER2 và EGFR GW572016 (do Glaxo cung cấp) chất ức chế tyrosin kinaza HER2 và EGFR dùng qua đường miệng và PKI- 166 (do Novartis cung cấp); các chất ức chế pan-HER như canertinib (CI-1033; Pharmacia); các chất ức chế Raf-1 như tác nhân đối mã ISIS-5132 do ISIS Pharmaceuticals cung cấp ức chế việc truyền tín hiệu Raf-1; các chất ức chế TK không nhằm vào HER như Imatinib mesylat (Gleevec™) do Novartis cung cấp; chất ức chế kinaza I điều chỉnh ngoại bào MAPK CI-1040 (do Pharmacia cung cấp); các quinazolin, như PD 153035, 4-(3-cloanilino) quinazolin; các pyridopyrimidin; pyrimidopyrimidin; các pyrolopyrimidin, như CGP 59326, CGP 60261 và CGP 62706; các pyrazolopyrimidin, 4-(phenylamino-7H-pyrrolo(2,3-d) pyrimidin; curcumin (diferuloyl metan, 4,5-bis (4-floanilino)phtalimit); các tyrphostin chứa các gốc nitrothiophen PD-0183805 (Warner-Lambert); các phân tử đối mã (ví dụ các loại gắn kết với axit nucleic mã hóa HER); các quinoxalin (US 5.804.396); các tryphostin (US 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); các chất ức chế pan-HER như CI- 1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK- 787 (Novartis/Schering AG); INC-IC11 (Imclone); hoặc như được mô tả trong tài liệu công bố patent bất kỳ sau: US 5,804,396; WO 99/09016 (American Cyanamid); WO 98/43960 (American Cyanamid); WO 97/38983 (Warner Lambert); WO 99/06378 (Warner Lambert); WO 99/06396 (Warner Lambert); WO 96/30347 (Pfizer, Inc); WO 96/33978 (Zeneca); WO96/3397 (Zeneca); và WO 96/33980 (Zeneca).

"Các chất chống tạo mạch" đề cập đến hợp chất phong bế, hoặc cản trở tới một mức độ nhất định, sự phát triển của các mạch máu. Nhân tố chống tạo mạch có thể là phân tử nhỏ hoặc kháng thể chẳng hạn gắn kết với nhân tố sinh trưởng

hoặc thụ thể nhân tố sinh trưởng tạo ra sự kích thích quá trình hình thành mạch. Nhân tố chống tạo mạch ưu tiên theo sáng chế là kháng thể gắn kết với nhân tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF), như Bevacizumab (AVASTIN™).

Thuật ngữ "xytokin" là thuật ngữ chung chỉ các protein được giải phóng bởi một nhóm tế bào tác động đến tế bào như các chất môi giới gian bào. Các ví dụ về các xytokin này là các lymphokin, các monokin, và các hocmon polypeptit truyền thống. Nằm trong số các xytokin này là hocmon sinh trưởng như hocmon sinh trưởng người, hocmon sinh trưởng người N-methionyl, và hocmon sinh trưởng bò, hocmon tuyến cận giáp, thyroxin, insulin, proinsulin, relaxin; các hocmon prorelaxin, glycoprotein như hocmon được tổng hợp và giải phóng từ tuyến yên trước (FSH), hocmon kích thích tuyến giáp (TSH), và hocmon tạo hoàng thể (LH), nhân tố sinh trưởng gan; nhân tố sinh trưởng nguyên bào sợi, prolactin, lactogen nhau, nhân tố hoại tử khối u α và β , chất ức chế Muller, peptit liên quan đến gonadotropin chuột, inhibin; activin, nhân tố sinh trưởng nội mô mạch integrin, thrombopoietin (TPO), các nhân tố sinh trưởng thần kinh như NGF- β , nhân tố sinh trưởng tiểu cầu; các nhân tố sinh trưởng biến đổi (TGFs) như TGF- α và TGF- β , nhân tố sinh trưởng tương tự insulin I và -II, hocmon do tế bào thận tiết ra (EPO), các nhân tố kích thích tạo xương; các interferon như interferon α , β , và γ , các nhân tố kích thích khuẩn lạc (CSFs) như đại thực bào-CSF (M-CSF), bạch cầu hạt-đại thực bào-CSF (GM-CSF), và bạch cầu hạt-CSF (G-CSF), các intolokin (ILs) như IL-1, IL-1 $\cdot$, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, nhân tố hoại tử khối u như TNF- α và TNF- β , và các nhân tố polypeptit khác bao gồm LIF và kit phối tử (KL). Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ xytokin bao gồm các protein có nguồn gốc tự nhiên hoặc từ dịch nuôi cấy tế bào tái tổ hợp và các loại tương đương có hoạt tính sinh học của các xytokin trình tự tự nhiên.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" đề cập tới lượng tạo ra hiệu quả mong muốn. Đối với trường hợp là thành phần chế phẩm như enzym hyaluronidaza theo sáng chế thì lượng hữu hiệu là lượng cần thiết để làm tăng sự phân tán và hấp thu của kháng thể kháng HER2 cùng sử dụng theo cách để kháng thể kháng HER2 có thể hoạt động theo cách chữa bệnh hữu hiệu như nêu trên. Đối với trường hợp là

được chất thì nó là lượng hoạt chất hữu hiệu để điều trị bệnh ở bệnh nhân. Trong đó bệnh là bệnh ung thư, lượng hữu hiệu của được chất có thể giảm số lượng các tế bào ung thư; giảm kích cỡ khối u; ức chế (tức là làm chậm tới một mức độ nhất định và tốt hơn là làm ngừng lại) sự thâm nhiễm tế bào ung thư vào các cơ quan ngoại biên; ức chế, tới một mức độ nhất định, sự sinh trưởng khối u; và/hoặc làm giảm bớt tới một mức độ nhất định một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh ung thư. Trong một chừng mực được chất có thể ngăn ngừa sự sinh trưởng và/hoặc tiêu diệt tế bào ung thư đang tồn tại, nó có thể kìm hãm tế bào và/hoặc gây độc tế bào. Lượng hữu hiệu có thể kéo dài sự sống mà bệnh không tiến triển, tạo ra đáp ứng mục tiêu (bao gồm đáp ứng một phần PR, hoặc đáp ứng hoàn toàn, CR), tăng thời gian sống sót hoàn toàn, và/hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh ung thư.

Tốt hơn là kháng thể mà được tạo ra theo sáng chế về cơ bản là tinh khiết và về bản chất là đồng nhất theo mong muốn (tức là không bị nhiễm protein, v.v.. nhờ đó enzym hyaluronidaza trong chế phẩm theo sáng chế này không được cho là protein nhiễm bản của kháng thể đơn dòng kháng HER2 theo sáng chế). Kháng thể “về cơ bản tinh khiết” có nghĩa là chế phẩm bao gồm ít nhất khoảng 90% khối lượng kháng thể, dựa vào khối lượng tổng của chế phẩm, tốt hơn là ít nhất khoảng 95% khối lượng. Kháng thể “về cơ bản đồng nhất” có nghĩa là chế phẩm bao gồm ít nhất khoảng 99% khối lượng kháng thể, dựa vào khối lượng tổng của chế phẩm.

Sáng chế sẽ được hiểu đầy đủ hơn bằng cách tham khảo các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên chúng sẽ không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Tất cả tài liệu và các trích dẫn patent được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các chế phẩm kháng HER2 để sử dụng dưới da theo sáng chế được triển khai dựa vào các kết quả thử nghiệm như nêu dưới đây nhờ sử dụng quy trình điều chế chung và các phương pháp phân tích và các thử nghiệm như nêu dưới đây.

