

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047666**(13) **B9**

**(12) ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К
ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(15) Информация об исправлении
Версия исправления: 1 (W1 B1)
исправления в формуле

(48) Дата публикации исправления
2024.09.06, Бюллетень №9'2024

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.22

(21) Номер заявки
202192588

(22) Дата подачи заявки
2020.03.24

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ВАРИАНТ РН20
ГИАЛУРОНИДАЗЫ ЧЕЛОВЕКА, И ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ
ПОДКОЖНОГО ВВЕДЕНИЯ**

(31) 10-2019-0033880

(32) 2019.03.25

(33) KR

(43) 2022.03.17

(86) PCT/KR2020/003975

(87) WO 2020/197230 2020.10.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АЛТЕОГЕН ИНК. (KR)

(72) Изобретатель:
**Пак Сун Чэ, Чон Хе-Син, Ли Сон Чу,
Ким Кёван, Бён Минсо, Нам Ки Сок
(KR)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A2-2013102144
KR-A-1020100135291
KR-A-1020140021046
US-A1-20150010529
KR-A-1020120094493

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей: (а) лекарственное средство и (b) вариант РН20 человека. Вариант РН20 человека, содержащийся в фармацевтической композиции согласно изобретению, включает замену (замены) аминокислотного остатка в одной или нескольких областях, выбранных из области альфа-спирали 8 (S347-C381) и линкерной области (A333-R346) между альфа-спиралью 7 и альфа-спиралью 8 в РН20 человека дикого типа, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где аминокислотный остаток (остатки), расположенный на N-конце или C-конце, избирательно удален. Кроме того, фармацевтическая композиция согласно изобретению может дополнительно включать фармацевтически приемлемую добавку, в частности стабилизатор. Фармацевтическая композиция согласно изобретению может максимизировать терапевтический эффект лекарственного средства, используемого в комбинации с ней, благодаря эффекту вариантов РН20 человека.

B9**047666****047666****B9**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей вариант RH20 человеческой гиалуронидазы, обладающий повышенной ферментативной активностью и термостабильностью, и одно или несколько лекарственных средств, а также способ лечения заболевания с их помощью.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению предпочтительно может использоваться для подкожной инъекции.

Предшествующий уровень техники

Лекарства, которые следует вводить в высокой дозе или в нескольких дозах, особенно лекарственные препараты на основе антител и т.п., обычно вводят посредством внутривенной инъекции, и такая инъекция занимает около 90 мин или более, при этом внутривенная инъекция должна сопровождаться дополнительной процедурой подготовки, таким образом создаются неудобства и для пациента, и для врачей, и для медицинского персонала, и возникают дополнительные расходы. Напротив, подкожная инъекция имеет то преимущество, что позволяет осуществлять немедленное введение, но скорость абсорбции является относительно низкой по сравнению с внутривенной инъекцией, и когда объем инъекции составляет 3-5 мл или более, она может вызвать отек и боль в месте введения, поскольку абсорбция происходит медленно. По этой причине подкожная инъекция белковых терапевтических агентов обычно ограничивается инъекцией раствора в небольшом количестве 2 мл или менее. Однако при подкожном введении (или подкожной инъекции) гиалуронидазы вместе с терапевтическим препаратом гиалуроновая кислота, распределенная во внеклеточном матриксе, гидролизуется под действием гиалуронидазы, и таким образом, вязкость подкожной области снижается, а проницаемость для вещества повышается, и, следовательно, высокая доза или несколько доз лекарства могут быть легко доставлены в организм.

У человека существует шесть типов генов гиалуронидазы: Hya11, Hya12, Hya13, Hya14, Hya1PS1 и RH20/SPAM1. Hya11 и Hya12 экспрессируются в большинстве тканей, а RH20/SPAM1 (далее обозначаемая как RH20) экспрессируется в клеточной мембране сперматозоидов и акросомной мембране. Hya1PS1 не экспрессируется, поскольку является псевдогеном. RH20 - это фермент (EC 3.2.1.35), который расщепляет β -1,4 связи между N-ацетилглюкозаминном и глюкуроновой кислотой, которые являются сахарами, составляющими гиалуроновую кислоту. Гиалуронидаза человека RH20 имеет оптимальный pH 5,5, но проявляет некоторую активность даже при pH 7-8, тогда как другие гиалуронидазы человека, включая Hya11, имеют оптимальный pH 3-4 и очень слабую активность при pH 7-8. Значение pH в подкожных участках у человека составляет около 7,4, что является практически нейтральным, и таким образом, среди различных типов гиалуронидаз RH20 широко применяется в клинической практике. Примеры клинического использования RH20 включают подкожную инъекцию терапевтического агента на основе антител, использование в качестве глазного релаксанта и анестезирующей добавки в офтальмологической хирургии, использование для увеличения доступа противоракового терапевтического агента к опухолевым клеткам путем гидролиза гиалуроновой кислоты во внеклеточном матриксе опухолевых клеток, и применение для ускорения резорбции жидкостей организма и крови, которые чрезмерно присутствуют в тканях.

Между тем, в настоящее время коммерческая RH20 находится в форме, экстрагированной из семенников крупного рогатого скота или овец. Её примеры включают Amphadase® (бычья гиалуронидаза) и Vitrase® (овечья гиалуронидаза).

Гиалуронидаза из бычьих семенников (ВТН) образуется путем удаления сигнального пептида и 56 аминокислот на С-конце из бычьей гиалуронидазы RH20 дикого типа при посттрансляционной модификации. ВТН также является гликопротеином и имеет содержание маннозы 5% и содержание глюкозамина 2,2%, исходя из общего состава, включая аминокислоты (Borders and Raftery, 1968). Когда гиалуронидазу животного происхождения повторно вводят в организм человека в высокой дозе, может формироваться нейтрализующее антитело, а другие биоматериалы животного происхождения, содержащиеся в виде примесей в препаратах RH20, могут вызывать аллергическую реакцию. В частности, использование RH20, экстрагированной из тканей крупного рогатого скота, ограничено из-за опасности коровьего бешенства. Чтобы преодолеть эти проблемы, были проведены исследования рекомбинантных человеческих белков RH20.

Сообщалось, что рекомбинантные человеческие белки RH20 были экспрессированы в дрожжах (*P. pastoris*), клетках насекомых DS-2, клетках животных и т.п. (Chen et al., 2016, Hofinger et al., 2007). Рекомбинантные белки RH20, продуцируемые в клетках насекомых и дрожжах, отличаются от RH20 человека с точки зрения характера N-гликозилирования при посттрансляционной модификации.

Среди гиалуронидаз были идентифицированы белковые структуры Hya11 (PDB ID:2PE4) (Chao et al., 2007) и гиалуронидазы пчелиного яда (PDB ID: 1FCQ, 1FCU, 1FCV). Hya11 состоит из двух доменов, каталитического домена и EGF-подобного домена, а каталитический домен имеет форму $(\beta/\alpha)_8$, в которой каждая из альфа-спирали и бета-цепи, которые характеризуют вторичную структуру белка, повторяется восемь раз (Chao et al., 2007). EGF-подобный домен полностью консервативен в вариантах, в которых С-конце Hya11 по-разному подвергается сплайсингу. Аминокислотные последовательности Hya11 и

РН20 идентичны на 35,1%, а третичная структура белка РН20 еще не установлена.

В исследовании структурно-функциональной взаимосвязи человеческого белка РН20 было обнаружено, что С-концевая область РН20 важна для экспрессии белка и ферментативной активности, и, в частности, сообщалось, что терминация С-конца аминокислотами 477-483 важна для ферментативной экспрессии и активности (Frost, 2007). Активность полноразмерного белка РН20 (аминокислоты 1-509) или варианта рН20, имеющего усеченный С-конец в положении 467, составляла всего 10% или менее от активности варианта рН20, имеющего усеченный С-конец в одном сайте среди положений 477-483 (Frost, 2007). Halozyme Therapeutics разработала гНuРН20 (аминокислоты 36-482), который представляет собой рекомбинантный белок, где С-конец зрелого белка РН20 расщеплен по Y482 (Bookbinder et al., 2006; Frost, 2007).

Между тем, хотя исследования по разработке различных терапевтических препаратов в виде подкожных инъекций с использованием РН20 человека продолжают, проблема низкой стабильности РН20 человека как такового все еще остается нерешенной.

На основе этого предшествующего уровня техники авторы настоящего изобретения подтвердили, что варианты РН20 человека, включающие одну или несколько замен аминокислотных остатков в области альфа-спирали 8 (от S347 до C381) и в области линкера (от A333 до R346) между альфа-спиралью 7 и альфа-спиралью 8 в аминокислотной последовательности гиалуронидазы РН20 дикого типа, и где удалены некоторые аминокислоты, расположенные на N-конце и/или С-конце РН20, имели очень высокую ферментативную активность и термостабильность, и поэтому подали заявку на патент (PCT/KR 2019/009215).

Авторы настоящей заявки также подтвердили, что варианты РН20 в соответствии с настоящим изобретением могут применяться к фармацевтическим композициям или составам, включающим лекарственные средства, например, лекарственные препараты на основе антител, в частности, высокодозированные антитела против HER2 или антитела против иммунных контрольных точек, и, соответственно, фармацевтические композиции и составы в соответствии с настоящим изобретением, включающие варианты РН20 вместе с лекарствами, такими как антитела против HER2 или антитела против иммунных контрольных точек, могут быть использованы для подкожной инъекции, а активность лекарств, таких как лекарственные препараты на основе антител и варианты РН20, очень стабильна и может сохраняться в течение длительного времени, завершая, таким образом, настоящее изобретение.

Изложение сущности изобретения

Техническая проблема, решаемая изобретением.

Таким образом, настоящее изобретение было сделано с учетом вышеуказанных проблем, и целью настоящего изобретения является обеспечение новой фармацевтической композиции, включающей вариант РН20, обладающий повышенной ферментативной активностью и термостабильностью, и лекарственное средство, где термостабильность и активность лекарства и варианта РН20 может сохраняться в течение длительного времени; особенно фармацевтической композиции, которую можно использовать для подкожной инъекции.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения заболевания, включающего применение фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением у субъекта, нуждающегося в лечении.

Техническое решение.

В соответствии с настоящим изобретением вышеуказанные и другие цели могут быть достигнуты путем обеспечения фармацевтической композиции, включающей (а) лекарственное средство и (b) вариант РН20.

Вариант РН20, содержащийся в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, может включать одну или несколько замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из S343E, M345T, K349E, L353A, L354I, N356E и I361T в человеческом белке РН20 дикого типа, имеющем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и может дополнительно включать замену (замены) аминокислотного остатка в одной или нескольких областях, выбранных из области альфа-спирали 8 (от S347 до C381) и/или линкерной области (от A333 до R346) между альфа-спиралью 7 и альфа-спиралью 8, где некоторые аминокислотные остатки, расположенные на N-конце и/или С-конце, избирательно удаляются.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно включать одну или несколько добавок, выбранных из фармацевтически приемлемых добавок, в частности буфер, стабилизатор и поверхностно-активное вещество.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может использоваться в форме инъекционного препарата для подкожного введения.

Описание чертежей

Вышеупомянутые и другие цели, характеристики и другие преимущества настоящего изобретения будут более понятны из следующего подробного описания, взятого вместе с прилагаемыми чертежами, на которых:

фиг. 1А иллюстрирует хроматограммы от эксклюзионной хроматографии трастузумаба в испытании на стабильность в жестких условиях при 45°C, а фиг. 1В иллюстрирует изменение чистоты моно-

мерного белка трастузумаба в зависимости от состава в испытании на стабильность в жестких условиях при 45°C;

фиг. 2 иллюстрирует результаты измерения температур агрегации белков для композиций, включающих трастузумаб и новый вариант PH20 HP46;

фиг. 3А представляет собой хроматограмму слабого катионообменного обмена (WCX) трастузумаба в испытании на стабильность в жестких условиях при 45°C, фиг. 3В иллюстрирует изменения (%) относительных количеств кислых вариантов в композициях в испытании на стабильность в жестких условиях при 45°C, фиг. 3С иллюстрирует изменения (%) относительных количеств главных пиков для композиций в испытании на стабильность в жестких условиях при 45°C, а фиг. 3D иллюстрирует изменения (%) относительных количеств основных вариантов в композициях в испытании на стабильность в жестких условиях при 45°C;

фиг. 4 иллюстрирует изменения чистоты мономерного белка трастузумаба в композициях 5-7 в испытании на стабильность в жестких условиях при 45°C;

фиг. 5А иллюстрирует изменения (%) относительных количеств кислых вариантов в композициях 5-7 в испытании на стабильность в жестких условиях при 45°C, фиг. 5В иллюстрирует изменения (%) относительных количеств главных пиков в композициях 5, 6 и 7 в испытании на стабильность в жестких условиях при 45°C, а фиг. 5С иллюстрирует изменения (%) относительных количеств основных вариантов в композициях 5, 6 и 7 в испытании на стабильность в жестких условиях при 45°C;

фиг. 6А иллюстрирует результаты измерения остаточной ферментативной активности препарата герцептина для подкожного введения (Herceptin SC), трастузумаба + PH20 дикого типа (HW2) и трастузумаба + PH20 варианта HP46 в день 0 и день 1 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C, а фиг. 6В иллюстрирует результаты измерения остаточной ферментативной активности композиции герцептина для подкожного введения, трастузумаба + PH20 дикого типа (HW2) и трастузумаба + PH20 варианта HP46 в день 0 и день 1 в испытании на стабильность в жестких условиях при 45°C;

фиг. 7 иллюстрирует результаты анализа посредством эксклюзионной хроматографии композиций 8-10 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C в течение 14 дней;

фиг. 8А иллюстрирует результаты анализа изменений размера белковых частиц композиций 8-10 с использованием оборудования DLS, а фиг. 8В иллюстрирует результаты измерения температур агрегации белков;

фиг. 9А иллюстрирует хроматограмму слабого катионного обмена (WCX) композиции 8 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C, фиг. 9В иллюстрирует изменения (%) относительных количеств кислотных вариантов в составах 8-10 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C, фиг. 9С иллюстрирует изменения (%) относительных количеств главных пиков для композиций 8-10 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C, а фиг. 9D иллюстрирует изменения (%) относительных количеств основных вариантов в композициях 8-10 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C;

фиг. 10 иллюстрирует изменения (%) относительной ферментативной активности композиций 8-10 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C;

фиг. 11 иллюстрирует изменения чистоты мономеров трастузумаба в композициях 11-13 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C;

фиг. 12А иллюстрирует хроматограмму слабого катионного обмена (WCX) композиции 11 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C, фиг. 12В иллюстрирует изменения (%) относительных количеств кислых вариантов в композициях 11-13 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C, фиг. 12С иллюстрирует изменения (%) относительных количеств главных пиков в композициях 11-13 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C, а фиг. 12D иллюстрирует изменения (%) относительных количеств основных вариантов в композициях 11-13 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C;

фиг. 13 иллюстрирует изменения (%) относительной ферментативной активности композиций 11-13 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C;

фиг. 14 иллюстрирует изменения чистоты мономеров ритуксимаба в композициях 14-16 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C;

фиг. 15 иллюстрирует изменения относительной ферментативной активности композиций 14-16 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C;

фиг. 16 иллюстрирует изменения относительной ферментативной активности композиций 17 и 18 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C;

фиг. 17 иллюстрирует результаты анализа методом эксклюзионной хроматографии композиций 19-22 при 40°C;

фиг. 18 иллюстрирует изменения относительной ферментативной активности композиций 19-22 в испытании на стабильность в жестких условиях при 40°C;

фиг. 19 иллюстрирует изменения ферментативной активности в зависимости от изменений pH для рекомбинантных человеческих PH20 и HP46;

фиг. 20 иллюстрирует результаты анализа фармакокинетики препарата герцептина для подкожного введения (Herceptin SC) и биологически подобного кандидата герцептина (трастузумаб + HP46; Herceptin SC BS) у 9-недельных крыс Спрег-Доули, где герцептин и биологически подобный кандидат Герцептина вводили по 18 мг/кг каждого, и композиция для подкожного введения содержала 100 единиц rHuPH20 и 100 единиц HP46 (при pH 5,3).

