

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **031013**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.11.30

(51) Int. Cl. **A61K 9/00** (2006.01)

(21) Номер заявки
201400270

(22) Дата подачи заявки
2010.07.28

(54) ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННАЯ СТАБИЛЬНАЯ ЖИДКАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ОБЛАДАЮЩЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ АНТИТЕЛА К HER2, ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ, СОДЕРЖАЩИЕ ЭТУ КОМПОЗИЦИЮ УСТРОЙСТВО И НАБОР, А ТАКЖЕ СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ИЛИ НАРУШЕНИЯ, КОТОРОЕ МОЖНО ЛЕЧИТЬ С ПОМОЩЬЮ АНТИТЕЛА К HER2

(31) **09167025.7**

(56) US-A1-2006104968

(32) **2009.07.31**

US-A1-2007071675

(33) **EP**

WO-A1-2008150949

(43) **2014.06.30**

US-B1-6267958

(62) **201200204; 2010.07.28**

BOOKBINDER ET AL.: "A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 114, no. 2, 28 August 2006 (2006-08-28), pages 230-241, XP005625403, ISSN: 0168-3659, DOI:DOI:10.1016/J.JCONREL.2006.05.027 Abstract, page 232 item 2.9; page 233, item 3.3 to page 237, item 3.6; page 239, item 4.1; the whole document

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
Ф. ХОФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Адлер Михаэль, Граушоф Улла,
Малер Ханнс-Кристиан (CH), Штаух
Оливер Борис (DE)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В. (RU)**

US-A1-2002035736
WO-A2-2005023328

(57) В заявке описана высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция обладающего фармацевтической активностью антитела к HER2, такого, например, как трастузумаб (HERCEPTIN™), пертузумаб или T-DM1 или смесь указанных молекул антител, предназначенная для подкожной инъекции. В частности, в заявке описаны композиции, которые помимо взятого в соответствующем количестве антитела к HER2 содержат в эффективном количестве по меньшей мере один фермент гуалуронидазу в виде объединенной композиции или в виде формы, которую используют для совместного введения. Композиции содержат также по меньшей мере один забуферивающий агент, такой, например, как гистидиновый буфер, стабилизатор или смесь двух или большего количества стабилизаторов (например, сахарид, такой, например, как дигидрат α,α-трегалозы или сахароза, и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора), неионогенное поверхностно-активное вещество и в эффективном количестве по меньшей мере один фермент гуалуронидазу. Описаны также применение этих композиций, способы лечения заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к HER2, устройство для инъекций и набор, содержащие высококонцентрированную стабильную фармацевтическую композицию, обладающую фармацевтической активностью антитела к HER2.

B1

031013

031013 B1

Настоящее изобретение относится к высококонцентрированным стабильным фармацевтическим композициям обладающего фармацевтической активностью антитела к HER2, предназначенным для подкожной инъекции. Указанные композиции содержат помимо антитела в высоких концентрациях забуферивающий агент, стабилизатор или смесь двух или большего количества стабилизаторов, неионное поверхностно-активное вещество. Изобретение относится также к вариантам применения указанной композиции.

В последние годы возросло применение антител в фармацевтике. Во многих случаях эти антитела вводят путем внутривенной (IV) инъекции. При этом недостатком является то, что количество антитела, которое можно инъецировать внутривенным путем, ограничено физико-химическими свойствами антитела, прежде всего его растворимостью и стабильностью в приемлемой жидкой композиции и объемом применяемой для инфузии жидкости. Альтернативными путями введения являются подкожная или внутримышечная инъекция. Для таких путей введения требуется высокая концентрация белка в конечном инъекционном растворе (Shire S.J., Shahrokh Z. и др. "Challenges in the development of high protein concentration formulations", J. Pharm. Sci., 93(6), 2004, сс. 1390-1402; Roskos L.K., Davis C.G. и др. "The clinical pharmacology of therapeutic antibodies", Drug Development Research, 61(3), 2004, сс. 108-120). Для увеличения объема и, как следствие, терапевтической дозы, которая является безопасной и которую можно удобно вводить подкожно, предложено применение фермента(ов) гликозаминогликаназа с целью увеличения интерстициального пространства, в которое можно инъецировать композицию антитела (WO 2006/091871).

Примерами присутствующих в настоящее время на рынке стабильных композиций фармацевтически активных антител, предназначенных для терапевтического применения, являются следующие антитела:

HERCEPTIN™ (трастузумаб), представляющий собой моноклональное антитело к рецептору HER2 (антитело к HER2), который в настоящее время поступает в продажу в Европе в виде препарата, содержащего 150 мг лиофилизированного порошка (содержащего антитело, дигидрат α, α -трегалозы, L-гистидин и гидрохлорид L-гистидина и полисорбат 20), который перед осуществлением инфузий подлежит восстановлению водой для инъекций с получением предназначенной для инъекции дозы, составляющей приблизительно 21 мг/мл. В США и многих других странах трастузумаб поступает в продажу в виде продукта, представляющего собой многодозовый пузырек, содержащий 440 мг действующего вещества.

AVASTIN™ (бевасизумаб), представляющий собой моноклональное антитело к сосудистому эндотелиальному фактору роста (VEGF), который в настоящее время поступает в продажу в Европе в виде жидкой композиции в пузырьках двух типов: а) 100 мг бевасизумаба в 4 мл и б) 400 мг бевасизумаба в 16 мл соответственно, что обеспечивает конечную концентрацию 25 мг/мл после разведения водой для инъекций, содержащей следующие эксципиенты: дигидрат трегалозы, фосфат натрия и полисорбат 20.

Хотя установлено, что указанные выше композиции антител пригодны для внутривенного введения, существует необходимость в создании высококонцентрированных стабильных фармацевтических композиций обладающих терапевтической активностью антител, предназначенных для подкожной инъекции. Преимущество подкожных инъекций состоит в том, что они дают возможность медицинскому персоналу осуществлять их посредством относительно непродолжительного вмешательства в организм пациента. Кроме того, пациента можно научить осуществлять подкожную инъекцию самостоятельно. Указанное самовведение является особенно важным во время поддерживающего периода лечения, поскольку отпадает необходимость в больничном уходе (что снижает использование выделенных на медицину ресурсов). Как правило, объемы инъецируемого подкожным путем раствора не превышают примерно 2 мл. Для пациентов, которым требуется вводить несколько доз, можно инъецировать композицию в виде нескольких стандартных доз в несколько областей на поверхности тела.

В продажу уже поступают два следующих содержащих антитела продукта, предназначенных для подкожного введения:

HUMIRA™ (адалимумаб), представляющий собой моноклональное антитело к фактору некроза опухоли-альфа (TNF-альфа), который в настоящее время поступает в продажу в Европе в форме 40-миллиграммовой дозы в инъецируемом объеме 0,8 мл для подкожного применения (концентрация: 50 мг антитела/мл инъецируемого объема).

XOLAIR™ (омализумаб), представляющий собой моноклональное антитело к иммуноглобулину E (антитело к IgE), который в настоящее время поступает в продажу в форме продукта, содержащего 150 мг лиофилизированного порошка (включающего антитело, сахарозу, гистидин и моногидрат гидрохлорида гистидина и полисорбат 20), который для осуществления подкожной инъекции подлежит восстановлению водой с получением предназначенной для инъекции дозы, составляющей приблизительно 125 мг/мл.

В настоящее время на рынке отсутствует высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2, пригодная для подкожного введения. Таким образом, существует необходимость в разработке указанных высококонцентрированных стабильных фармацевтических композиций

обладающих терапевтической активностью антител, предназначенных для подкожной инъекции.

Инъецируемый объем лекарственных средств, предназначенных для парентерального введения в гиподерму, как правило, не превышает 2 мл из-за вязкоэластичного сопротивления к гидравлической проводимости в подкожной (SC) ткани, являющегося результатом противодействия при инъекции (Aukland K. и Reed R. "Interstitial-Lymphatic Mechanisms in the control of Extracellular Fluid Volume", *Physiology Reviews*, 73, 1993, сс. 1-78), а также результатом болевых ощущений.

Приготовление высококонцентрированных белковых композиций является относительно сложной задачей и требует адаптации каждой композиции к конкретным применяемым белкам, поскольку каждый белок имеет различные особенности агрегации. Считается, что, по меньшей мере, в ряде случаев агрегаты обуславливают иммуногенность терапевтических белков. Иммуногенная реакция на агрегаты белка или антитела может приводить к нейтрализации антител, что может делать неэффективным терапевтический белок или антитело. Вероятно, иммуногенность белковых агрегатов представляет собой основную проблему при подкожных инъекциях, причем повторное введение повышает риск возникновения иммунного ответа.

Хотя антитела обладают очень схожей общей структурой, указанные антитела различаются составом аминокислот (в частности, в CDR-участках, ответственных за связывание с антигеном) и схемой гликозилирования. Кроме того, могут иметь место дополнительные посттрансляционные модификации, такие как заряд и варианты гликозилирования. Конкретно, касательно антител к HER2 описаны такие посттрансляционные модификации, например, для гуманизованного моноклонального антитела hum-MAb4D5-8 (т.е. трастузумаба). В частности, разработаны методы очистки для удаления, например, кислотных вариантов, и композиции, содержащие пониженное количество кислотных вариантов (главным образом деамидированные варианты, в которых один или несколько остаток(ков) аспарагина исходного полипептида превращен(ы) в аспартат, т.е. нейтральная амидная боковая цепь превращена в остаток, имеющий в целом кислотный характер), которые впервые описаны Basey C.D. и Blank G.S. в WO 99/57134.

Стабильные лиофилизированные композиции антител, содержащие лиопротектант, буфер и поверхностно-активное вещество, описаны у Andya с соавторами (WO 97/04801 и US 6267958, 6685940, 6821151 и 7060268).

В WO 2006/044908 предложены композиции антител, которые содержат моноклональные антитела в гистидин-ацетатном буфере, имеющем значение pH 5,5-6,5, предпочтительно 5,8-6,2.

Таким образом, задача, положенная в основу настоящего изобретения, состоит в создании новых высококонцентрированных стабильных фармацевтических композиций обладающего фармацевтической активностью антитела к HER2, предназначенных для подкожной инъекции. Указанные композиции содержат помимо антител, присутствующих в высоких концентрациях, забуферивающий агент, стабилизатор или смесь двух или большего количества стабилизаторов, неионогенное поверхностно-активное вещество и в предпочтительном варианте применяемый в эффективном количестве по меньшей мере один фермент гиалуронидазу. Получение высококонцентрированных композиций антител является сложной задачей из-за возможного повышения вязкости при более высокой концентрации белка и возможного усиления агрегации белка, явления, которое само по себе зависит от концентрации. Высокая вязкость оказывает отрицательное воздействие на возможность осуществления процесса приготовления (например, на стадиях перекачки насосом и фильтрации) и введения (например, на возможность введения с помощью шприца) композиций антител. В некоторых случаях высокую вязкость можно снижать посредством добавления эксципиентов. Необходимость в осуществлении контроля и анализа агрегации белков повышает сложность процесса получения. Агрегация может происходить на различных стадиях процесса приготовления, таких как ферментация, очистка, приготовление препарата, и в процессе хранения. На агрегационное поведение терапевтического белка могут влиять различные факторы, такие как температура, концентрация белка, стресс, связанный с перемешиванием, замораживание и оттаивание, влияние растворителя и поверхностно-активного вещества, а также химические модификации. В процессе создания высококонцентрированной композиции антитела необходимо осуществлять мониторинг и контроль тенденции к агрегации белка путем добавления различных эксципиентов и поверхностно-активных веществ (Kiese S. и др., *J. Pharm. Sci.*, 97(10), 2008, сс. 4347-4366). Сложность приготовления приемлемой высококонцентрированной стабильной фармацевтической композиции обладающего фармацевтической активностью антитела к HER2, предлагаемой в настоящем изобретении, возрастает в связи с тем, что два различных белка, подлежащих включению в одну жидкую композицию, должны быть включены в композицию таким образом, чтобы композиция оставалась стабильной в течение нескольких недель, и обладающие фармацевтической активностью ингредиенты сохраняли активность во время соответствующего периода хранения.

Первым объектом настоящего изобретения является готовая к применению высококонцентрированная стабильная жидкая фармацевтическая композиция обладающего фармацевтической активностью антитела к HER2, состоящая из антитела к HER2 в концентрации примерно 120 ± 18 мг/мл; забуферивающего агента, обеспечивающего значение pH $5,5 \pm 2,0$, в концентрации примерно от 1 до 100 мМ; стабили-

затора или смеси двух или большего количества стабилизаторов в концентрации примерно от 1 до 500 мМ; неионогенного поверхностно-активного вещества в концентрации примерно от 0,01 до 0,08%, где антитело выбрано из группы трастузумаба, пертузумаба и Т-DM1.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения в этой композиции забуферивающий агент присутствует в концентрации от 1 до 50 мМ и обеспечивает значение pH $5,5 \pm 0,6$.

Причем в самом предпочтительном варианте забуферивающий агент представляет собой гистидиновый буфер, а именно 20 мМ гистидин/HCl.

В другом варианте осуществления данного изобретения стабилизатор представляет собой сахарид, предпочтительно представляет собой дигидрат α, α -трегалозы или сахарозу. Причем он присутствует в концентрации от 15 до 250 мМ или примерно 210 мМ соответственно.

В еще одном варианте в качестве второго стабилизатора применяют метионин, предпочтительно он присутствует в концентрации от 5 до 25 мМ.

Неионогенное поверхностно-активное вещество может представлять собой полисорбат, выбранный из группы, включающей полисорбат 20, полисорбат 80 и сополимер полиэтилена-полипропилена, предпочтительно присутствующий в концентрации 0,02% (мас./об.), 0,04% (мас./об.) или 0,06% (мас./об.) соответственно.

Вторым вариантом заявленного изобретения является композиция, содержащая антитело к HER2, а именно трастузумаб в концентрации 120 мг/мл, 20 мМ L-гистидин/HCl pH 5,5, дигидрат α, α -трегалозы в концентрации 210 мМ, метионин в концентрации 10 мМ, полисорбат 20 0,04%.

Заявленная композиция является стабильной при замораживании и оттаивании.

Она может быть предназначена для подкожного или внутримышечного введения.

Причем композиция, предназначенная для подкожного или внутримышечного введения, предпочтительно вводится совместно со 150 до приблизительно 16000 ед./мл гиалуронидазы, предпочтительно совместно с 2000 до приблизительно 12000 ед./мл гиалуронидазы.

Третьим объектом данного изобретения является применение высококонцентрированной стабильной фармацевтической композиции антитела к HER2 композиции для приготовления лекарственного средства, пригодного для лечения заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к HER2, такого как рак или незлокачественное заболевание у субъекта.

При этом раком является рак желудка, метастатический рак молочной железы или рак молочной железы на ранней стадии.

Четвертым объектом данного изобретения является устройство для инъекции, содержащее высококонцентрированную стабильную фармацевтическую композицию антитела к HER2.

И наконец, пятым объектом способ лечения заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к HER2, такого как рак или незлокачественное заболевание у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции антитела к HER2 совместно со 150 до приблизительно 16000 ед./мл гиалуронидазы, предпочтительно совместно с 2000 до приблизительно 12000 ед./мл гиалуронидазы.

В предпочтительном варианте гиалуронидазой является гHuPH20.

Композицию можно вводить совместно, одновременно или последовательно с химиотерапевтическим средством.

Последним объектом данного изобретения является набор для лечения заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к HER2, такого как рак или незлокачественное заболевание у субъекта, включающий один или несколько пузырьков, которые содержат заявленную композицию, и инструкции по подкожному введению композиции пациенту.

В предпочтительном варианте набор дополнительно содержит один или несколько пузырьков, содержащих гиалуронидазу и инструкции по подкожному введению композиции и от 150 до приблизительно 16000 ед./мл гиалуронидазы пациенту, причем инструкции по подкожному введению композиции могут относиться к введению композиции от 2000 до приблизительно 12000 ед./мл гиалуронидазы пациенту.

В предпочтительном варианте гиалуронидазой является гHuPH20, а набор также включает инъекционное устройство для подкожного введения композиции пациенту.

Итак, указанная композиция может состоять из обладающего фармацевтической активностью антитела к HER2 и приемлемых эксципиентов, а также может дополнительно содержать растворимый гликопротеин гиалуронидазы либо в составе комбинированной композиции, либо в виде отдельной композиции, предназначенной для совместного введения.

Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция обладающего фармацевтической активностью антитела к HER2, предлагаемая в настоящем изобретении, может представлять собой жидкую форму или может представлять собой лиофилизированную форму. Согласно данным, представленным в WO 97/04801, концентрацию антитела в восстановленной композиции можно повышать путем восстановления лиофилизированной композиции с получением концентрации белка в восстановленной композиции, превышающей примерно в 2-40 раз концентрацию белка в смеси до осуществления стадии

лиофилизации.

Включенный дополнительно в композицию фермент гиалуронидазу можно получать из образцов, выделенных из организма животных, человека или производить с использованием технологии рекомбинантной ДНК, что будет описано ниже.

Высококонцентрированные стабильные фармацевтические композиции антитела к HER2 могут иметь один из следующих составов:

а) антитело к HER2, например, выбранное из группы, включающей трастузумаб, пертузумаб и T-DM1, в концентрации от 100 до 150 мг/мл; гистидиновый буфер, например L-гистидин/HCl с pH примерно 5,5, в концентрации от 1 до 50 мМ; стабилизатор, такой, например, как дигидрат α,α -трегалозы, в концентрации от 15 до 250 мМ; и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора в концентрации от 5 до 25 мМ; неионогенное поверхностно-активное вещество в концентрации примерно от 0,01 до 0,08%; и фермент гиалуронидазу, такую, например, как гHuPH20, в концентрации от >150 до 16000 ед./мл, более конкретно от 1000 до 16000 ед./мл, например, в концентрации примерно 2000 ед./мл или примерно 12000 ед./мл;

б) антитело к HER2, например, выбранное из группы, включающей трастузумаб, пертузумаб и T-DM1, в концентрации 120 ± 18 мг/мл; гистидиновый буфер, например L-гистидин/HCl с pH примерно 5,5, в концентрации от 10 до 30 мМ или примерно 20 мМ; стабилизатор, такой, например, как дигидрат α,α -трегалозы, в концентрации от 15 до 250 мМ или примерно 210 мМ; и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора в концентрации от 5 до 25 мМ или примерно 10 мМ; неионогенное поверхностно-активное вещество в концентрации примерно от 0,01 до 0,08%; и фермент гиалуронидазу, такую, например, как гHuPH20, в концентрации от 1000 до 16000 ед./мл, или от 1500 до 12000 ед./мл, примерно 2000 ед./мл или примерно 12000 ед./мл;

в) антитело к HER2, например, выбранное из группы, включающей трастузумаб, пертузумаб и T-DM1, в концентрации примерно 120 мг/мл; гистидиновый буфер, например L-гистидин/HCl с pH примерно 5,5, в концентрации от 10 до 30 мМ или примерно 20 мМ; стабилизатор, такой, например, как дигидрат α,α -трегалозы, в концентрации от 15 до 250 мМ или примерно 210 мМ; и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора в концентрации от 5 до 25 мМ или от 5 до 15 мМ, или примерно 10 мМ; неионогенное поверхностно-активное вещество в концентрации примерно от 0,01 до 0,08%; и фермент гиалуронидазу, такую, например, как гHuPH20, в концентрации от 1000 до 16000 ед./мл, или от 1500 до 12000 ед./мл, или более конкретно в концентрации примерно 2000 ед./мл или примерно 12000 ед./мл;

г) антитело к HER2, например, выбранное из группы, включающей трастузумаб, пертузумаб и T-DM1, в концентрации примерно 120 мг/мл; гистидиновый буфер, например L-гистидин/HCl с pH примерно 5,5, в концентрации примерно 20 мМ; дигидрат α,α -трегалозы в концентрации примерно 210 мМ и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора в концентрации примерно 10 мМ; полисорбат 20 в концентрации 0,04 или 0,06%; и фермент гиалуронидазу, такую, например, как гHuPH20, в концентрации примерно 12000 ед./мл; и конкретно представляет собой указанную ниже композицию А;

д) антитело к HER2, например, выбранное из группы, включающей трастузумаб, пертузумаб и T-DM1, в концентрации примерно 120 мг/мл; гистидиновый буфер, например L-гистидин/HCl с pH примерно 5,5, в концентрации примерно 20 мМ; дигидрат α,α -трегалозы в концентрации примерно 210 мМ и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора в концентрации примерно 10 мМ; полисорбат 20 в концентрации 0,04 или 0,06%; и фермент гиалуронидазу, такую, например, как гHuPH20, в концентрации примерно 2000 ед./мл; и конкретно представляет собой указанную ниже композицию В;

е) лиофилированная форма, содержащая антитело к HER2, например, выбранное из группы, включающей трастузумаб, пертузумаб и T-DM1, в концентрации 120 мг/мл; гистидиновый буфер, например L-гистидин/HCl с pH примерно 5,5, в концентрации 20 мМ; дигидрат α,α -трегалозы в концентрации 210 мМ; и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора в концентрации 10 мМ; неионогенное поверхностно-активное вещество в концентрации примерно от 0,04 до 0,06%; и которая конкретно представляет собой указанную ниже композицию Г. Эти композиции можно восстанавливать с использованием фермента гиалуронидазы, такой, например, как гHuPH20, в концентрации от 1000 до 16000 ед./мл или от 1500 до 12000 ед./мл или более конкретно примерно 2000 ед./мл или примерно 12000 ед./мл.