A) Điều chế các thành phần cho chế phẩm

Trastuzumab được điều chế bằng các kỹ thuật thường đã biết để tạo ra các protein tái tổ hợp. Dòng tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc đã biến đổi di truyền (CHO) được tạo ra như mô tả trong EP-B-590058 được phát triển trong dịch nuôi cấy tế bào từ ngân hàng tế bào gốc. Kháng thể đơn dòng Trastuzumab được thu gom từ dịch nuôi cấy tế bào và tinh chế nhờ sử dụng phép sắc ký ái lực cố định Protein A, phép sắc ký trao đổi ion (ví dụ SP-Sepharose FF), bước lọc để loại bỏ lây nhiễm virus (ví dụ màng PVDF (do Milipore bán dưới tên Viresolve filters), tiếp theo là phép sắc ký trao đổi anion (ví dụ Q-Sepharose FF) và bước siêu lọc/lọc kép. Để điều chế các chế phẩm theo các ví dụ Trastuzumab được cung cấp với nồng độ khoảng 100 mg/ml trong 20 mM chất đệm histidin với độ pH khoảng 6,0.

rHuPH20 được điều chế bằng các kỹ thuật thường đã biết để tạo ra các protein tái tổ hợp. Quy trình bắt đầu bằng cách làm đông tan các tế bào từ ngân hàng tế bào hoạt động (WCB) hoặc từ ngân hàng tế bào gốc (MCB) và mở rộng nhờ dịch nuôi cấy tế bào trong hàng loạt bình quay, tiếp theo là mở rộng trong bình phản ứng sinh học. Sau khi hoàn thành giai đoạn điều chế, dịch nuôi cấy tế bào được làm sạch bằng cách lọc, và sau đó xử lý bằng dung môi/chất tẩy để làm bất hoạt các virus. Sau đó protein được làm tinh khiết bằng một loạt quy trình sắc ký cột để loại bỏ các tạp chất liên quan đến quy trình và sản phẩm. Bước lọc virus được tiến hành, và khối đã lọc sau đó được cô, điều chế thành chất đậm cuối cùng: 10 mg/mL rHuPH20 trong 20 mM chất đệm L-histidin/HCl, pH 6,5, 130 mM NaCl, 0,05% (khối lượng/thể tích) polysorbate 80. Khối rHuPH20 được giữ dưới -70°C.

Các tá dược khác của chế phẩm theo sáng chế được sử dụng rộng rãi trong thực tế và đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Vì vậy không cần phải giải thích một cách chi tiết.

Các chế phẩm chứa sản phẩm được chất lỏng để sử dụng dưới da theo sáng chế được triển khai như sau.

Ví dụ 1: Bào chế các chế phẩm lỏng

Để bào chế các chế phẩm lỏng, Trastuzumab được trao đổi chất đệm nhờ chất đệm lọc kép chứa chế phẩm chất đệm dùng trước và, nếu cần, cô bằng cách

lọc kép tới nồng độ kháng thể khoảng 150 mg/ml. Sau khi hoàn thành thao tác lọc kép, các tá dược (ví dụ trehaloza, rHuPH20) được thêm như dung dịch gốc vào dung dịch kháng thể. Sau đó chất hoạt động bề mặt được thêm vào bằng 50 đến 200 lần dung dịch gốc. Cuối cùng, nồng độ protein được điều chỉnh bằng chất đệm tới nồng độ Trastuzumab cuối cùng khoảng 110 mg/ml, 120 mg/ml hoặc 130 mg/ml như định rõ trong các chế phẩm đặc biệt thêm nữa dưới đây.

Tất cả các chế phẩm được lọc tiệt trùng qua các màng lọc gắn kết protein thấp 0,22 μm và làm đầy vô trùng vào các lọ thủy tinh tiệt trùng 6 ml gắn kín bằng nút cao su phủ (Copolyme của etylen và tetrafluoroetylen) ETFE và các nắp mép nhôm. Thể tích đầy khoảng 3,0 ml. Các chế phẩm đó được giữ ở các điều kiện thời tiết khác nhau (5°C, 25°C và 30°C) trong các khoảng thời gian khác nhau và nén bằng cách lắc (1 tuần với tần suất lắc 200 phút⁻¹ ở 5°C và 25°C) và các phương pháp nén làm đông tan. Các mẫu được phân tích trước và sau khi ứng dụng các thử nghiệm nén bằng các phương pháp dưới đây:

- 1) phép phổ quang kế UV;
- 2) phép sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC);
- 3) bằng phép sắc ký trao đổi ion (IEC);
- 4) bằng độ đục của dung dịch;
- 5) đối với các hạt có thể nhìn thấy; và
- 6) đối với hoạt tính rHuPH20.

Phổ học UV, sử dụng để xác định hàm lượng protein, được tiến hành bằng phổ quang kế Perkin Elmer $\lambda 35$ UV với độ dài bước sóng khoảng từ 240 nm đến 400 nm. Các mẫu protein tinh khiết được pha loãng tới khoảng 0,5 mg/ml với chất đệm chế phẩm tương ứng. Nồng độ protein được tính toán theo Phương trình 1.

$$\text{Phương trình 1: Nồng độ protein} = \frac{A(280) - A(320) \times \text{dil. factor}}{\epsilon \left(\frac{\text{cm}^2}{\text{mg}} \right) \times d(\text{cm})}$$

Độ hấp thu ánh sáng UV ở 280 nm được điều chỉnh theo sự tán xạ ánh sáng ở 320 nm và nhân với nhân tố pha loãng, nó được xác định từ các khối lượng đã

cân và độ đặc của mẫu tinh khiết và chất đệm pha loãng. Tử số được chia cho sản phẩm của độ dài đường dẫn của ống thử nghiệm d và hệ số tắt ϵ .

Phép sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC) được sử dụng để phát hiện loại phân tử lượng có thể hòa tan (các thể kết tụ) và các sản phẩm thủy phân phân tử lượng thấp (LMW) trong các chế phẩm. Phương pháp được tiến hành bằng dụng cụ Waters Alliance 2695 HPLC với Waters W2487 Dual Absorbance Detector và có gắn cột Tosoh Haas TSK Gel SuperSW3000, 4,6x300 mm theo dãy. Các thể kết tụ và các sản phẩm thủy phân, đơn phân nguyên vẹn được tách bằng profil rửa giải đẳng dòng nhờ sử dụng 50 mM natri phosphat, 420 mM natri perchlorat, pH 7,0 làm pha động và được phát hiện ở bước sóng 280 nm.

Phép sắc ký trao đổi ion (IEC) được tiến hành để phát hiện các sản phẩm thoái biến hóa học làm thay đổi điện tích tổng của Trastuzumab trong các chế phẩm. Nhằm mục đích này Trastuzumab được cắt bằng Carboxypeptidaza B. Phương pháp sử dụng dụng cụ HPLC thích hợp gắn bộ dò UV (độ dài bước sóng phát hiện là 214 nm) và cột trao đổi cation Dionex ProPac™ WCX-10 Analytical (4 x 250 mm). 10mM chất đệm natri phosphat pH 7,5 trong H₂O và 10 mM chất đệm natri phosphat pH 7,5 và 100 mM NaCl được sử dụng làm pha động tương ứng, với tốc độ dòng chảy là 0,8 ml/phút.

Để xác định độ đục, vẻ trắng đục được đo bằng FTU (các đơn vị độ đục) nhờ sử dụng đục kế HACH 2100AN ở nhiệt độ trong phòng.

Các mẫu được phân tích đối với các hạt có thể nhìn thấy nhờ sử dụng dụng cụ kiểm tra bằng mắt Seidenader V90-T.