Подробное описание и примерные варианты осуществления

Если не указано иное, все используемые в настоящей заявке технические и научные термины имеют то же значение, которое понятно рядовым специалистом в области техники, к которой относится изобретение. В целом, номенклатура, используемая в настоящей заявке, хорошо известна и широко используется в данной области техники.

Вариант осуществления настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, включающей (а) лекарственное средство и (b) вариант PH20, и фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может использоваться для профилактики или лечения заболевания, и предпочтительно применяется для подкожного введения.

Вариант PH20 человека, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, имеет некоторые замены аминокислотных остатков в области, соответствующей области альфа-спирали и/или линкерной области, предпочтительно области альфа-спирали 8 (от S347 до C381), и/или линкерной области (от A333 до R346) между альфа-спиралью 7 и альфа-спиралью 8, более предпочтительно аминокислотной области между T341 и N363, и наиболее предпочтительно от T341 до I361, от L342 до I361, от S343 до I361, от I344 до I361, M345-I361 или M345-N363 в аминокислотной последовательности PH20 дикого типа (имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1), предпочтительно зрелого белка PH20 дикого типа (имеющего последовательность, состоящую из L36-S490 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1).

В настоящем изобретении "зрелый белок PH20 дикого типа" относится к белку, содержащему аминокислотные остатки от L36 до S490 из SEQ ID NO: 1, в которых отсутствуют от M1 до T35, которые образуют сигнальный пептид, и от A491 до L509, которые не связаны с основной функцией PH20 в аминокислотной последовательности PH20 дикого типа, имеющего последовательность SEQ ID NO: 1.

Таблица 1

Аминокислотная последовательность PH20 дикого типа (SEQ ID NO: 1)

```

MGVLKFKNIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTNFRAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFCLGKFDEPL
DMSLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDN
LGMVAIDWEEWRPTWARWPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL
RPNHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLDSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR
VREAIRVSKIIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCS
LLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYHLHLPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL
EDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCIDAFKPPMETEEPQIFYNASPSTLSATMF
IVSILFLIISVASL

```

В частности, вариант PH20 или его фрагмент, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, содержит одну или несколько мутаций, предпочтительно замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из S343E, M345T, K349E, L353A, L354I, N356E и I361T, и наиболее предпочтительно замены одной или нескольких аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из L354I и N356E, в PH20 дикого типа, имеющем последовательность SEQ ID NO: 1.

В настоящем изобретении термин "вариант PH20" предназначен для включения мутации некоторых аминокислотных остатков, предпочтительно замены аминокислотных остатков в последовательности PH20 человека дикого типа, а также делеции некоторых аминокислотных остатков на N-конце и/или C-конце вместе с такой заменой аминокислотных остатков, и используется по существу в том же значении, что и выражение "вариант PH20 или его фрагмент".

Авторы настоящего изобретения проверили новые варианты PH20 или их фрагменты с повышенной ферментативной активностью и термостабильностью по сравнению с PH20 дикого типа, обеспеченные посредством предыдущих исследований, основанных на экспериментальных результатах, в которых ферментативная активность и температура агрегации белка (Tagg) при нейтральном pH увеличиваются, когда аминокислотные последовательности области альфа-спирали 8 и линкерной области между альфа-

спиралью 7 и альфа-спиралью 8 человеческого PH20 частично заменяют аминокислотными последовательностями области альфа-спирали 8 и линкерной области между альфа-спиралью 7 и альфа-спиралью 8 Hyal1 с высокой гидрофильностью.

Соответственно, вариант PH20, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, включает замены одного или нескольких аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из S343E, M345T, K349E, L353A, L354I, N356E и I361T, предпочтительно замены одного или нескольких аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из L354I и N356E, в аминокислотной последовательности PH20 дикого типа (имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1), предпочтительно зрелого белка PH20 дикого типа (имеющего последовательность, состоящую из L36-S490 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1), в котором заменены один или несколько аминокислотных остатков в области, соответствующей области альфа-спирали и/или линкерной области, предпочтительно в области альфа-спирали 8 (от S347 до C381) и/или линкерной области (от A333 до R346) между альфа-спиралью 7 и альфа-спиралью 8, более предпочтительно в аминокислотной области, соответствующей T341-N363, T341-I361, L342-I361, S343-I361, I344-I361, M345-I361 или M345-N363.

В частности, в варианте PH20, включенном в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, область альфа-спирали 8 (от S347 до C381) и/или линкерная область (от A333 до R346) альфа-спирали 7 и альфа-спирали 8 из PH20 дикого типа, предпочтительно зрелого PH20 дикого типа, может быть замещена несколькими аминокислотными остатками в аминокислотной последовательности, соответствующей области Hyal1, имеющей последовательность SEQ ID NO: 51 (см. табл. 2 и 3), но настоящее изобретение этим не ограничивается.

Таблица 2

Аминокислотная последовательность Hyal1 дикого типа (SEQ ID NO: 51).

MAAHLLPICALFLTLDDMAQGFRGPLLPNRPFPTVWNANTQWCLERHGVDDVSVFDDVVANPGQTFRG
 PDMTIFYSSQLGTYPPYPTPTGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDILAAIPAPDFSGLAVIDWEAWRPRWAF
 NWDTKDIYRQRSRALVQAQHPDWFAPQVEAVAQDQFQGAARAWMAGTLQLGRALRPRGLWGFYGFPCYNY
 DFLSPNYTGQCPSGIRAQNDQLGWLWGQSRALYPSIYMPAVLEGTGKSQMYVQHRVAEAFRVAVAAGDPNL
 PVLPHYVQIFYDTTNHFPLDLEHSLGESAAQGAAGVVLWVSWENTRTKESCQAIKEYMDTTLGPFILNVT
 SGALLCSQALCSGHGRCVRRRSHPKALLLLNPASFISIQLTPGGGPLSLRGALSLEDQAQMAVEFKRCRCYPG
 WQAPWCERKSMW

Таблица 3

Сравнение альфа-спиралей и аминокислотных последовательностей PH20 и Hyal1

Альфа-спираль	Аминокислотная последовательность PH20	Аминокислотная последовательность Hyal1
Альфа-спираль 1	От P56 до D65	От N39 до G48
Альфа-спираль 3	От S119 до M135	От S101 до I117
Альфа-спираль 4'	От K161 до N176	От K144 до H159
Альфа-спираль 4	От S180 до R211	От P163 до R194
Альфа-спираль 5	От F239 до S256	От P222 до S239
Альфа-спираль 6	От A274 до D293	От K257 до G277
Альфа-спираль 7	От S317 до G332	От P299 до G314
Альфа-спираль 8	От S347 до C381	От T329 до C363

Более конкретно, вариант PH20 или его фрагмент, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, предпочтительно включает замену аминокислотного остатка L354I и/или N356E в аминокислотной последовательности PH20 дикого типа, предпочтительно зрелого PH20 дикого типа, и предпочтительно дополнительно включает замену аминокислотного остатка в одном или нескольких положениях, выбранных из T341 до N363, особенно в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из T341, L342, S343, I344, M345, S347, M348, K349, L352, L353, D355, E359, I361 и N363, но настоящее изобретение этим не ограничивается, и более предпочтительно, дополнительно включает одну или несколько замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, D355K, E359D, I361T и N363G, но настоящее изобретение этим не ограничивается.

Предпочтительно вариант PH20 или его фрагмент, включенный в фармацевтическую композицию

согласно настоящему изобретению, может включать замену аминокислотного остатка, выбранную из M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и может дополнительно включать замену одного или нескольких аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из T341S, L342W, S343E, I344N и N363G, но настоящее изобретение этим не ограничивается.

Более предпочтительно вариант RH20 или его фрагмент, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, может включать, без ограничения, любую замену, выбранную из следующих групп:

(a) T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T;

(b) L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T;

(c) M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T;

(d) M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T и N363G;

(e) I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T; и

(f) S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T.

В настоящем описании выражение, которое описывается однобуквенным кодом аминокислотного остатка вместе с числами, таким как "S347", означает аминокислотный остаток в соответствующем положении в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

Например, "S347" означает, что аминокислотный остаток в положении 347 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 представляет собой серин. Кроме того, "S347T" означает, что серин в положении 347 SEQ ID NO: 1 заменен на треонин.

Вариант RH20, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, интерпретируется как включающий варианты, в которых аминокислотный остаток в определенном положении аминокислотного остатка подвергнут консервативной замене.

Используемый в настоящей заявке термин "консервативная замена" относится к модификациям варианта RH20, которые включают замену одной или нескольких аминокислот аминокислотами, имеющими аналогичные биохимические свойства, которые не вызывают потери биологической или биохимической функции соответствующего варианта RH20.

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, определены и хорошо известны в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин и гистидин), аминокислоты с кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту), аминокислоты с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин и цистеин), аминокислоты с неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин и триптофан), аминокислоты с бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин и изолейцин) и аминокислоты с ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин).

Ожидается, что вариант RH20, включенный в фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим описанием, все еще сохранит свою активность, несмотря на наличие консервативных аминокислотных замен.

Кроме того, вариант RH20 или его фрагмент, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, интерпретируется как включающий варианты RH20 или их фрагменты, имеющие по существу такую же функцию и/или эффект, что и варианты RH20 или их фрагменты в соответствии с настоящим изобретением, и имеющий гомологию аминокислотной последовательности по меньшей мере 80% или 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% с вариантом RH20 или его фрагментом в соответствии с настоящим изобретением.

Варианты RH20 согласно настоящему изобретению имеют повышенные уровни экспрессии в клетках животных и повышенный уровень рефолдинга белка, тем самым повышая термостабильность по сравнению со зрелым белком RH20 дикого типа. Кроме того, ферментативная активность вариантов RH20 превышала или была сходной с активностью зрелого RH20 дикого типа, несмотря на повышение термостабильности.

Между тем, известно, что, когда некоторые аминокислоты на С-конце зрелого белка RH20 дикого типа, такие как S490, дополнительно отщепляются, ферментативная активность снижается, но варианты RH20 в соответствии с настоящим описанием показали повышенную термостабильность, и повышенную или аналогичную ферментативную активность по сравнению со зрелым RH20 дикого типа, даже если С-конце зрелого RH20 дикого типа имеет дополнительно отщепленную последовательность. Кроме того, варианты RH20 сохраняли свою ферментативную активность, когда до пяти аминокислотных остатков отщеплялись от N-концевых аминокислот, что указывает на то, что остатки, начинающиеся с P41 N-

конца, играли важную роль в экспрессии белка и ферментативной активности.

Соответственно, вариант PH20, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, включает некоторые замены аминокислотных остатков в области альфа-спирали 8 (от S347 до C381) и/или в линкерной области (от A333 до R346) между альфа-спиралью 7 и альфа-спиралью 8 PH20 дикого типа и, кроме того, включает делеции некоторых аминокислотных остатков на С-конце и/или N-конце, но настоящее описание этим не ограничивается.

В одном варианте осуществления вариант PH20, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, может включать некоторые делеции аминокислотных остатков на N-конце, возникающие в результате расщепления перед аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из M1-P42 на N-конце аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, предпочтительно перед аминокислотным остатком L36, N37, F38, R39, A40, P41 или P42, и/или делеции некоторых аминокислотных остатков на С-конце в результате расщепления после аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из V455-W509 на С-конце, предпочтительно после аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из V455-S490, и наиболее предпочтительно после аминокислотного остатка V455, C458, D461, C464, I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 или S490.

Выражение "расщепление перед L36, N37, F38, R39, A40, P41 или P42 на N-конце" означает, соответственно, что все аминокислотные остатки от M1 до T35 непосредственно перед L36, все аминокислотные остатки от M1 до L36 непосредственно перед N37, все аминокислотные остатки от M1 до N37 непосредственно перед F38, все аминокислотные остатки от M1 до F38 непосредственно перед R39, все аминокислотные остатки от M1 до R39 непосредственно перед A40, все аминокислотные остатки от M1 до A40 непосредственно перед P41 или все аминокислотные остатки от M1 до P41 непосредственно перед P42 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 отщепляются и удаляются. Выражение "расщепление перед M1 на N-конце SEQ ID NO: 1" означает, что на N-конце расщепления не происходит.

Кроме того, выражение "расщепление после V455, C458, D461, C464, I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488, или S490 на С-конце" означает расщепление и удаление аминокислотного остатка, следующего за V455, C458, D461, C464, I465, D466, A467, F468, K470, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 или S490, соответственно, в последовательности SEQ ID NO: 1. Например, расщепление после S490 означает расщепление между S490 и A491.

Предпочтительно вариант PH20 человека, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему раскрытию, может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 5-50, более предпочтительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44, но настоящее изобретение этим не ограничивается. В вариантах PH20, сконструированных в конкретных вариантах осуществления согласно настоящему изобретению, последовательности замещенных или расщепленных аминокислот показаны в табл. 4 ниже.