Высококонцентрированные стабильные фармацевтические композиции антитела к HER2 могут также содержать один из составов, указанных в табл. 1, 3 и 4, при этом композиции В, Г, Д и Е являются менее предпочтительными, поскольку они обладают менее желательными свойствами, что продемонстрировано в примерах и в табл. 1.

Для облегчения подкожной инъекции терапевтических белков предложено использовать в небольших количествах растворимые гликопротеины с гиалуронидазной активностью (sHASEGP) (см. WO 2006/091871). Установлено, что добавление указанных растворимых гликопротеинов с гиалуронидазной активностью (либо в составе комбинированной композиции, либо путем совместного введения) облегчает введение терапевтического лекарственного средства в гиподерму. Путем быстрой деполимеризации

гиалуронана (НА) во внеклеточном пространстве фермент sHASEGP снижает вязкость интерстициальной ткани, повышая тем самым гидравлическую проводимость и делая возможным безопасное и удобное введение в подкожную ткань более значительных объемов. Повышенная гидравлическая проводимость, индуцируемая sHASEGP посредством снижения интерстициальной вязкости, обуславливает более высокое диспергирование, потенциально повышая системную биологическую доступность вводимого SC-путем терапевтического лекарственного средства.

Таким образом, высококонцентрированные стабильные фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, которые содержат растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью, являются наиболее пригодными для подкожной инъекции. Специалисту в данной области должно быть очевидно, что указанную композицию, содержащую антитело к HER2 и растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью, можно приготавливать для введения в виде одной комбинированной композиции или в альтернативном варианте в виде двух различных композиций, которые можно смешивать непосредственно перед осуществлением подкожной инъекции. В альтернативном варианте антитело к HER2 и растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью можно вводить путем отдельных инъекций в различные области тела, предпочтительно в области, непосредственно примыкающие друг к другу. Можно также инъектировать терапевтические средства, которые присутствуют в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, в виде последовательных инъекций, осуществляя, например, сначала инъекцию растворимого гликопротеина с гиалуронидазной активностью, а затем инъекцию содержащей антитело к HER2 композиции. Указанные инъекции можно осуществлять также и в обратном порядке, т.е. сначала осуществлять инъекцию композиции, содержащей антитело к HER2, а затем инъекцию растворимого гликопротеина с гиалуронидазной активностью. В том случае, когда антитело к HER2 и растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью вводят в виде различных инъекций, то один или оба белка следует приготавливать в сочетании с забуферивающим агентом, стабилизатором(ами) и неионогенным поверхностно-активным веществом, но без фермента гиалуронидазы. Фермент гиалуронидазу можно приготавливать, например, в смеси, содержащей буфер L-гистидин/HCl, pH примерно 6,5, NaCl в концентрации 100-150 мМ и полисорбат 20 или полисорбат 80 в концентрации от 0,01 до 0,1% (мас./об.). В частности фермент гиалуронидазу приготавливают в смеси, содержащей буфер L-гистидин/HCl, pH 6,5 (20 мМ), NaCl (130 мМ), полисорбат 80 (0,05% (мас./об.)), как это в качестве примера указано для композиции Ж в табл. 1 ниже.

Как отмечалось выше, растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью можно рассматривать в качестве дополнительного эксципиента в композиции антитела к HER2. Растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью можно добавлять в композицию антитела к HER2 в момент изготовления композиции антитела к HER2 или его можно добавлять незадолго до инъекции. В альтернативном варианте растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью можно вводить посредством другой инъекции. В последнем случае растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью можно приготавливать в отдельном пузырьке либо в лиофилизированной форме, которую необходимо восстанавливать приемлемыми разбавителями перед осуществлением подкожной инъекции, либо производитель можно приготавливать его в виде жидкой композиции. Композицию антитела к HER2 и растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью можно поставлять в виде отдельных продуктов или можно приготавливать в виде наборов, включающих оба предназначенных для инъекции компонента и соответствующие инструкции по их подкожному введению. Можно снабжать также одну или обе композиции соответствующими инструкциями по восстановлению и/или введению.

Из существующего уровня техники известны различные антитела к HER2. Предпочтительно такие антитела представляют собой моноклональные антитела. Они могут представлять собой так называемые химерные антитела, гуманизированные антитела либо полностью человеческие антитела. Они могут представлять собой любые из следующих видов антител: полноразмерные антитела к HER2; фрагменты антител к HER2, обладающие такой же биологической активностью; включая варианты аминокислотных последовательностей и/или варианты гликозилирования указанных антител или фрагментов. Примерами гуманизированных антител к HER2 являются антитела, известные под Международными непатентованными названиями (INN) трастузумаб и пертузумаб. Другим приемлемым антителом к HER2 является T-DM1, которое представляет собой конъюгат антитело-токсин, содержащий huMAb4D5-8 (HERCEPTIN™) и майтанзиноид (т.е. DM1=N²-деацетил-N^{2'}-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзин; агент, обладающий высокой эффективностью в отношении микротрубочек), указанный конъюгат (образующийся с помощью МСС-линкера) в настоящее время находится в стадии разработки с целью его применения для лечения метастатического рака молочной железы. Другие антитела к HER2, обладающие различными свойствами, описаны у Tagliabue и др., *Int. J. Cancer*, 47, 1991, сс. 933-937; McKenzie и др., *Oncogene*, 4, 1989, сс. 543-548; *Cancer Res.*, 51, 1991, сс. 5361-5369; Vacus и др., *Molecular Carcinogenesis*, 3, 1990, сс. 350-362; Stancovski и др., *PNAS (USA)*, 88, 1991, сс. 8691-8695; Vacus и др., *Cancer Research*, 52, 1992, сс. 2580-2589; Xu и др., *Int. J. Cancer*, 53, 1993, сс. 401-408; WO 94/00136; Kasprzyk и др., *Cancer Research*, 52, 1992, сс. 2771-2776; Hancock и др., *Cancer Res.*, 51, 1991, сс. 4575-4580; Shawver и др., *Cancer Res.*, 54, 1994, сс. 1367-1373; Arteaga и др., *Cancer Res.*, 54, 1994, сс. 3758-3765; Harwerth и др., *J. Biol. Chem.*, 267, 1992, сс. 15160-15167; US 578386; и у Klapper и др., *Oncogene*, 14, 1997, сс. 2099-2109. Наиболее эффективным

терапевтическим антителом к HER2 является трастузумаб, поступающий в продажу от фирм Genentech Inc. и F. Hoffmann-La Roche Ltd под товарным знаком HERCEPTIN™. Другие подробности, касающиеся антигена HER2 и антител к нему, описаны в многочисленных патентах и не относящихся к патентам публикациях (соответствующий обзор представлен в US 5821337 и WO 2006/044908).

Антитело к HER2 представляет собой, например, антитело, выбранное из группы, включающей трастузумаб, пертузумаб и Т-DM1. Хотя возможно включение в состав заявленной композиции их смеси. Установлено, что комбинация пертузумаба и трастузумаба обладает активностью и хорошо переносится пациентами, страдающими метастатическим HER2-положительным раком молочной железы, характеризовавшимся прогрессированием при осуществлении предыдущей терапии с использованием трастузумаба (см., например, Baselga J. и др., *Journal of Clin. Oncol.*, т. 28 (7), 2010, сс. 1138-1144). Понятия "трастузумаб", "пертузумаб" и "Т-DM1" все относятся к соответствующим антителам к HER2, которые удовлетворяют требованиям, необходимым для получения разрешения на продажу в качестве идентичного или биологически сходного продукта в стране или на территории, выбранной из группы стран, включающей США, страны Европы и Японию. Трастузумаб имеет CDR-участки, описанные в EP-B-590058. Пертузумаб имеет CDR-участки, описанные в WO 01/00245. Установлено, что активность трастузумаба в анализе антипролиферативного действия в отношении клеток BT-474 (Nahta R. и др. "The HER-2-targeting antibodies Trastuzumab and Pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells", *Cancer Res.*, 64, 2004, сс. 2343-2346) составляла $0,7-1,3 \times 10^4$ ед./мг. Конъюгат Т-DM1 описан в WO 2005/117986.

HERCEPTIN™ (трастузумаб) разрешен для применения в странах Евросоюза (EU) для пациентов с метастатическим раком молочной железы (MBC), у которых в опухолях происходит сверхэкспрессия HER2, в следующих режимах:

- в виде монотерапии для лечения пациентов, подвергавшихся по меньшей мере двум химиотерапевтическим режимам для лечения у них метастатической болезни. Предварительная химиотерапия должна была включать, по меньшей мере, применение антрациклина и таксана, если только пациентов можно подвергать такому лечению. У пациентов с зависимым от рецепторов гормонов раком не должна была также иметь успеха и гормональная терапия, если только указанных пациентов можно подвергать такому лечению;

- в комбинации с паклитакселом для лечения тех пациентов, которых не подвергали химиотерапии для лечения у них метастатической болезни и которым не показано лечение антрациклином;

- в комбинации с доцетакселом для лечения тех пациентов, которых не подвергали химиотерапии для лечения у них метастатической болезни;

- в комбинации с ингибитором ароматазы для лечения пациентов в постменопаузальном периоде, страдающих зависимым от гормонов рецепторов MBC, которых ранее не подвергали лечению трастузумабом.

Трастузумаб разрешен также для применения в странах EU для пациентов с MBC, у которых в опухолях происходит сверхэкспрессия HER2, для лечения пациентов с ранней стадией HER2-положительного рака молочной железы (ЕВС) после хирургического вмешательства, химиотерапии (неoadьювантной или адьювантной) и лучевой терапии (если это возможно).

Кроме того, в настоящее время проводится изучение применимости трастузумаба для лечения рака желудка.

В настоящее время разрешены две схемы применения трастузумаба (табл. 1) при лечении как метастатического рака молочной железы (MBC), так и ранней стадии рака молочной железы (ЕВС): один раз в неделю (q1w) и каждые 3 недели (q3w). При схеме применения q1w используют ударную дозу 4 мг/кг с последующим использованием дозы 2 мг/кг. При схеме применения q3w используют ударную дозу 8 мг/кг с последующим использованием дозы 6 мг/кг.

Как отмечалось выше, предназначенный для внутривенного введения HERCEPTIN™ (трастузумаб) в настоящее время поступает в продажу в лиофилизированной форме в пузырьках. В каждом пузырьке, содержащем поступающую в продажу в Европе композицию, находится сухой остаток, полученный после лиофилизации стерильного водного раствора с объемом заполнения 6,25 мл, который содержит следующие компоненты: 150 мг трастузумаба (эффективное количество составляет 156,3 мг для гарантии того, что из конечного продукта после восстановления можно будет получить номинальное количество, составляющее 150 мг), 3,50 мг гидрохлорида L-гистидина, 2,25 мг L-гистидина, 141,9 мг дигидрата α, α -трегалозы, 0,63 мг полисорбата 20. Растворенный лиофилизат содержит примерно 24 мг/мл трастузумаба, 5мМ L-гистидин/HCl, pH 6,0, 60 мМ дигидрат α, α -трегалозы, 0,01% полисорбата 20. Затем раствор вносят в раствор для инфузии и после этого вводят путем инфузии пациенту в течение 90 мин (продолжительность последующих инфузий в случае MBC может составлять 30 мин, если они хорошо переносятся).

В данной области известно несколько растворимых гликопротеинов с гиалуронидазной активностью. Для дополнительной оценки функции, механизма действия и свойств указанных растворимых гликопротеинов с гиалуронидазной активностью ниже представлена следующая основная информация.

Гиподермальный (SC) интерстициальный матрикс состоит из сети волокнистых белков, погружен-

ной в вязкоэластичный гель гликозаминогликанов. Гиалуронан (НА), несulfированный состоящий из повторяющихся звеньев линейный дисахарид, является основным гликозаминогликаном в SC-ткани. НА секретируется в интерстициальную ткань фибробластами в виде высокомолекулярного вязкого полимера с молекулярной массой порядка нескольких мегадальтонов, который затем локально расщепляется в лимфе и в печени под действием лизосомальных гиалуронидаз и экзогликозидаз. Примерно 50% гиалуронана в организме продуцируется в SC-ткани, в которой он присутствует в количестве, составляющем примерно 0,8 мг/г веса ткани во влажном состоянии (Aukland K. и Reed R., выше). Считается, что у взрослого человека весом 70 кг количество НА составляет 15 г, из которых 30% ежедневно подвергается круговороту (синтезируется и расщепляется) (Laurent L.B. и др. "Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver", *Exp. Physiol.*, 76, 1991, сс. 695-703). НА, являющийся основной составляющей гелеподобного компонента гиподермального матрикса, в значительной степени определяет его вязкость.

Гликозаминогликаны (GAG) представляют собой сложные линейные полисахариды внеклеточного матрикса (ECM). GAG отличаются наличием повторяющихся структур дисахаридов N-замещенного гексозамина и урановой кислоты (в случае гиалуронана (НА), хондроитинсульфата (CS), хондроитина (C), дерматансульфата (DS), гепарансульфата (HS) и гепарина (H)) или галактозы (в случае кератансульфата (KS)). За исключением НА все они ковалентно связаны с коровыми белками. С точки зрения структуры GAG с их коровыми белками обозначают как протеогликианы (PG).

У млекопитающих гиалуронан (НА) обнаружен главным образом в соединительных тканях, коже, хряще и в синовиальной жидкости. Гиалуронан представляет собой также основной компонент стекловидного тела глаза. В соединительной ткани вода при гидратации, ассоциированной с гиалуронаном, создает гидратированные матриксы между тканями. Гиалуронан играет решающую роль в биологических явлениях, ассоциированных с подвижностью клеток, включая быстрое развитие, регенерацию, репарацию, эмбриогенез, эмбриологическое развитие, заживление ран, ангиогенез и онкогенез (Toole, *Cell Biol. Extracell. Matrix*, под ред. Nau, изд-во Plenum Press, New York, 1991, сс. 1384-1386; Bertrand и др., *Int. J. Cancer*, 52, 1992, сс. 1-6; Knudson и др., *FASEB J.*, 7, 1993, сс. 1233-1241). Кроме того, уровень гиалуронана коррелирует с агрессивностью опухолей (Ozello и др., *Cancer Res.*, 20, 1960, сс. 600-604; Takeuchi и др., *Cancer Res.*, 36, 1976, сс. 2133-2139; Kimata и др., *Cancer Res.*, 43, 1983, сс. 1347-1354).

НА обнаружен во внеклеточном матриксе многих типов клеток, прежде всего в мягких соединительных тканях. С НА связаны различные физиологические функции, такие как белковый гомеостаз в воде и плазме (Laurent T.C. и др., *FASEB J.*, 6, 1992, сс. 2397-2404). Производство НА повышается в пролиферирующих клетках, и это может играть роль при митозе. Он принимает также участие в локомоции и клеточной миграции. НА, вероятно, играет важные роли в регуляции, развитии и дифференцировке клеток (Laurent и др., см. выше).

НА нашел широкое применение в клинической медицине. Установлено, что его тканезащитные и реологические свойства можно использовать в глазной хирургии (например, для защиты эндотелия роговицы в процессе хирургии катаракты). Сывороточный НА является диагностическим маркером болезни печени и различных воспалительных состояний, таких как ревматоидный артрит. Интерстициальный отек, связанный с накоплением НА, может вызывать дисфункцию различных органов (Laurent и др., выше).

Белковые взаимодействия гиалуронана участвуют также в структуре внеклеточного матрикса или "основного вещества".

Гиалуронидазы представляют собой группу, как правило, активных в нейтральных или кислых условиях ферментов, широко распространенных в царстве животных. Гиалуронидазы варьируются по субстратной специфичности и механизму действия (WO 2004/078140). Известно три общих класса гиалуронидаз:

1. Гиалуронидазы млекопитающих (КФ 3.2.1.35), которые представляют собой эндо-бета-N-ацетилгексозаминидазы, основными конечными продуктами которых являются тетрасахариды и гексасахариды. Они обладают гидролитической и трансгликозидазной активностью и могут расщеплять гиалуронан и хондроитинсульфаты (CS), как правило, хондроитин-4- сульфат (C4-S) и хондроитин-6-сульфат (C6-S).

2. Бактериальные гиалуронидазы (КФ 4.2.99.1), которые расщепляют гиалуронан и в различной степени CS и DS. Они представляют собой эндо-бета-N-ацетилгексозаминидазы, которые участвуют в реакции бета-элиминирования, основными конечными продуктами которой являются дисахариды.

3. Гиалуронидазы (КФ 3.2.1.36) из пиявок, других паразитов и ракообразных, которые представляют собой эндо-бета-глюкуронидазы, гидролизующие бета-1-3-связи, в результате чего образуются конечные продукты, представляющие собой тетрасахариды и гексасахариды.

Гиалуронидазы млекопитающих можно дополнительно подразделять на две группы: ферменты, активные в нейтральной среде, и ферменты, активные в кислой среде. В человеческом геноме выявлено шесть гиалуронидазоподобных генов, а именно HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 и RH20/SPAM1. HYALP1 представляет собой псевдоген, а у HYAL3 не обнаружена ферментативная активность в отношении известных субстратов. HYAL4 представляет собой хондроитиназу и отличается

невысоким уровнем активности в отношении гиалуронана. HYAL1 является прототипом активного в кислой среде фермента, а PH20 является прототипом активного в нейтральной среде фермента. Активные в кислой среде гиалуронидазы, такие как HYAL1 и HYAL2, обычно не обладают каталитической активностью при нейтральном значении pH (т.е. при pH 7). Например, HYAL1 обладает слабой каталитической активностью *in vitro* при значении pH, превышающем 4,5 (Frost I.G. и Stern R. "A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents", *Anal. Biochemistry*, 251, 1997, сс. 263-269). HYAL2 представляет собой активный в кислой среде фермент с очень низкой удельной активностью *in vitro*.