Thử nghiệm enzyme *in vitro* về rHuPH20 với hyaluronidaza được sử dụng làm thử nghiệm hoạt tính. Thử nghiệm này dựa vào sự hình thành của hạt không thể hòa tan khi hyaluronan (natri hyaluronat) gắn kết với chất kết tụ cation. Hoạt tính enzyme được đo bằng cách ủ rHuPH20 với chất hyaluronan và sau đó làm kết tụ hyaluronan không hấp thụ bằng albumin huyết thanh axit hóa (huyết thanh ngựa). Độ đục được đo ở độ dài bước sóng là 640 nm và mức giảm độ đục do hoạt tính enzyme tạo ra đối với chất hyaluronan tiêu chuẩn để đánh giá hoạt tính enzyme. Phương pháp này được tiến hành nhờ sử dụng đường cong chuẩn

tạo ra bởi các mức độ pha loãng của mẫu chuẩn thử nghiệm rHuPH20, và hoạt tính mẫu được đọc từ đường cong.

Các thử nghiệm khác được tiến hành bao gồm các biến đổi dưới đây:

- các biến đổi về độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0;
- các biến đổi về hàm lượng protein nằm trong khoảng từ 110 mg/ml đến 130 mg/ml;
- các biến đổi về chất hoạt động bề mặt nằm trong khoảng từ 0,02% đến 0,06%;
- các biến đổi về chất ổn định (methionin) nằm trong khoảng từ 5 mM đến 15 mM;

Các chế phẩm và các kết quả về độ ổn định thử nghiệm đối với các chế phẩm sản phẩm được kháng HER-2 lỏng (Các chế phẩm A đến X) được nêu trong Bảng 1 dưới đây trong đó các chữ viết tắt được sử dụng:

ffp: = không có các hạt; effp: = về cơ bản không có các hạt; wafp: = có một vài hạt;

F/T: = làm lạnh/làm đông tan; skg: = lắng; nd: = không xác định;

Các chế phẩm chỉ định dưới đây chứng tỏ rằng nó có thể tạo ra các chế phẩm lỏng có các nồng độ cao của hai protein khác nhau. Các chế phẩm này có thể được bào chế một cách rất dễ dàng và các chi phí thấp hơn so với các chế phẩm đông khô nhanh. Ngoài ra các chế phẩm này dễ dàng sử dụng do không cần hòa tan sản phẩm đông khô cuối cùng (hoàn nguyên) (sẵn sàng để sử dụng). Đã phát hiện ra rằng các chế phẩm chỉ định trong các Bảng 1, 3 và 4 cũng thích hợp để bào chế chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa các kháng thể kháng HER2 có hoạt tính tính được không có enzym hyaluronidaza. Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế còn đề xuất các chế phẩm có các thành phần chỉ định, nhưng không có enzym hyaluronidaza.

Bảng 1: Thông số về chế phẩm và độ ổn định của các chế phẩm thu được chứa chất kháng HER2 theo sáng chế

Chế phẩm A: chế phẩm lỏng với thành phần 120 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,5, 210 mM α,α -trehaloza dihydrat, 10 mM methionin, 0,04% polysorbat 20, 12.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	111	0,4	98,9	0,7	60	15	10	5,0	ffp	13613
5°C	1 tuần	nd	0,4	98,7	0,9	nd	nd	nd	5,2	ffp	13775
5°C	1 tuần	nd	0,4	98,7	0,9	60	11	12	5,7	ffp	12053
5°C	(5 chu trình)	nd	0,4	98,7	0,9	nd	nd	nd	6,0	effp	12558
5°C	8 tuần	105	0,4	98,5	1,1	60	15	11	4,8	ffp	13204
5°C	21 tuần	nd	0,4	98,7	0,8	62	12	11	5,3	ffp	14940
5°C	36 tuần	nd	0,4	98,7	0,8	59	11	12	3,8	ffp	12613
25°C	8 tuần	106	0,5	98,3	1,2	53	8	19	4,7	ffp	12176
25°C	21 tuần	nd	0,6	97,7	1,7	42	7	26	5,2	ffp	13976
25°C	36 tuần	nd	0,7	97,2	2,1	33	7	34	3,8	ffp	12348
30°C	8 tuần	105	0,6	97,8	1,6	45	6	26	4,4	ffp	13294
30°C	21 tuần	107	0,8	96,3	2,9	33	6	25	5,5	ffp	nd

Chế phẩm B: chế phẩm lỏng với thành phần 120 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,5, 210 mM α,α -trehalosa dihydrat, 10 mM methionin, 0,06% polysorbat 80, 12.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	111	0,4	98,9	0,7	59	15	10	4,4	ffp	13293
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,4	98,7	0,9	nd	nd	nd	5,2	ffp	13530
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,4	98,7	0,8	61	12	12	5,2	ffp	9390
F/T	(5 chu trình)	nd	0,4	98,7	0,9	nd	nd	nd	5,5	ffp	12532
5°C	8 tuần	109	0,4	98,7	0,9	60	15	11	5,1	ffp	13508
	21 tuần	nd	0,5	98,8	0,8	nd	nd	nd	5,3	ffp	nd
	36 tuần	nd	0,4	98,8	0,8	nd	nd	nd	4,5	ffp	nd
25°C	8 tuần	109	0,5	98,2	1,3	53	8	19	4,6	ffp	nd
	21 tuần	nd	0,7	97,6	1,8	nd	nd	nd	5,2	effp	nd
	36 tuần	nd	0,8	97,1	2,1	nd	nd	nd	5,3	ffp	nd
30°C	8 tuần	109	0,6	97,7	1,7	45	6	26	4,8	ffp	13394
	21 tuần	107	0,9	96,2	2,9	nd	nd	nd	5,3	ffp	nd

Chế phẩm C: chế phẩm lỏng với thành phần 120 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCL pH 5,5, 130 mM natri clorua, 10 mM methionin, 0,04% polysorbat 20, 12.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	129	0,5	98,8	0,7	59	15	10	24,2	ffp	12355
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	26,0	ffp	13123
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,5	98,5	0,9	60	12	11	25,3	ffp	12209
F/T	(5 chu trình)	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	24,8	ffp	12576
5°C	8 tuần	126	0,5	98,7	0,8	60	15	11	25,4	ffp	12463
	21 tuần	nd	0,6	98,4	1,0	62	13	9	23,6	ffp	15409
	36 tuần	nd	0,6	98,6	0,8	59	12	12	26,3	ffp	13218
25°C	8 tuần	125	0,7	98,0	1,3	54	9	18	25,0	ffp	13038
	21 tuần	nd	0,9	97,5	1,6	42	9	22	24,3	ffp	14972
	36 tuần	nd	1,0	97,0	2,1	32	9	31	25,7	ffp	12028
30°C	8 tuần	125	0,8	97,6	1,6	46	8	25	23,0	ffp	12751
	21 tuần	125	1,2	96,3	2,6	32	8	29	25,7	ffp	nd

Chế phẩm D: chế phẩm lỏng với thành phần 120 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,5, 130 mM natri clorua, 10 mM methionin, 0,06% polysorbat 80, 12.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	128	0,4	98,9	0,7	59	15	10	25,1	ffp	15178
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	24,1	effp	12201
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,6	98,5	0,9	60	12	11	25,4	effp	8311
F/T	(5 chu trình)	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	24,8	effp	11906
5°C	8 tuần	125	0,5	98,7	0,8	60	15	11	25,0	ffp	13238
	21 tuần	nd	0,6	98,5	1,0	nd	nd	nd	24,3	ffp	nd
	36 tuần	nd	0,6	98,6	0,8	nd	nd	nd	26,1	ffp	nd
25°C	8 tuần	125	0,7	98,1	1,2	54	9	18	23,4	ffp	12661
	21 tuần	nd	0,9	97,3	1,8	nd	nd	nd	24,5	ffp	nd
	36 tuần	nd	1,1	96,8	2,1	nd	nd	nd	26,6	ffp	nd
30°C	8 tuần	124	0,9	97,5	1,7	45	8	25	23,7	ffp	12182
	21 tuần	125	1,3	96,1	2,6	nd	nd	nd	24,2	effp	nd