Аминокислотные последовательности вариантов РН20
согласно изобретению, и их свойства замещения/расщепления

Название	№ последовательности	Замена	Последовательность
HM1	5	12 аминокислот замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T, и N363G.	LNFRAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGGQVTIFYVDRLGYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIMIWTLSITRTKESQQAIK <u>EYMDTTLG</u> PIIINVTLAAKMCSQVLCQEQQVCIRK NWNSSDYHLNPNDFAIQLEKGGKFTVRGKPTLED LEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIAD GVCIDAFKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM2	6	7 аминокислот замещены Y365F, I367L, L371S, A372G, K374L, M375L и V379A	LNFRAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGGQVTIFYVDRLGYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRF NHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIMIWTLSITRTKESQQAIKE <u>YMDTTLNPFILNVTSGALLCSQA</u> LCQEQQVCIRKN WNSSDYHLNPNDFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADG VCIDAFKPPMETEEPQIFYNASPSTLS

HM3	7	19 аминокислот замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T, N363G, Y365F, I367L, L371S, A372G, K374L, M375L, V379A.	LNFRAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGGQVTIFVDR LGYYPIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKK DITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVWGTLSITRTKESCAIK <u>EYMDTTLGPFILNVTSGALLCSOALCQE QGVCIRK</u> NWNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLED LEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKD TDAVDVCIAD GVCIDAF LKPPMETEEPQIFYNASPTLS
HM4	8	17 аминокислот замещены на G340V, T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T и N363G.	LNFRAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGGQVTIFVDR LGYYPIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKK DITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVW <u>WSENTRTKESCA</u> <u>IKEYMDTTLGPIIINVT LAAKMCSQVLCQE QGVCIR</u> KNWNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLE DLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKD TDAVDVCIAD DGVCIDAF LKPPMETEEPQIFYNASPTLS
HM6	9	11 аминокислотных остатков замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T.	LNFRAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGGQVTIFVDR LGYYPIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKK DITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVWGTLSITRTKESCAIK <u>EYMDTTLNPIIINVT LAAKMCSQVLCQE QGVCIRK</u> NWNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLED LEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKD TDAVDVCIAD GVCIDAF LKPPMETEEPQIFYNASPTLS

HM7	10	16 аминокислот замещены G340V, T341S L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T.	LNFRAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFL VETIKLGKLLRPN HLWGYYLFPDCYNHHYK KPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIW <u>SWENTRTKESQAIKE</u> YMDTTLNPIIINVT LAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAFKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM8	11	12 аминокислот замещены I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T.	LNFRAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFL VETIKLGKLLRPN HLWGYYLFPDCYNHHYK KPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTL <u>SNTRTKESQAIKEY</u> MDTTLNPIIINVT LAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAFKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM9	12	13 аминокислот замещены S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T.	LNFRAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFL VETIKLGKLLRPN HLWGYYLFPDCYNHHYK KPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTL <u>LENTRTKESQAIKEY</u> MDTTLNPIIINVT LAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAFKPPMETEEPQIFYNASPSTLS

HM10	13	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T.	LNFRAPPVIPNVVFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIYDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRP NHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVWGTWENTRTKESCQA IKEYMDTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQQVCI RKNWNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCI ADGVCI DAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM11	14	13 аминокислотных остатков замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T, Y365F и I367L.	LNFRAPPVIPNVVFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIYDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPN HLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTLSITRTKESCQAIKEYM DTTLNPFILNVTLAAKMCSQVLCQEQQVCIKRNW NSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCI DAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM12	15	15 аминокислотных остатков замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T, Y365F, I367L, L371S и A372G.	LNFRAPPVIPNVVFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIYDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPN HLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTLSITRTKESCQAIKEYM DTTLNPFILNVTSGAKMCSQVLCQEQQVCIKRNW NSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCI DAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS

HM13	16	11 аминокислотных остатков замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и проведено расщепление перед остатком F38 на N-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKIDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWPKDVKYKNSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND LSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTLSITRTKESCQAIKEY MDTTLNPIIINVTLAAKMC SQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAFKPPMETEEOIFYNASPSTLS
HM14	17	11 аминокислотных остатков замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и проведено расщепление после карбоксильной группы I465.	LNFRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKIDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTLSITRTKESCQAIKEYM DTTLNPIIINVTLAAKMC SQVLCQEQGVCIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCI
HM15	18	11 аминокислотных остатков замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и проведено расщепление после карбоксильной группы F468.	LNFRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKIDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTLSITRTKESCQAIKEYM DTTLNPIIINVTLAAKMC SQVLCQEQGVCIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCI DAF

HM16	19	11 аминокислотных остатков замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и проведено расщепление после карбоксильной группы P471.	LNFRAPPVIPNV/PFLWAWNAPSEFLGKGFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGGQVTFIVDRLGYYPIYDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLIVETIKLGLLRPN HLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTL SITRTKESQAIKEYM <u>DT</u> TLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGV CIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFCYCSYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCI DAFLKP
HM17	20	Аминокислотные остатки L36-V47 замещены FRGPLLPNR, и 11 аминокислот замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T.	FRGPLLPNR PFLWAWNAPSEFLGKGFDEPLDMSLF SFIGSPRINATGGQVTFIVDRLGYYPIYDSITGVTVN GGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVID WEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLIVETIKLGLLRPNHLW GYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLS WLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVREAI RVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYT FGETVALGASGIVWGTL SITRTKESQAIKEYMDT <u>T</u> LNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGV CIRKNWNSS DYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSE KFYCSYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCI DAFLKPPMETEERQIFYNASPSTLS
HM18	21	Аминокислоты L36-A52 замещены FRGPLLPNRPFTTV, и 11 аминокислот замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T.	FRGPLLPNRPFTTV WNAPEFLGKGFDEPLDMSLF SFIGSPRINATGGQVTFIVDRLGYYPIYDSITGVTVN GGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVID WEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLIVETIKLGLLRPNHLW GYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLS WLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVREAI RVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYT FGETVALGASGIVWGTL SITRTKESQAIKEYMDT <u>T</u> LNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGV CIRKNWNSS DYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSE KFYCSYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCI DAFLKPPMETEERQIFYNASPSTLS

HM19	22	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и проведено расщепление перед остатком F38 на N-конце и после остатка K470 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDR LGYYPYDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND LSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGT <u>WENTRTKESQCAIKE</u> YMDTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQE QGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAFK
HM20	23	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и проведено расщепление перед остатком F38 на N-конце и после остатка F468 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDR LGYYPYDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND LSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGT <u>WENTRTKESQCAIKE</u> YMDTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQE QGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAF
HM21	24	15 аминокислотных остатков замещены T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T.	LNFRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDR LGYYPYDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVWGS <u>WENTRTKESQCA</u> <u>IKEYMDTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQE</u> QGVC RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCI ADGVCIDAFKPPMETEEPQJIFYNASPSTLS

HM24	25	11 аминокислотных остатков замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком A40 на N-конце.	<p>APPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSLFS FIGSPRINATGQGVTFYVDR LGYYPIDSITGVTVN GGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVID WEEWRPTWARNWPKDVKYKNSIELVQQQNVQ LSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHL WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVRE AIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELV YTFGETVALGASGIVIWGTLSTRTKESCOAIKEYM DTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLE QFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADG VCIDAFKPPMETEEOQIFYNASPSTLS</p>
HM25	26	11 аминокислот замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, расщепление проведено перед остатком P42 на N-конце.	<p>PVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSLFSFIG SPRINATGQGVTFYVDR LGYYPIDSITGVTVNGGI PQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWE EWRPTWARNWPKDVKYKNSIELVQQQNVQLSL TEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWG YYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLSW LWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIR VSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYT FGETVALGASGIVIWGTLSTRTKESCOAIKEYMDT TLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKKNWNSS DYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSE KFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCID AFLKPPMETEEOQIFYNASPSTLS</p>
HM29	27	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и проведено расщепление перед остатком L36 на N-конце и после остатка A467 на C-конце.	<p>LNFRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDR LGYYPIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSTRTKESCOA IKEYMDTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCI ADGVCIDA</p>

HM30	28	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком L36 на N-конце и после остатка C464 на C-конце.	LNFRAPPVIPNVPFLLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGGQGVTFYVDRLGYYPIIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYPMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRP NHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVWGTWENTRTKESCOA <u>IKEYMDTTLN</u> PYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCI ADGVC
HM31	29	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком L36 на N-конце и после остатка D461 на C-конце.	LNFRAPPVIPNVPFLLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGGQGVTFYVDRLGYYPIIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYPMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRP NHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVWGTWENTRTKESCOA <u>IKEYMDTTLN</u> PYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCI AD
HM32	30	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед первым остатком L36 на N-конце и после остатка C458 на C-конце.	LNFRAPPVIPNVPFLLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGGQGVTFYVDRLGYYPIIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYPMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRP NHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVWGTWENTRTKESCOA <u>IKEYMDTTLN</u> PYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCI

HM33	31	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком L36 на N-конце и после остатка V455 на C-конце.	LNFRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRN DDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVWGTWENTRTKESQQA <u>IKEYMDTTLN</u> PIIINVTLAAKMC SQVLCQE QGVCI RKNWNSSDYHLNPNDFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADV KDTDAV
HM34	32	15 аминокислотных остатков замещены T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка K470 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGSWENTRTKESQAIKE <u>YMDTTLN</u> PIIINVTLAAKMC SQVLCQE QGVCI RKN WNSSDYHLNPNDFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAFK
HM35	33	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка P472 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTWENTRTKESQAIKE <u>YMDTTLN</u> PIIINVTLAAKMC SQVLCQE QGVCI RKN WNSSDYHLNPNDFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAFKPP

HM36	34	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка M473 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPNH LWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND LSWLWNESTALYPSIYLNQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTWENTRTKESQAIKE YMDTTLNPIYINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKRN WNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAFKPPM
HM37	35	14 аминокислотных остатком замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-и после остатка E474 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPNH LWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND LSWLWNESTALYPSIYLNQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTWENTRTKESQAIKE YMDTTLNPIYINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKRN WNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAFKPPME
HM38	36	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка T475 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPNH LWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND LSWLWNESTALYPSIYLNQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTWENTRTKESQAIKE YMDTTLNPIYINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKRN WNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAFKPPMET

HM39	37	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка E476 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFLGKDFEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPIYDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKIDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGT <u>WENTRTKESCQAIKE</u> YMD <u>TT</u> LNPIYINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKRN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADG VCIDAFKPPMETE
HM40	38	11 аминокислотных остатков замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком N37 на N-конце.	NFRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFLGKDFEPLDMSL LFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPIYDSITGVTV VNGGIPQKISLQDHLDKAKKIDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV VQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPNH HLWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDE LVYTFGETVALGASGIVWGTLS <u>TRTKESCQAIKEY</u> MD <u>TT</u> LNPIYINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKRN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADG VCIDAFKPPMETEEOJFYNASPSTLS
HM41	39	11 аминокислотных остатков замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком R39 на N-конце.	RAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFLGKDFEPLDMSLF SFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPIYDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKIDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTLS <u>TRTKESCQAIKEY</u> MD <u>TT</u> LNPIYINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKRN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADG VCIDAFKPPMETEEOJFYNASPSTLS

HM42	40	11 аминокислотных остатков замещены M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком P41 на N-конце.	PPVIPNVFLWAWNAPSEFCLGKDFEPLDMSLFSFI GSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPIYDITSGVTVNG GIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDW EEWRPTWARNWPKDVKYKNSIELVQQQNVQLS LTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLW GYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLS WLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLVRRNRVREA IRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVY TFGETVALGASGIVWGTLSITRTKESCOAIKEYMD TTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKRNWNS SDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFS EKFYCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCID AFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM43	41	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка I465 на C-конце.	FRAPPVIPNVFLWAWNAPSEFCLGKDFEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPIYDITSGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEWRPTWARNWPKDVKYKNSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHL WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLS SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLVRRNRVREA IRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVY TFGETVALGASGIVWGSWENTRTKESCOAIKEYM DTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKRNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFYCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCI
HM44	42	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка D466 на C-конце.	FRAPPVIPNVFLWAWNAPSEFCLGKDFEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPIYDITSGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEWRPTWARNWPKDVKYKNSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHL WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLS SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLVRRNRVREA IRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVY TFGETVALGASGIVWGSWENTRTKESCOAIKEYM DTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKRNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFYCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCI D

HM45	43	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка A467 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPNHL WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREA IRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVY TFGETVALGASGIMWGSWENTRTKESQAIKEYM DTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGV CIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFCYSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCI DA
HM46	44	15 аминокислотных остатков замещены T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка F468 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPNHL WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREA IRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVY TFGETVALGASGIMWGSWENTRTKESQAIKEYM DTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGV CIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFCYSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCI DAF
HM47	45	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка P478 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLLRPNH LWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDL LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIMWGTWENTRTKESQAIKE YMDTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGV CIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAFKPPMETEEP

HM48	46	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка I480 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKIDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWPKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTWENTRTKESCQAIKE YMDTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKRN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYCSYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAF LKPPMETE EEPQI
HM49	47	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка Y482 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKIDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWPKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTWENTRTKESCQAIKE YMDTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKRN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYCSYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAF LKPPMETE EEPQIFY
HM50	48	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка A484 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKIDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWPKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGTWENTRTKESCQAIKE YMDTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIKRN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYCSYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAF LKPPMETE EEPQIFYNA

HM51	49	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка P486 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNA PSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGV TIFVDR LGGYYPYDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKK DITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGLLRPNH LWGYLFPDCYNH HYYKPGYNGSCFNVEIKRND LSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSP LPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGT <u>WENTRTKESQAIKE</u> YMDTTLNPIIINVT LAAKMCSQVLCQEQGV CIRKN WNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYCSYSL SCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAF LKPPMETE EPQIFYNASP
HM52	50	14 аминокислотных остатков замещены L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T, и расщепление проведено перед остатком F38 на N-конце и после остатка T488 на C-конце.	FRAPPVIPNV PFLWAWNA PSEFC LGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGV TIFVDR LGGYYPYDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKK DITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGLLRPNH LWGYLFPDCYNH HYYKPGYNGSCFNVEIKRND LSWLWNESTALYPSIYLN TQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSP LPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVWGT <u>WENTRTKESQAIKE</u> YMDTTLNPIIINVT LAAKMCSQVLCQEQGV CIRKN WNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFCYCSYSL SCKEKADV KDTDAVDVCIADG VCIDAF LKPPMETE EPQIFYNASP

Между тем, в предыдущих исследованиях сообщалось, что ферментативная активность PH20 дикого типа изменяется в зависимости от положений расщепления аминокислотных остатков, расположенных на C-конце. Однако в настоящем описании конкретная альфа-спираль, образующая вторичную структуру PH20, была заменена альфа-спиралью другой гиалуронидазы человека, с конструированием вариантов PH20, имеющих более высокую стабильность, чем PH20 дикого типа, и в этих вариантах взаимодействие между замещенным доменом альфа-спирали и другими вторичными структурами PH20 демонстрируют характер, отличный от характера PH20 дикого типа, так что варианты имеют определенный уровень ферментативной активности или более высокий, независимо от положения расщепления на C-конце.