Гиалуронидазоподобные ферменты можно охарактеризовать также как ферменты, которые, как правило, связаны с плазматической мембраной посредством гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря, их примерами являются человеческая HYAL2 и человеческая PH20 (Danilkovitch-Miagkova и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(8), 2003, сс. 4580-4585; Phelps и др., *Science*, 240(4860), 1988, сс. 1780-1782), и ферменты, которые, как правило, являются растворимыми, их примером служит человеческая HYAL1 (Frost I.G. и др. "Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236(1), 1997, сс. 10-15). Однако имеют место вариации от вида к виду: например, бычья PH20 очень слабо связана с плазматической мембраной и не "заякорена" через чувствительный к фософлипазе якорь (Lalancette и др., *Biol. Reprod.*, 65(2), 2001, сс. 628-636). Эта уникальная особенность бычьей гиалуронидазы обеспечила клиническое применение растворимой гиалуронидазы из яичек быка в виде экстракта (Wydase™, Hyalase™). Другие виды PH20 представляют собой "заякоренные" с помощью липида ферменты, которые, как правило, являются нерастворимыми без использования детергентов или липаз. Например, человеческая PH20 "заякорена" на плазматической мембране через GPI-якорь. Попытки создать ДНК-конструкции человеческой PH20, для которых не требуется интродукция липидного якоря в полипептид, приводили к получению либо каталитически неактивного фермента, либо нерастворимого фермента (Arming и др., *Eur. J. Biochem.*, 247(3), 1997, сс. 810-814). Установлено, что встречающаяся в естественных условиях гиалуронидаза спермы макака присутствует как в растворимой, так и в связанной с мембраной форме. В то время как связанная с мембраной форма с молекулярной массой 64 кДа обладает ферментативной активностью при pH 7,0, форма с молекулярной массой 54 кДа обладает активностью только при pH 4,0 (Cheng и др., *Dev. Biol.*, 10, 175(1), 1996, сс. 142-153). Таким образом, у растворимых форм PH20 часто отсутствует ферментативная активность в нейтральных условиях.

Как отмечалось выше и согласно данным, представленным в WO 2006/091871, в композицию можно в небольших количествах добавлять растворимые гликопротеины, обладающие гиалуронидазной активностью (sHASEGP), для облегчения введения терапевтического лекарственного средства в гиподерму. В результате быстрой деполимеризации НА во внеклеточном пространстве sHASEGP снижает вязкость интерстициальной ткани, повышая тем самым гидравлическую проводимость, и это обеспечивает возможность безопасного и удобного введения более значительных объемов в SC-ткань. Повышенная гидравлическая проводимость, индуцируемая sHASEGP посредством снижения вязкости интерстициальной ткани, обеспечивает повышенное диспергирование, потенциально повышает системную биологическую доступность вводимого SC-путем терапевтического лекарственного средства.

При инъекции НА в гиподерму его деполимеризация с помощью sHASEGP происходит в ограниченной области SC-ткани, а именно в месте инъекции. Согласно экспериментальным данным для sHASEGP характерна локальная инактивация в интерстициальном пространстве, так у мышей время полужизни составляет от 13 до 20 мин, при этом у мышей линии CD-1 не обнаружена заметная абсорбция в кровь после однократного внутривенного введения дозы. Для sHASEGP характерно время полужизни в сосудистом компартменте, составляющее 2,3 и 5 мин у мышей и обезьян циномоглус (яванский макакрабобед) соответственно при использовании доз вплоть до 0,5 мг/кг. Быстрый клиренс sHASEGP в сочетании с постоянным синтезом НА-субстрата в SC-ткани приводит к кратковременному и локально активному повышению проницаемости для других совместно инъектируемых молекул, это явление является полностью обратимым через 24-48 ч после введения (Bywaters G.L. и др. "Reconstitution of the dermal barrier to dye spread after Hyaluronidase", *Br. Med. J.*, 2 (4741), 1951, сс. 1178-1183).

Помимо воздействий на локальное диспергирование в жидкости sHASEGP действует также в качестве усилителя абсорбции. Макромолекулы с молекулярной массой, превышающей 16 килодальтонов (кДа), как правило, не могут абсорбироваться через капилляры посредством диффузии и главным образом абсорбируются через дренирующие лимфатические узлы. Таким образом, введенные подкожно макромолекулы, такие, например, как терапевтическое антитело (молекулярная масса примерно 150 кДа), должны пересечь интерстициальный матрикс прежде, чем достигнут дренирующей лимфатической системы для последующей абсорбции в сосудистый компартмент. В результате повышения локального диспергирования sHASEGP повышает скорость (K_a) абсорбции многих макромолекул. Это приводит к повышенным пиковым уровням в крови (C_{max}) и потенциально к повышенной биологической доступности по сравнению с SC-введением без использования sHASEGP (Bookbinder L.H. и др. "A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics", *J. Control. Release*, 114, 2006, сс. 230-241).

Содержащие гиалуронидазу животного происхождения продукты уже применяли в клинических условиях в течение более чем 60 лет, прежде всего для повышения диспергирования и абсорбции других,

вводимых совместно лекарственных средств и для гиподермоклиза (SC-инъекция/инфузия жидкости в большом объеме) (Frost G.I. "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", *Expert Opinion on Drug Delivery*, 4, 2007, сс. 427-440). Особенности механизма действия гиалуронидаз описаны подробно в следующих публикациях: Duran-Reynolds F. "A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action", *CR Soc Biol Paris*, 1938, сс. 69-81; Chain E., "A mucolytic enzyme in testes extracts", *Nature*, 1939, сс. 977-978; Weissmann B. "The transglycosylative action of testicular hyaluronidase", *J. Biol. Chem.*, 216, 1955, сс. 783-794; 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.*, 97, 1991, сс. 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.*, 76, 1991, сс. 695-703; Laurent T.C. и Fraser J.R.E. "Degradation of Bioactive Substances: Physiology and Pathophysiology", под ред. Henriksen J.H., изд-во CRC Press, Boca Raton, FL; 1991, сс. 249-265; Harris E.N. и др. "Endocytic function, glycosaminoglycan specificity, and antibody sensitivity of the recombinant human 190-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE)", *J. Biol. Chem.*, 279, 2004, сс. 36201-36209; Frost G.I. "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", *Expert Opinion on Drug Delivery*, 4, 2007, сс. 427-440. Содержащие гиалуронидазу продукты, разрешенные для применения в странах EU, представляют собой Hylase® "Dessau" и Hyalase®. Содержащие гиалуронидазу животного происхождения продукты, разрешенные для применения в США, включают Vitrase™, Hydase™ и Amphadase™.

Безопасность и эффективность содержащих гиалуронидазу продуктов интенсивно изучались. Было установлено, что наиболее важным риском, касающимся безопасности, является гиперчувствительность и/или аллергенность, которая, по-видимому, связана с недостаточной чистотой препаратов животного происхождения (Frost G.I. "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", *Expert Opinion on Drug Delivery*, 4, 2007, сс. 427-440). Следует отметить, что существуют различия касательно разрешенных доз гиалуронидаз животного происхождения в Великобритании, Германии и США. В Великобритании принятая доза при использовании в качестве адьюванта для подкожной или внутримышечной инъекции составляет 1500 ед., которую добавляют непосредственно в инъекционный раствор. В США обычная применяемая для этой цели доза составляет 150 ед. При осуществлении гиподермоклиза гиалуронидазу применяют с целью подкожного введения относительно больших объемов жидкости. В Великобритании, как правило, добавляют 1500 ед. гиалуронидазы к каждому 500-1000 мл жидкости для подкожного применения. В США 150 ед. рассматриваются как требуемые для каждого литра раствора для гиподермоклиза. В Германии считается, что для этой цели следует применять 150-300 ед. В Великобритании для повышения диффузии местных анестезирующих средств добавляют 1500 ед. В Германии и США считается, что для этой цели следует применять 150 ед. Несмотря на различия в дозах (доза в Великобритании в 10 раз выше, чем в США), отсутствуют данные о каких-либо заметных различиях в профилях безопасности продуктов, содержащих гиалуронидазу животного происхождения, в США и Великобритании соответственно.

2 декабря 2005 г. фирма Halozyme Therapeutics Inc. получила разрешение FDA на применение инъекционной композиции рекомбинантной человеческой гиалуронидазы, rHuPH20 (HYLENEX™). От FDA получено разрешение на применение HYLENEX™ в дозе 150 ед. для SC-введения при следующих показаниях:

- в качестве адьюванта для повышения абсорбции и диспергирования других инъекционных лекарственных средств,
- для гиподермоклиза,
- в качестве вспомогательного средства для SC-урографии для улучшения резорбции рентгеноконтрастных агентов.

В качестве части обобщения, выполненного в процессе регистрации, установлено, что rHuPH20 обладает такой же способностью повышать диспергирование и абсорбцию других инъекционных лекарственных средств, что и ранее разрешенные препараты гиалуронидазы животного происхождения, но отличается улучшенным профилем безопасности. В частности, применение рекомбинантной человеческой гиалуронидазы (rHuPH20) минимизирует по сравнению с гиалуронидазами животного происхождения потенциальный риск загрязнения патогенами животных и трансмиссивными спонгиформными энцефалопатиями.

Растворимые гликопротеины с гиалуронидазной активностью (sHASEGP), способ их получения и их применение в фармацевтических композициях описаны в WO 2004/078140. Применение растворимых гликопротеинов с гиалуронидазной активностью в комбинации с различными взятыми в качестве примера антителами, такими, например, как трастузумаб, упомянуто в WO 2006/091871.

В детальном экспериментальном исследовании, изложенном дополнительно ниже, неожиданно установлено, что композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, отличаются предпочтительной стабильностью при хранении и удовлетворяют всем необходимым требованиям для одобрения службой здравоохранения.

Фермент гиалуронидаза в композициях, предлагаемых в настоящем изобретении, повышает степень введения антитела к HER2 в системный кровоток, например повышая абсорбцию действующего вещества (т.е. действует в качестве усилителя проникновения). Фермент гиалуронидаза повышает также степень введения терапевтического антитела к HER2 в системный кровоток при подкожном пути применения в результате обратимого гидролиза гиалуронана, внеклеточного компонента интерстициальной SC-ткани. Гидролиз гиалуронана в гиподерме приводит к временному открытию каналов в интерстициальном пространстве SC-ткани и тем самым повышает степень введения терапевтического антитела к HER2 в системный кровоток. Кроме того, введение становится менее болезненным для человека и приводит к меньшему связанному с вводимым объемом опуханию SC-ткани.

Гиалуронидаза при ее местном применении полностью проявляет свое действие локально. Другими словами, гиалуронидаза инактивируется и метаболизируется местно в течение нескольких минут и, как установлено, не обладает системным или пролонгированным действием. Быстрая инактивация гиалуронидазы в течение нескольких минут при ее проникновении в кровоток обуславливает реальную возможность осуществлять сравнительные эксперименты по оценке биологической доступности различных содержащих гиалуронидазу продуктов. Это свойство минимизирует также любые проблемы, связанные с потенциальной системной безопасностью, поскольку содержащий гиалуронидазу продукт не может оказывать воздействие на удаленные области.

Общей особенностью всех ферментов гиалуронидаз является их способность осуществлять деполимеризацию гиалуронана вне зависимости от различий в химической структуре, виде-источнике, в тканях-источниках или в партиях лекарственного продукта, полученного из одних и тех же видов и тканей. Их отличительной особенностью является то, что их активность является одинаковой (за исключением эффективности) несмотря на различие в структурах.

Фермент гиалуронидаза, применяемый в качестве эксципиента в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, отличается тем, что не оказывает отрицательного воздействия на молекулярную целостность антитела к HER2 в стабильной фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании. Кроме того, фермент гиалуронидаза модифицирует только введение антитела к HER2 в системный кровоток, но не обладает никакими свойствами, которые могут обуславливать или принимать участие в терапевтических воздействиях абсорбированного системно антитела к HER2. Фермент гиалуронидаза не обладает системной биологической доступностью и не оказывает отрицательного воздействия на молекулярную целостность антитела к HER2 при хранении в рекомендованных условиях стабильной фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении. Поэтому ее можно рассматривать в качестве эксципиента в композиции антитела к HER2, предлагаемой в настоящем изобретении. Поскольку она не обладает никаким терапевтическим действием, она представляет собой вспомогательную составную часть фармацевтической формы в отличие от обладающего терапевтической активностью антитела к HER2.

В данной области известно несколько приемлемых ферментов гиалуронидаз, которые можно применять согласно настоящему изобретению. Предпочтительным ферментом является человеческая гиалуронидаза, наиболее предпочтительно фермент, известный как гHuPH20. гHuPH20 является представителем семейства обладающих активностью в нейтральной и кислой среде β -1,4-гликозилгидролаз, которые катализируют деполимеризацию гиалуронана путем гидролиза β -1,4-связи между C₁-положением N-ацетилглюкозамина и C₄-положением глюкуроновой кислоты. Гиалуронан представляет собой полисахарид, присутствующий во внутриклеточном основном веществе соединительной ткани, такой как подкожная интерстициальная ткань, и в определенных специализированных тканях, таких как пупочный канатик и жидкость стекловидного тела. Гидролиз гиалуронана приводит к временному снижению вязкости интерстициальной ткани и ускоряет диспергирование инъекционных жидкостей или локализованных трансудатов или экссудатов, облегчая тем самым их абсорбцию. Воздействия гиалуронидазы является местным и обратимым и сопровождается полным восстановлением тканевого гиалуронана в течение 24-48 ч (Frost G.I. "Recombinant human hyaluronidase (гHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", Expert Opinion on Drug Delivery, 4, 2007, сс. 427-440). Повышение проницаемости соединительной ткани в результате гидролиза гиалуронана коррелирует с эффективностью гиалуронидазы в качестве вещества, обладающего способностью повышать диспергирование и абсорбцию вводимых совместно молекул.

В человеческом геноме присутствует несколько генов гиалуронидаз. Только генный продукт PH20 обладает выраженной гиалуронидазной активностью в физиологических внеклеточных условиях и действует в качестве агента, способствующего распространению, в то время как обладающие активностью в кислой среде гиалуронидазы не обладают указанным свойством.

гHuPH20 представляет собой первый и единственный рекомбинантный человеческий фермент гиалуронидазу, который в настоящее время доступен для терапевтического применения. Встречающийся в естественных условиях человеческий белок PH20 имеет липидный якорь, присоединенный к находящейся на карбоксильном конце аминокислоте, который "заякоревает" ее в плазматической мембране. Фермент гHuPH20, разработанный на фирме Halozyme, представляет собой укороченный делеционный вари-

ант, лишенный аминокислот на карбоксильном конце, ответственных за присоединение липида.

Это позволяет получать растворимый обладающий активностью при нейтральном значении pH фермент, сходный с белком, который обнаружен в препаратах бычьих яичек. Белок gHuPH20 синтезируют с состоящим из 35 аминокислот сигнальным пептидом, который удаляется с N-конца в процессе секретиции. Зрелый белок gHuPH20 содержит ортолог N-концевой аминокислотной последовательности, аутентичный с обнаруженным в некоторых препаратах бычьей гиалуронидазы.

PH20-гиалуронидазы, включая PH20 животного происхождения и рекомбинантную человеческую gHuPH20, катализируют деполимеризацию гиалуронана путем гидролиза P-1,4-связи между C₁-положением N-ацетилглюкозамина и C₄-положением глюкуроновой кислоты. Наименьшим продуктом расщепления является тетрасахарид (Weissmann B. "The transglycosylative action of testicular hyaluronidase", J. Biol. Chem., 216, 1955, сс. 783-794). Эта структура N-ацетилглюкозамин/глюкуроновая кислота не обнаружена в N-сцепленных гликанах рекомбинантных биологических продуктов и поэтому gHuPH20 не влияет на гликозилирование антител, входящих вместе с ней в препаративную форму, таких, например, как трастузумаб. Фермент gHuPH20 сам несет шесть N-сцепленных гликанов на молекулу, имеющую коровье строение, сходные с обнаруженными в моноклональных антителах. Установлено, что эти N-сцепленные структуры не изменяются со временем, подтверждая тем самым отсутствие ферментативной активности gHuPH20 в отношении этих N-сцепленных гликановых структур. Короткое время полужизни gHuPH20 и постоянный синтез гиалуронана обуславливают кратковременное и локальное действие фермента на ткани.

Фермент гиалуронидазу, который является эксципиентом в подкожной композиции, можно получать с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Такой путь гарантирует, что в любые моменты времени получают один и тот же белок (идентичная аминокислотная последовательность) и что таким образом можно избегать аллергической реакции, например, вызываемой загрязняющими белками, которые образуются при совместной очистке в процессе экстракции из ткани. Фермент гиалуронидаза, применяемая в композиции, приведенная в качестве примера, представляет собой человеческий фермент, а именно gHuPH20.

Аминокислотная последовательность gHuPH20 (HYLENEX™) хорошо известна и представлена в CAS под регистрационным номером 75971-58-7. Приблизительная молекулярная масса составляет 61 кДа.

Осуществляли множественные сравнения структуры и функции клонов кДНК гиалуронидазы млекопитающих, полученных из естественных источников, и PH-20 человека и других млекопитающих. Ген PH-20 представляет собой ген, применяемый для получения рекомбинантного продукта gHuPH20; однако рекомбинантный лекарственный продукт представляет собой состоящую из 447 аминокислот укороченную версию полноразмерного белка, кодируемого геном PH-20. При любом сравнении структурные сходства касательно аминокислотных последовательностей редко превышали 60%. Сравнения функциональных характеристик продемонстрировали, что активность gHuPH20 очень сходна с активностью ранее зарегистрированных содержащих гиалуронидазу продуктов. Эта информация согласуется с клиническими данными, полученными в течение последних 50 лет, о том, что вне зависимости от источника гиалуронидазы клиническая безопасность и эффективность единиц гиалуронидазы являются эквивалентными.

Применение gHuPH20 в содержащей антитело к HER2 композиции для SC-введения позволяет осуществлять введение более значительных объемов лекарственного продукта и потенциально приводит к повышению абсорбции вводимого подкожно трастузумаба в системный кровоток.

Осмотическое давление стабильной фармацевтической композиции составляет 330±50 мОсм/кг.

В стабильной фармацевтической композиции практически отсутствуют видимые (при оценке человеческим глазом) частицы. Частицы, невидимые невооруженным глазом (при оценке с затемнением света), должны удовлетворять следующим критериям:

максимальное количество на флакон частиц размером ≥10 мкм→6000,

максимальное количество на флакон частиц размером ≥25 мкм→600.

При раке или незлокачественном заболевании, как правило, должны присутствовать экспрессирующие HER2 клетки, в результате чего антитело к HER2 в терапевтической фармацевтической предназначенной для SC-введения композиции должно обладать способностью связываться с пораженными клетками. Различные виды рака или незлокачественных заболеваний, которые можно лечить с помощью композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, перечислены в представленном ниже разделе "Определения".

Стабильную фармацевтическую композицию, которая содержит обладающее фармацевтической активностью антитело к HER2 можно вводить с помощью подкожной инъекции, при этом повторять введение несколько раз с интервалом 3 недели (q3w). Полный объем инъекционной жидкости в большинстве случаев вводят в течение периода времени, составляющего от 1 до 10 мин, предпочтительно от 2 до 6 мин, наиболее предпочтительно 3±1 мин. При применении в качестве вспомогательной терапии страдающих ЕВС пациентов и пациентов с МВС, подвергающихся монотерапии трастузумабом, которым не вводят другие внутривенные (IV) химиотерапевтические средства, указанное подкожное применение

приводит к повышению удобства для пациентов, поскольку его можно осуществлять путем самовведения в домашних условиях. Это повышает строгость соблюдения больным режима и схемы лечения и снижает/устраняет затраты, связанные с IV-введением (т.е. затраты на осуществление IV-введения, арендную плату койко-дней, перевоз пациента и т.д.). С подкожным введением весьма вероятно должны быть связаны снижение частоты и/или интенсивности связанных с инфузией реакций.