Chế phẩm E: chế phẩm lỏng với thành phần 120 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,5, 105 mM α,α -trehalosa dihydrat, 65 mM natri clorua, 10 mM methionin, 0,04% polysorbat 20, 12.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	128	0,4	98,9	0,7	59	15	10	16,6	ffp	13475
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	17,2	ffp	12363
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,5	98,5	1,0	60	12	11	17,2	effp	12793
F/T	(5 chu trình)	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	16,5	effp	12374
5°C	8 tuần	125	0,5	98,7	0,8	60	15	11	16,9	ffp	13086
	21 tuần	nd	0,5	98,6	0,9	61	13	11	16,4	ffp	14896
	36 tuần	nd	0,5	98,7	0,8	59	12	12	16,5	ffp	13321
25°C	8 tuần	125	0,7	98,1	1,2	53	9	18	15,4	ffp	nd
	21 tuần	nd	0,8	97,5	1,7	41	8	29	19,2	ffp	14730
	36 tuần	nd	0,9	97,0	2,1	32	9	32	17,4	ffp	12028
30°C	8 tuần	124	0,8	97,7	1,5	45	8	25	15,7	ffp	11745
	21 tuần	123	1,1	96,3	2,6	32	8	24	17,4	ffp	nd

Chế phẩm F: chế phẩm lỏng với thành phần 120 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,5, 105 mM α , α -trehaloza dihydrat, 65 mM natri clorua, 10 mM methionin, 0,06% polysorbat 80, 12.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	127	0,4	98,9	0,7	59	15	10	16,7	effp	13069
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	16,0	ffp	13188
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,5	98,6	0,9	60	12	11	15,8	ffp	9764
F/T	(5 chu trình)	nd	0,5	98,7	0,8	nd	nd	nd	18,5	ffp	11769
5°C	8 tuần	125	0,5	98,7	0,8	60	15	11	16,5	ffp	nd
	21 tuần	nd	0,6	98,6	0,9	nd	nd	nd	16,6	ffp	nd
	36 tuần	nd	0,6	98,7	0,8	nd	nd	nd	17,2	ffp	nd
25°C	8 tuần	125	0,7	98,1	1,2	53	9	18	17,4	ffp	13570
	21 tuần	nd	0,9	97,4	1,7	nd	nd	nd	16,4	ffp	nd
	36 tuần	nd	1,0	96,9	2,1	nd	nd	nd	18,3	ffp	nd
30°C	8 tuần	124	0,8	97,5	1,7	45	8	25	16,2	ffp	11860
	21 tuần	123	1,8	95,6	2,9	nd	nd	nd	16,1	ffp	nd

Chế phẩm G: chế phẩm lỏng với thành phần 120 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,5, 210 mM α,α -trehaloza dihydrat, 10 mM methionin, 0,04% polysorbat 20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)		
-	Ban đầu	122	0,3	99,7	nd	71	11	7	4,2	ffp
5°C	4 tuần	nd	0,3	99,6	nd	60	11	11	nd	nd
	12 tuần	118	0,4	99,6	<0,3	70	10	7	4,8	ffp
	24 tuần	121	0,4	99,5	nd	68	9	9	4,1	ffp
	36 tuần	nd	0,5	99,5	0,1	67	8	10	nd	nd
15°C	4 tuần	nd	0,4	99,6	nd	70	10	7	nd	nd
	12 tuần	121	0,5	99,4	<0,3	66	8	11	4,3	ffp
	24 tuần	121	0,5	99,3	<0,3	59	7	17	4,4	ffp
	36 tuần	nd	0,6	99,2	0,2	53	7	22	nd	nd
25°C	4 tuần	nd	0,5	99,5	<0,3	66	7	11	nd	nd
	12 tuần	121	0,6	97,2	2,1	53	6	22	4,2	ffp
	24 tuần	122	0,7	98,0	1,4	39	6	32	4,2	ffp

và rHuPH20 được thêm vào trước khi tiêm từ khối thành phần dưới đây: 10 mg/ml rHuPH20 trong 20 mM His/Histidin HCl, pH 6,5, 130 mM NaCl, 0,05% (khối lượng/thể tích) polysorbat 80

Chế phẩm H: chế phẩm lỏng với thành phần 110 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,0, 210 mM α,α -trehalosa dihydrat, 5 mM methionin, 0,02% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	111	0,6	98,7	0,8	69	12	6	3,9	ffp	2081
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,6	98,7	0,7	68	12	6	3,9	ffp	2406
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,7	98,6	0,7	68	10	7	3,8	ffp	nd
F/T	(5 chu trình)	nd	0,7	98,7	0,7	68	12	6	3,8	ffp	2167
5°C	8 tuần	nd	0,6	98,8	0,6	69	10	8	4,0	ffp	2235
	12 tuần	110	0,6	98,7	0,7	66	10	9	3,9	ffp	1970
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,7	98,3	1,0	57	5	15	4,1	ffp	1891
	12 tuần	111	0,7	97,8	1,5	50	4	20	3,8	ffp	2079
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,4	94,1	4,5	31	3	30	4,1	ffp	nd
	12 tuần	111	1,6	92,5	5,9	28	5	35	4,7	ffp	nd

Chế phẩm I: chế phẩm lỏng với thành phần 110 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 6,0, 210 mM α,α -trehalosa dihydrat, 5 mM methionin, 0,02% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	111	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,7	effp	1948
Sk 5°C	1 tuần	nd	0,8	98,6	0,7	68	12	7	5,1	ffp	2672
Sk 25°C	1 tuần	nd	0,8	98,6	0,7	67	11	8	4,7	ffp	1724
F/T	(5 chu trình)	nd	0,8	98,6	0,7	68	12	7	4,5	ffp	2507
5°C	8 tuần	nd	0,8	98,6	0,6	68	11	8	4,5	ffp	1911
	12 tuần	112	0,8	98,5	0,7	65	11	10	4,7	ffp	2034
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,9	98,1	1,0	53	12	18	4,8	effp	1910
	12 tuần	111	1,0	97,8	1,2	45	12	21	4,9	ffp	2157
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,6	95,3	3,1	26	9	26	5,0	ffp	nd
	12 tuần	112	1,9	93,9	4,3	20	9	22	5,7	ffp	nd

Chế phẩm J: chế phẩm lỏng với thành phần 110 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,0, 210 mM α,α -trehalosa dihydrat, 5 mM methionin, 0,06% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	111	0,6	98,7	0,7	69	12	6	3,7	ffp	2198
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,6	98,6	0,7	68	12	6	4,3	effp	2528
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,6	98,6	0,8	68	10	7	4,0	effp	1993
F/T	(5 chu trình)	nd	0,7	98,7	0,7	68	12	6	3,7	ffp	2256
5°C	8 tuần	nd	0,6	98,8	0,6	68	10	8	4,1	ffp	2263
	12 tuần	111	0,6	98,6	0,8	66	10	9	3,9	ffp	2337
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,7	98,3	1,0	56	5	15	4,0	ffp	1931
	12 tuần	111	0,7	97,9	1,4	50	4	20	4,0	ffp	2291
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,3	94,5	4,2	30	3	35	4,2	ffp	nd
	12 tuần	111	1,6	92,4	6,0	27	5	35	4,2	ffp	nd

Chế phẩm K: chế phẩm lỏng với thành phần 110 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 6,0, 210 mM α , α -trehaloza dihydrat, 5 mM methionin, 0,06% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	111	0,8	98,6	0,7	69	12	7	4,7	ffp	2258
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,8	98,6	0,7	68	12	7	5,0	ffp	2680
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,8	98,5	0,7	67	11	8	4,6	effp	2049
F/T	(5 chu trình)	nd	0,8	98,6	0,7	69	12	7	4,8	ffp	2316
5°C	8 tuần	nd	0,8	98,5	0,7	68	12	8	4,5	ffp	2132
	12 tuần	112	0,8	98,5	0,7	65	12	9	5,2	ffp	2260
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,9	98,3	0,8	53	12	18	4,5	ffp	1863
	12 tuần	112	1,0	97,9	1,2	46	12	21	4,7	ffp	1917
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,5	95,4	3,1	26	10	26	5,2	ffp	nd
	12 tuần	112	1,9	93,9	4,3	28	8	22	6,2	ffp	nd