Кроме того, в настоящем описании были предприняты попытки увеличить экспрессию рекомбинантного белка PH20 путем использования сигнального пептида других белков, демонстрирующих высокие уровни экспрессии белка в клетках животных, вместо исходного сигнального пептида PH20 человека.

Таким образом, в другом варианте осуществления вариант PH20, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, может включать на своем N-конце сигнальный пептид, полученный из гиалуронидазы-1 человека (Hyal1), гормона роста человека или сывороточного альбумина человека вместо сигнального пептида PH20 дикого типа, который состоит из M1-T35, и предпочтительно может включать, как показано в табл. 5, сигнальный пептид, производный от гормона роста человека, имеющий аминокислотную последовательность MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSA в соответствии с SEQ ID NO: 2, сигнальный пептид, производный от человеческого сывороточного альбумина, имеющий аминокислотную последовательность MKWVTFISLLFLFSSAYS согласно SEQ ID NO: 3, или сигнальный пептид, производный от Hyal1 человека, имеющий аминокислотную последовательность MAANLLPICALFLTLDDMAQG согласно SEQ ID NO: 4, но настоящее изобретение этим не ограничивается.

Таблица 5

Аминокислотная последовательность сигнального пептида гормона роста человека, сывороточного альбумина человека или Hya11 человека

Происхождение пептида	сигнального	Аминокислотная последовательность	SEQ ID №:
Гормон роста человека		MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLEQESA	2
Сывороточный альбумин человека		MKWVTFISLLFLFSSAYS	3
Hya11 человека		MAAHLIPICALFLTLLDMAQG	4

Среди вариантов RH20, включенных в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, вариант, имеющий 6xHis-метку, прикрепленную к С-концу, был обозначен как HM, а вариант без 6xHis-метки был обозначен как HP. Кроме того, зрелый белок RH20 дикого типа (L36-S490) с 6xHis-меткой, прикрепленной к его С-концу, был обозначен как WT, а зрелый RH20 дикого типа (L36-Y482) без 6xHis-метки и в котором С-конце отщеплен после Y482, был обозначен как HW2.

HP46 (SEQ ID NO: 44) представляет собой вариант RH20 человека, полученный путем моделирования структуры белка с использованием Hya11 (PDB ID: 2PE4) (Chao et al., 2007), который представляет собой гиалуронидазу человека с известной третичной структурой белка, с последующей заменой аминокислотной последовательности альфа-спирали 8 и линкерной области между альфа-спиралью 7 и альфа-спиралью 8 на аминокислотную последовательность Hya11, и с расщеплением N-конца на F38 и расщеплением С-конца после F468. В частности, альфа-спираль 8 расположена вне третичной структуры белка RH20 и меньше взаимодействует с соседними альфа-спиралями или бета-цепями, чем другие альфа-спирали. Как правило, ферментативная активность и термостабильность имеют компромиссное соотношение между ними, и таким образом, чем выше термостабильность белка, тем ниже ферментативная активность, тогда как, когда ферментативная активность увеличивается из-за улучшения гибкости структуры белка, термостабильность имеет тенденцию к снижению. Однако удельная активность HP46, измеренная турбидиметрическим анализом при pH 7,0, составляла примерно 46 Ед./мкг, что, по оценкам, примерно в два раза выше, чем у RH20 дикого типа, где активность составила примерно 23 Ед./мкг.

Термостабильность белка может быть оценена на основе температуры плавления T_m , при которой денатурируется 50% третичной структуры белка, и температуры агрегации T_{agg} , при которой происходит агрегация между белками. Как правило, температура агрегации белка обычно ниже, чем его температура плавления. Альфа-спираль 8 Hya11 проявляет большую гидрофильность, чем альфа-спираль 8 RH20. Замещенная альфа-спираль 8 Hya11 увеличивает гидрофильность поверхности белка HP46, тем самым вызывая эффект задержки агрегации между белками, который происходит из-за гидрофобных взаимодействий, и, таким образом, температура агрегации составляет 51°C, что, как наблюдается, является увеличением на 4,5°C по сравнению с температурой агрегации RH20 дикого типа, которая составляет 46,5°C.

HP46 представляет собой вариант, в котором аминокислотные остатки в альфа-спирали 8 и линкерной области между альфа-спиралью 7 и альфа-спиралью 8 замещены, при этом T341 заменен на серин. Когда аминокислотный остаток 341 представляет собой треонин, активность фермента аналогична активности RH20 дикого типа, но при замене серином активность фермента увеличивается примерно в 2 раза, и было подтверждено, что даже в анализе на гелевом субстрате полученный вариант гидролизует гиалуроновую кислоту в 5-6 раз больше, чем RH20 дикого типа. Анализ на геле в качестве субстрата включает процессы денатурации и рефолдинга белка, что означает, что рефолдинг третичной структуры белка и восстановление HP46 усиливаются по сравнению с RH20 дикого типа.

Количество варианта RH20 в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению составляет по меньшей мере 50 Ед./мл, предпочтительно в диапазоне от 100 Ед./мл до 20000 Ед./мл, более предпочтительно в диапазоне примерно от 150 Ед./мл до 18000 Ед./мл, еще более предпочтительно в диапазоне от 1000 Ед./мл до 16000 Ед./мл, и наиболее предпочтительно в диапазоне от 1500 Ед./мл до 12000 Ед./мл.

Примеры лекарственного средства, включенного в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, включают, без ограничения, белковые лекарственные средства, лекарственные средства на основе антител, малых молекул, аптамеров, препараты на основе РНК-интерференции, антисмысловых олигонуклеотидов и клеточных терапевтических агентов, таких как химерный антигенный рецептор (CAR)-Т или CAR-естественный киллер (NK), и можно использовать не только коммерчески доступные в настоящее время лекарства, но и лекарства, проходящие клинические испытания или находящиеся в стадии разработки.

В качестве лекарственного средства предпочтительно можно использовать белковое лекарственное средство или лекарственное средство на основе антител.

"Белковое лекарственное средство", включенное в фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой лекарственное средство, которое состоит из аминокислот, и таким образом, проявляет лечебный или профилактический эффект посредством активности белка, представляет собой лекарственное средство, состоящее из иного белка, чем лекарственное средство на

основе антител, и может быть выбрано из группы, состоящей из цитокина, терапевтического фермента, гормона, растворимого рецептора и его гибридного белка, инсулина или его аналога, костного морфогенетического белка (BMP), эритропоэтина и сывороточного белка, но настоящее описание этим не ограничивается.

Цитокин, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, может быть выбран из группы, состоящей из интерферона, интерлейкина, колониестимулирующего фактора (CSF), фактора некроза опухоли (TNF) и фактора роста ткани (TGF), но настоящее изобретение этим не ограничивается.

Терапевтический фермент может включать β -глюкоцеребозидазу и агалсидазу- β , но не ограничивается ими.

Растворимый рецептор, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, представляет собой внеклеточный домен рецептора, а его гибридный белок представляет собой белок, в котором Fc-область или подобная область из антитела слита с растворимым рецептором. Растворимый рецептор представляет собой растворимую форму рецептора, с которой связывается ассоциированный с заболеванием лиганд, и его примеры включают форму, в которой область Fc слита с растворимым рецептором TNF- α (например, продукт, содержащий ингредиент этанерцепт, и аналогичные формы), форму, в которой область Fc слита с растворимым рецептором VEGF (продукт, содержащий ингредиент алефацепт и аналогичные ему формы), форму, в которой область Fc слита с CTLA-4 (например, продукт, содержащий ингредиент абатацепт или белатацепт и аналогичные им формы), форму, в которой область Fc слита с растворимым рецептором интерлейкина 1 (например, продукт, содержащий ингредиент рилонацепт и аналогичные ему формы), и форму, в которой область Fc слита с растворимым рецептором LFA3 (например, продукт, содержащий ингредиент алефацепт и аналогичные ему формы), но настоящее изобретение этим не ограничивается.

Гормон, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, относится к гормону, вводимому в организм, или его аналогу для лечения или профилактики заболеваний, вызванных дефицитом гормона и т.п., и их примеры включают гормон роста человека, эстроген и прогестерон, но не ограничиваются ими.

Белок сывороточного происхождения, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, представляет собой белок, присутствующий в плазме, и включает как белки, экстрагированные из плазмы, так и продуцируемые рекомбинантные белки, и их примеры могут включать фибриноген, фактор фон Виллебранда, альбумин, тромбин, фактор II (FII), фактор V (FV), фактор VII (FVII), фактор IX (FIX), фактор X (FX) и фактор XI (FXI), но не ограничиваются ими.

Лекарственное средство на основе антител, включенное в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, может быть лекарственным средством из моноклонального антитела или лекарственным средством из поликлонального антитела.

Лекарственное средство из моноклонального антитела согласно настоящему изобретению представляет собой белок, содержащий моноклональное антитело и фрагмент моноклонального антитела, которые способны специфически связываться с антигеном, ассоциированным с конкретным заболеванием. Моноклональное антитело также включает биспецифическое антитело, а белок, содержащий моноклональное антитело или его фрагмент, концептуально включает конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC).

Примеры антигена, относящегося к конкретному заболеванию, включают 4-1BB, интегрин, бета-амилоид, ангиопоэтин (ангиопоэтин 1 или 2), аналог ангиопоэтина 3, B-клеточный активирующий фактор (BAFF), V7-H3, комплемент 5, CCR4, CD3, CD4, CD6, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD52, CD62, CD79b, CD80, CGRP, клаудин-18, фактор комплемента D, CTLA4, DLL3, рецептор EGF, фактор гемофилии, рецептор Fc, FGF23, фолатный рецептор, GD2, GM-CSF, HER2, HER3, рецептор интерферона, гамма-интерферон, IgE, рецептор IGF-1, интерлейкин 1, рецептор интерлейкина 2, рецептор интерлейкина 4, интерлейкин 5, рецептор интерлейкина 5, интерлейкин 6, рецептор интерлейкина 6, интерлейкин 7, интерлейкин 12/23, интерлейкин 13, интерлейкин 17A, рецептор интерлейкина 17A, рецептор интерлейкина 31, рецептор интерлейкина 36, LAG3, LFA3, LAG3, LFA3, PVSK9, PD-1, PD-L1, RANK-L, SLAMF7, тканевой фактор, TNF, VEGF, рецептор VEGF и фактор фон Виллебранда (vWF), но настоящее изобретение этим не ограничивается.

Ниже перечислены, без ограничения, белки, включая моноклональные антитела или фрагменты моноклональных антител против антигенов, связанных с конкретным заболеванием:

- утомилумаб как антитело против 4-1BB;
- натализумаб, этролизумаб, ведолизумаб и бимагрумаб в качестве антител против интегрина;
- бапинеизумаб, кренезумаб, соланезумаб, адуканумаб и гантенерумаб в качестве антител против бета-амилоида;
- антитела против ангиопоэтина, такие как AMG780 против ангиопоэтина 1 и 2, MEDI 3617 и несвакумаб против ангиопоэтина 2 и вануцизумаб, который является биспецифическим антителом против ангиопоэтина 2 и VEGF;

эвинакумаб как антитело против аналога ангиопоэтина 3;
табалумаб, ланалумаб и белимумаб в качестве антител против фактора активации В-клеток (BAFF);
омбуртамаб как антитело против B7-H3;
равулизумаб и экулизумаб как антитела против комплемента 5;
могамулизумаб как антитело против CCR4;
отеликсизумаб, теплизумаб и муромонаб как антитела против CD3, тебентафусп как биспецифическое антитело против GP100 и CD3, блинатумомаб как биспецифическое антитело против CD19 и CD3, и REGN1979 как биспецифическое антитело против CD20 и CD3;
ибализумаб и занолимумаб как антитела против CD4;
итолизумаб как антитело против CD6;
эфализумаб как антитело против CD11a;
инебилизумаб, тафаситамаб и лонкастуксимаб теизирин, который представляет собой ADC, в качестве антител против CD19;
окрелизумаб, ублитуксимаб, обинутузумаб, офатумумаб, ритуксимаб, тозитумомаб и ибритумомаб тиуксетан, который представляет собой ADC, в качестве антител против CD20;
эпратузумаб, инотузумаб озогамидин, который представляет собой ADC, и моксетумомаб пасудотокс в качестве антител против CD22;
брентуксимаб ведотин в качестве ADC против CD30;
вадастуксимаб, талирин и гемтузумаб озогамидин в качестве ADC против CD33;
даратумумаб и изатуксимаб в качестве антител против CD38;
алемтузумаб как антитело против CD52;
кризанлизумаб как антитело против CD62;
полатузумаб ведотин в качестве ADC против CD79b;
галиксимаб как антитело против CD80;
эптинезумаб, фреманезумаб, галканезумаб и эренумаб в качестве антител против CGRP;
золбетуксимаб как антитело против клаудина-18;
лампализумаб как антитело против фактора комплемента D;
тремелимумаб, залифрелимаб и ипилимумаб в качестве антител против CTLA4;
ровалпитузумаб теизирин в качестве ADC против DLL3;
цетуксимаб, депатуксизумаб, залутумумаб, нецитумумаб и панитумумаб в качестве антител против рецептора EGF;
эмицизумаб как биспецифическое антитело против фактора коагуляции IX и фактора коагуляции X, которые являются факторами гемофилии;
нипокалимаб и розаноликсизумаб как антитела против рецептора Fc;
буросумаб как антитело против FGF23;
фарлетузумаб как антитело против фолатного рецептора и мирветуксимаб соравтанзин как ADC против фолатного рецептора;
динутуксимаб и накситамаб как антитела против GD2;
отилимаб как антитело против GM-CSF;
маргетуксимаб, пертузумаб и трастузумаб в качестве антител против HER2 и трастузумаб деруксте- кан, трастузумаб эмтанзин и трастузумаб дуокармазин в качестве ADC против HER2;
патритумаб как антитело против HER3;
анифролумаб как антитело против рецептора интерферона;
эмапалумаб как антитело против гамма-интерферона;
лигелизумаб и омализумаб как антитела против IgE;
далотузумаб, фигитумумаб и тепротумумаб в качестве антител против рецептора IGF-1;
гебокизумаб и канакинумаб как антитела против интерлейкина 1;
даклизумаб и базиликсимаб как антитела против рецептора интерлейкина 2;
дупилумаб как антитело против рецептора интерлейкина 4;
меполизумаб и реслизумаб как антитела против интерлейкина 5;
бенрализумаб как антитело против рецептора интерлейкина 5;
клазакизумаб, олокизумаб, сирукумаб и силтуксимаб в качестве антител против интерлейкина 6;
сарилумаб, сатрализумаб, тоцилизумаб и REGN88 в качестве антител против рецептора интерлейкина 6;
секукинумаб как антитело против интерлейкина 7;
устекинумаб и бриакинумаб как антитела против интерлейкина 12/23;
лебрикизумаб и тралокинумаб как антитела против интерлейкина 13;
иксекизумаб и бимекизумаб как антитела против интерлейкина 17A;
бродалумаб как антитело против рецептора интерлейкина 17A;
бразикиумаб, гуселкумаб, рисанкизумаб, тилдракизумаб и мирикизумаб в качестве антител против интерлейкин 23;
немолизумаб как антитело против рецептора интерлейкина 31;

спезолимаб как антитело против рецептора интерлейкина 3б;
 релатлимаб как антитело против LAG3;
 нарсоплимаб как антитело против NASP2;
 фасинумаб и танезумаб как антитела против NGF;
 алирокумаб, эволокумаб и бокоцизумаб в качестве антител против PVSK9;
 ламбролизумаб, балстилимаб, камрелизумаб, цемиплимаб, достарлимаб, пролголимаб, шинтили-
 маб, спартализумаб, тислелизумаб, пембролизумаб и ниволумаб в качестве антител против PD-1;
 атезолизумаб, авелумаб, энвафолимаб и дурвалумаб в качестве антител против PD-L1 и бинтрафусп
 альфа в качестве биспецифических антител против TGF бета и PD-L1;
 деносумаб как антитело против RANK-L;
 элотузумаб как антитело против SLAMF7;
 концизумаб и марстацимаб как антитела против тканевого фактора;
 антитела против TNF, в частности TNF α , включая инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб, фрагмент
 антитела цертолизумаб пегол и озорализумаб, который является биспецифическим антителом против
 TNF и альбумина;
 антитела против VEGF, включая бролуцизумаб, ранибизумаб, бевацизумаб и фарицимаб, которые
 являются биспецифическими антителами против VEGF и Ang2;
 рамуцирумаб как антитело против рецептора VEGF;
 каплацизумаб как антитело против vWF.