Добавление гиалуронидазы в композицию позволяет повышать инъецируемый объем, который можно безопасно и комфортно вводить подкожно. Общепринятый инъецируемый объем составляет от 1 до 15 мл. Установлено, что введение такой композиции повышает диспергирование, абсорбцию и биологическую доступность терапевтического антитела. Крупные молекулы (т.е. >16 кДа), которые вводят SC-путем, абсорбируются в сосудистый компартмент главным образом вместе с дренирующими лимфатическими жидкостями (Supersaxo A. и др. "Effect of Molecular Weight on the Lymphatic Absorption of Water-Soluble Compounds Following Subcutaneous Administration, 2, 1990, сс. 167-169; Swartz M.A. "Advanced Drug Delivery Review, The physiology of the lymphatic system", 50, 2001, сс. 3-20). Таким образом, в этом случае скорость интродукции этих крупных молекул в системный кровоток замедляется по сравнению с внутривенной инфузией, что может приводить к снижению частоты/интенсивности связанных с инфузией реакций.

Для получения предназначенной для подкожного введения композиции трастузумаба требуются высокие концентрации антитела на конечной стадии очистки процесса изготовления. Поэтому к общепринятому процессу получения трастузумаба добавляют дополнительную стадию (стадию ультрафильтрации/диализации). Согласно данным, представленным в WO 97/04801, высококонцентрированную стабильную фармацевтическую препаративную форму антитела к HER2 можно получать также в виде стабилизированной композиции белка, которую можно восстанавливать приемлемым разбавителем с получением восстановленной композиции с высокой концентрацией антитела к HER2.

Предназначенная для SC-введения композиция антитела к HER2 показана прежде всего для лечения рака. При этом понятие "рак" и "раковый" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примерами рака являются (но, не ограничиваясь только ими) карцинома, лимфома, бластома (включая медуллобластому и ретинобластому), саркома (включая липосаркому и синовиальноклеточную саркому), нейроэндокринные опухоли (включая карциноидные опухоли, гастриномы и островковоклеточный рак), мезотелиома, шваннома (включая невриному слухового нерва), менингиома, аденокарцинома, меланома и лейкоз или лимфоидные злокачественные заболевания. Более конкретными примерами указанных видов рака являются плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, печеночно-клеточный рак, гастриальный рак или рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластома, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатома, рак молочной железы, рак ободочной кишки, ректальный рак, колоректальный рак, карцинома эндометрия или матки, карцинома слюнных желез, рак почки или ренальный рак, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, печеночная карцинома, анальная карцинома, карцинома пениса, рак яичек, рак пищевода, опухоли желчных протоков, а также рак головы и шеи.

Понятие "примерно" в контексте настоящего описания означает, что конкретное представленное значение может варьироваться в определенных пределах, например, означает, что указанное значение включает вариации в диапазоне $\pm 10\%$, предпочтительно $\pm 5\%$, наиболее предпочтительно $\pm 2\%$.

Рак, при котором происходит "сверхэкспрессия" рецептора HER, представляет собой рак, отличающийся существенно более высокими уровнями рецептора HER, такого как HER2, на клеточной поверхности по сравнению с нераковой клеткой ткани такого же типа. Указанная сверхэкспрессия может вызываться амплификацией гена или повышенной транскрипцией или трансляцией. Сверхэкспрессию рецептора HER можно определять диагностическими или прогностическими анализами, позволяющими определять повышенные уровни белка HER на поверхности клетки (например, иммуногистохимическим анализом; ИГХ). В альтернативном или дополнительном варианте можно измерять уровни кодирующей HER нуклеиновой кислоты в клетке, например, на основе методов флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH; см. WO 98/45479), Саузерн-блоттинга или полимеразной цепной реакции (ПЦР), например количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Можно изучать также сверхэкспрессию рецептора HER, оценивая "слушивающийся" антиген (например, внеклеточный домен HER) в биологической жидкости, такой как сыворотка (см., например, US 4933294, выданный 12 июня 1990 г.; WO 91/05264, опубликованную 18 апреля 1991 г.; US 540138, выданный 28 марта 1995 г. и Sias и др., J. Immunol. Methods, 132, 1990, сс. 73-80). Помимо указанных выше анализов практикующим специалистам в данной области известны различные анализы *in vivo*. Например, можно экспонировать клетки в организме пациента антителом, которое необязательно может содержать выявляемую метку, например радиоактивный изотоп, и связывание антитела с клетками пациента можно оценивать, например, наружным сканированием с измерением радиоактивности или путем анализа биопсии, полученной у пациента до обработки антителом.

И, наоборот, рак, при котором "не происходит сверхэкспрессия рецептора HER2", представляет со-

бой рак, отличающийся отсутствием превышающий нормальный уровень экспрессии рецептора HER2 по сравнению с нераковой клеткой ткани такого же типа.

Рак, при котором происходит "сверхэкспрессия" лиганда HER2, представляет собой рак, отличающийся производством значительно более высоких уровней лиганда по сравнению с нераковой клеткой ткани такого же типа. Указанная сверхэкспрессия может вызываться амплификацией гена или повышенной транскрипцией или трансляцией. Сверхэкспрессию лиганда HER можно определять диагностически путем оценки уровней лиганда (или кодирующей его нуклеиновой кислоты) в организме пациента, например в биопсии опухоли, или с помощью различных диагностических анализов, таких как ИГХ, FISH, Саузерн-блоттинг, ПЦР, или с помощью анализов *in vivo*, хорошо известных в данной области.

Очевидно, что содержащую антитело к HER2 предназначенную для SC-введения композицию, можно применять также для лечения различных незлокачественных заболеваний или нарушений, таких как аутоиммунные заболевания (например, псориаз); эндометриоз; склеродерма; рестеноз; полипы, такие как полипы ободочной кишки, носовые полипы или полипы желудочно-кишечного тракта; фиброаденома; респираторное заболевание; холецистит; нейрофиброматоз; поликистоз почек; воспалительные заболевания; кожные нарушения, включая псориаз и дерматит; сосудистое заболевание; состояния, включающие аномальную пролиферацию сосудистых эпителиальных клеток; язвы желудочно-кишечного тракта; болезнь Менетрие, секретирующие аденомы или синдром потери белка; почечные нарушения; ангиогенные нарушения; глазное заболевание, такое как возрастная дегенерация желтого пятна, синдром предполагаемого глазного гистоплазмоза, неоваскуляризация сетчатки в результате пролиферативной диабетической ретинопатии, васкуляризация сетчатки, диабетическая ретинопатия или возрастная дегенерация желтого пятна; связанные с костной тканью патологии, такие как остеоартрит, рахит и остеопороз; повреждение после церебрального ишемического инсульта; заболевания, связанные с фиброзом или отеком, такие как цирроз печени, фиброз легкого, саркоидоз, тиреоидит, синдром системной гипервязкости, болезнь Рандю-Ослера-Вебера, хроническое обтурирующее заболевание легких или отек, связанный с ожогами, травмой, облучением, "ударом", гипоксией или ишемией; реакция гиперчувствительности кожи; диабетическая ретинопатия и диабетическая нефропатия; синдром Гийена-Барре; реакция "трансплантат-против-хозяина" или отторжение трансплантата; болезнь Педжетта; воспаление кости или сустава; фотостарение (например, вызванное УФ-облучением человеческой кожи); доброкачественная гипертрофия предстательной железы; определенные микробные инфекции, включая вызываемые микробными патогенами, выбранными из аденовирусов, хантавирусов, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia spp.* и *Bordetella pertussis*; тромбоз, связанный с агрегацией тромбоцитов; связанные с репродуктивной системой состояния, такие как эндометриоз, синдром гиперстимуляции яичников, преэклампсия, дисфункциональное маточное кровотечение или менометрорагия; синовит; атерома; острые и хронические нефропатии (включая пролиферативный гломерулонефрит и индуцируемое диабетом заболевание почек); экзема; образование гипертрофированных рубцов; эндотоксический шок и грибная инфекция; семейный аденоматозный полипоз; нейродегенеративные болезни (например, болезнь Альцгеймера, связанная со СПИ-Дом деменция, болезнь Паркинсона, амиотрофический боковой склероз, пигментный ретинит, атрофия спинномозговых мышц и дегенерация мозжечка); миелодиспластические синдромы; гипопластическая анемия; ишемическое повреждение; фиброз легкого, почки или печени; опосредуемая Т-клетками реакция гиперчувствительности; детский гипертрофический стеноз привратника; синдром задержки мочи; псориазический артрит и тиреоидит Хашимото. Примерами незлокачественных показаний для лечения являются псориаз, эндометриоз, склеродема, сосудистое заболевание (например, рестеноз, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца или гипертензия), полипы ободочной кишки, фиброаденома или болезнь дыхательных путей (например, астма, хронический бронхит, бронхоэктаз или муковисцидоз).

Когда показанием для лечения является рак, для лечения пациента можно применять комбинацию содержащей антитело композиции и химиотерапевтического средства. Комбинированное применение включает совместное введение или одновременное введение с использованием различных композиций или одной фармацевтической композиции или последовательное введение в любом порядке, предпочтительно в течение периода времени, при котором оба (или все) действующие вещества одновременно проявляют свою биологическую активность. Так химиотерапевтическое средство можно вводить до или после введения содержащей антитело композиции. Промежуток времени между по меньшей мере одним введением химиотерапевтического средства и по меньшей мере одним введением содержащей антитело композиции составляет предпочтительно примерно 1 месяц или менее и наиболее предпочтительно примерно 2 недели или менее. В альтернативном варианте химиотерапевтическое средство и содержащую антитело композицию вводят пациенту одновременно в виде одной композиции или различных композиций.

Лечение с помощью композиции, содержащей антитело, должно приводить к улучшению признаков или симптомов рака или заболевания. Например, когда подлежащее лечению заболевание представляет собой рак, такая терапия может приводить к увеличению продолжительности жизни (общей продолжительности жизни и/или продолжительности жизни без прогрессирования заболевания) и/или может приводить к конкретному клиническому ответу (частичному или полному). Кроме того, лечение с использованием комбинации химиотерапевтического средства и содержащей антитело композиции мо-

жет приводить к синергетической или превышающей аддитивное действие терапевтической пользе для пациента.

Как правило, входящее в композицию антитело вводят в виде "голого" антитела. Однако вводимое антитело можно конъюгировать с цитотоксическим агентом. Иммуноконъюгат и/или антиген, с которым оно связано, затем интернализуется клеткой, что приводит к повышенной терапевтической эффективности иммуноконъюгата в отношении уничтожения раковой клетки, с которой он связан. Цитотоксический агент оказывает направленное или интерферирующее воздействие на нуклеиновую кислоту в раковой клетке. Примерами таких цитотоксических агентов являются майтанзиноиды, калихеамицины, рибонуклеазы и ДНК-эндонуклеазы. Наиболее изученными в клинических условиях иммуноконъюгатами являются иммуноконъюгаты трастузумаб-майтанзиноид (Т-DM1), которые описаны в WO 2003/037992, в частности иммуноконъюгат Т-МСС-DM1, химическое название которого N²-деацетил-N²-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзин-4-малеимидометилциклогексил-1-карбоксил-трастузумаб.

При подкожном введении композицию можно вводить с помощью приемлемого устройства, такого как (но, не ограничиваясь только ими) шприц; устройство для инъекции (например, устройства INJECT-EASE™ и GENJECT™); инфузионный насос (такой, например, как Accu-Chek™); ручка-инжектор (например, GENPEN™); безыгольное устройство (например, MEDDECTOR™ и BIOJECTOR™); или с помощью системы введения на основе пластыря для подкожного применения. Приемлемая для композиции система введения описана в WO 2010/029054. Указанное устройство содержит жидкую композицию в количестве от примерно 5 до примерно 15 мл или более предпочтительно 5 мл.

Предназначенная для предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза антитела должна зависеть от указанного выше типа заболевания, подлежащего лечению, от того, применяют антитело в превентивных или терапевтических целях, от предшествующей терапии, истории болезни пациента и его ответа на антитело и предписания лечащего врача. Антитело можно вводить пациенту однократно или в виде серий обработок. В зависимости от типа и серьезности заболевания начальная доза антитела к HER2, предназначенная для введения пациенту, может составлять от примерно 1 мкг/кг до 50 мг/кг веса тела или более конкретно от примерно 0,1 до 20 мг/кг веса тела, и ее применяют, например, путем одного или нескольких отдельных введений или с помощью длительной инфузии. Более конкретно, антитело к HER2 можно применять в дозах, составляющих от примерно 0,05 мг антитела к HER2/кг веса тела до примерно 10 мг антитела к HER2/кг веса тела. Если применяют химиотерапевтическое средство, то его, как правило, вводят в известных дозах или необязательно в более низкой дозе, что может быть связано с совместным действием лекарственных средств или с отрицательными побочными действиями, связанными с применением химиотерапевтического средства. Для подготовки и разработки схем применения указанных химиотерапевтических средств можно использовать инструкции производителя или их может определять эмпирически практикующий специалист в данной области. Подготовка и схемы применения указанной химиотерапии описаны также в *Chemotherapy Service*, под ред. М.С. Perry, изд-во Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992.

Другие терапевтические схемы, которые можно объединять с антителом, включают (но, не ограничиваясь только ими) применение второго (третьего, четвертого и т.д.) химиотерапевтического(их) средства(в) (другими словами "коктейля" различных химиотерапевтических средств); другого моноклонального антитела; ингибирующего рост агента; цитотоксического агента; лекарственного средства, мишенью которого является EGFR; ингибитора тирозинкиназы; ангиангиогенного средства и/или цитокина и т.д. или любой их приемлемой комбинации.

Помимо указанных выше терапевтических схем пациента можно подвергать хирургическому вмешательству для удаления раковых клеток и/или лучевой терапии.

Можно получить изделие, которое содержит фармацевтическую композицию и инструкции по ее применению. Это изделие содержит контейнер. Приемлемыми контейнерами являются, например, банки, пузырьки (например, пузырьки с несколькими или двумя камерами), шприцы (например, шприцы с несколькими или двумя камерами) и лабораторные пробирки. Контейнер можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию и этикетку на нем или присоединенную к нему, на контейнере можно размещать указания по применению. Содержащий композицию контейнер может представлять собой флакон для многократного использования, который можно применять для повторных введений (например, от 2 до 6 введений) восстановленной композиции. Изделие может включать также дополнительные продукты, важные с коммерческой точки зрения или для потребителя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листовку-вкладыш в упаковке с инструкциями по применению.

Понятие "фармацевтическая композиция" относится к препарату в такой форме, которая обеспечивает эффективное проявление биологической активности действующего вещества и которая не содержит дополнительных компонентов, которые обладают неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому требуется вводить композицию. Указанные композиции являются стерильными.

"Стерильная" композиция является асептической или свободной от всех живых микроорганизмов и их спор.

"Стабильная" композиция представляет собой форму, в которой все входящие белки практически сохраняют их физическую стабильность, и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность при хранении при соответствующей температуре хранения, например при 2-8°C. Желательно, чтобы при хранении композиция практически сохраняла свою физическую и химическую стабильность, а также биологическую активность. Период хранения выбирают, как правило, на основе соответствующего периода хранения композиции. Кроме того, композиция должна обладать стабильностью после замораживания (например, до -70°C) и оттаивания композиции, например после 1, 2 или 3 циклов замораживания и оттаивания. В данной области известны различные аналитические методы измерения стабильности белков, и они обобщены, например, в: Peptide and Protein Drug Delivery, под ред. Vincent Lee, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, New York, 1991, сс. 247-301 и у Jones A. Adv. Drug Delivery Rev. 10, 1993, сс. 29-90. Стабильность можно оценивать при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Стабильность можно оценивать качественно и/или количественно разнообразными различными путями, включая оценку образования агрегатов (например, с помощью гель-фильтрации, путем измерения мутности и/или посредством визуальной оценки); путем оценки гетерогенности заряда с помощью катионообменной хроматографии или капиллярного зонального электрофореза; путем анализа аминоконцевой или карбоксиконцевой последовательности; масс-спектрометрическим анализом; анализом на основе ДСН-ПААГ для сравнения укороченного и интактного антитела; анализом на основе пептидного картирования (например, триптического или с помощью протеазы LYS-C); путем оценки биологической активности антитела или его способности связываться с антигеном и т.д. Нестабильность может предусматривать наличие одного или нескольких следующих признаков: агрегация, деамидирование (например деамидирование Asp), окисление (например окисление Met), изомеризация (например изомеризация Asp), отщепление/гидролиз/фрагментация (например, фрагментация шарнирной области), образование сукцинимидов, наличие неспаренного(ых) остатка(ов) цистеина, N-концевое удлинение, C-концевой процессинг, изменения гликозилирования и т.д. В контексте настоящего описания "деамидированное" моноклональное антитело представляет собой антитело, в котором один или несколько остатков аспарагина модифицированы, например, с образованием аспарагиновой кислоты или изоаспарагиновой кислоты, в результате посттрансляционной модификации.

Понятие "забуферивающий агент, обеспечивающий значение pH на уровне $5,5 \pm 2,0$ " относится к агенту, который препятствует изменению значения pH в содержащем его растворе благодаря действию водных в конъюгат кислотных/основных компонентов. Применяемый в композициях буфер может иметь значение pH от примерно 5,0 до примерно 7,0, или от примерно 5,0 до примерно 6,5, или от примерно 5,3 до примерно 5,8. Установлено, что наиболее приемлемым является значение pH примерно 5,5. Примерами забуферивающих агентов, которые могут контролировать значение pH в указанном диапазоне, являются ацетатный, сукцинатный, глюконатный, гистидиновый, цитратный, глицилглициновый и другие буферы на основе органических кислот.

"Гистидиновый буфер" содержит аминокислоту гистидин. Примерами гистидиновых буферов является хлорид гистидина, ацетат гистидина, фосфат гистидина, сульфат гистидина. Приведенный в примерах в качестве наиболее приемлемого гистидиновый буфер представляет собой буфер, содержащий хлорид гистидина. Такой включающий хлорид гистидина буфер получают титрованием L-гистидина (в виде твердого свободного основания) разбавленной соляной кислотой. В частности, гистидиновый буфер или буфер, содержащий хлорид гистидина, имеет значение pH $5,5 \pm 0,6$, более предпочтительно значение pH от примерно 5,3 до примерно 5,8 и наиболее предпочтительно имеет значение pH 5,5.

Понятие "изотонический" означает, что композиция имеет практически такое же осмотическое давление, что и человеческая кровь. Изотонические композиции, как правило, имеют осмотическое давление примерно от 250 до 350 мОсм. Изотоничность можно измерять с помощью осмометра давления пара или криоскопического осмометра (принцип действия которого основан на оценке понижения температуры замерзания).

В контексте настоящего описания понятие "сахарид" относится к соединению, которое имеет общую формулу $(C_nH_{2n}O)_n$, и его производным, включая моносахариды, дисахариды, трисахариды, полисахариды, сахараные спирты, редуцирующие сахара, нередуцирующие сахара и т.д.

В контексте настоящего описания примерами сахаридов являются глюкоза, сахароза, трегалоза, лактоза, фруктоза, мальтоза, декстран, глицерин, эритрит, арабит, силит, сорбит, маннит, меллибиоза, мелезитоза, раффиноза, маннотриоза, стахиоза, мальтоза, лактулоза, мальтулоза, глюцит, мальтит, лактит, изомальтулоза и т.д. В частности, композиции могут содержать нередуцирующий дисахарид в качестве стабилизатора, например сахарид, выбранный из группы, включающей трегалозу (например, в форме дигидрата α, α -трегалозы) и сахарозу.