Chế phẩm L: chế phẩm lỏng với thành phần 110 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,0, 210 mM α,α -trehaloza dihydrat, 15 mM methionin, 0,02% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	111	0,6	98,7	0,7	69	12	6	3,5	effp	2301
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,6	98,7	0,7	69	12	6	4,1	ffp	2574
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,6	98,7	0,7	68	10	7	4,1	ffp	nd
F/T	(5 chu trình)	nd	0,7	98,5	0,8	68	12	7	3,6	ffp	2435
5°C	8 tuần	nd	0,6	98,8	0,6	68	10	7	3,8	ffp	2263
	12 tuần	111	0,6	98,7	0,7	67	10	8	3,8	ffp	1857
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,7	98,4	1,0	56	5	15	3,8	ffp	1919
	12 tuần	111	0,7	97,9	1,4	50	4	19	3,8	ffp	2106
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,3	94,2	4,5	31	4	34	3,9	ffp	nd
	12 tuần	111	1,5	92,6	6,0	28	4	35	4,2	ffp	nd

Chế phẩm M: chế phẩm lỏng với thành phần 110 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 6,0, 210 mM α,α -trehaloza dihydrat, 15 mM methionin, 0,02% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	110	0,7	98,6	0,7	69	12	7	4,4	effp	2203
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,7	98,6	0,6	69	12	7	5,2	ffp	2169
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,7	98,6	0,7	67	11	8	4,9	ffp	1661
F/T	(5 chu trình)	nd	0,7	98,6	0,6	68	12	7	4,6	ffp	2183
5°C	8 tuần	nd	0,7	98,6	0,7	68	12	8	4,5	ffp	2188
	12 tuần	111	0,8	98,6	0,7	66	12	9	4,9	effp	2028
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,9	98,1	1,1	53	12	18	4,5	ffp	1900
	12 tuần	111	0,9	98,0	1,2	46	12	21	4,7	ffp	1936
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,5	95,0	3,5	26	10	26	5,4	ffp	nd
	12 tuần	111	1,7	94,1	4,2	27	8	22	5,5	ffp	nd

Chế phẩm N: chế phẩm lỏng với thành phần 110 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,0, 210 mM α,α -trehaloza dihydrat, 15 mM methionin, 0,06% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	111	0,6	98,7	0,7	69	12	7	3,8	effp	2410
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,6	98,6	0,7	69	12	6	4,0	effp	2559
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,6	98,6	0,8	68	10	7	3,7	ffp	2086
F/T	(5 chu trình)	nd	0,7	98,7	0,7	68	12	6	4,0	ffp	2457
5°C	8 tuần	nd	0,6	98,8	0,7	69	10	7	3,9	ffp	2102
	12 tuần	111	0,6	98,8	0,7	67	10	8	3,6	effp	2037
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,7	98,2	1,1	57	5	15	3,8	ffp	2215
	12 tuần	111	0,7	97,9	1,4	50	4	19	3,7	ffp	2050
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,3	94,7	4,1	30	4	34	4,0	ffp	nd
	12 tuần	111	1,5	92,5	6,0	28	4	35	4,5	ffp	nd

Chế phẩm O: chế phẩm lỏng với thành phần 110 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 6,0, 210 mM α,α -trehaloza dihydrat, 15 mM methionin, 0,06% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	111	0,8	98,6	0,7	69	12	7	4,5	ffp	2153
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,7	98,6	0,7	69	12	7	4,7	ffp	1846
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,7	98,5	0,7	67	11	8	4,9	effp	2192
F/T	(5 chu trình)	nd	0,7	98,6	0,7	69	12	7	4,3	effp	2323
5°C	8 tuần	nd	0,7	98,7	0,6	68	12	8	4,8	ffp	2049
	12 tuần	112	0,8	98,5	0,7	66	12	9	4,6	ffp	1903
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,9	98,2	0,9	53	12	18	4,8	ffp	2002
	12 tuần	112	0,9	97,9	1,2	46	13	21	4,8	ffp	2216
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,5	95,6	2,9	26	10	25	5,2	ffp	nd
	12 tuần	112	1,9	94,0	4,3	27	8	22	6,1	ffp	nd

Chế phẩm P: chế phẩm lỏng với thành phần 130 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,0, 210 mM α,α -trehaloza dihydrat, 5 mM methionin, 0,02% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	128	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,8	ffp	2035
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,4	ffp	2728
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,7	98,6	0,7	68	10	7	3,9	ffp	nd
F/T	(5 chu trình)	nd	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,7	ffp	2559
5°C	8 tuần	nd	0,6	98,8	0,6	69	10	7	3,6	ffp	2217
	12 tuần	129	0,6	98,7	0,7	67	11	9	3,8	ffp	1878
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,8	98,2	1,0	57	5	15	3,5	ffp	2091
	12 tuần	128	0,8	97,8	1,4	51	4	19	4,3	ffp	1887
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,6	94,2	4,2	31	4	35	3,9	ffp	nd
	12 tuần	129	1,9	92,1	5,9	28	5	35	4,5	ffp	nd

Chế phẩm Q: chế phẩm lỏng với thành phần 130 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 6,0, 210 mM α , α -trehaloza dihydrat, 5 mM methionin, 0,02% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	131	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,4	effp	2309
Sk 5°C	1 tuần	nd	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,4	ffp	2522
Sk 25°C	1 tuần	nd	0,9	98,4	0,7	67	11	8	4,8	ffp	1787
F/T	(5 chu trình)	nd	0,8	98,5	0,6	69	12	6	4,8	ffp	2312
5°C	8 tuần	nd	0,9	98,6	0,6	68	12	8	5,1	ffp	2131
	12 tuần	132	0,9	98,4	0,7	66	11	9	4,9	effp	1931
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	1,1	97,8	1,1	54	12	18	5,1	ffp	1888
	12 tuần	132	1,1	97,8	1,1	46	12	21	4,7	ffp	1912
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,8	95,2	3,0	27	10	27	5,6	effp	nd
	12 tuần	132	2,2	93,4	4,4	28	8	22	6,1	ffp	nd

Chế phẩm R: chế phẩm lỏng với thành phần 130 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,0, 210 mM α,α -trehaloza dihydrat, 5 mM methionin, 0,06% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	131	0,7	98,6	0,7	69	12	6	3,7	effp	2096
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,7	98,7	0,6	69	12	6	3,7	effp	1856
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,7	98,5	0,8	68	10	7	4,3	effp	1958
F/T	(5 chu trình)	nd	0,7	98,7	0,6	69	12	6	3,8	effp	2371
5°C	8 tuần	nd	0,7	98,7	0,6	69	10	7	3,5	effp	2075
	12 tuần	131	0,6	98,6	0,7	67	10	8	3,6	effp	2350
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,9	98,2	1,0	58	5	15	3,5	effp	1989
	12 tuần	131	0,9	97,7	1,4	51	4	20	3,9	effp	1999
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,6	94,3	4,1	32	4	35	4,2	ffp	nd
	12 tuần	132	2,0	92,0	6,0	29	5	35	4,6	effp	nd