Между тем, сверхэкспрессия рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), которая способствует делению клеток, наблюдается примерно у 20-25% пациентов с раком молочной железы, и рак молочной железы при сверхэкспрессии HER2-рецептора быстро прогрессирует, является агрессивным и имеет низкий ответ на химиотерапию по сравнению с раком молочной железы с низким уровнем экспрессии HER2, и, следовательно, его прогноз является неблагоприятным. Трастузумаб, который представляет собой лекарственное средство на основе моноклонального антитела, нацеленного на HER2, специфически связывается с HER2 на поверхности сверхэкспрессирующих HER2 раковых клеток, подавляя передачу сигнала репликации и пролиферации клеток, тем самым замедляя прогрессирование опухоли. Трастузумаб был одобрен Управлением по контролю за продуктами питания и лекарствами США (FDA) в 1998 г. для лечения рака молочной железы в США, а в 2003 г. - Управлением по контролю за продуктами питания и лекарствами Кореи (KFDA). С тех пор эффективность трастузумаба была также признана при раке желудка со сверхэкспрессией HER2, и поэтому его использовали в качестве терапевтического агента при раке желудка.

Состав герцептина для внутривенной инъекции компании Roche (коммерческое название: Herceptin) состоит из 440 мг трастузумаба в качестве основного ингредиента, и лиофилизированный трастузумаб смешивают с физиологическим раствором и вводят внутривенно. С другой стороны, состав трастузумаба для подкожной инъекции (коммерческое название Herceptin SC) представляет собой жидкий состав объемом 5 мл и содержит 600 мг (120 мг/мл) трастузумаба в качестве основного ингредиента, и включает в качестве добавок 20 мМ гистидина (pH 5,5), 210 мМ трегалозы, 10 мМ метионина, 0,04% полисорбата 20 и 10000 единиц гHuPH20 (2000 Ед./мл, 0,004%, 40 мкг/мл).

Срок годности препаратов герцептина для подкожного введения составляет 21 месяц. Композиция трастузумаба для внутривенного введения находится в лиофилизированной форме и имеет срок хранения 30 месяцев, а композиция трастузумаба для подкожного введения находится в жидкой форме и имеет короткий срок хранения, составляющий 21 месяц. По этой причине можно определить, что стабильность одного или более из трастузумаба и рекомбинантной гиалуронидазы человека PH20 в жидких препаратах ограничена.

В этом контексте в настоящем изобретении, с учетом характеристик варианта PH20 согласно настоящему изобретению, где по сравнению с гиалуронидазой человека дикого типа PH20 и рекомбинантным PH20 человека, доступным от Halozyme, вариант PH20 не только имеет повышенную ферментативную активность, но также имеет высокую измеренную температуру агрегации белка, таким образом демонстрируя повышенную термостабильность, срок хранения препарата для подкожной инъекции установлен на длительный период, предпочтительно 21 месяц или более.

Содержание лекарственного антитела в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может находиться в диапазоне от 5 мг/мл до 500 мг/мл, предпочтительно от 20 мг/мл до 200 мг/мл, более предпочтительно от 100 мг/мл до 150 мг/мл, и наиболее предпочтительно 120 \pm 18 мг/мл, например, приблизительно 110 мг/мл, приблизительно 120 мг/мл или приблизительно 130 мг/мл.

Поликлональное антитело, включенное в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой сывороточное антитело, экстрагированное из сыворотки, такое как иммуноглобулин, но не ограничивается этим.

В случае низкомолекулярного соединения любое лекарство, которое требует быстрого действия для профилактики или лечения, может использоваться без ограничений. Например, можно использовать обезболивающие на основе морфина (Thomas et al., 2009). Кроме того, при использовании в качестве те-

рапевтического средства при некрозе тканей, вызванном противораковыми препаратами, низкомолекулярное соединение можно использовать отдельно или в комбинации с антидотными препаратами, такими как алкалоиды барвинка и таксаны (Kreidieh et al., 2016).

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно включать один или несколько компонентов, выбранных из группы, состоящей из буфера, стабилизатора и поверхностно-активного вещества.

Буфер, включенный в композицию в соответствии с настоящим изобретением, можно использовать без ограничения, при условии, что он обеспечивает достижение pH от 4 до 8, предпочтительно от 5 до 7, и буфер предпочтительно представляет собой один или несколько буферов, выбранных из группы, состоящей из малата, формиата, цитрата, ацетата, пропионата, пиридина, пиперазина, какодилата, сукцината, 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), гистидина, Трис, бис-Трис, фосфата, этаноламина, карбоната, пиперазин-N,N'-бис-(2-этансульфоновой кислоты) (PIPES), имидазола, бис-Трис пропана, N,N'-бис-(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновой кислоты (BES), 3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислоты (MOPS), гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES), пиррофосфата и триэтанолamina, более предпочтительно гистидиновый буфер, например L-гистидин/HCl, но не ограничивается этим.

Концентрация буфера может находиться в диапазоне от 0,001 до 200 мМ, предпочтительно от 1 мМ до 50 мМ, более предпочтительно от 5 мМ до 40 мМ и наиболее предпочтительно от 10 мМ до 30 мМ.

Стабилизаторы в композиции согласно настоящему изобретению можно использовать без ограничения, если они обычно используются в данной области для стабилизации белков, и предпочтительно стабилизаторы могут быть, например, одним или несколькими стабилизаторами, выбранными из группы состоящий из углеводов, Сахаров или их гидратов, сахароспиртов или их гидратов, и аминокислот.

Углеводы, сахара или сахароспирты, используемые в качестве стабилизатора, могут быть одним или несколькими, выбранными из группы, состоящей из трегалозы или ее гидратов, сахарозы, сахарина, глицерина, эритритола, трейтола, ксилитола, арабитола, рибитола, маннитола, сорбитола, галактитола, фуцитолола, идитола, инозитола, волемиитола, изомальта, мальтитола, полиглицитола, циклодекстрина, гидроксилпропилциклодекстрина и глюкозы, но не ограничиваются ими.

Аминокислота может быть одной или несколькими аминокислотами, выбранными из группы, состоящей из глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, лизина, лизилизина, лейцина, метионина, валина, серина, селенометионина, цитруллина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, орнитина, изолейцина, таурина, теанина, треонина, триптофана, тирозина, фенилаланина, пролина, пирролизина, гистидина и аланина, но не ограничиваются ими.

Концентрация Сахаров или сахароспиртов, используемых в качестве стабилизатора в фармацевтической композиции в соответствии с настоящим описанием, может находиться в диапазоне от 0,001 мМ до 500 мМ, предпочтительно от 100 мМ до 300 мМ, более предпочтительно от 150 мМ до 250 мМ и наиболее предпочтительно от 180 мМ до 230 мМ и, в частности, может составлять около 210 мМ.

Кроме того, концентрация аминокислот, используемых в качестве стабилизатора в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, может находиться в диапазоне от 1 мМ до 100 мМ, предпочтительно от 3 мМ до 30 мМ, более предпочтительно от 5 мМ до 25 мМ и наиболее предпочтительно от 7 мМ до 20 мМ, и в частности, может находиться в диапазоне от 8 мМ до 15 мМ.

Композиция согласно изобретению может дополнительно включать поверхностно-активное вещество.

Предпочтительно поверхностно-активное вещество может быть неионным поверхностно-активным веществом, таким как сложный эфир полиоксиэтилен-сорбитана и жирной кислоты (полисорбат или Твин), полиэтилен-полипропиленгликоль, полиоксиэтиленстеарат, полиоксиэтиленалкиловые эфиры, например, монолауриловый эфир полиоксиэтилена, алкилфенилполиэтиленовый эфир [Тритон-Х], и сополимер полиоксиэтилена-полиоксипропилена [Полоксамер и Плурионик] и додецилсульфат натрия (SDS), но не ограничивается этим.

Более предпочтительно можно использовать полисорбат. Полисорбат может представлять собой полисорбат 20 или полисорбат 80, но не ограничивается этим.

Концентрация неионного поверхностно-активного вещества в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может находиться в диапазоне от 0,0000001% (мас./об.) до 0,5% (мас./об.), предпочтительно от 0,000001% (мас./об.) до 0,4% (мас./об.), более предпочтительно от 0,00001% (мас./об.) до 0,3% (мас./об.) и наиболее предпочтительно от 0,001% (мас./об.) до 0,2% (мас./об.).

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может включать 50-350 мг/мл антитела, например, антитела против HER2 или антитела против иммунной контрольной точки, гистидиновый буфер, обеспечивающий pH $5,5 \pm 2,0$; 10-400 мМ α, α -трегалозы, 1-50 мМ метионина и от 0,0000001% (мас./об.) до 0,5% (мас./об.) полисорбата.

В более конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может включать 120 мг/мл антитела против HER2 или антитела против иммунной кон-

трольной точки, 20 мМ гистидинового буфера, который обеспечивает pH $5,5 \pm 2,0$; 210 мМ α, α -трегалозы, 10 мМ метионина и 2000 Ед./мл варианта РН20, и может дополнительно включать от 0,005% (мас./об.) до 0,1% (мас./об.) полисорбата.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может применяться посредством внутривенного введения, подкожного введения, внутримышечного введения, интраперитонеального введения, эндотелиального введения, местного введения, интраназального введения, внутрилегочного введения, интравенального введения и т.п., и подкожное введение предпочтительно осуществляют посредством подкожной инъекции; и наиболее предпочтительно использовать фармацевтическую композицию в качестве инъекционного препарата для подкожного введения.

Таким образом, другой вариант осуществления настоящего изобретения обеспечивает состав, включающий фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, предпочтительно состав для подкожной инъекции.

Инъекционный состав для подкожной инъекции может быть предоставлен в форме, готовой к инъекции без дополнительного процесса разбавления, и может быть обеспечен помещенным в предварительно заполненный шприц, стеклянную ампулу или пластиковый контейнер.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболевания с использованием фармацевтической композиции или препарата в соответствии с настоящим изобретением.

Заболевание, которое можно лечить с использованием фармацевтической композиции или состава согласно настоящему изобретению, конкретно не ограничено, и нет никаких ограничений, если это заболевание, которое можно лечить с помощью лекарственного средства, используемого в комбинации с вариантом РН20 согласно настоящему изобретению.

Заболевание, которое можно лечить с использованием фармацевтической композиции или состава в соответствии с настоящим описанием, может представлять собой рак или аутоиммунное заболевание, но не ограничивается этим.

Рак или карцинома, которые можно лечить фармацевтической композицией или составом в соответствии с настоящим изобретением, особо не ограничивается и включает как солидные раковые заболевания, так и гемобласты. Примеры таких видов рака включают рак кожи, такой как меланома, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, рак желудка, рак молочной железы, рак легких, рак яичников, рак бронхов, рак носоглотки, рак гортани, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак шейки матки, опухоль головного мозга, рак простаты, рак костей, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак почки, рак пищевода, рак желчных путей, рак яичек, рак прямой кишки, рак головы и шеи, рак шейки матки, рак мочеточника, остеосаркому, нейробластому, фибросаркому, рабдомиосаркому, астроцитому, нейробластому и глиому, но не ограничиваются ими. Предпочтительно рак, который можно лечить с использованием фармацевтической композиции или состава по настоящему изобретению, может быть выбран из группы, состоящей из рака желудка, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких и рака почки, но не ограничивается этим.

Аутоиммунные заболевания, которые можно лечить фармацевтической композицией или составом в соответствии с настоящим изобретением, включают ревматоидный артрит, астму, псориаз, рассеянный склероз, аллергический ринит, болезнь Крона, язвенный колит, системную эритематозную волчанку, диабет I типа, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК) и атопический дерматит, но не ограничиваются этим.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения заболевания, включающий применение фармацевтической композиции или состава согласно настоящему изобретению у субъекта, нуждающегося в лечении, и настоящее изобретение дополнительно обеспечивает применение фармацевтической композиции или состава согласно настоящему изобретению для лечения болезни.

Если здесь не определено иное, технические термины и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области техники. Кроме того, будут опущены повторяющиеся описания той же технической конфигурации и работы, что и в предшествующем уровне техники.

В дальнейшем настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на следующие примеры. Эти примеры предоставлены только для иллюстративных целей, и для специалистов в данной области техники будет очевидно, что эти примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Разработка композиции.

Были приготовлены четыре композиции трастузумаба для подкожного введения, как показано в табл. 6. Ко позиции 1-4 в целом содержат 120 мг/мл трастузумаба и состоят из 20 мМ гистидина/гистидин-НСI (pH 5,5), 210 мМ трегалозы, 10 мМ метионина и варианта РН20. Разница между композициями 1-4 заключается в концентрации неионного поверхностно-активного вещества, где композиция 1 содержит 0% полисорбата 20, композиция 2 содержит 0,005% полисорбата 20, состав 3 композиция содержит 0,04% полисорбата 20, и композиция 4 содержит 0,1% полисорбата 20.