В контексте настоящего описания понятие "поверхностно-активное вещество" относится к поверхностно-активному агенту, например неионогенному поверхностно-активному веществу. Примерами поверхностно-активных веществ являются полисорбат (например, полисорбат 20 и полисорбат 80); полксамер (например, полксамер 188); Тритон; додецилсульфат натрия (ДСН); лаурилсульфат натрия; октилгликозид натрия; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсульфобетанин; лаурил-, миристил-, ли-

нолеил- или стеарилсаркозин; линолеил-, миристил- или цетилбетаин лауроамидопропил-, кокаמידопропил-, линолеамидопропил-, миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилбетаин (например, лауроамидопропил); миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилдиметиламин; натрийметилкокоил- или динатрийметилолеилтаурат; и серии MONAQU AT™ (фирма Mopa Industries, Inc., Патерсон, шт. Нью-Джерси); полиэтилглицоль, полипропилглицоль и сополимеры этилен- и пропиленгликоля (например, Плуороники, PF68 и т.д.); и т.д., обнаружено, что полисорбат 20 (PS20) и полисорбат 80 (PS80) соответственно наиболее пригодны для включения в представленные в настоящем описании композиции.

В контексте настоящего описания понятие "антитело" используют в его наиболее широком смысле, и оно относится конкретно к полноразмерным моноклональным антителам, поликлональным антителам, мультиспецифическим антителам (например, биспецифическим антителам), образованным по меньшей мере из двух полноразмерных антител, и фрагментам антител, если они обладают требуемой биологической активностью.

В контексте настоящего описания понятие "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. из популяции антител, которые являются идентичными и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов, которые могут возникать при получении моноклонального антитела, такие варианты, как правило, присутствуют в небольших количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые включают различные антитела к различным детерминантам (эпитопам), мишенью каждого моноклонального антитела является одна детерминанта антигена. Помимо своей специфичности моноклональные антитела обладают тем преимуществом, что они не загрязнены другими иммуноглобулинами. Прилагательное "моноклональный" указывает на тот отличительный признак, что антитело получено из практически гомогенной популяции антител, и оно не подразумевает требования, что антитело должно быть получено каким-либо конкретным методом. Например, моноклональные антитела можно создавать с помощью метода гибридом, впервые описанного у Köhler и др., *Nature*, 256, 1975, с. 495, или их можно создавать методами рекомбинантной ДНК (см., например, US 4816567). "Моноклональные антитела" можно выделять также из фаговых библиотек антител с помощью методов, которые описаны у Clarkson и др., *Nature*, 352, 1991, сс. 624-628 и Marks и др., *J. Mol. Biol.*, 222, 1991, сс. 581-597.

"Фрагмент антитела" представляет собой часть полноразмерного антитела, в частности, содержит антигенсвязывающий центр или вариабельную область антитела. Примерами фрагментов антитела являются Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты; димерные антитела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагмента(ов) антител.

"Полноразмерное антитело" представляет собой антитело, которое содержит антигенсвязывающую вариабельную область и константную область (CL) легкой цепи и домены CH1, CH2 и CH3 тяжелой цепи. Домены константной цепи могут представлять собой имеющие нативные последовательности домены константной цепи (например, константные домены, имеющие человеческую нативную последовательность) или варианты их аминокислотной последовательности. В частности, полноразмерное антитело обладает одной или несколькими эффекторными функциями.

Понятие "вариант аминокислотной последовательности" антитела в контексте настоящего описания относится к антителу, аминокислотная последовательность которого отличается от последовательности основных видов антител. Как правило, варианты аминокислотной последовательности должны быть гомологичны по меньшей мере примерно на 70% последовательностям основных видов антител и предпочтительно должны быть гомологичны по меньшей мере примерно на 80%, более предпочтительно гомологичны по меньшей мере примерно на 90% последовательностям основных видов антител. Варианты аминокислотной последовательности несут замены, делеции и/или добавления в определенных положениях, находящихся внутри последовательностей, или в положениях, примыкающих к последовательностям основных видов антител. Примерами вариантов аминокислотной последовательности являются кислый вариант (например, деамидированный вариант антитела), основной вариант, антитело, удлиненное лидерной последовательностью (например, VHS-) на аминоконце одной или двух его легких цепей, антитело с C-концевым остатком лизина на одной или двух его тяжелых цепях и т.д., и они включают комбинации вариантов аминокислотных последовательностей тяжелых и/или легких цепей. Наибольший интерес представляет вариант антитела с удлиненной лидерной последовательностью на аминоконце одной или двух его легких цепей, необязательно содержащий также другие отличия в аминокислотной последовательности и/или в гликозилировании относительно основных видов антител.

В контексте настоящего описания понятие "вариант гликозилирования" относится к антителу с присоединенными к нему одним или несколькими углеводными фрагментами, которые отличаются от углеводных фрагментов, присоединенных к антителам основных видов. Примерами вариантов гликозилирования являются антитело, несущее олигосахаридную структуру G1 или G2 вместо олигосахаридной структуры G0, присоединенной к его Fc-области, антитело с одним или двумя углеводными фрагментами, присоединенными к одной или двум легким цепям, антитело, у которого отсутствует углевод, присоединенный к одной или двум тяжелым цепям антитела, и т.д. и комбинации вариацией гликозилирования. Кроме того, понятие "вариант гликозилирования" относится также к антителам со сконструирован-

ным гликозилированием, которые описаны, например, в EP 1331266 и USP 7517670.

Понятие "эффektorные функции" антитела относится к видам биологической активности, связанной с Fc-областью (с имеющей нативную последовательность Fc-областью или с Fc-областью, несущей вариант аминокислотной последовательности) антитела. Примерами эффektorных функций антитела являются связывание C1q; комплементзависимая цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора, BCR) и т.д.

В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей полноразмерные антитела можно разделять на различные "классы". Известно пять основных классов полноразмерных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них дополнительно подразделяют на "подклассы" (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные области тяжелых цепей, соответствующие различным классам антител, обозначают соответственно как α (альфа), δ (дельта), ϵ (эпсилон), γ (гамма) и μ (мю). Строение субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

В контексте настоящего описания понятие "биологическая активность" моноклонального антитела относится к способности антитела связываться с антигеном и обуславливать поддающийся измерению биологический ответ, который можно оценивать *in vitro* или *in vivo*. Указанная активность может представлять собой антагонистическую (например, если антитело представляет собой антитело к HER2) или агонистическую активность. В случае пертузумаба согласно одному из вариантов осуществления изобретения понятие "биологическая активность" относится к способности включенного в композицию антитела ингибировать пролиферацию клеточной линии человеческого рака молочной железы MDA-MB-175-VII.

Понятие "моноклональные антитела" в контексте настоящего описания относится, в частности, к так называемым химерным антителам, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, выведенным из конкретных видов или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, а остальная цепь(и) идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям антител, выведенным из других видов или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам указанных антител, если они обладают требуемой биологической активностью (US 4816567; и Morrison и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1984, сс. 6851-6855). Химерные антитела включают "приматизированные" антитела, которые содержат антигенсвязывающие последовательности переменных областей, выведенные из примата, кроме человека (например, обезьян Старого Света, человекообразных обезьян), и последовательности человеческих константных областей.

"Гуманизированные" формы антител видов кроме человека (например, грызунов), представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальные последовательности, выведенные из иммуноглобулина вида кроме человека. Основная часть гуманизированных антител соответствует человеческим иммуноглобулинам (антитело-реципиент), в которых остатки из гипервариабельного участка реципиента заменены на остатки из гипервариабельного участка антитела видов кроме человека (антитело-донор), таких как мыши, крысы, кролики или приматы кроме человека, обладающие требуемой специфичностью, аффинностью и активностью. В некоторых случаях остатки каркасного участка (FR) человеческого иммуноглобулина заменяют на соответствующие остатки иммуноглобулина видов кроме человека. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не присутствуют в антителе-реципиенте или антителе-доноре. Эти модификации осуществляют для дальнейшего усовершенствования характеристик антитела. В целом, гуманизированное антитело должно содержать практически полностью по меньшей мере одну и, как правило, две переменные области, в которых все или практически все гипервариабельные петли соответствуют петлям иммуноглобулина видов кроме человека и все или практически все FR имеют последовательность человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно может содержать также по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Более подробно см. у Jones и др., Nature 321, 1986, сс. 522-525; Riechmann и др., Nature 332, 1988, сс. 323-329 и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 1992, сс. 593-596.

К гуманизированным антителам к HER2 относятся huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 и huMAb4D5-8 или трастузумаб (HERCEPTIN™), которые представлены в табл. 3 US 5821337; гуманизированное антитело 520C9 (WO 93/21319) и гуманизированное антитело 2C4, например пертузумаб, дополнительное описание которых представлено ниже.

В контексте настоящего описания понятия "трастузумаб", "HERCEPTIN™" и "huMAb4D5-8" относятся к антителу к эпитопу 4D5 HER2. Указанное антитело предпочтительно содержит аминокислотные последовательности легких и тяжелых цепей, представленные, например, на фиг. 14 в WO 2006/044908.

"Эпитоп 4D5" представляет собой область внеклеточного домена HER2, с которой связываются антитело к 4D5 (ATCC CRL 10463) и трастузумаб. Этот эпитоп примыкает к трансмембранному домену

HER2 и находится внутри домена IV HER2. Для скрининга антител, которые связываются с эпитопом 4D5, можно осуществлять стандартный анализ перекрестной блокады, описанный в *Antibodies, A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, под ред. Harlow и David Lane, 1988. В альтернативном варианте можно осуществлять эпитопное картирование для оценки того, связывается ли антитело с эпитопом 4D5 HER2 (например, любой один или несколько остатков в области, простирающейся примерно от остатка 529 до примерно остатка 625 включительно, HER2). "Эпитоп 7C2/7F3" представляет собой область на аминоконце внутри домена I внеклеточного домена HER2, с которой связываются антитела 7C2 и/или 7F3. Для скрининга антител, которые связываются с эпитопом 7C2/7F3, можно осуществлять стандартный анализ перекрестной блокады, описанный в *Antibodies, A Laboratory Manual*, под ред. Harlow и David Lane, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. В альтернативном варианте можно осуществлять эпитопное картирование для оценки того, связывается ли антитело с эпитопом 7C2/7F3 HER2 (например, любой один или несколько остатков в области, простирающейся примерно от остатка 22 до примерно остатка 53 HER2).

В контексте настоящего описания понятия "пертузумаб" и "rhMAb 2C4" относятся к антителу, которое связывается с эпитопом 2C4, и предпочтительно содержит аминокислотные последовательности переменных областей легких и тяжелых цепей, описанные в WO 2006/044908, более предпочтительно эти понятия относятся к гуманизированной версии 574 антитела 2C4, которая представлена на фиг. 2 в WO 2006/044908.

"Эпитоп 2C4" представляет собой область внеклеточного домена HER2, с которой связывается антитело 2C4. Для скрининга антител, которые связываются с эпитопом 2C4, можно осуществлять стандартный анализ перекрестной блокады, описанный в *Antibodies, A Laboratory Manual*, под ред. Harlow и David Lane, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. В альтернативном варианте можно осуществлять эпитопное картирование для оценки того, связывается ли антитело с эпитопом 2C4 HER2. Эпитоп 2C4 содержит остатки из домена II во внутриклеточном домене HER2. 2C4 и пертузумаб связываются с внеклеточным доменом HER2 в области стыка доменов I, II и III (Franklin и др., *Cancer Cell* 5, 2004, сс. 317-328).

"Ингибирующий рост агент" в контексте настоящего описания относится к соединению или композиции, которое/которая ингибирует рост клетки, прежде всего экспрессирующей HER раковой клетки, либо *in vitro*, либо *in vivo*. Так, ингибирующий рост агент может представлять собой агент, который значительно снижает процент экспрессирующих HER клеток на S-фазе. Примерами ингибирующих рост агентов являются агенты, которые блокируют этапы развития клеточного цикла (отличные от S-фазы), например агенты, индуцирующие приостановку G1-фазы и приостановку M-фазы. Классическими блокаторами M-фазы являются алкалоиды винка (барвинка) (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы торо II, такие как доксорубицин, эпирубицин, даунорубицин, этопозид и блеомицин. Те агенты, которые приостанавливают G1-фазу, распространяют свое действие также на приостановку S-фазы, например, ДНК-алкилирующие агенты, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлоретамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ага-С. Дополнительную информацию можно почерпнуть из следующей публикации: "The Molecular Basis of Cancer", под ред. Mendelsohn и Israel, глава 1, озаглавленная "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", Murakami и др. (изд-во WB Saunders: Philadelphia, 1995), см., прежде всего с. 13.

Примерами "ростингибирующих" антител являются антитела, которые связываются с HER2 и ингибируют рост раковых клеток, для которых характерна сверхэкспрессия HER2. Предпочтительные ростингибирующие антитела к HER2 ингибируют рост опухолевых клеток молочной железы SK-BR-3 в клеточной культуре больше чем на 20% и предпочтительно больше чем на 50% (например, от примерно 50% до примерно 100%) при концентрации антитела примерно от 0,5 до 30 мкг/мл, когда ингибирование роста определяют через 6 дней после обработки клеток линии SK-BR-3 антителом (см. US 5677171, выданный 14 октября 1997 г.). Предпочтительным ростингибирующим антителом является гуманизированный вариант мышинового моноклонального антитела 4D5, например трастузумаб.

Понятие "лечение" относится как к терапевтическим, так и профилактическим или превентивным мерам. К нуждающимся в лечении индивидуумам относятся как уже страдающие заболеванием индивидуумы, так и индивидуумы, у которых требуется предупреждать болезнь. Таким образом, пациент, подлежащий лечению, может представлять собой пациента, у которого заболевание уже диагностировано, или который может быть предрасположен, или который обладает чувствительностью к заболеванию.

Понятие "цитотоксический агент" в контексте настоящего описания относится к субстанции, которая ингибирует или предотвращает функцию клеток и/или вызывает разрушение клеток. Под понятие подпадают радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³ Bi²¹², P³² и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или обладающие ферментативной активностью токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты. "Химиотерапевтическое средство" представляет собой химическое соединение, которое можно применять для лечения рака. Примерами химиотерапевтических средств являются алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXANTM); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие

как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, такие как алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилломеларнин; ацетогенины (прежде всего буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARENOL™); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновая кислота; камптотецин (включая синтетические аналоги топотекан (HYCAMTIN™), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR™), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновая кислота; тенипозид; криптофицины (прежде всего криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотные аналоги горчичного газа, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлоретамин, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфанид, урациловый аналог горчичного газа; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединновые антибиотики (например, калихеамицин, прежде всего калихеамицин гамма 11 и калихеамицин омега 11, см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33, 1994, сс. 183-186); динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; а также неокарциностатина хромофор и родственные хромопротеиновые энединновые антибактериальные хромофоры), аклаиномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицины, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубинин, деторубинин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубинин (ADRIAMYCIN™), морфолинодоксорубинин, цианморфолинодоксорубинин, 2-пирролинодоксорубинин, доксорубинин-HCl для инъекций в виде липосом (DOXIL™), липосомальный доксорубинин TLC D-99 (MYOCET™), пэгилированный липосомальный доксорубинин (CAELYX™) и дезоксидоксорубинин), эпирубицин, эзорубинин, идарубинин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пуромидин, квеламицин, родорубинин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубинин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин GEMZAR™, тегафур (UFTORAL™), капецитабин (XELODA™), эпотилон и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; антиадренальные средства, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; наполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубинин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSKL™ (фирма JHS Natural Products, Юджин, шт. Орегон); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (прежде всего токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангвидин); уретан; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); тиопета; таксоид, например, паклитаксел (TAXOL™), композиция паклитаксела, сконструированная на основе наночастиц альбумина (ABRAXANE™) и доцетаксел (TAXOTERE™); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин, оксалиптин и карбоплатин; алкалоиды винка, которые препятствуют полимеризации тубулина при образовании микротрубочек, включая винбластин (VELBAN™), винкрестин (ONCOVIN™), виндезин (ELDISINE™), FILDESIN™ и винорелбин (NAVELBINE™); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; леуковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (TARGRETIN™); бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS™ или OSTAC™), этидронат (DIDROCAL™), NE- 58095, золедроновая кислота/золедронат (ZOMETA™), алендронат (FOSAMAJX™), памидронат (AREDIA™), тилудронат (SKELID™) или ризедронат (ACTONEL™); троксацитабин (1,3-диоксолановый аналог нуклеозида цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, прежде всего, ингибирующие экспрессию генов путей передачи сигналов аномальной пролиферации клеток, такие, например, как ПКС-альфа, Raf, H-Ras, и рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERA-TOPRE™ и вакцины для генной терапии, например вакцина ALLOVECTIN™, вакцина LEUVECTIN™ и вакцина VAXID™; ингибитор топоизомеразы 1 (например, LURTOTECAN™); gmRH (например, ABA-RELIX™); BAY439006 (сорафениб; фирма Bayer); SU-11248 (фирма Pfizer); перифозин, ингибитор COX-2 (например, целекоксиб или эторикоксиб), ингибитор протеосом (например, PS341); бортезомиб (VELCADE™); CCI-779; типифарниб (R1 1577); орафениб, ABT510; ингибитор Vcl-2, такой как облимерсен натрия (GENASENSE™); пиксантрон; ингибиторы EGFR (см. определение ниже); ингибиторы тирозинкиназ (см. определения ниже); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого

из вышеуказанных средств; а также комбинации двух или большего количества указанных средств, такие как CHOP (сокращенное обозначение комбинированной терапии на основе циклофосфида, доксорубина, винкристина и преднизолона) и FOLFOX (сокращенное обозначение схемы лечения на основе оксалиплатина (ELOXATIN™) в сочетании с 5-ФУ и леуковорином).

Под указанное определение подпадают также антигормональные средства, действие которых направлено на регулирование или ингибирование гормонального воздействия на опухоли, такие как антиэстрогены, отличающиеся смешанным агонистическим/антагонистическим профилем, такие как тамоксифен (NOLVADEX™), 4-гидрокситамоксифен, торемифен (FARESTON™), идоксифен, дролоксифен, ралоксифен (EVTSTA™), триоксифен, кеоксифен, и селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM), такие как SERM3; "чистые" антиэстрогены, не обладающие агонистическими свойствами, такие как фулвестрант (FASLODEX™) и EM800 (каждый из указанных агентов может блокировать димеризацию эстрогенного рецептора (ER), ингибировать ДНК-связывание, повышать круговорот ER и/или подавлять уровни ER); ингибиторы ароматазы, включая стероидные ингибиторы ароматазы, такие как форместан и эксеместан (AROMASIN™), и нестероидные ингибиторы ароматазы, такие как анастразол (ARIMIDEX™), летрозол (FEMARA™) и аминоклутетимид, и другие ингибиторы ароматазы, такие как ворозол (RIVISOR™), мегестрола ацетат (MEGASE™), фадрозол, имидазол; агонисты релизинг-гормона лютеинизирующего гормона, такие как леупролид (LUPRON™ и ELIGARD™), гозерелин, бусерелин и триптерелин; половые стероиды, включая прогестины, такие как мегестрола ацетат и медроксипрогестерона ацетат, эстрогены, такие как диэтилстилбестрол и премарин, и андрогены/ретиноиды, такие как флуоксместрон, полностью трансретиноевая кислота и фенретидин; онапристон; антипрогестероны; понижающие регуляторы эстрогенового рецептора (ERD); антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; тестолактон; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных средств; а также комбинации двух или большего количества указанных средств.