Chế phẩm S: chế phẩm lỏng với thành phần 130 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 6,0, 210 mM α , α -trehaloza dihydrat, 5 mM methionin, 0,06% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	131	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,6	effp	2406
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,8	wafp	2808
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,9	98,4	0,7	67	11	8	4,9	ffp	2141
F/T	(5 chu trình)	nd	0,8	98,5	0,6	69	12	6	4,7	ffp	2487
5°C	8 tuần	nd	0,8	98,5	0,7	69	12	8	4,8	effp	2076
	12 tuần	132	0,9	98,4	0,7	66	12	9	4,8	effp	1897
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	1,1	97,8	1,1	55	12	18	5,0	ffp	1956
	12 tuần	131	1,1	97,7	1,2	47	12	21	4,9	ffp	2094
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,9	95,2	3,0	27	9	27	5,7	ffp	nd
	12 tuần	133	2,2	93,5	4,3	21	9	22	6,1	ffp	nd

Chế phẩm T: chế phẩm lỏng với thành phần 130 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,0, 210 mM α , α -trehaloza dihydrat, 15 mM methionin, 0,02% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	131	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,7	effp	2311
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,7	ffp	2397
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,7	98,5	0,8	68	10	7	4,0	effp	nd
F/T	(5 chu trình)	nd	0,7	98,7	0,6	68	12	6	3,7	ffp	2277
5°C	8 tuần	nd	0,6	98,8	0,5	67	10	7	3,5	ffp	2167
	12 tuần	131	0,6	98,6	0,7	69	10	7	3,7	ffp	2070
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,8	98,2	1,0	56	5	15	3,6	ffp	2122
	12 tuần	131	0,8	97,8	1,4	52	4	19	3,7	ffp	2138
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,5	94,3	4,2	31	4	34	4,0	ffp	nd
	12 tuần	132	1,8	92,2	6,0	29	4	35	4,1	ffp	nd

Chế phẩm U: chế phẩm lỏng với thành phần 130 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 6,0, 210 mM α , α -trehaloza dihydrat, 15 mM methionin, 0,02% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	131	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,5	effp	2768
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,8	98,6	0,7	68	12	7	4,7	effp	2884
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,8	98,5	0,7	68	11	8	6,0	effp	2044
F/T	(5 chu trình)	nd	0,8	98,6	0,6	68	12	7	4,6	ffp	2617
5°C	8 tuần	nd	0,8	98,5	0,7	67	12	8	4,3	ffp	2571
	12 tuần	132	0,8	98,5	0,7	67	12	8	4,5	ffp	2164
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	1,0	98,0	1,0	52	12	18	4,9	ffp	2116
	12 tuần	131	1,0	97,7	1,3	47	13	21	5,0	effp	1990
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,7	95,4	2,9	24	10	24	5,4	ffp	nd
	12 tuần	132	2,0	93,7	4,3	19	9	20	5,7	ffp	nd

Chế phẩm V: chế phẩm lỏng với thành phần 130 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,0, 210 mM α , α -trehaloza dihydrat, 15 mM methionin, 0,06% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	131	0,7	98,7	0,7	68	12	6	3,7	effp	2323
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,7	98,6	0,7	69	12	6	3,7	ffp	2646
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,7	98,5	0,8	68	10	7	3,8	ffp	2056
F/T	(5 chu trình)	nd	0,7	98,7	0,7	68	12	6	3,5	effp	2498
5°C	8 tuần	nd	0,6	98,9	0,5	67	10	7	3,5	effp	2179
	12 tuần	132	0,6	98,6	0,8	69	10	7	3,7	ffp	2119
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,8	98,1	1,1	56	5	15	3,6	ffp	2072
	12 tuần	132	0,8	97,8	1,4	52	4	19	3,9	effp	2348
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,5	94,2	4,3	31	4	34	3,9	ffp	nd
	12 tuần	132	1,8	92,3	5,9	30	5	34	4,3	ffp	nd

Chế phẩm W: chế phẩm lỏng với thành phần 130 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 6,0, 210 mM α,α -trehalosa dihydrat, 15 mM methionin, 0,06% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	131	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,7	ffp	2018
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,6	ffp	1790
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,8	98,5	0,7	67	11	8	4,9	ffp	1918
F/T	(5 chu trình)	nd	0,8	98,6	0,7	69	12	7	4,7	ffp	2379
5°C	8 tuần	nd	0,8	98,7	0,5	67	11	8	4,4	ffp	2028
	12 tuần	131	0,8	98,4	0,8	67	12	8	4,7	effp	1964
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	1,0	98,0	1,0	53	12	18	4,3	ffp	2198
	12 tuần	131	1,0	97,8	1,2	47	13	20	5,0	ffp	1894
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,7	95,4	3,0	24	9	25	5,0	ffp	nd
	12 tuần	132	2,0	93,7	4,4	27	9	20	5,8	effp	nd

Chế phẩm X: chế phẩm lỏng với thành phần 120 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,5, 210 mM α,α -trehalosa dihydrat, 10 mM methionin, 0,04% polysorbat 20, 2.000 U/ml rHuPH20.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	121	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,2	effp	2277
Skg 5°C	1 tuần	nd	0,8	98,6	0,7	69	12	6	4,2	ffp	1855
Skg 25°C	1 tuần	nd	0,8	98,5	0,7	68	11	7	4,8	ffp	2070
F/T	(5 chu trình)	nd	0,8	98,6	0,7	69	12	6	4,5	ffp	2477
5°C	8 tuần	nd	0,8	98,6	0,6	68	10	8	4,3	ffp	2447
	12 tuần	122	0,7	98,6	0,7	67	10	9	4,3	ffp	2189
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 tuần	nd	0,9	98,2	1,0	57	7	18	4,5	ffp	2030
	12 tuần	122	0,9	97,8	1,3	50	7	23	4,5	ffp	2030
	36 tuần	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 tuần	nd	1,4	95,3	3,3	34	6	33	4,8	ffp	nd
	12 tuần	122	1,7	93,6	4,6	32	7	31	5,1	ffp	nd

Ví dụ 2: Bào chế chế phẩm đông khô

Dung dịch chứa khoảng 60 mg/ml Trastuzumab được bào chế như được mô tả ở trên đối với các chế phẩm lỏng. Tất cả các tá dược được thêm vào đến mức đạt nửa nồng độ của chế phẩm lỏng nêu trên. Chế phẩm được lọc tiệt trùng qua các màng lọc 0,22 μm và phân bổ vô trùng thành các lượng bằng nhau vào các lọ thủy tinh tiệt trùng 20 ml. Các lọ được gắn kín riêng biệt bằng các nút cao su phủ ETFE (Copolyme của etylen và tetrafloetylen) thích hợp để sử dụng trong các quá trình làm đông khô nhanh và làm đông khô nhanh bằng chu trình sấy đông nêu trong Bảng 2.

Bảng 2 chu trình sấy đông

Bước	Nhiệt độ nền (°C)	Độ biến đổi (°C/phút)	Thời gian giữ(phút)	Điểm đặt chân không(μbar)
Làm lạnh sơ bộ	5°C	0,0	60	-
Làm lạnh	-40°C	1,0	120	-
Sấy cơ cấp	-25°C	0,5	4560	80
Sấy thứ cấp	+25°C	0,2	300	80

Trước tiên sản phẩm được làm lạnh từ nhiệt độ trong phòng tới khoảng 5°C (làm lạnh sơ bộ), tiếp theo là bước làm lạnh ở -40°C với tốc độ làm lạnh đĩa khoảng 1°C/min, tiếp theo là bước giữ ở -40°C trong khoảng 2 giờ. Bước sấy thứ nhất được tiến hành ở nhiệt độ đĩa khoảng -25°C và áp suất buồng khoảng 80 μbar trong khoảng 76 giờ. Sau đó, bước sấy thứ hai bắt đầu với độ biến đổi nhiệt độ là 0,2°C/phút trong -25°C đến 25°C, tiếp theo là bước giữ ở 25°C trong ít nhất 5 giờ với áp suất buồng khoảng 80 μbar .