Состав композиций

	Композиция 1	Композиция 2	Композиция 3	Композиция 4
Антитело	Трастузумаб (120 мг/мл)			
Буфер	20 мМ гистидин/гистидин-НСl			
Стабилизатор 1	210 мМ трегалоза			
Стабилизатор 2	10 мМ метионин			
Полисорбат 20	0%	0,005%	0,04%	0,1%
Гиалуронидаза	HP46 из SEQ ID NO: 44 (2 000 Ед./мл)			

Пример 2. Анализ с помощью спектрофотометра.

Композиции с 1 по 4 оставляли на 14 дней при 45°C, и изменения концентрации белка анализировали с использованием спектрофотометра, произведенного Beckman. Каждый образец разбавляли дистиллированной водой так, чтобы концентрация образца составляла 0,4 мг/мл, а затем измеряли поглощение белка при 280 нм с помощью спектрофотометра. В испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 45°C в течение 14 дней, не было значительного изменения концентрации белка в композициях 1-4. Однако активность гиалуронидазы быстро снижалась при 45°C, и таким образом, в настоящем примере ферментативную активность не измеряли (см. фиг. 6).

Пример 3. Исследование соотношения мономеров трастузумаба в каждой композиции с использованием эксклюзионной хроматографии.

Для анализа методом эксклюзионной хроматографии использовали систему ВЭЖХ от Shimadzu Prominence, и колонку TSK-gel G3000SWXL (7,8×300 мм, 5 мкм) и предколонку TSK (6,0×4,0 мм, 7 мкм). В качестве подвижной фазы использовали 0,2 М фосфат калия (рН 6,2), содержащий 0,25 М хлорид калия. Анализ выполняли в течение 35 мин в режиме изократического разделения при скорости потока 0,5 мл/мин. Образец разбавляли аналитическим растворителем так, чтобы конечная концентрация составляла 10 мг/мл, и после введения 20 мкл в колонку для ВЭЖХ регистрировали поглощение при 280 нм элюата колонки. Рассчитывали соотношение мономеров трастузумаба на хроматограмме ВЭЖХ и строили график.

При проведении гель-хроматографического анализа в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 45°C в течение 14 дней, композиции 1-4 показали аналогичные закономерности изменений. Основными изменениями было увеличение продуктов разложения с высокой молекулярной массой (HMW) и с низкой молекулярной массой (LMW) и уменьшение содержания мономера (около 1,5%), и не было существенной разницы в зависимости от состава. В заключение следует отметить, что в результате проведения анализа методом эксклюзионной хроматографии в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 45°C, не было значительных различий в профилях стабильности между композициями в зависимости от концентрации полисорбата 20 (0-0,1% (мас./об.)) (см. фиг. 1).

Пример 4. Измерение температуры агрегации белков композиций, содержащих трастузумаб и HP46.

Динамическое рассеяние света (DLS) используется для анализа денатурационных свойств белков, связанных с нагреванием. В настоящем эксперименте изменение размера белковой молекулы в соответствии с изменением температуры было измерено и использовано для расчета температуры агрегации белка. Для анализа DLS использовали прибор Zetasizer-nano-ZS от Malvern, и кварцевую кювету (ZEN2112). В процессе анализа температуру повышали с 25°C до 85°C с интервалом в 1°C, и образец разбавляли до 1 мг/мл с использованием каждого буфера для композиций, а затем 150 мкл образца добавляли в кювету для анализа.

Температура агрегации в композиции 1, не содержащей полисорбат 20, составила 74°C, а температура агрегации в композициях 2-4 составила 76°C (см. фиг. 2).

Пример 5. Анализ с помощью WCX-хроматографии композиций, содержащих трастузумаб и HP46.

Для хроматографического анализа WCX использовали систему ВЭЖХ, доступную от Shimadzu Prominence, а в качестве колонок - колонку TSKgel CM-STAT (4,6×100 мм, 7 мкм), и предколонку TSKgel CMSTAT (3,2 мм, внутренний диаметр × 1,5 см) и т.п. Подвижная фаза А представляла собой 10 мМ фосфат натрия (рН 7,5), а подвижная фаза В - 10 мМ фосфат натрия (рН 7,2), содержащий 0,1 М NaCl. Анализ проводили в течение 55 мин с линейным градиентом концентрации 0-30% подвижной фазы В при скорости потока 0,8 мл/мин. Образец разбавляли подвижной фазой А так, чтобы конечная концентрация составляла 1,0 мг/мл, 80 мкл образца вводили в ВЭЖХ, а затем регистрировали поглощение колоночного элюата при 280 нм. Рассчитывали соотношение мономеров трастузумаба на хроматограмме ВЭЖХ и строили график.

Композиции 1-4 показали аналогичный характер изменений, когда анализ WCX выполняли в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 45°C в течение 14 дней. Конкретные изменения включают увеличение относительного содержания кислых вариантов (изменение примерно на 30% за 14 дней), уменьшение относительного содержания главного пика (изменение примерно на 44% за 14 дней) и увеличение относительного содержания основных вариантов (изменение примерно на 15% за 14 дней), и

не было значительной разницы в зависимости от состава. В заключение, в анализе WCX в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 45°C, стабильность белка в соответствии с полисорбатом 20 (0-0,1%) была аналогичной (см. фиг. 3).

Пример 6. Разработка композиций.

Готовили три типа композиций трастузумаба для подкожного введения, как описано в табл. 7. Композиции с 5 по 7 в целом включали 120 мг/мл трастузумаба, 20 мМ гистидин/гистидин-НСI (рН 5,5), 210 мМ трегалозы, 10 мМ метионина и НР46. Разница между композициями 5-7 заключается в ингредиенте - стабилизаторе 3: композиция 5 - 0,04% полисорбат 20, композиция 6 - 50 мМ Лиз-Лиз и композиция 3 - глицин.

Таблица 7

Состав композиций

	Композиция 5	Композиция 6	Композиция 7
Антитело	Трастузумаб (120 мг/мл)		
Буфер	20 мМ гистидин/гистидин-НСI		
Стабилизатор 1	210 мМ трегалоза		
Стабилизатор 2	10 мМ метионин		
Стабилизатор 3	0,04% полисорбат 20	50 мМ Лиз-Лиз	50 мМ глицин
Гиалуронидаза	НР46 из SEQ ID NO:44 (2 000 Ед./мл)		

Пример 7. Анализ с помощью спектрофотометра.

Композиции 5-7 оставляли на 14 дней при 45°C, и изменения концентрации белка анализировали с использованием спектрофотометра, произведенного Beckman. Каждый образец разбавляли дистиллированной водой так, чтобы концентрация образца составляла 0,4 мг/мл, а затем измеряли поглощение белка при 280 нм с помощью спектрофотометра. В испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 45°C в течение 14 дней, не было значительного изменения концентрации белка в композициях 5-7. Однако активность гиалуронидазы быстро снижалась при 45°C, и поэтому в настоящем примере ферментативную активность не измеряли (см. фиг. 6).

Пример 8. Исследование соотношения мономеров трастузумаба в каждой композиции с использованием эксклюзионной хроматографии.

Для анализа методом эксклюзионной хроматографии использовали систему ВЭЖХ от Shimadzu Prominence, с использованием колонки TSK-gel G3000SWXL (7,8×300 мм, 5 мкм) и предколонки TSK (6,0×4,0 мм, 7 мкм). В качестве подвижной фазы использовали 0,2 М фосфат калия (рН 6,2), содержащий 0,25 М хлорид калия. Применяли режим изократического разделения при скорости потока 0,5 мл/мин в течение 35 мин. Образец разбавляли аналитическим растворителем так, чтобы конечная концентрация составляла 10 мг/мл, и после введения 20 мкл образца в колонку для ВЭЖХ измеряли оптическую плотность при 280 нм. Рассчитывали соотношение мономеров трастузумаба на хроматограмме ВЭЖХ и строили график.

Когда гель-хроматографический анализ выполняли в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 45°C в течение 14 дней, композиции 5-7 показали аналогичные закономерности изменений. Основными изменениями были увеличение высокомолекулярных (HMW) и низкомолекулярных (LMW) примесей и уменьшение содержания мономера (около 1,5%), и не было существенной разницы в зависимости от состава. В заключение, в результате проведения гель-хроматографического анализа в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 45°C, аналогичная стабильность белка была показана в композициях с 0,04% полисорбата 20, 50 мМ Лиз-Лиз и 50 мМ глицина (см. фиг. 4).

Пример 9. WCX-хроматографический анализ композиций, содержащих трастузумаб и НР46.

Для хроматографического анализа WCX использовали систему ВЭЖХ от Shimadzu Prominence, и в качестве колонок использовали TSK-gel CM-STAT (4,6×100 мм, 7 мкм), предколонку TSK-gel CMSTAT (3,2 мм, внутренний диаметр × 1,5 см) и т.п. Подвижная фаза А представляла собой 10 мМ фосфат натрия (рН 7,5), а подвижная фаза В - 10 мМ фосфат натрия (рН 7,2), содержащий 0,1 М NaCl. Анализ выполняли в течение 55 мин с применением режима разделения с линейным градиентом концентрации 0-30% при скорости потока 0,8 мл/мин. Образец разбавляли подвижной фазой А так, чтобы конечная концентрация составляла 1,0 мг/мл, 80 мкл образца вводили в ВЭЖХ, а затем регистрировали поглощение при 280 нм. Рассчитывали соотношение мономеров трастузумаба на хроматограмме ВЭЖХ и строили график.

Композиции 5-7 показали аналогичный характер изменений, когда анализ WCX выполняли в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 45°C в течение 14 дней. Конкретные изменения включают увеличение относительного содержания кислых вариантов (изменение примерно на 30% за 14 дней), уменьшение относительного содержания главного пика (изменение примерно на 44% за 14 дней) и увеличение относительного содержания основных вариантов. (изменение примерно на 15% за 14 дней), и не было значительной разницы в зависимости от состава. В заключение, в результате выполнения анализа WCX в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 45°C, аналогичная стабильность белка была показана в композициях с 0,04% полисорбата 20, 50 мМ Лиз-Лиз и 50 мМ глицина (см. фиг. 5).

Пример 10. Оценка стабильности НР46 в соответствии с температурами 40°C и 45°C в композициях трастузумаба и НР46 для подкожного введения.

Для оценки стабильности НР46 в композициях для подкожного введения из трастузумаба смешивали трастузумаб (120 мг/мл) и РН20 (2000 Ед./мл). В это время использованный буфер содержал 20 мМ гистидина (рН 5,5), 210 мМ трегалозу, 10 мМ метионина и 0,04% полисорбата 20. Ферментативную активность контрольного образца измеряли в день 0, и экспериментальные образцы оставляли при 40°C или 45°C в течение 1 дня, а затем измеряли ферментативную активность каждого образца.

Каждый из препаратов из герцептина для подкожного введения, трастузумаб + НВ2 и трастузумаб + НР46 оставляли при 40°C на 1 день, а затем измеряли активность гиалуронидазы, и в результате соответствующие образцы показали активность 51%, 47% и 94%, что указывает на то, что НР46 имел наибольшую термостабильность при 40°C (см. фиг. 6). Далее, препараты герцептин для подкожного введения, трастузумаб + НВ2 и трастузумаб + НР46 оставляли при 45°C в течение 1 дня, а затем измеряли активность гиалуронидазы, и в результате герцептин для подкожного введения и трастузумаб + НВ2 не проявляли ферментативной активности, но ферментативная активность препарата трастузумаб + НР46 сохранялась (см. фиг. 6).

Пример 11. Разработка композиций.

Готовили три препарата трастузумаба для подкожного введения, как показано в табл. 8. Композиции 8-10 в целом содержали 120 мг/мл трастузумаба, 20 мМ гистидин/гистидин-НСI (рН 5,5); 210 мМ трегалозы, 10 мМ метионина и вариант РН20. Разница между композициями 8-10 заключается в концентрации неионного поверхностно-активного вещества, где композиция 8 содержит 0% полисорбата 20, композиция 9 -0,005% полисорбата 20, и композиция 10-0,04% полисорбата 20.

Таблица 8

Состав композиций

	Композиция 8	Композиция 9	Композиция 10
Антитело	Трастузумаб (120 мг/мл)		
Полисорбат 20	0%	0,005%	0,04%
Буфер	20 мМ гистидин/гистидин-НСI		
Стабилизатор 1	210 мМ трегалоза		
Стабилизатор 2	10 мМ метионин		
рН	5,5		
Гиалуронидаза	НР46 из SEQ ID NO:44 (2 000 Ед./мл)		

Пример 12. Анализ с использованием спектрофотометра.

Композиции с 8 по 10 оставляли на 14 дней при 40°C, и изменения концентрации белка анализировали с использованием спектрофотометра, произведенного Beckman. Каждый образец разбавляли дистиллированной водой так, чтобы концентрация образца составляла 0,4 мг/мл, а затем измеряли поглощение белка при 280 нм с помощью спектрофотометра. В испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 14 дней, не было значительного изменения концентрации белка в композициях 8-10.

Пример 13. Анализ соотношения мономеров трастузумаба в каждой композиции с использованием эксклюзионной хроматографии.

Для анализа методом эксклюзионной хроматографии использовали систему ВЭЖХ, доступную от Shimadzu Prominence, и в качестве колонок использовали TSK-gel G3000SWXL (7,8×300 мм, 5 мкм) и предколонку TSK (6,0×4,0 мм, 7 мкм). В качестве подвижной фазы использовали 0,2 М фосфат калия (рН 6,2), содержащий 0,25 М хлорид калия. Анализ выполняли в течение 35 мин в режиме изократического разделения при скорости потока 0,5 мл/мин. Образец разбавляли аналитическим растворителем так, чтобы конечная концентрация составляла 10 мг/мл, и после введения 20 мкл образца в колонку для ВЭЖХ измеряли оптическую плотность при 280 нм. Рассчитывали соотношение мономеров трастузумаба на хроматограмме ВЭЖХ и строили график.

Когда гель-хроматографический анализ выполняли в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 14 дней, композиции 8-10 показали аналогичные закономерности изменений. Основные изменения заключались в увеличении количества продуктов разложения с высокой молекулярной массой (НМВ) и с низкой молекулярной массой (ЛМВ), и снижении содержания мономера (примерно менее 1,0%), и не было существенной разницы в зависимости от состава. В заключение, в результате проведения анализа методом эксклюзионной хроматографии в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C, не было значительных различий в профилях стабильности между композициями в зависимости от концентрации (0-0,04%) полисорбата 20 (см. фиг. 7).

Пример 14. Измерение температуры агрегации белков для композиций, содержащих трастузумаб и НР46.