В контексте настоящего описания понятие "лекарственное средство, мишенью которого является EGFR" относится к терапевтическому средству, которое связывается с EGFR и необязательно ингибирует активацию EGFR. Примерами таких средств являются антитела и низкомолекулярные соединения, которые связываются с EGFR. Примерами связывающихся с EGFR антител являются MAб 579 (ATCC CRL HB 8506), MAб 455 (ATCC CRL HB8507), MAб 225 (ATCC CRL 8508), MAб 528 (ATCC CRL 8509) (см. US 4943533 на имя Mendelsohn и др.) и их варианты, такие как химеризованное антитело 225 (C225 или цетуксимаб; ERBITUX™) и реконструированное человеческое антитело 225 (H225) (см. WO 96/40210 на имя фирмы Imclone Systems Inc.); антитела, которые связываются с мутантом типа II EGFR (US 5212290); гуманизированные и химерные антитела, которые связываются с EGFR, описанные в US 5891996; и человеческие антитела, которые связываются с EGFR, такие как ABX-EGF (см. WO 98/50433 на имя фирмы Abgenix). Антитело к EGFR можно конъюгировать с цитотоксическим агентом с получением иммуноконъюгата (см., например, EP-A-659439 на имя фирмы Merck Patent GmbH). Примерами низкомолекулярных соединений, которые связываются с EGFR, являются ZD 1839 или gefитиниб (IRESSA™; фирма Astra Zeneca), CP-358774 или эрлотиниб×HCl (TARCEVA™ фирмы Genentech/Roche/OSI) и AG1478, AG1571 (SU 5271; фирма Sugen).

"Ингибитор тирозинкиназы" представляет собой молекулу, которая ингибирует в определенной степени тирозинкиназную активность тирозинкиназы, например, рецептора HER. Примерами указанных ингибиторов являются отмеченные в предыдущем разделе лекарственные средства, мишенью которых является EGFR, а также низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы HER2, такой как TAK1 65, поступающий в продажу от фирмы Takeda, ингибиторы HER двойного действия, такие как EKB-569 (поступает в продажу от фирмы Wyeth), который главным образом связывается с EGFR, но ингибирует клетки, в которых происходит сверхэкспрессия как HER2, так и EGFR, GW572016 (поступает в продажу от фирмы Glaxo), оральный ингибитор тирозинкиназ HER2 и EGFR, и PKI-166 (поступает в продажу от фирмы Novartis); пан-ингибиторы HER, такие как канертиниб (CI-1033; фирма Pharmacia); ингибиторы Raf-1, такие как антисмысловый агент ISIS-5132, поступающий в продажу от фирмы ISIS Pharmaceuticals, который ингибирует передачу сигналов Raf-1; ингибиторы тирозинкиназ (TK), мишенью которых не является HER, такие как имитиниба мезилат (Gleevec™), поступающий в продажу от фирмы Novartis; ингибитор регулируемой внеклеточными сигналами киназы I из семейства MARK, такой как CI-1040 (поступает в продажу от фирмы Pharmacia); хиназолины, такие как PD 153035, 4-(3-хлоранилино)хиназолин; пиримидопиримидины; пирролопиримидины, такие как CGP 59326, CGP 60261 и CGP 62706; пиразолопиримидины, 4-(фениламино-7H-пирроло[2,3-d]пиримидины; куркумин (диферулоилметан, 4,5-бис(4-фторанилино)фталимид); тирфостины, содержащие нитротифеновые фрагменты; PD-0183805 (фирма Warner-Larner); антисмысловые молекулы (например, связывающиеся с кодирующей HER нуклеиновой кислотой); хиноксалины (US 5804396); тирфостины (US 5804396); ZD6474 (фирма Astra Zeneca); PTK-787 (фирма Novartis/Schering AG); пан-ингибиторы HER, такие как CI-1033 (фирма Pfizer); аффинитак (ISIS 3521; фирма Isis/Lilly); PKI 166 (фирма Novartis); GW2016 (фирма Glaxo Smith-Kline); CI-1033 (фирма Pfizer); EKB-569 (фирма Wyeth); семаксиниб (фирма Sugen); ZD6474 (фирма AstraZeneca); PTK-787 (фирма Novartis/Schering AG); INC-IC11 (фирма Imclone); или агенты, описанные в

любом из следующих опубликованных патентов: US 5804396; WO 99/09016 (на имя фирмы American Cyanamid); WO 98/43960 (на имя фирмы American Cyanamid); WO 97/38983 (на имя фирмы Warner Lambert); WO 99/06378 (на имя фирмы Warner Lambert); WO 99/06396 (на имя фирмы Warner Lambert); WO 96/30347 (на имя фирмы Pfizer, Inc); WO 96/33978 (на имя фирмы Zeneca); WO 96/3397 (на имя фирмы Zeneca) и WO 96/33980 (на имя фирмы Zeneca).

"Антиангиогенное средство" представляет собой соединение, которое блокирует или оказывает определенное интерферирующее воздействие на развитие кровеносных сосудов. Антиангиогенный фактор может представлять собой, например, низкомолекулярное соединение или антитело, которое связывается с фактором роста или рецептором фактора роста, участвующим в ускорении ангиогенеза. Понятие "цитокин" является родовым названием белков, которые высвобождаются одной клеточной популяцией и оказывают воздействие на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами указанных цитокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. К цитокинам относятся такие ростовые гормоны, как человеческий гормон роста, N-метионилированный человеческий гормон роста и бычий гормон роста, гормон парашитовидных желез, тироксин, инсулин, проинсулин, релаксин; прорелаксин, гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреотропный гормон (ТТГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ), гепатоцитарный фактор роста; фактор роста фибробластов, пролактин, плацентарный лактоген, фактор некроза опухолей α и β , ингибирующее вещество Мюллера, мышинный гонадотропинассоциированный пептид, ингибин; активин, сосудистый эндотелиальный фактор роста, интегрин, тромбопоэтин (ТРО), факторы роста нервов, такие как NGF- β , тромбоцитарный фактор роста; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF- α и TGF- β , инсулиноподобный фактор роста-I и -II, эритропоэтин (ЕРО), остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон- α , - β и - γ , колониеммулирующие факторы (CSF), такие как CSF макрофагов (M-CSF), CSF гранулоцитов-микрофагов (GM-CSF) и CSF гранулоцитов (G-CSF), интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, фактор некроза опухолей, такой как TNF- α или TNF- β , и другие полипептидные факторы, включая LIF (фактор, ингибирующий миграцию лейкоцитов) и набор лигандов (KL). В контексте настоящего описания понятие "цитокин" относится к белкам, выведенным из встречающихся в естественных условиях источников или из рекомбинантной клеточной культуры, и к биологически активным эквивалентам нативных последовательностей цитокинов.

Понятие "эффективное количество" относится к количеству, обеспечивающему требуемое действие. В случае присутствия фермента гиалуронидазы в качестве ингредиента композиции эффективное количество представляет собой количество, необходимое для повышения диспергирования и абсорбции вводимого совместно антитела к HER2, так, чтобы антитело к HER2 могло оказывать указанное выше терапевтическое действие. В случае фармацевтической лекарственной субстанции оно представляет собой количество действующего вещества, эффективное в отношении лечения заболевания у пациента. Когда заболевание представляет собой рак, эффективное количество лекарственного средства может снижать количество раковых клеток; уменьшать размер опухоли; ингибировать (т.е. в определенной степени замедлять и предпочтительно прекращать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. в определенной степени замедлять и предпочтительно прекращать) метастазирование опухоли; ингибировать в определенной степени рост опухоли и/или облегчать в определенной степени один или несколько ассоциированных с раком симптомов. Для того чтобы лекарственное средство могло в определенной степени предупреждать рост и/или уничтожать существующие раковые клетки, оно должно обладать цитостатическим и/или цитотоксическим действием. Эффективное количество может удлинять период жизни без прогрессирующего развития заболевания, приводить к целевому ответу на лечение (включая частичный ответ, PR, или полный ответ, CR), повышает общую продолжительность жизни и/или облегчать один или несколько симптомов рака.

Антитело, которое включают в состав композиции предпочтительно является практически чистым и желателно практически гомогенным (т.е. не содержит белков-загрязнителей и т.д., при этом фермент гиалуронидаза в композиции не рассматривается как белок-загрязнитель моноклонального антитела к HER2). Понятие "практически чистое" антитело означает, что оно входит в композицию антитела в количестве, составляющем по меньшей мере примерно 90 мас.% в пересчете на общую массу композиции, предпочтительно по меньшей мере примерно 95 мас.%. "Практически гомогенное" антитело означает, что оно входит в композицию антитела в количестве, составляющем по меньшей мере примерно 99 мас.% в пересчете на общую массу композиции.

Для лучшего понимания изобретения оно проиллюстрировано с помощью представленных ниже примеров. Однако их не следует рассматривать в качестве ограничивающих объем изобретения. Все процитированные литературные и патентные публикации включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Примеры дополнительно проиллюстрированы с помощью прилагаемых чертежей, на которых продемонстрированы следующие экспериментальные результаты:

на фиг. 1 - данные о стабильности композиций А-Е (см. табл. 1, ниже) после 8 недель хранения, ка-

сающиеся низкомолекулярных (LMW) субстанций, которые получали с помощью гель-фильтрации - ЖХВР. Как видно из чертежа, содержащие PS20 композиции А, В и Д отличались несколько более высокой стабильностью по сравнению с содержащими PS80 композициями Б, Г и Е при хранении при 30°C;

на фиг. 2 - данные о стабильности композиций А-Е (см. табл. 1, ниже) после 8 недель хранения, касающиеся высокомолекулярных (HMW) субстанций, которые получали с помощью гель-фильтрации - ЖХВР. Как видно из чертежа, в содержащих трегалозу без добавления хлорида натрия композициях А и Б обнаружены меньшие количества HMW после хранения в течение 8 недель;

на фиг. 3 - данные о стабильности после 8 недель хранения, касающиеся мутности. Как видно из чертежа, для содержащих трегалозу композиций форм А и Б характерна невысокая мутность; в то время как содержащие NaCl композиции В-Е отличались существенно более высокой мутностью. Для композиций Д и Е, которые содержали и трегалозу, и NaCl, характерна промежуточная степень мутности. Никакого значимого повышения мутности не обнаружено при хранении в течение 8 недель;

на фиг. 4 - данные о вязкости жидких композиций А-Е (см. табл. 1, ниже) при измерении с помощью конусно-пластинчатого вискозиметра при температуре окружающей среды. Все композиции имели низкую вязкость, позволяющую использовать их для подкожной инъекции.

Примеры

Предлагаемые в изобретении содержащие антитело к HER2 композиции, предназначенные для подкожного введения, создавали с учетом представленных ниже экспериментальных результатов с использованием общей методологии получения и аналитических методов и анализов, которые изложены далее.

А) Получение входящих в композицию компонентов.

Трастузумаб получали с помощью методов, хорошо известных для получения рекомбинантных белков. Генетически сконструированную линию клеток яичника китайского хомячка (CHO), для создания которой использовали метод, описанный в EP-B-590058, размножали в культуре клеток из мастер-банка клеток. Из жидкой культуры клеток собирали моноклональное антитело трастузумаб и очищали с помощью основанной на применении иммобилизованного белка А аффинной хроматографии, катионообменной хроматографии (например, SP-Сефароза FF), фильтрации для удаления вирусных загрязнителей (например, используя ПВДФ-мембрану (поступает в продажу от фирмы Milipore под названием Viresolve-фильтры), с последующей анионообменной хроматографией (например, Q-Сефароза FF) и ультрафильтрацией/диафильтрацией. Для приготовления композиций, представленных в этих примерах, трастузумаб применяли в концентрации примерно 100 мг/мл в 20 мМ гистидиновом буфере, значение pH примерно 6,0.

гHuPH20 получали с помощью методов, хорошо известных для получения рекомбинантных белков. Этот процесс начинали с оттаивания клеток из рабочего банка клеток (WCB) или мастер-банка клеток (MCB) и размножали в культуре клеток в сериях вращающихся колб с последующим размножением в биореакторе. После завершения стадии получения жидкую клеточную культуру осветляли фильтрацией и затем обрабатывали растворителем/детергентом для инактивации вирусов. Затем белок очищали путем осуществления серий процессов хроматографии на колонках для удаления примесей, связанных с осуществлением процесса и связанных с продуктом. Осуществляли стадию фильтрации вирусов и затем полученную после фильтрации партию продукта концентрировали в конечном буфере: 10 мг/мл гHuPH20 в 20 мМ L-гистидин/HCl-буфере, pH 6,5, 130 мМ NaCl, 0,05% (мас./об.) полисорбата 80. Партию гHuPH20 хранили при температуре ниже -70°C.

Другие эксципиенты, применяемые в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, широко используют на практике и известны специалисту в данной области. Поэтому нет необходимости обсуждать их подробно.

Предлагаемые в изобретении жидкие композиции лекарственного средства, предназначенные для подкожного введения, создавали согласно описанному ниже методу.

Пример 1. Приготовление жидких композиций.

Для приготовления жидких композиций трастузумаба осуществляли обмен буфера на буфер для диафильтрации, содержащий требуемую буферную композицию, и при необходимости осуществляли концентрирование путем диафильтрации до получения концентрации антитела примерно 150 мг/мл. После завершения процедуры диафильтрации к раствору антитела добавляли эксципиенты (например, трегалозу, гHuPH20) в виде маточных растворов. Затем добавляли поверхностно-активное вещество в виде 50-200-кратного маточного раствора. И, наконец, концентрацию белка доводили буфером до достижения конечной концентрации трастузумаба, составляющей примерно 110, 120 или 130 мг/мл, указанной ниже для конкретных композиций.

Все композиции стерилизовали фильтрацией через 0,22 мкм фильтры с низкой способностью связывать белки и фильтровали в асептических условиях в стерильные 6-миллилитровые стеклянные пипетки, снабженные крышками ETE (сополимер этилена и тетрафторэтилена) резиновыми пробками и зажимными алюминиевыми крышками. Объем заполнения составлял примерно 3,0 мл. Эти композиции хранили в различных климатических условиях (5, 25 и 30°C) в течение различных интервалов времени и подвергали стрессу путем встряхивания (1 неделя с частотой встряхивания 200 мин при 5 и 25°C) и стрессу методом замораживания-оттаивания. Образцы анализировали до и после воздействия указанных

вариантов стресса с помощью следующих аналитических методов:

- 1) УФ-спектрофотометрия;
- 2) гель-фильтрация (SEC);
- 3) ионообменная хроматография (ИЕС);
- 4) определение мутности раствора;
- 5) определение видимых частиц и
- 6) определение активности гНuPH20.

УФ-спектроскопию, применяемую для определения содержания белков, осуществляли с использованием УФ-спектрофотометра Perkin Elmer X35 при диапазоне длин волн от 240 до 400 нм. Образцы "чистого" белка разводили до концентрации примерно 0,5 мг/мл с помощью соответствующего данной композиции буфера. Концентрацию белка рассчитывали согласно уравнению 1

$$= \frac{A(280) - A(320) \times \phi. \text{ разв.}}{\varepsilon \left(\frac{\text{см}^2}{\text{мг}} \right) \times d(\text{см})}$$

Уравнение 1: Содержание белка

Абсорбцию УФ-света при 280 нм корректировали с учетом рассеяния света при 320 нм и умножали на фактор разведения (ф. разв.), который определяли на основе взвешенных масс и плотностей "чистого" образца и буфера для разведения. Числитель делили на произведение длины пути кюветы (d) на коэффициент экстинкции (ε).

Для обнаружения растворимых высокомолекулярных субстанций (агрегаты) и низкомолекулярных продуктов гидролиза (LMW) в композициях применяли гель-фильтрацию (SEC). Метод осуществляли с помощью устройства Waters Alliance 2695 HPLC с детектором двойной абсорбции типа Waters W2487, снабженного двумя расположенными в ряд колонками размером 4,6×300 TosoHaas TSK Gel SuperSW3000. Продукты, представляющие собой интактные мономеры, агрегаты и продукты гидролиза разделяли с применением изократического профиля элюции, используя 50 мМ фосфат натрия, 420 мМ перхлорат натрия, pH 7,0 в качестве подвижной фазы, и осуществляли обнаружение при длине волны 280 нм.

Ионообменную хроматографию (ИЕС) осуществляли для обнаружения продуктов химического расщепления, изменяющих чистый заряд трастузумаба в композициях. Для этой цели трастузумаб расщепляли карбоксипептидазой В. Для осуществления метода использовали приемлемое устройство для ЖХВР, снабженное УФ-детектором (обнаружение при длине волны 214 нм), аналитическую катионообменную колонку Dionex ProPac™ WCX-10 (4×250 мм). В качестве подвижных фаз А и Б использовали соответственно 10 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,5 в H₂O и 10 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,5 и 100 мМ NaCl со скоростью потока 0,8 мл/мин.

Для оценки мутности опалесценцию определяли в FTU (единица мутности по формазину), используя турбидиметр HACH 2100AN при комнатной температуре.

В образцах анализировали присутствие видимых частиц с помощью устройства для визуальной оценки Seidenader V90-T.

Анализ *in vitro* фермента гиалуронидазы гНuPH20 использовали в качестве анализа активности. Этот анализ основан на образовании нерастворимого осадка при связывании гиалуронана (гиалуронат натрия) с катионным осадителем. Активность фермента определяли путем инкубации гНuPH20 с применяемым в качестве субстрата гиалуронаном и последующего осаждения нерасщепленного гиалуронана с помощью подкисленного сывороточного альбумина (лошадиная сыворотка). Мутность оценивали при длине волны 640 нм, и снижение мутности в результате активности фермента в отношении субстрата гиалуронана использовали в качестве меры ферментативной активности. Процедуру осуществляли с использованием стандартной кривой, созданной на основе оценки разведений стандартного референс-образца гНuPH20, и активность образца определяли на основе этой кривой.

Другие эксперименты осуществляли с использованием следующих вариаций:

- вариации значений pH от примерно 5,0 до примерно 6,0,
- вариации содержания белка от примерно 110 мг/мл до примерно 130 мг/мл,
- вариации содержания поверхностно-активного вещества от примерно 0,02% до примерно 0,06%,
- вариации концентрации стабилизатора (метионина) от примерно 5 мМ до примерно 15 мМ.

Составы и результаты определения стабильности содержащих в качестве лекарственного продукта антитело к HER-2 жидких композиций (композиции А-III) представлены ниже в табл. 1, в которой использованы следующие сокращения: Ffr - свободна от частиц; effer - практически свободна от частиц; wafp - содержит небольшое количество частиц; F/T - замораживание/оттаивание; Skg - встряхивание; nd - не определяли.

Указанные представленные ниже композиции свидетельствуют о том, что можно получать жидкие композиции с высокими концентрациями двух различных белков. Указанные композиции можно получать более легко и с меньшими затратами по сравнению с лифилизированными композициями. Кроме того, с указанными композициями проще обращаться, поскольку отсутствует необходимость в растворении лиофилизированного конечного продукта (восстановление) (являются готовыми к применению).

Установлено, что композиции, указанные в табл. 1, 3 и 4, также пригодны для получения высококонцентрированной стабильной фармацевтической композиции обладающих фармацевтической активностью антител к HER2, в которой отсутствует фермент гиалуронидаза. Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения являются также композиции, содержащие указанные ингредиенты, но в которых отсутствует фермент гиалуронидаза.

Таблица 1

Данные о составе и стабильности содержащих в качестве лекарственного продукта антитело к HER-2 жидких композиций, предлагаемых в изобретении.