Quá trình làm đông khô nhanh được tiến hành bằng thiết bị sấy đông Usifroid SMH-90 LN2 (Usifroid, Maurepas, France) hoặc thiết bị sấy đông LyoStar II (FTS Systems, Stone Ridge, NY, USA). Các mẫu sấy đông được giữ ở các điều kiện thời tiết (5°C, 25°C và 30°C) trong các khoảng thời gian khác nhau. Các lọ làm đông khô nhanh được hoàn nguyên tới thể tích cuối cùng là 2,65 ml với nước để tiêm (WFI) tạo ra chế phẩm đẳng trương với nồng độ kháng

thể khoảng 120 mg/ml. Thời gian hoàn nguyên của các bánh sấy đông là khoảng 10 phút. Việc phân tích các mẫu hoàn nguyên được tiến hành sau thời gian ủ mẫu lỏng hoàn nguyên 24 giờ ở nhiệt độ môi trường.

Các mẫu được phân tích lại bằng các phương pháp phân tích đã được mô tả ở trên như sau:

- 1) phép phổ quang kế UV;
- 2) phép sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC);
- 3) phép sắc ký trao đổi ion (IEC);
- 4) độ đục của dung dịch; và
- 5) đối với các hạt có thể nhìn thấy.

Các kết quả về độ ổn định thử nghiệm đối với chế phẩm Y được nêu trong Bảng 3 dưới đây trong đó các chữ viết tắt được sử dụng:

ffp: = không có các hạt; effp: = về cơ bản không có các hạt; nd: = không xác định.

Bảng 3: Thông số về chế phẩm và độ ổn định của chế phẩm kết quả chứa được chất kháng HER2 đông khô nhanh theo sáng chế này

Chế phẩm Y: chế phẩm đông khô với thành phần 120 mg/ml Trastuzumab, 20 mM L-histidin/HCl pH 5,5, 210 mM α , α -trehaloza dihydrat, 10 mM methionin, 0,04% polysorbat 20, 12.000 U/ml rHuPH20 sau khi hoàn nguyên.

Điều kiện bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích cỡ			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt có thể nhìn thấy	Hoạt tính HE (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh 1 (%)	Đỉnh 4 (%)			
-	Ban đầu	129	0,5	98,8	0,8	59	15	10	7,1	ffp	12451
5°C	8 tuần	124	0,6	98,6	0,9	59	16	10	5,7	effp	13380
	21 tuần	nd	0,8	98,6	0,7	62	15	8	5,9	effp	14927
	36 tuần	nd	0,8	98,5	0,7	59	16	10	6,0	ffp	13744
	8 tuần	120	1,3	97,8	0,8	59	16	11	6,1	effp	13162
25°C	21 tuần	nd	2,1	96,7	1,2	61	15	8	5,7	effp	15396
	36 tuần	nd	2,7	96,6	0,7	58	15	11	6,0	ffp	13673
	8 tuần	121	1,9	97,5	0,9	58	16	11	5,7	effp	13425
30°C	21 tuần	126	3,2	96,0	0,8	60	14	8	6,0	effp	nd
	36 tuần	nd	3,9	95,4	0,7	57	14	11	5,9	ffp	15034

Các đặc tính của các chế phẩm nêu trên được tóm tắt trong Bảng 4 sau:

F	Tr mg/ml	His		tre mM	NaCl mM	Meth mM	PS		rHu
		m	pH				20	80	
							%	%	U/ml
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 *)

F = Chế phẩm

His=L-histidin/HCl

NaCl=Natri Clorua

PS =polysorbat theo % (khối lượng/thể tích)

*)=Sau hoàn nguyên

Tr =Trastuzumab

tre= α , α -trehaloza dihydrat

met=methionin

rHu=rHuPH20

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 có hoạt tính được đề tiêm dưới da, trong đó chế phẩm này bao gồm:
 - a. khoảng từ 50 đến 350 mg/ml kháng thể kháng HER2;
 - b. khoảng từ 1 đến 100 mM chất đệm để tạo ra độ pH = $5,5 \pm 2,0$;
 - c. khoảng từ 1 đến 500 mM chất ổn định hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất ổn định;
 - d. khoảng từ 0,01 đến 0,08% chất hoạt động bề mặt không ion; và
 - e. nhiều hơn 150 đến khoảng 16.000 U/ml, khoảng 2.000 U/ml, hoặc khoảng 12.000 U/ml, tương ứng với enzym hyaluronidaza.
2. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 có hoạt tính được theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa khoảng từ 1.000 đến 16.000 U/ml enzym hyaluronidaza.
3. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó nồng độ kháng thể kháng HER2 là từ 100 đến 150 mg/ml, 120 ± 18 mg/ml, khoảng 110 mg/ml, khoảng 120 mg/ml, hoặc khoảng 130 mg/ml, tương ứng.
4. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chất đệm có nồng độ từ 1 đến 50 mM.
5. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó chất đệm tạo ra độ pH = $5,5 \pm 0,6$.
6. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó chất đệm là chất đệm histidin, ví dụ 20 mM histidin/HCl.

7. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chất ổn định là sacarit, ví dụ α, α -trehaloza dihydrat hoặc sucroza.
8. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó chất ổn định có nồng độ từ 15 đến 250 mM hoặc khoảng 210 mM tương ứng.
9. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm 7 hoặc 8, trong đó methionin được sử dụng làm chất ổn định thứ hai, ví dụ với nồng độ từ 5 đến 25 mM.
10. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó chất hoạt động bề mặt không ion là polysorbat được chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 20, polysorbat 80 và copolyme polyetylen-polypropylen.
11. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm 10, trong đó nồng độ của polysorbat là 0,02% (khối lượng/thể tích), 0,04% (khối lượng/thể tích) hoặc 0,06% (khối lượng/thể tích) tương ứng.
12. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó kháng thể kháng HER2 này được chọn từ nhóm bao gồm trastuzumab, pertuzumab và T-DM1 hoặc tổ hợp của các kháng thể này.
13. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó chế phẩm này ổn định khi làm đông lạnh và đông tan.
14. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó enzyme hyaluronidaza là rHuPH20.
15. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó chế phẩm này chứa 120

mg/ml Trastuzumab, 20mM L-histidin/HCl pH 5,5, 210 mM α,α -trehaloza dihydrat, 10mM methionin, 0,04% polysorbat 20 và 2.000 U/ml rHuPH20.

16. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó chế phẩm này ở dạng lỏng.

17. Chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó chế phẩm này ở dạng đông khô.

18. Thiết bị tiêm bao gồm chế phẩm được ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17.

19. Kit bao gồm một hoặc nhiều lọ chứa chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17 và các hướng dẫn để tiêm dưới da chế phẩm cho bệnh nhân.