Динамическое рассеяние света (DLS) используется для анализа денатурационных свойств белков, связанных с нагреванием в области белковых лекарств. В настоящем эксперименте изменение размера

белковой молекулы в соответствии с изменением температуры было измерено и использовано для расчета температуры агрегации белка. Для анализа DLS использовали прибор Zetasizer-nano-ZS от Malvern, и кварцевую кювету (ZEN2112). В процессе анализа температуру повышали с 25°C до 85°C с интервалом в 1°C, и образец разбавляли до 1 мг/мл с использованием каждого буфера для композиции, а затем 150 мкл образца добавляли в кювету для анализа.

Температура агрегации в композиции 8, не содержащей полисорбат 20, составила 78,3°C, композиция 9 показала температуру агрегации 77,3°C, а композиция 10 показала температуру агрегации 77,7°C. В примере 13 не было показано никаких изменений в соотношении мономеров в белке, несмотря на то, что он не содержал полисорбат 20, и в результате сравнения случая отсутствия полисорбата 20 со случаем, когда он содержал полисорбат 20, было подтверждено, что не было никакой разницы в агрегации между белками. Эти результаты показывают, что минимальное количество полисорбата 20 не обязательно требуется для препаратов трастузумаба для подкожного введения (см. фиг. 8).

Пример 15. WСХ-хроматографический анализ композиций, содержащих трастузумаб и НР46.

Для хроматографического анализа WСХ использовали систему ВЭЖХ от Shimadzu Prominence, а в качестве колонок использовали колонку TSKgel CM-STAT (4,6×100 мм, 7 мкм), предколонку TSKgel CMSTAT (3,2 мм, внутренний диаметр × 1,5 см) и т.п. Подвижная фаза А представляет собой 10 мМ фосфат натрия (рН 7,5), а подвижная фаза В - 10 мМ фосфат натрия (рН 7,2), содержащий 0,1 М NaCl. Анализ проводили в течение 55 мин с линейным градиентом концентрации 0-30% подвижной фазы В при скорости потока 0,8 мл/мин. Образец разбавляли подвижной фазой А так, чтобы конечная концентрация составляла 1,0 мг/мл, 80 мкл образца вводили в ВЭЖХ, а затем регистрировали поглощение колоночного элюата при 280 нм. Рассчитывали соотношение мономеров трастузумаба на хроматограмме ВЭЖХ и строили график.

Композиции с 8 по 10 показали аналогичный характер изменений, когда анализ WСХ выполняли в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 14 дней. Конкретные изменения включают увеличение относительного содержания кислых вариантов (изменение примерно на 10% за 14 дней), уменьшение относительного содержания главного пика (изменение примерно на 40% за 14 дней) и увеличение относительного содержания основных вариантов (изменение примерно 300% за 14 дней), и не было значительной разницы в зависимости от состава. В заключение, при анализе WСХ в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C стабильность белка при разных содержаниях полисорбата 20 (0-0,04%) была аналогичной (см. фиг. 9).

Пример 16. Анализ ферментативной активности композиций, содержащих трастузумаб и НР46.

Турбидиметрический анализ для измерения ферментативной активности - это метод измерения по абсорбции степени, в которой агрегат образуется за счет связывания остаточной гиалуроновой кислоты с подкисленным альбумином (BSA), и когда гиалуроновая кислота гидролизуется с помощью РН20, степень связывания с альбумин снижается, что приводит к снижению абсорбции. ВТН (Sigma) в качестве стандартизованного продукта разбавляли до 1 Ед./мл, 2 Ед./мл, 5 Ед./мл, 7,5 Ед./мл, 10 Ед./мл, 15 Ед./мл, 20 Ед./мл, 30 Ед./мл, 50 Ед./мл и 60 Ед./мл в соответствующих пробирках. Очищенные образцы варианта РН20 разводили буфером для разбавления ферментов (20 мМ Трис-НСl, рН 7,0, 77 мМ NaCl, 0,01% (масс/об.) бычьего сывороточного альбумина) до 100X, 300X, 600X, 1200X и 2400X в соответствующих пробирках. В свежих пробирках раствор гиалуронидазы с концентрацией 3 мг/мл разбавляли в 10 раз до концентрации 0,3 мг/мл, так чтобы объем каждой пробирки составил 180 мкл. 60 мкл образца, содержащего гиалуронидазу, добавляли к разбавленному раствору гиалуроновой кислоты, смешивали с ним и оставляли для реакции при 37°C в течение 45 мин. После завершения реакции 50 мкл прореагировавшего фермента и 250 мкл кислого раствора альбумина добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета и встряхивали в течение 10 мин, а затем измеряли поглощение при 600 нм с помощью спектрофотометра.

В результате выполнения анализа активности в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 14 дней, было подтверждено, что чем выше концентрация полисорбата 20, тем больше снижение активности с течением времени (см. фиг. 10).

Пример 17. Разработка композиции.

Были приготовлены три композиции трастузумаба для подкожного введения, как показано в табл. 9. Композиции с 11 по 13 в целом содержали 120 мг/мл трастузумаба, 20 мМ гистидин/гистидин-НСl (рН 5,5), 210 мМ трегалозы, 10 мМ метионина и вариант РН20. Разница между композициями 11-13 заключается в концентрации неионного поверхностно-активного вещества, где композиция 11 содержит 0% полисорбата 80, композиция 12 - 0,005% полисорбата 80 и композиция 13 - 0,04% полисорбата 80.

Состав композиций

	Композиция 11	Композиция 12	Композиция 13
Антитело	Трастузумаб (120 мг/мл)		
Полисорбат 80	0%	0,005%	0,04%
Буфер	20 мМ гистидин/гистидин-НСl		
Стабилизатор 1	210 мМ трегалоза		
Стабилизатор 2	10 мМ метионин		
pH	5,5		
Гиалуронидаза	HP46 из SEQ ID NO:44 (2 000 Ед./мл)		

Когда гель-хроматографический анализ выполняли в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 14 дней, композиции с 11 по 13 демонстрировали аналогичные модели изменений. Основные изменения заключались в увеличении количества продуктов разложения с высокой молекулярной массой (HMW) и с низкой молекулярной массой (LMW) и снижении содержания мономера (примерно менее 1,0%), и не было существенной разницы в зависимости от состава. В заключение, в результате проведения гель-хроматографического анализа в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C, не было существенной разницы в профилях стабильности между композициями в зависимости от концентрации (0-0,04%) полисорбата 80 (см. фиг. 11).

Пример 18. WCX-хроматографический анализ композиций, содержащих трастузумаб и HP46.

Для хроматографического анализа WCX использовали систему ВЭЖХ от Shimadzu Prominence, колонку TSKgel CM-STAT (4,6×100 мм, 7 мкм) и предколонку TSKgel CMSTAT (3,2 мм, внутренний диаметр × 1,5 см), и т.п. Подвижная фаза А представляла собой 10 мМ фосфат натрия (pH 7,5), а подвижная фаза В - 10 мМ фосфат натрия (pH 7,2), содержащий 0,1 М NaCl. Анализ проводили в течение 55 мин с линейным градиентом концентрации 0-30% подвижной фазы В при скорости потока 0,8 мл/мин. Образец разбавляли подвижной фазой А так, чтобы конечная концентрация составляла 1,0 мг/мл, 80 мкл образца вводили в ВЭЖХ, а затем регистрировали поглощение колоночного элюата при 280 нм. Рассчитывали соотношение мономеров трастузумаба на хроматограмме ВЭЖХ и строили график.

Композиции с 11 по 13 показали аналогичный характер изменений, когда анализ WCX выполняли в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 14 дней. Конкретные изменения включают увеличение относительного содержания кислых вариантов (изменение примерно на 10% за 14 дней), уменьшение относительного содержания главного пика (изменение примерно на 40% за 14 дней) и увеличение относительного содержания основных вариантов (изменение примерно 300% за 14 дней), и не было значительной разницы в зависимости от состава. В заключение, в анализе WCX в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C, стабильность белка в зависимости от содержания полисорбата 80 (0-0,04%) была аналогичной (см. фиг. 12).

Пример 19. Анализ ферментативной активности композиций, содержащих трастузумаб и HP46.

Турбидиметрический анализ для измерения ферментативной активности - это метод измерения по степени абсорбции, где агрегаты образуются за счет связывания остаточной гиалуроновой кислоты с подкисленным альбумином (BSA), и когда гиалуроновая кислота гидролизуетсся с помощью РН20, степень связывания с альбумином снижается, что приводит к снижению абсорбции. ВТН (Sigma) в качестве стандартизованного продукта разбавляли до 1 Ед./мл, 2 Ед./мл, 5 Ед./мл, 7,5 Ед./мл, 10 Ед./мл, 15 Ед./мл, 20 Ед./мл, 30 Ед./мл, 50 Ед./мл и 60 Ед./мл, добавляя в соответствующие пробирки. Очищенные образцы белка разводили буфером для разбавления ферментов (20 мМ Трис-НСl, pH 7,0, 77 мМ NaCl, 0,01% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина) до 100X, 300X, 600X, 1200X и 2400X в соответствующих пробирках. В свежих пробирках раствор гиалуронидазы с концентрацией 3 мг/мл разбавляли в 10 раз до концентрации 0,3 мг/мл, так чтобы объем каждой пробирки составлял 180 мкл. 60 мкл образца, содержащего гиалуронидазу, добавляли к разбавленному раствору гиалуроновой кислоты, смешивали с ним и оставляли реагировать при 37°C в течение 45 мин. После завершения реакции 50 мкл прореагировавшего фермента и 250 мкл кислого раствора альбумина добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета и встряхивали в течение 10 мин, а затем измеряли поглощение при 600 нм с помощью спектрофотометра.

В результате выполнения анализа активности в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 14 дней, было подтверждено, что чем выше была концентрация полисорбата 80, тем более выраженным было снижение активности с течением времени (см. фиг. 13).

Пример 20. Разработка композиции.

Были приготовлены три типа композиций ритуксимаба, как описано в табл. 10. Композиции с 14 по 16 в целом включали 120 мг/мл ритуксимаба, 20 мМ гистидин/гистидин-НСl (pH 5,5), 210 мМ трегалозы, 10 мМ метионина и вариант РН20.

Разница между композициями 14-16 заключается в концентрации неионного поверхностно-активного вещества: композиция 14 - 0% полисорбата 80, композиция 15 - 0,005% полисорбата 80 и композиция 16 - 0,06% полисорбата 80.

Состав композиций

	Композиция 14	Композиция 15	Композиция 16
Ритуксимаб	120 мг/мл (± 10)		
Полисорбат 80	0%	0,005%	0,06%
Буфер	20 мМ гистидин/гистидин-НСl		
Стабилизатор 1	210 мМ трегалоза		
Стабилизатор 2	10 мМ метионин		
pH	5,5		
Гиалуронидаза	HP46 из SEQ ID NO:44 (2 000 Ед./мл)		

Когда гель-хроматографический анализ проводили в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 7 дней, композиции 14-16 показали аналогичный характер изменений. Основными изменениями были увеличение продуктов разложения с высокой молекулярной массой (HMW) и с низкой молекулярной массой (LMW) и уменьшение содержания мономера (менее примерно 1,0%), и не было значительной разницы в зависимости от состава. В заключение следует отметить, что в результате проведения гель-хроматографического анализа в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C, не было значительных различий в профилях стабильности между композициями в зависимости от концентрации (0-0,06%) полисорбата 80 (см. фиг. 14).

Пример 21. Анализ ферментативной активности композиций, содержащих ритуксимаб и HP46.

Турбидиметрический анализ для измерения ферментативной активности - это метод измерения по абсорбции степени, в которой агрегат образуется за счет связывания остаточной гиалуроновой кислоты с подкисленным альбумином (BSA), и когда гиалуроновая кислота гидролизуется с помощью PH20, степень связывания с альбумином уменьшается, что приводит к снижению абсорбции. ВТН (Sigma) в качестве стандартизованного продукта разбавляли до 1 Ед./мл, 2 Ед./мл, 5 Ед./мл, 7,5 Ед./мл, 10 Ед./мл, 15 Ед./мл, 20 Ед./мл, 30 Ед./мл, 50 Ед./мл и 60 Ед./мл в соответствующих пробирках. Очищенные образцы белка разводили буфером для разбавления ферментов (20 мМ Трис-НСl, pH 7,0, 77 мМ NaCl, 0,01% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина) до 100X, 300X, 600X, 1200X и 2400X в соответствующих пробирках. В свежих пробирках раствор гиалуронидазы с концентрацией 3 мг/мл разбавляли в 10 раз до концентрации 0,3 мг/мл, так чтобы объем каждой пробирки составил 180 мкл. 60 мкл образца, содержащего гиалуронидазу, добавляли к разбавленному раствору гиалуроновой кислоты, смешивали с ним и оставляли реагировать при 37°C в течение 45 мин. После завершения реакции 50 мкл прореагировавшего фермента и 250 мкл кислого раствора альбумина добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета и встряхивали в течение 10 мин, а затем измеряли поглощение при 600 нм с помощью спектрофотометра.

В результате выполнения анализа активности в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 7 дней, было подтверждено, что чем выше концентрация полисорбата 80, тем более выражено снижение активности с течением времени (см. фиг. 15).

Пример 22. Анализ ферментативной активности в композициях из коммерческих продуктов, не содержащих полисорбат.

Готовили два типа коммерческих композиций ритуксимаба, как описано в табл. 11. Композиция 17 представляет собой коммерческий буфер для составов для подкожных инъекций, а Композиция 18 представляет собой коммерческий буфер для составов для внутривенных инъекций. Композиции 17 и 18 содержали вариант PH20 и ритуксимаб в концентрации 120 мг/мл и 100 мг/мл, соответственно, но не содержали полисорбат 80, в отличие от составов коммерческих продуктов.

Таблица 11

Состав композиций

	Композиция 17	Композиция 18
Ритуксимаб	120 мг/мл	100 мг/мл
Буфер	20 мМ гистидин/гистидин-НСl	145 мМ натрия цитрат
Стабилизатор 1	210 мМ трегалоза	145 мМ NaCl
Стабилизатор 2	10 мМ метионин	10 мМ метионин
pH	5,5	6,5
Гиалуронидаза	HP46 из SEQ ID NO:44 (2 000 Ед./мл)	

Турбидиметрический анализ для измерения ферментативной активности - это метод измерения по абсорбции степени, в которой агрегат образуется за счет связывания остаточной гиалуроновой кислоты с подкисленным альбумином (BSA), и когда гиалуроновая кислота гидролизуется с помощью PH20, степень связывания с альбумином снижается, что приводит к снижению абсорбции. ВТН (Sigma) в качестве стандартизованного продукта разбавляли до 1 Ед./мл, 2 Ед./мл, 5 Ед./мл, 7,5 Ед./мл, 10 Ед./мл, 15 Ед./мл, 20 Ед./мл, 30 Ед./мл, 50 Ед./мл и 60 Ед./мл в соответствующих пробирках. Очищенные образцы белка разводили буфером для разбавления ферментов (20 мМ Трис-НСl, pH 7,0, 77 мМ NaCl, 0,01% (мас./об.)