Композиция А представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/НСI, рН 5,5, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 10 мМ метионин, 0,04% полисорбат 20, 12000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	Начало	111	0,4	98,9	0,7	60	15	10	5,0	ffp	13613
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,4	98,7	0,9	nd	nd	nd	5,2	ffp	13775
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,4	98,7	0,9	60	11	12	5,7	ffp	12053
F/T	(5 циклов)	nd	0,4	98,7	0,9	nd	nd	nd	6,0	effp	12558
5°C	8 недель	105	0,4	98,5	1,1	60	15	11	4,8	ffp	13204
	21 неделя	nd	0,4	98,7	0,8	62	12	11	5,3	ffp	14940
	36 недель	nd	0,4	98,7	0,8	59	11	12	3,8	ffp	12613
25°C	8 недель	106	0,5	98,3	1,2	53	8	19	4,7	ffp	12176
	21 неделя	nd	0,6	97,7	1,7	42	7	26	5,2	ffp	13976
	36 недель	nd	0,7	97,2	2,1	33	7	34	3,8	ffp	12348
30°C	8 недель	105	0,6	97,8	1,6	45	6	26	4,4	ffp	13294
	21 неделя	107	0,8	96,3	2,9	33	6	25	5,5	ffp	nd

Композиция Б представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/НСI, рН 5,5, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 10 мМ метионин, 0,06% полисорбат 80, 12000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	Начало	111	0,4	98,9	0,7	59	15	10	4,4	ffp	13293
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,4	98,7	0,9	nd	nd	nd	5,2	ffp	13530
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,4	98,7	0,8	61	12	12	5,2	ffp	9390
F/T	(5 циклов)	nd	0,4	98,7	0,9	nd	nd	nd	5,5	ffp	12532
5°C	8 недель	109	0,4	98,7	0,9	60	15	11	5,1	ffp	13508
	21 неделя	nd	0,5	98,8	0,8	nd	nd	nd	5,3	ffp	nd
	36 недель	nd	0,4	98,8	0,8	nd	nd	nd	4,5	ffp	nd
25°C	8 недель	109	0,5	98,2	1,3	53	8	19	4,6	ffp	nd
	21 неделя	nd	0,7	97,6	1,8	nd	nd	nd	5,2	effp	nd
	36 недель	nd	0,8	97,1	2,1	nd	nd	nd	5,3	ffp	nd
30°C	8 недель	109	0,6	97,7	1,7	45	6	26	4,8	ffp	13394
	21 неделя	107	0,9	96,2	2,9	nd	nd	nd	5,3	ffp	nd

Композиция В представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/НСI, рН 5,5, 130 мМ хлорид натрия, 10 мМ метионин, 0,04% полисорбат 20, 12000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	Начало	129	0,5	98,8	0,7	59	15	10	24,2	ffp	12355
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,5	98,6	0,9	Nd	nd	nd	26,0	ffp	13123
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,5	98,5	0,9	60	12	11	25,3	ffp	12209
F/T	(5 циклов)	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	24,8	ffp	12576
5°C	8 недель	126	0,5	98,7	0,8	60	15	11	25,4	ffp	12463
	21 неделя	nd	0,6	98,4	1,0	62	13	9	23,6	ffp	15409
	36 недель	nd	0,6	98,6	0,8	59	12	12	26,3	ffp	13218
25°C	8 недель	125	0,7	98,0	1,3	54	9	18	25,0	ffp	13038
	21 неделя	nd	0,9	97,5	1,6	42	9	22	24,3	ffp	14972
	36 недель	nd	1,0	97,0	2,1	32	9	31	25,7	ffp	12028
30°C	8 недель	125	0,8	97,6	1,6	46	8	25	23,0	ffp	12751
	21 неделя	125	1,2	96,3	2,6	32	8	29	25,7	ffp	nd

Композиция Г представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл

трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,5, 130 мМ хлорид натрия, 10 мМ метионин, 0,06% полисорбат 80, 12000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	128	0,4	98,9	0,7	59	15	10	25,1	ffp	15178
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,5	98,6	0,9	nd	Nd	nd	24,1	effp	12201
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,6	98,5	0,9	60	12	11	25,4	effp	8311
F/T	(5 циклов)	nd	0,5	98,6	0,9	nd	Nd	nd	24,8	effp	11996
5°C	8 недель	125	0,5	98,7	0,8	60	15	11	25,0	ffp	13238
	21 неделя	nd	0,6	98,5	1,0	nd	Nd	nd	24,3	ffp	nd
	36 недель	nd	0,6	98,6	0,8	nd	Nd	nd	26,1	ffp	nd
25°C	8 недель	125	0,7	98,1	1,2	54	9	18	23,4	ffp	12661
	21 неделя	nd	0,9	97,3	1,8	nd	Nd	nd	24,5	ffp	nd
	36 недель	nd	1,1	96,8	2,1	nd	Nd	nd	26,6	ffp	nd
30°C	8 недель	124	0,9	97,5	1,7	45	8	25	23,7	ffp	12182
	21 неделя	125	1,3	96,1	2,6	nd	Nd	nd	24,2	effp	nd

Композиция Д представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,5, 105 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 65 мМ хлорид натрия, 10 мМ метионин, 0,04% полисорбат 20, 12000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	128	0,4	98,9	0,7	59	15	10	16,6	ffp	13475
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	17,2	ffp	12363
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,5	98,5	1,0	60	12	11	17,2	effp	12793
F/T	(5 циклов)	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	16,5	effp	12374
5°C	8 недель	125	0,5	98,7	0,8	60	15	11	16,9	ffp	13086
	21 неделя	nd	0,5	98,6	0,9	61	13	11	16,4	ffp	14896
	36 недель	nd	0,5	98,7	0,8	59	12	12	16,5	ffp	13321
25°C	8 недель	125	0,7	98,1	1,2	53	9	18	15,4	ffp	nd
	21 неделя	nd	0,8	97,5	1,7	41	8	29	19,2	ffp	14730
	36 недель	nd	0,9	97,0	2,1	32	9	32	17,4	ffp	12028
30°C	8 недель	124	0,8	97,7	1,5	45	8	25	15,7	ffp	11745
	21 неделя	123	1,1	96,3	2,6	32	8	24	17,4	ffp	nd

Композиция Е представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,5, 105 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 65 мМ хлорид натрия, 10 мМ метионин, 0,06% полисорбат 80, 12000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	127	0,4	98,9	0,7	59	15	10	16,7	effp	13069
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	16,0	ffp	13188
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,5	98,6	0,9	60	12	11	15,8	ffp	9764
F/T	(5 циклов)	nd	0,5	98,7	0,8	nd	nd	nd	18,5	ffp	11769
5°C	8 недель	125	0,5	98,7	0,8	60	15	11	16,5	ffp	nd
	21 неделя	nd	0,6	98,6	0,9	nd	nd	nd	16,6	ffp	nd
	36 недель	nd	0,6	98,7	0,8	nd	nd	nd	17,2	ffp	nd
25°C	8 недель	125	0,7	98,1	1,2	53	9	18	17,4	ffp	13570
	21 неделя	nd	0,9	97,4	1,7	nd	nd	nd	16,4	ffp	nd
	36 недель	nd	1,0	96,9	2,1	nd	nd	nd	18,3	ffp	nd
30°C	8 недель	124	0,8	97,5	1,7	45	8	25	16,2	ffp	11860
	21 неделя	123	1,8	95,6	2,9	nd	nd	nd	16,1	ffp	nd

Композиция Ж представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,5, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 10 мМ метионин, 0,04% полисорбат 20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)		
-	Начало	122	0,3	99,7	nd	71	11	7	4,2	ffp
5°C	4 недели	nd	0,3	99,6	nd	60	11	11	nd	nd
	12 недель	118	0,4	99,6	<0,3	70	10	7	4,8	ffp
	24 недели	121	0,4	99,5	nd	68	9	9	4,1	ffp
	36 недель	nd	0,5	99,5	0,1	67	8	10	nd	nd
15°C	4 недели	nd	0,4	99,6	nd	70	10	7	nd	nd
	12 недель	121	0,5	99,4	<0,3	66	8	11	4,3	ffp
	24 недели	121	0,5	99,3	<0,3	59	7	17	4,4	ffp
	36 недель	nd	0,6	99,2	0,2	53	7	22	nd	nd
25°C	4 недели	nd	0,5	99,5	<0,3	66	7	11	nd	nd
	12 недель	121	0,6	97,2	2,1	53	6	22	4,2	ffp
	24 недели	122	0,7	98,0	1,4	39	6	32	4,2	ffp

и перед инъекций в нее добавляют гHuPH20 из партии, имеющий следующий состав: 10 мг/мл гHuPH20 в 20 мМ His/гистидин-HCl, pH 6,5, 130 мМ NaCl, 0,05% (мас./об.) полисорбат 80.

Композиция З представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 110 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 5 мМ метионин, 0,02% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	111	0,6	98,7	0,8	69	12	6	3,9	ffp	2081
Skг, 5°C	1 неделя	nd	0,6	98,7	0,7	68	12	6	3,9	ffp	2406
Skг, 25°C	1 неделя	nd	0,7	98,6	0,7	68	10	7	3,8	ffp	nd
F/T	(5 циклов)	nd	0,7	98,7	0,7	68	12	6	3,8	ffp	2167
5°C	8 недель	nd	0,6	98,8	0,6	69	10	8	4,0	ffp	2235
	12 недель	110	0,6	98,7	0,7	66	10	9	3,9	ffp	1970
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,7	98,3	1,0	57	5	15	4,1	ffp	1891
	12 недель	111	0,7	97,8	1,5	50	4	20	3,8	ffp	2079
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,4	94,1	4,5	31	3	30	4,1	ffp	nd
	12 недель	111	1,6	92,5	5,9	28	5	35	4,7	ffp	nd

Композиция И представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 110 мг/мл трастузумаб, 20мМ L-гистидин/HCl, pH 6,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 5 мМ метионин, 0,02% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	111	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,7	effp	1948
Skг, 5°C	1 неделя	nd	0,8	98,6	0,7	68	12	7	5,1	ffp	2672
Skг, 25°C	1 неделя	nd	0,8	98,6	0,7	67	11	8	4,7	ffp	1724
F/T	(5 циклов)	nd	0,8	98,6	0,7	68	12	7	4,5	ffp	2507
5°C	8 недель	nd	0,8	98,6	0,6	68	11	8	4,5	ffp	1911
	12 недель	112	0,8	98,5	0,7	65	11	10	4,7	ffp	2034
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,9	98,1	1,0	53	12	18	4,8	effp	1910
	12 недель	111	1,0	97,8	1,2	45	12	21	4,9	ffp	2157
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,6	95,3	3,1	26	9	26	5,0	ffp	nd
	12 недель	112	1,9	93,9	4,3	20	9	22	5,7	ffp	nd

Композиция К представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 110 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 5 мМ метионин, 0,06% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	НЕ-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	111	0,6	98,7	0,7	69	12	6	3,7	ffp	2198
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,6	98,6	0,7	68	12	6	4,3	effp	2528
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,6	98,6	0,8	68	10	7	4,0	effp	1993
F/T	(5 циклов)	nd	0,7	98,7	0,7	68	12	6	3,7	ffp	2256
5°C	8 недель	nd	0,6	98,8	0,6	68	10	8	4,1	ffp	2263
	12 недель	111	0,6	98,6	0,8	66	10	9	3,9	ffp	2337
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,7	98,3	1,0	56	5	15	4,0	ffp	1931
	12 недель	111	0,7	97,9	1,4	50	4	20	4,0	ffp	2291
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,3	94,5	4,2	30	3	35	4,2	ffp	nd
	12 недель	111	1,6	92,4	6,0	27	5	35	4,2	ffp	nd

Композиция Л представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 110 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 6,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 5 мМ метионин, 0,06% полисорбата 20, 2000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	НЕ-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	111	0,8	98,6	0,7	69	12	7	4,7	ffp	2258
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,8	98,6	0,7	68	12	7	5,0	ffp	2680
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,8	98,5	0,7	67	11	8	4,6	effp	2049
F/T	(5 циклов)	nd	0,8	98,6	0,7	69	12	7	4,8	ffp	2316
5°C	8 недель	nd	0,8	98,5	0,7	68	12	8	4,5	ffp	2132
	12 недель	112	0,8	98,5	0,7	65	12	9	5,2	ffp	2260
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,9	98,3	0,8	53	12	18	4,5	ffp	1863
	12 недель	112	1,0	97,9	1,2	46	12	21	4,7	ffp	1917
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,5	95,4	3,1	26	10	26	5,2	ffp	nd
	12 недель	112	1,9	93,9	4,3	28	8	22	6,2	ffp	nd

Композиция М представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 110 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 15 мМ метионин, 0,02% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	НЕ-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	111	0,6	98,7	0,7	69	12	6	3,5	effp	2301
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,6	98,7	0,7	69	12	6	4,1	ffp	2574
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,6	98,7	0,7	68	10	7	4,1	ffp	nd
F/T	(5 циклов)	nd	0,7	98,5	0,8	68	12	7	3,6	ffp	2435
5°C	8 недель	nd	0,6	98,8	0,6	68	10	7	3,8	ffp	2263
	12 недель	111	0,6	98,7	0,7	67	10	8	3,8	ffp	1857
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,7	98,4	1,0	56	5	15	3,8	ffp	1919
	12 недель	111	0,7	97,9	1,4	50	4	19	3,8	ffp	2106
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,3	94,2	4,5	31	4	34	3,9	ffp	nd
	12 недель	111	1,5	92,6	6,0	28	4	35	4,2	ffp	nd

Композиция Н представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 110 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 6,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 15 мМ метионин, 0,02% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	НЕ-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	110	0,7	98,6	0,7	69	12	7	4,4	effp	2203
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,7	98,6	0,6	69	12	7	5,2	ffp	2169
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,7	98,6	0,7	67	11	8	4,9	ffp	1661
F/T	(5 циклов)	nd	0,7	98,6	0,6	68	12	7	4,6	ffp	2183
5°C	8 недель	nd	0,7	98,6	0,7	68	12	8	4,5	ffp	2188
	12 недель	111	0,8	98,6	0,7	66	12	9	4,9	effp	2028
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,9	98,1	1,1	53	12	18	4,5	ffp	1900
	12 недель	111	0,9	98,0	1,2	46	12	21	4,7	ffp	1936
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,5	95,0	3,5	26	10	26	5,4	ffp	nd
	12 недель	111	1,7	94,1	4,2	27	8	22	5,5	ffp	nd

Композиция О представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 110 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 15 мМ метионин, 0,06% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuRH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	НЕ-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	111	0,6	98,7	0,7	69	12	7	3,8	effp	2410
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,6	98,6	0,7	69	12	6	4,0	effp	2559
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,6	98,6	0,8	68	10	7	3,7	ffp	2086
F/T	(5 циклов)	nd	0,7	98,7	0,7	68	12	6	4,0	ffp	2457
5°C	8 недель	nd	0,6	98,8	0,7	69	10	7	3,9	ffp	2102
	12 недель	111	0,6	98,8	0,7	67	10	8	3,6	effp	2037
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,7	98,2	1,1	57	5	15	3,8	ffp	2215
	12 недель	111	0,7	97,9	1,4	50	4	19	3,7	ffp	2050
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,3	94,7	4,1	30	4	34	4,0	ffp	nd
	12 недель	111	1,5	92,5	6,0	28	4	35	4,5	ffp	nd

Композиция П представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 110 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 6,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 15 мМ метионин, 0,06% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuRH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	НЕ-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	111	0,8	98,6	0,7	69	12	7	4,5	ffp	2153
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,7	98,6	0,7	69	12	7	4,7	ffp	1846
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,7	98,5	0,7	67	11	8	4,9	effp	2192
F/T	(5 циклов)	nd	0,7	98,6	0,7	69	12	7	4,3	effp	2323
5°C	8 недель	nd	0,7	98,7	0,6	68	12	8	4,8	ffp	2049
	12 недель	112	0,8	98,5	0,7	66	12	9	4,6	ffp	1903
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,9	98,2	0,9	53	12	18	4,8	ffp	2002
	12 недель	112	0,9	97,9	1,2	46	13	21	4,8	ffp	2216
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,5	95,6	2,9	26	10	25	5,2	ffp	nd
	12 недель	112	1,9	94,0	4,3	27	8	22	6,1	ffp	nd

Композиция Р представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 130 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 5 мМ метионин, 0,02% полисорбата 20, 2000 ед./мл гHuRH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	НЕ-активность (ед./мл)
			НМВ (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	128	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,8	ffp	2035
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,4	ffp	2728
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,7	98,6	0,7	68	10	7	3,9	ffp	nd
F/T	(5 циклов)	nd	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,7	ffp	2559
5°C	8 недель	nd	0,6	98,8	0,6	69	10	7	3,6	ffp	2217
	12 недель	129	0,6	98,7	0,7	67	11	9	3,8	ffp	1878
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,8	98,2	1,0	57	5	15	3,5	ffp	2091
	12 недель	128	0,8	97,8	1,4	51	4	19	4,3	ffp	1887
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,6	94,2	4,2	31	4	35	3,9	ffp	nd
	12 недель	129	1,9	92,1	5,9	28	5	35	4,5	ffp	nd

Композиция С представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 130 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 6,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 5 мМ метионин, 0,02% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuRH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	НЕ-активность (ед./мл)
			НМВ (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	131	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,4	effp	2309
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,4	ffp	2522
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,9	98,4	0,7	67	11	8	4,8	ffp	1787
F/T	(5 циклов)	nd	0,8	98,5	0,6	69	12	6	4,8	ffp	2312
5°C	8 недель	nd	0,9	98,6	0,6	68	12	8	5,1	ffp	2131
	12 недель	132	0,9	98,4	0,7	66	11	9	4,9	effp	1931
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	1,1	97,8	1,1	54	12	18	5,1	ffp	1888
	12 недель	132	1,1	97,8	1,1	46	12	21	4,7	ffp	1912
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,8	95,2	3,0	27	10	27	5,6	effp	nd
	12 недель	132	2,2	93,4	4,4	28	8	22	6,1	ffp	nd

Композиция Т представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 130 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 5 мМ метионин, 0,06% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuRH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	НЕ-активность (ед./мл)
			НМВ (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	131	0,7	98,6	0,7	69	12	6	3,7	effp	2096
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,7	98,7	0,6	69	12	6	3,7	effp	1856
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,7	98,5	0,8	68	10	7	4,3	effp	1958
F/T	(5 циклов)	nd	0,7	98,7	0,6	69	12	6	3,8	effp	2371
5°C	8 недель	nd	0,7	98,7	0,6	69	10	7	3,5	effp	2075
	12 недель	131	0,6	98,6	0,7	67	10	8	3,6	effp	2350
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,9	98,2	1,0	58	5	15	3,5	effp	1989
	12 недель	131	0,9	97,7	1,4	51	4	20	3,9	effp	1999
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,6	94,3	4,1	32	4	35	4,2	ffp	nd
	12 недель	132	2,0	92,0	6,0	29	5	35	4,6	effp	nd

Композиция У представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 130 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 6,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 5 мМ метионин, 0,06% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuRH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	131	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,6	effp	2406
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,8	wafp	2808
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,9	98,4	0,7	67	11	8	4,9	ffp	2141
F/T	(5 циклов)	nd	0,8	98,5	0,6	69	12	6	4,7	ffp	2487
5°C	8 недель	nd	0,8	98,5	0,7	69	12	8	4,8	effp	2076
	12 недель	132	0,9	98,4	0,7	66	12	9	4,8	effp	1897
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	1,1	97,8	1,1	55	12	18	5,0	ffp	1956
	12 недель	131	1,1	97,7	1,2	47	12	21	4,9	ffp	2094
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,9	95,2	3,0	27	9	27	5,7	ffp	nd
	12 недель	133	2,2	93,5	4,3	21	9	22	6,1	ffp	nd

Композиция Ф представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 130 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 15 мМ метионин, 0,02% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	131	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,7	effp	2311
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,7	ffp	2397
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,7	98,5	0,8	68	10	7	4,0	effp	nd
F/T	(5 циклов)	nd	0,7	98,7	0,6	68	12	6	3,7	ffp	2277
5°C	8 недель	nd	0,6	98,8	0,5	67	10	7	3,5	ffp	2167
	12 недель	131	0,6	98,6	0,7	69	10	7	3,7	ffp	2070
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,8	98,2	1,0	56	5	15	3,6	ffp	2122
	12 недель	131	0,8	97,8	1,4	52	4	19	3,7	ffp	2138
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,5	94,3	4,2	31	4	34	4,0	ffp	nd
	12 недель	132	1,8	92,2	6,0	29	4	35	4,1	ffp	nd