20. Kit theo điểm 19, trong đó kit này còn bao gồm thiết bị tiêm để tiêm chế phẩm dưới da cho bệnh nhân.

FIG 1

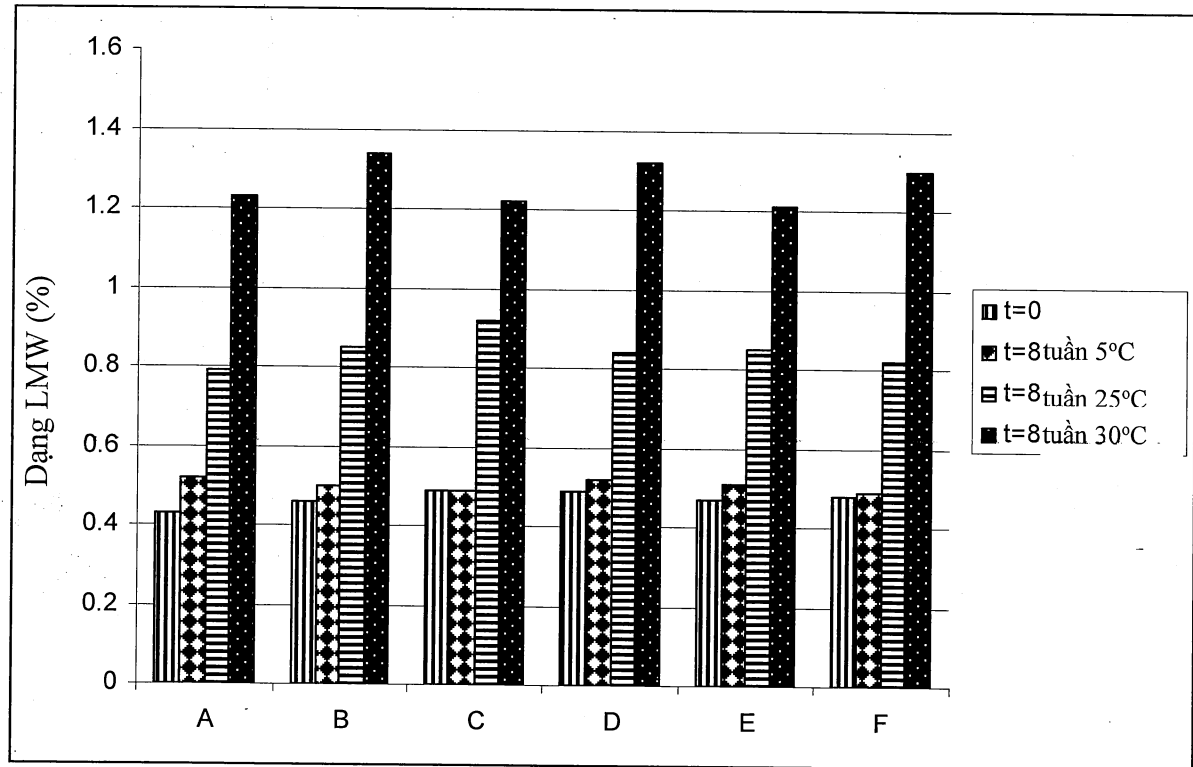


FIG 2

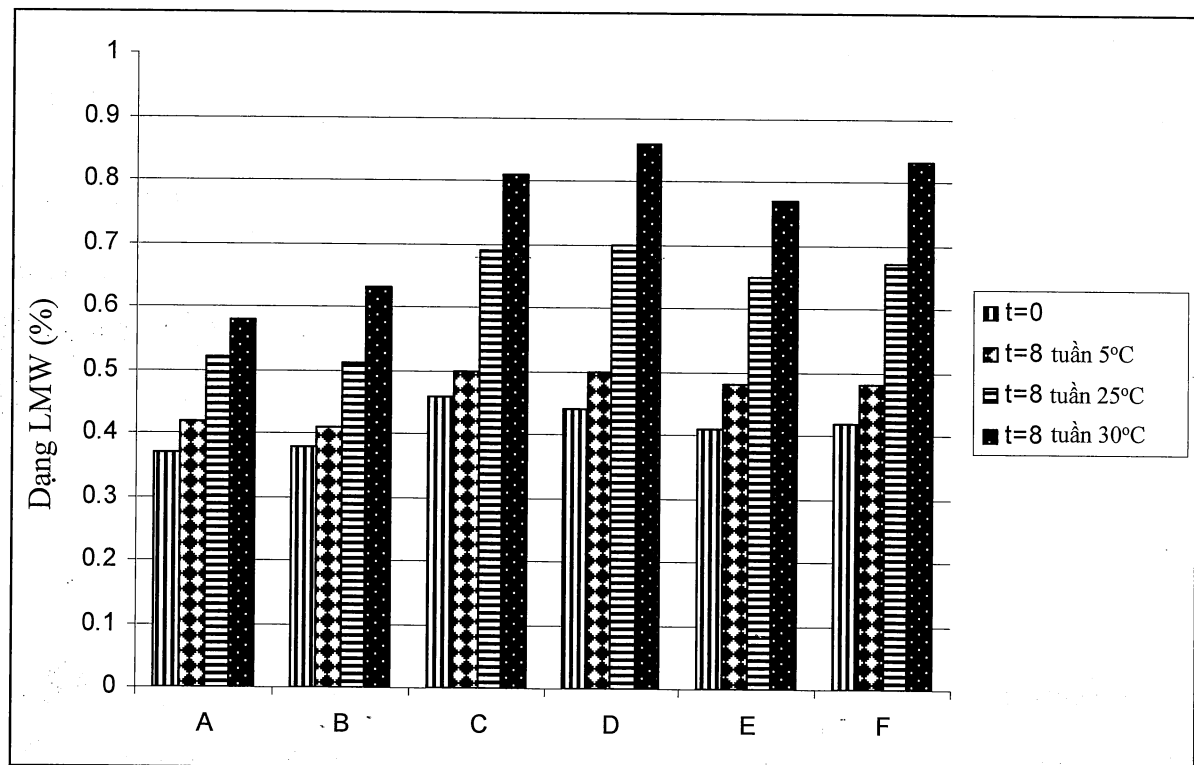


FIG 3

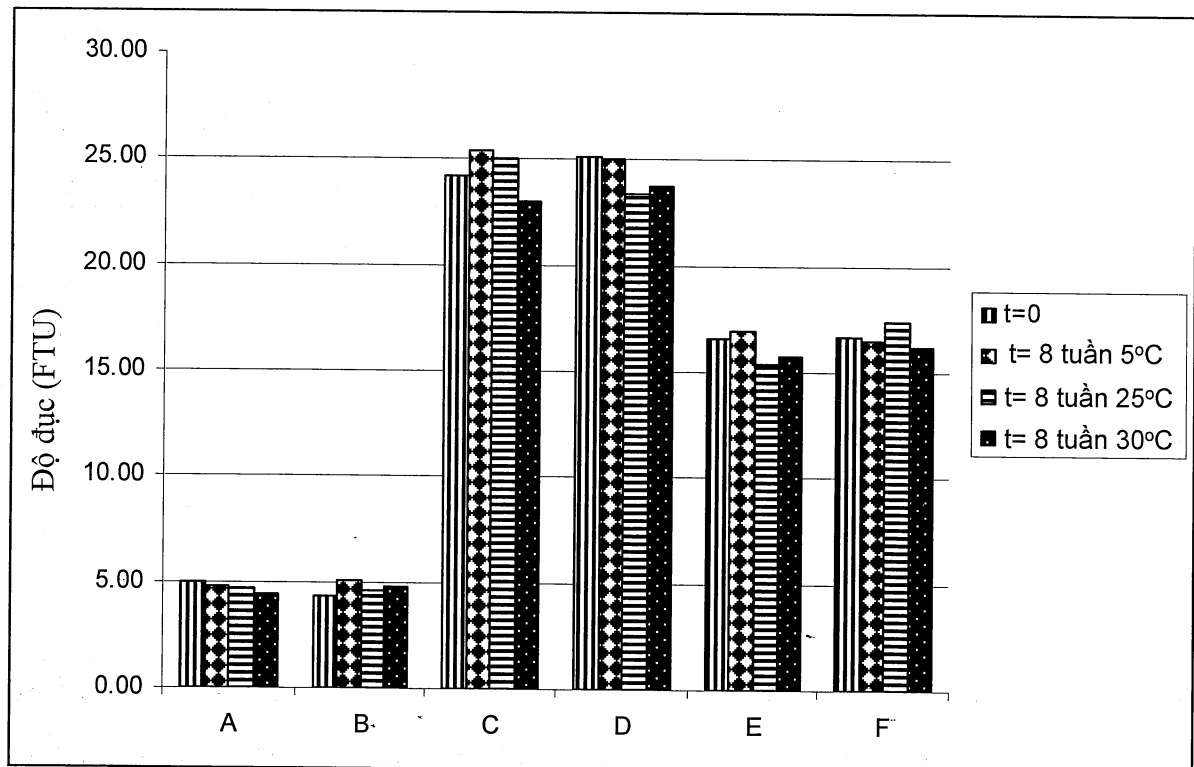


FIG 4