Композиция Х представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 130 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 6,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 15 мМ метионин, 0,02% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	131	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,5	effp	2768
Skg, 5°C	1 неделя	nd	0,8	98,6	0,7	68	12	7	4,7	effp	2884
Skg, 25°C	1 неделя	nd	0,8	98,5	0,7	68	11	8	6,0	effp	2044
F/T	(5 циклов)	nd	0,8	98,6	0,6	68	12	7	4,6	ffp	2617
5°C	8 недель	nd	0,8	98,5	0,7	67	12	8	4,3	ffp	2571
	12 недель	132	0,8	98,5	0,7	67	12	8	4,5	ffp	2164
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
25°C	8 недель	nd	1,0	98,0	1,0	52	12	18	4,9	ffp	2116
	12 недель	131	1,0	97,7	1,3	47	13	21	5,0	effp	1990
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
40°C	8 недель	nd	1,7	95,4	2,9	24	10	24	5,4	ffp	Nd
	12 недель	132	2,0	93,7	4,3	19	9	20	5,7	ffp	nd

Композиция Ц представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 130 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 15 мМ метионин, 0,06% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	131	0,7	98,7	0,7	68	12	6	3,7	ffp	2323
Skг, 5°C	1 неделя	nd	0,7	98,6	0,7	69	12	6	3,7	ffp	2646
Skг, 25°C	1 неделя	nd	0,7	98,5	0,8	68	10	7	3,8	ffp	2056
F/T	(5 циклов)	nd	0,7	98,7	0,7	68	12	6	3,5	effp	2498
5°C	8 недель	nd	0,6	98,9	0,5	67	10	7	3,5	effp	2179
	12 недель	132	0,6	98,6	0,8	69	10	7	3,7	ffp	2119
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,8	98,1	1,1	56	5	15	3,6	ffp	2072
	12 недель	132	0,8	97,8	1,4	52	4	19	3,9	effp	2348
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,5	94,2	4,3	31	4	34	3,9	ffp	nd
	12 недель	132	1,8	92,3	5,9	30	5	34	4,3	ffp	nd

Композиция Ч представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 130 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 6,0, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 15 мМ метионин, 0,06% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuRH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	131	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,7	ffp	2018
Skг, 5°C	1 неделя	nd	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,6	ffp	1790
Skг, 25°C	1 неделя	nd	0,8	98,5	0,7	67	11	8	4,9	ffp	1918
F/T	(5 циклов)	nd	0,8	98,6	0,7	69	12	7	4,7	ffp	2379
5°C	8 недель	nd	0,8	98,7	0,5	67	11	8	4,4	ffp	2028
	12 недель	131	0,8	98,4	0,8	67	12	8	4,7	effp	1964
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	1,0	98,0	1,0	53	12	18	4,3	ffp	2198
	12 недель	131	1,0	97,8	1,2	47	13	20	5,0	ffp	1894
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,7	95,4	3,0	24	9	25	5,0	ffp	nd
	12 недель	132	2,0	93,7	4,4	27	9	20	5,8	effp	nd

Композиция Ш представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл трастузумаб, 20 мМ L-гистидин/HCl, pH 5,5, 210 мМ дигидрат α,α -трегалозы, 10 мМ метионин, 0,04% полисорбат 20, 2000 ед./мл гHuRH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1 (%)	Пик 4 (%)			
-	начало	121	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,2	effp	2277
Skг, 5°C	1 неделя	nd	0,8	98,6	0,7	69	12	6	4,2	ffp	1855
Skг, 25°C	1 неделя	nd	0,8	98,5	0,7	68	11	7	4,8	ffp	2070
F/T	(5 циклов)	nd	0,8	98,6	0,7	69	12	6	4,5	ffp	2477
5°C	8 недель	nd	0,8	98,6	0,6	68	10	8	4,3	ffp	2447
	12 недель	122	0,7	98,6	0,7	67	10	9	4,3	ffp	2189
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 недель	nd	0,9	98,2	1,0	57	7	18	4,5	ffp	2030
	12 недель	122	0,9	97,8	1,3	50	7	23	4,5	ffp	2030
	36 недель	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 недель	nd	1,4	95,3	3,3	34	6	33	4,8	ffp	nd
	12 недель	122	1,7	93,6	4,6	32	7	31	5,1	ffp	nd

Пример 2. Получение лиофилизированной композиции.

Получали раствор с содержанием трастузумаба примерно 60 мг/мл согласно методу, описанному выше для жидких композиций. Все эксципиенты добавляли в концентрации, составляющей половину от концентрации в указанной жидкой композиции. Композицию стерилизовали фильтрацией через фильтры с размером ячеек 0,22 мкм и в асептических условиях распределяли в равных количествах в стерильные 20-миллилитровые стеклянные флаконы. Флаконы неплотно закрывали покрытыми ETFE (сополимер этилена и тетрафторэтилена) резиновыми пробками, пригодными для применения в процессах лиофилизации, и лиофилизировали с использованием цикла замораживания-оттаивания, представленного в табл. 2.

Таблица 2

Цикл замораживания-оттаивания

Стадия	Температура на полке (°C)	Скорость изменения температуры (°C/мин)	Время выдерживания (мин)	Уровень вакуума (мкбар)
Предварительное охлаждение	5°C	0,0	60	-
Замораживание	-40°C	1,0	120	-
Первичная сушка	-25°C	0,5	4560	80
Вторичная сушка	+25°C	0,2	300	80

Температуру продукта сначала снижали с комнатной температуры до примерно 5°C (предварительное охлаждение), затем осуществляли стадию замораживания при -40°C со скоростью охлаждения полки примерно 1°C/мин, после чего выдерживали при -40°C в течение примерно 2 ч. Первую стадию сушки осуществляли при температуре на полке примерно -25°C, при этом давление в камере поддерживали на уровне примерно 80 мкбар в течение примерно 76 ч. Затем начинали вторую стадию сушки при температуре от -25 до 25°C, повышая температуру со скоростью 0,2°C/мин, с последующим выдерживанием при 25°C в течение по меньшей мере 5 ч при давлении в камере примерно 80 мкбар.

Лиофилизацию осуществляли в устройстве для сушки вымораживанием типа Usifroid SMH-90 LN2 (фирма Usifroid, Морепа, Франция) или типа LyoStar II г (фирма FTS Systems, Стоун Ридж, шт. Нью-Йорк, США). Полученные после сушки вымораживанием образцы хранили в различных климатических условиях (5, 25 и 30°C) в течение различных промежутков времени. Содержимое флаконов для лиофилизации восстанавливали до конечного объема 2,65 мл водой для инъекций (WFI) с получением изотонической композиции с концентрацией антитела примерно 120 мг/мл. Время восстановления полученных в результате сушки вымораживанием осадков (кейков) составляло 10 мин. Анализ восстановленных образцов осуществляли после инкубации восстановленного жидкого образца в течение 24 ч при температуре окружающей среды.

Образцы снова анализировали с помощью описанных выше следующих аналитических методов:

- 1) УФ-спектрофотометрия;
- 2) гель-фильтрация (SEC);
- 3) ионообменная хроматография (ИЕС);
- 4) определение мутности раствора и
- 5) определение видимых частиц.

Результаты определения стабильности композиции Ц представлены ниже в табл. 3, в которой использованы следующие сокращения: ffp - свободна от частиц; effp - практически свободна от частиц; nd - не определяли.

Таблица 3

Данные о составе и стабильности содержащей в качестве лекарственного продукта антитело к HER-2 лиофилизованной композиции, предлагаемой в изобретении

Композиция Ц представляет собой лиофилизованную композицию, имеющую после восстановления следующий состав: 120 мг/мл трастузумаб, 20 mM L-гистидин/HCl, pH 5,5, 210 mM дигидрат α , α -трегалозы, 10 mM метионин, 0,04% полисорбат 20, 12000 ед./мл гNuPH20

Условия хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация-ЖХВР			Ионообменная-ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	HE-активность (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Основной пик (%)	Пик 1(%)	Пик 4(%)			
-	начало	129	0,5	98,8	0,8	59	15	10	7,1	ffp	12451
5°C	8 недель	124	0,6	98,6	0,9	59	16	10	5,7	effp	13380
	21 неделя	nd	0,8	98,6	0,7	62	15	8	5,9	Effp	14927
	36 недель	nd	0,8	98,5	0,7	59	16	10	6,0	Ffp	13744
	8 недель	120	1,3	97,8	0,8	59	16	11	6,1	Effp	13162
25°C	21 неделя	nd	2,1	96,7	1,2	61	15	8	5,7	Effp	15396
	36 недель	nd	2,7	96,6	0,7	58	15	11	6,0	Ffp	13673
	8 недель	121	1,9	97,5	0,9	58	16	11	5,7	Effp	13425
30°C	21 неделя	126	3,2	96,0	0,8	60	14	8	6,0	Effp	nd
	36 недель	nd	3,9	95,4	0,7	57	14	11	5,9	Ffp	15034

Свойства указанных выше композиций обобщены в представленной ниже табл. 4.

Таблица 4

F	Tr (мг/мл)	His		Tre (мМ)	NaCl (мМ)	Meth (мМ)	PS		rHu (ед./мл)
		мМ	pH				20 %	80 %	
А	120	20	5,5	210		10	0,04		12000
Б	120	20	5,5	210		10		0,06	12000
В	120	20	5,5		130	10	0,04		12000
Г	120	20	5,5		130	10		0,06	12000
Д	120	20	5,5	105	65	10	0,04		12000
Е	120	20	5,5	105	65	10		0,06	12000
Ж	120	20	5,5	210		10	0,04		
З	110	20	5,0	210		5	0,02		2000
И	110	20	6,0	210		5	0,02		2000
К	110	20	5,0	210		5		0,06	2000
Л	110	20	6,0	210		5	0,06		2000
М	110	20	5,0	210		15	0,02		2000
Н	110	20	6,0	210		15	0,02		2000
О	110	20	5,0	210		15	0,06		2000
П	110	20	6,0	210		15	0,06		2000
Р	130	20	5,0	210		5	0,02		2000
С	130	20	6,0	210		5	0,02		2000
Т	130	20	5,0	210		5	0,06		2000
У	130	20	6,0	210		5	0,06		2000
Ф	130	20	5,0	210		15	0,02		2000
Х	130	20	6,0	210		15	0,02		2000
Ц	130	20	5,0	210		15	0,06		2000
Ч	130	20	6,0	210		15	0,06		2000
Ш	120	20	5,5	210		10	0,04		2000
Щ	120	20	5,5	210		10	0,04		12000*)

F = композиция

His = L-гистидин/НСl

NaCl = хлорид натрия

PS = полисорбат, % (мас./об.)

*) = после восстановления

Tr = трастузумаб

tre = дигидрат α, α -трегалозы

met = метионин

rHu = rHuPH20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Высококонцентрированная стабильная жидкая фармацевтическая композиция обладающего фармацевтической активностью антитела к HER2, состоящая из:

а) антитела к HER2 в концентрации примерно 120 ± 18 мг/мл;

б) забуферивающего агента, обеспечивающего значение pH $5,5 \pm 2,0$, в концентрации примерно от 1 до 100 мМ;

в) стабилизатора или смеси двух или большего количества стабилизаторов в концентрации примерно от 1 до 500 мМ;

г) неионогенного поверхностно-активного вещества в концентрации примерно от 0,01 до 0,08%, где антитело выбрано из группы трастузумаба, пертузумаба и Т-DM1.

2. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по п.1, в которой забуферивающий агент присутствует в концентрации от 1 до 50 мМ.

3. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по п.1 или 2, в которой забуферивающий агент обеспечивает значение pH $5,5 \pm 0,6$.

4. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по одному из пп.1-3, в которой забуферивающий агент представляет собой гистидиновый буфер.

5. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по одному из пп.1-4, в которой забуферивающий агент представляет собой 20 мМ гистидин/НСl.

6. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по одному из пп.1-5, в которой стабилизатор представляет собой сахарид.

7. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по одному из пп.1-6, в которой стабилизатор представляет собой дигидрат α, α -трегалозы или сахарозу.

8. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по одному из пп.1-7, в которой стабилизатор присутствует в концентрации от 15 до 250 мМ или примерно 210 мМ соответственно.

9. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по любому из пп.1-8, в которой в качестве второго стабилизатора применяют метионин.

10. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по п.9, где метионин присутствует в концентрации от 5 до 25 мМ.

11. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по одному из пп.1-10, в которой неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, выбранный из группы, включающей полисорбат 20, полисорбат 80 и сополимер полиэтилена-полипропилена.

12. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по п.11, в которой полисорбат присутствует в концентрации 0,02% (мас./об.), 0,04% (мас./об.) или 0,06% (мас./об.) соответственно.

13. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2, включающая трастузумаб в концентрации 120 мг/мл, 20 мМ L-гистидин/HCl pH 5,5, дигидрат α, α -трегалозы в концентрации 210 мМ, метионин в концентрации 10 мМ, полисорбат 20 в концентрации 0,04%.

14. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по одному из пп.1-12, которая является стабильной при замораживании и оттаивании.

15. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по п.1, предназначенная для подкожного или внутримышечного введения.

16. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по любому из пп.1-14, предназначенная для подкожного или внутримышечного введения совместно со 150 до приблизительно 16000 ед./мл гиалуронидазы.

17. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к HER2 по любому из пп.1-14, предназначенная для подкожного или внутримышечного введения совместно с 2000 до приблизительно 12000 ед./мл гиалуронидазы.

18. Применение композиции по одному из пп.1-15 для приготовления лекарственного средства, пригодного для лечения заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к HER2, такого как рак или незлокачественное заболевание у субъекта.

19. Применение по п.18, где раком является рак желудка, метастатический рак молочной железы или рак молочной железы на ранней стадии.

20. Устройство для инъекции, содержащее высококонцентрированную стабильную фармацевтическую композицию антитела к HER2 по одному из пп.1-15.

21. Способ лечения заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к HER2, такого как рак или незлокачественное заболевание у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции антитела к HER2 по одному из пп.1-15 совместно со 150 до приблизительно 16000 ед./мл гиалуронидазы.

22. Способ по п.21, где композиция вводится совместно с 2000 до приблизительно 12000 ед./мл гиалуронидазы.

23. Способ по п.21 или 22, где гиалуронидазой является гHuPH20.

24. Способ по любому из пп.21-23, в котором композицию вводят совместно, одновременно или последовательно с химиотерапевтическим средством.

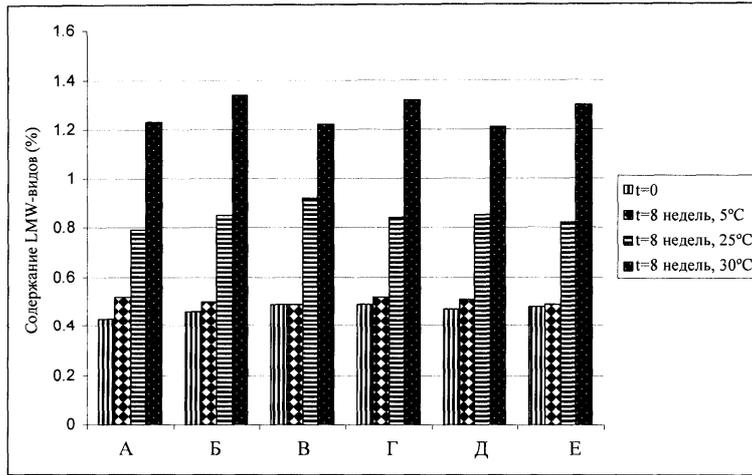
25. Набор для лечения заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к HER2, такого как рак или незлокачественное заболевание у субъекта, включающий один или несколько пузырьков, которые содержат композицию по одному из пп.1-15 и инструкции по подкожному введению композиции пациенту.

26. Набор по п.25, дополнительно содержащий один или несколько пузырьков, содержащих гиалуронидазу, и инструкции по подкожному введению композиции и от 150 до приблизительно 16000 ед./мл гиалуронидазы пациенту.

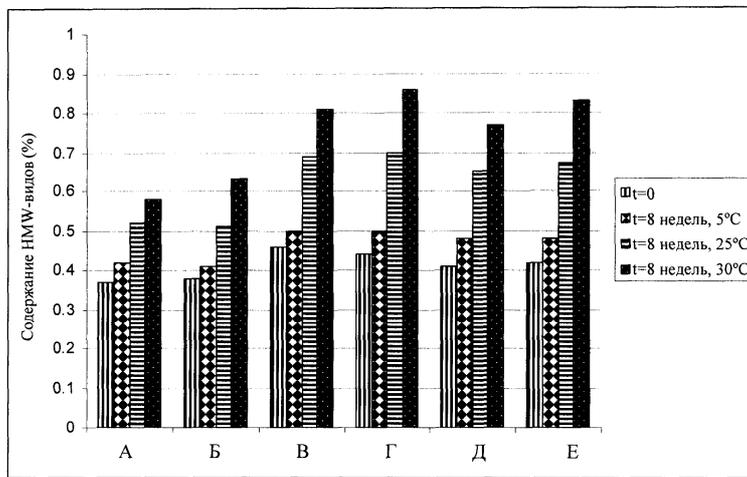
27. Набор по п.25 или 26, дополнительно содержащий один или несколько пузырьков, содержащих гиалуронидазу, и инструкции по подкожному введению композиции и от 2000 до приблизительно 12000 ед./мл гиалуронидазы пациенту.

28. Набор по п.26 или 27, где гиалуронидазой является гHuPH20.

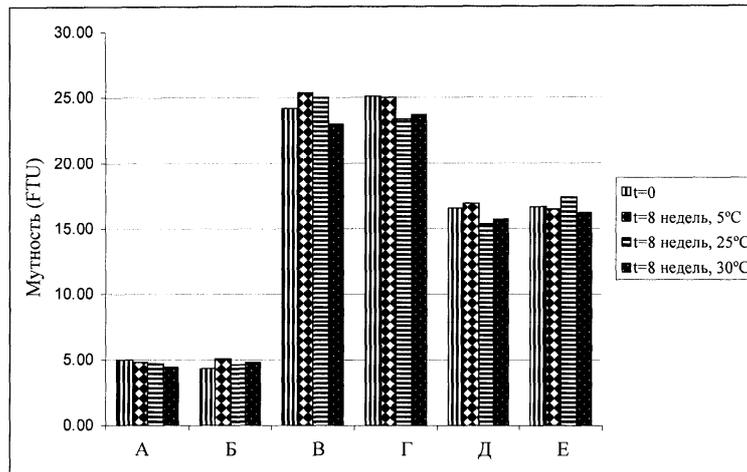
29. Набор по п.25, включающий также инъекционное устройство для подкожного введения композиции пациенту.



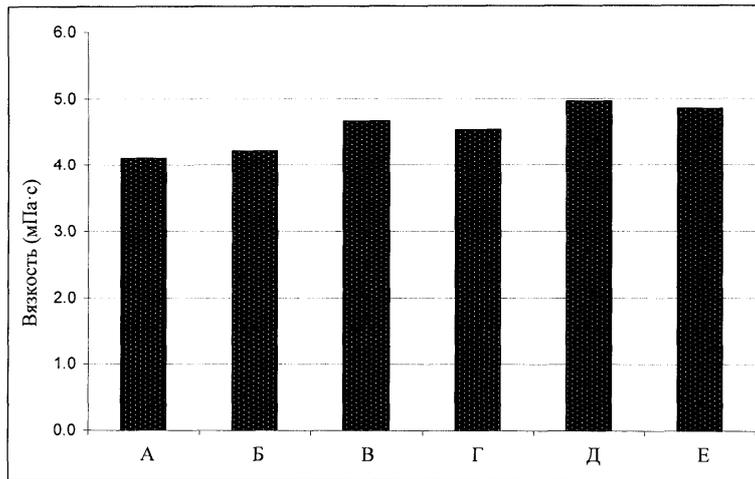
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