бычьего сывороточного альбумина) до 100X, 300X, 600X, 1200X и 2400X в соответствующих пробирках. В свежих пробирках раствор гиалуронидазы с концентрацией 3 мг/мл разбавляли в 10 раз до концентрации 0,3 мг/мл, так чтобы объем каждой пробирки составил 180 мкл. 60 мкл образца, содержащего гиалуронидазу, добавляли к разбавленному раствору гиалуроновой кислоты, смешивали с ним и оставляли реагировать при 37°C в течение 45 мин. После завершения реакции 50 мкл прореагировавшего фермента и 250 мкл кислого раствора альбумина добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета и встряхивали в течение 10 мин, а затем измеряли поглощение при 600 нм с помощью спектрофотометра.

В результате выполнения анализа активности в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 6 дней, было подтверждено, что высокая активность сохраняется даже в композициях, не содержащих полисорбат 80, и в частности, в композиции 18 сохраняется высокая активность (см. фиг. 16).

Пример 23. Разработка композиции.

Четыре типа композиций пембролизумаба готовили, как описано в табл. 12. Композиции 19, 20 и 21 в целом включают 25 мг/мл пембролизумаба, 10 мМ гистидина (pH 5,5), 7% сахарозы, 10 мМ метионина и вариант РН20. Разница между композициями 19-21 заключается в концентрации неионного поверхностно-активного вещества: композиция 19 - 0% полисорбата 80, композиция 20 - 0,005% полисорбата 80 и композиция 21 - 0,02% полисорбата 80. Композиция 22 содержит 25 мг/мл пембролизумаба и состоит из 10 мМ гистидина (pH 5,5), 210 мМ трегалозы, 10 мМ метионина, 0,02% полисорбата 80 и варианта РН20.

Таблица 12

Состав композиций

	Композиция 19	Композиция 20	Композиция 21	Композиция 22
Антитело	Пембролизумаб (25 мг/мл)			
Буфер	10 мМ гистидин (pH 5,5)			
Стабилизатор 1	7% сахарозы	7% сахарозы	7% сахарозы	210 мМ трегалозы
Стабилизатор 2	10 мМ метионина	10 мМ метионина	10 мМ метионина	10 мМ метионина
Полисорбат 80	0%	0,005%	0,02%	0,02%
Гиалуронидаза	HP46 из SEQ ID NO:44 (2 000 Ед./мл)			

Пример 24. Анализ с помощью спектрофотометра.

Композиции 19, 20, 21 и 22 оставляли на 7 дней при 40°C, и изменения концентрации белка анализировали с использованием спектрофотометра, произведенного Beckman. Каждый образец разбавляли дистиллированной водой так, чтобы концентрация образца составила 0,4 мг/мл, а затем измеряли поглощение белка при 280 нм с помощью спектрофотометра.

В испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 7 дней, не было значительного изменения концентрации белка в композициях 19-22.

Пример 25. Исследование соотношения мономеров пембролизумаба в каждой композиции с использованием эксклюзионной хроматографии.

Для анализа методом эксклюзионной хроматографии использовали систему ВЭЖХ от Shimadzu Prominence, и использовали колонку TSK-gel G3000SWXL (7,8×300 мм, 5 мкм) и предколонку TSK (6,0×4,0 мм, 7 мкм). В качестве подвижной фазы использовали 0,2 М фосфат калия (pH 6,2), содержащий 0,25 М хлорид калия. Анализ выполняли в течение 35 мин в режиме изократического разделения при скорости потока 0,5 мл/мин. Образец разбавляли аналитическим растворителем так, чтобы конечная концентрация составила 10 мг/мл, и после введения 20 мкл образца в колонку для ВЭЖХ измеряли оптическую плотность элюата колонки при 280 нм. Рассчитывали соотношение мономеров пембролизумаба на хроматограмме ВЭЖХ и строили график.

Когда гель-хроматографический анализ выполняли в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 7 дней, композиции 19, 20, 21 и 22 показали аналогичные закономерности изменений. Не было существенной разницы в зависимости от состава в характере изменения высокомолекулярных (HMW) и низкомолекулярных (LMW) продуктов разложения. В заключение, в результате проведения анализа методом эксклюзионной хроматографии в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C, композиции 19, 20, 21 и 22 не показали каких-либо значительных различий, а также не было никакой разницы в зависимости от типа сахара (см. фиг. 17). Эти результаты соответствовали результатам в случаях трастузумаба и ритуксимаба в предыдущих примерах.

Пример 26. Измерение ферментативной активности композиций, содержащих пембролизумаб и HP46.

Турбидиметрический анализ для измерения ферментативной активности - это метод измерения по абсорбции степени, при которой агрегат образуется путем связывания остаточной гиалуроновой кислоты с подкисленным альбумином (БСА), и когда гиалуроновая кислота гидролизует с помощью РН20, степень связывания с альбумином снижается, что приводит к снижению абсорбции. ВТН (Sigma) в качестве стандартизованного продукта разбавляли до 1 Ед./мл, 2 Ед./мл, 5 Ед./мл, 7,5 Ед./мл, 10 Ед./мл, 15 Ед./мл,

20 Ед./мл, 30 Ед./мл, 50 Ед./мл и 60 Ед./мл в соответствующих пробирках. Очищенные образцы белка разводили буфером для разбавления ферментов (20 мМ Трис-НСl, рН 7,0, 77 мМ NaCl, 0,01% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина) до 100X, 300X, 600X, 1200X и 2400X в соответствующих пробирках. В свежих пробирках раствор гиалуронидазы с концентрацией 3 мг/мл разбавляли в 10 раз до концентрации 0,3 мг/мл, так чтобы объем каждой пробирки составлял 180 мкл. 60 мкл образца, содержащего фермент, добавляли к разбавленному раствору гиалуроновой кислоты, смешивали с ним и оставляли реагировать при 37°C в течение 45 мин. После завершения реакции 50 мкл прореагировавшего фермента и 250 мкл кислого раствора альбумина добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета и встряхивали в течение 10 мин, а затем измеряли поглощение при 600 нм с помощью спектрофотометра.

В результате выполнения анализа активности в испытании на стабильность в жестких условиях, то есть при 40°C в течение 7 дней, было подтверждено, что по мере увеличения концентрации полисорбата 80 снижение активности с течением времени было несколько увеличено. Было также подтверждено, что при включении того же количества полисорбата 80 снижение активности было менее выражено в композиции, содержащей трегалозу, чем в композиции, содержащей сахарозу (см. фиг. 18).

Пример 27. Профили рН-активности HP46 и HW2 дикого типа.

Для эксперимента по подтверждению профилей рН-активности HP46 и HW2 дикого типа использовали метод микротурбидиметрического анализа. Буфер гиалуроновой кислоты для растворения гиалуроновой кислоты в качестве субстрата и ферментный буфер для разбавления фермента готовили для каждого значения рН.

Всего готовили три 96-луночных планшета для реакции между ферментом и субстратом и обозначали как А, В и С, и проводили эксперимент.

Буфер гиалуроновой кислоты с рН 4,0, 4,5 или 5,0 готовили с использованием 20 мМ уксусной кислоты и 70 мМ NaCl, а раствор гиалуроновой кислоты с рН 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 или 8,0 готовили с использованием 20 мМ фосфата натрия и 70 мМ NaCl. 20 мг гиалуроновой кислоты растворяли в 10 мл каждого из приготовленных буферов гиалуроновой кислоты, чтобы приготовить конечный раствор субстрата гиалуроновой кислоты, который затем разбавляли каждым буфером гиалуроновой кислоты, приготовленным в соответствии с рН, чтобы получить 500 мкл раствора с концентрацией 0,1 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,45 мг/мл или 0,7 мг/мл, и 100 мкл каждого раствора распределяли в каждую лунку 96-луночного планшета, обозначенного как планшет А. Буферы гиалуроновой кислоты, разведенные и приготовленные в соответствии с концентрацией, использовали в качестве калибровочных кривых для измерения концентрации гиалуроновой кислоты.

Ферментный буфер с рН 4,0, рН 4,5 или рН 5,0 готовили с использованием 20 мМ уксусной кислоты, 0,01% (мас./об.) BSA, 70 мМ NaCl, и ферментный буфер с рН 5,5, рН 6,0, рН 6,5, рН 7,0 или рН 8,0 готовили с использованием 20 мМ фосфата натрия, 0,01% (мас./об.) BSA и 70 мМ NaCl.

Ферменты HP46 и HW2 дикого типа разбавляли ферментным буфером, приготовленным в соответствии с рН, до 10 Ед./мл, и 50 мкл полученного раствора распределяли в каждую лунку 96-луночного планшета, обозначенного как В.

50 мкл образца переносили из каждой лунки 96-луночного планшета, обозначенного как А, в каждую лунку 96-луночного планшета, обозначенного как В, с последующим проведением реакции в инкубаторе с встряхиванием при 37°C в течение 45 мин. За 15 мин до завершения реакции 200 мкл кислого раствора альбумина вносили в каждую лунку 96-луночного планшета, обозначенного как С, и когда реакция ферментативного субстрата завершалась, 40 мкл образца переносили из каждой лунки 96-луночного планшета, обозначенного как В, в каждую лунку 96-луночного планшета, обозначенного как С, с последующим продолжением реакции в течение 20 мин. Через 20 мин измеряли оптическую плотность при 600 нм, рассчитывали количество гиалуроновой кислоты, оставшейся после реакции с ферментативным субстратом, и определяли профили активности ферментов в зависимости от рН (см. фиг. 19).

Пример 28. Анализ фармакокинетики с использованием композиции герцептина для подкожного введения и трастузумаба и HP46 на крысах Спрег-Дуоли.

Чтобы проверить, проявляет ли композиция трастузумаба и HP46 для подкожного введения те же фармакокинетические свойства, что и композиция герцептина для подкожного введения, был проведен эксперимент с использованием 9-недельных крыс Спрег-Дуоли. Доза вводимого герцептина и трастузумаба составила 18 мг/кг массы тела крысы, количество гNuPH20, включенного в композицию герцептина для подкожного введения, составило 100 Ед, а количество HP46 также составило 100 Ед. В фармакокинетическом анализе трастузумаб и HP46 показали такую же площадь под кривой (AUC), что и у композиции герцептина для подкожного введения (см. фиг. 20).

Промышленная применимость

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может использоваться для подкожного введения, и она также очень стабильна, и активность вариантов PH20 вместе с лекарственным средством, предпочтительно лекарственным средством на основе антител или подобным, может сохраняться в течение длительного времени. Таким образом, фармацевтическая композиция может способствовать снижению не только стоимости производства препаратов для подкожных инъекций, но также и

медицинских затрат, и она очень эффективна с точки зрения удобства для пациентов.

Хотя предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были раскрыты в иллюстративных целях, специалисты в данной области техники поймут, что возможны различные модификации, добавления и замены без отклонения от объема и сущности изобретения, раскрытых в прилагаемой формуле изобретения.

Ссылки.

Bookbinder, L.H., Hofer, A., Haller, M.F., Zepeda, M.L., Keller, G.A., Lim, J.E., Edgington, T.S., Shepard, H.M., Patton, J.S., and Frost, G.I. (2006). A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. *J Control Release* 114, 230-241.

Borders jr., C.L. and Raftery, A. (1968) Purification and Partial Characterization of Testicular Hyaluronidase. *J Biol Chem* 243, 3756-3762.

Chao, K.L., Muthukumar, L., and Herzberg, O. (2007). Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. *Biochemistry* 46, 6911-6920.

Chen, K.J., Sabrina, S., El-Safory, N.S., Lee, G.C., and Lee, C.K. (2016) Constitutive expression of recombinant human hyaluronidase PH20 by *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng.* 122, 673-678.

Frost, G.I. (2007). Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration. *Expert Opin Drug Deliv* 4, 427-440.

Hofinger, E.S., Bernhardt, G., and Buschauer, A. (2007) Kinetics of Hyal-1 and PH-20 hyaluronidases: comparison of minimal substrates and analysis of the transglycosylation reaction. *Glycobiology* 17, 963-971

Kreidieh, F.Y., Moukadem, H.A., and Saghir, N.S.E. (2016) Overview, prevention and management of chemotherapy extravasation. *World J Clin Oncol* 7, 87-97.

Thomas, J.R., Yocum, R.C., Haller, M.F., and Flament J. (2009) The INFUSE-Morphine IIB Study: Use of Recombinant Human Hyaluronidase (rHuPH20) to Enhance the Absorption of Subcutaneous Morphine in Healthy Volunteers. *J Pain Symptom Manag* 38, 673-682.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20 с последовательностью SEQ ID NO: 1, обладающий гиалуронидазной активностью, где вариант PH20 содержит

замены аминокислотных остатков M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T в SEQ ID NO: 1; и

делецию аминокислотных остатков M1-T35, M1-L36, M1-N37, M1-F38, M1-R39, M1-A40 или M1-P41 на N-конце SEQ ID NO: 1; и

делецию всех аминокислотных остатков после I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 или S490 на C-конце SEQ ID NO: 1.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где вариант PH20 дополнительно содержит одну или не-

сколько замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из T341S, L342W, S343E, I344N и N363G.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, где вариант PH20 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков T341S, L342W, S343E, I344N и N363G.

4. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20 с последовательностью SEQ ID NO: 1, где вариант PH20 содержит:

(i) делецию аминокислотных остатков M1-T35, M1-L36, M1-N37, M1-F38, M1-R39, M1-A40 или M1-P41 на N-конце SEQ ID NO: 1,

(ii) делецию всех аминокислотных остатков после I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 или S490 на C-конце SEQ ID NO: 1 и

(iii) замены аминокислотных остатков, перечисленные в любой из следующих групп:

(A) T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T;

(B) L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T;

(C) M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T и

(D) M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T и N363G.

5. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20 с последовательностью SEQ ID NO: 1, где вариант PH20 содержит:

(i) делецию аминокислотных остатков M1-T35, M1-L36, M1-N37, M1-F38, M1-R39, M1-A40 или M1-P41 на N-конце SEQ ID NO: 1,

(ii) делецию всех аминокислотных остатков после I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 или S490 на C-конце SEQ ID NO: 1 и

(iii) замены аминокислотных остатков, перечисленные в любой из следующих групп:

(A) I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T и

(B) S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T.

6. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20 с последовательностью SEQ ID NO: 1, где вариант PH20 содержит

замены аминокислотных остатков T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T; и

делецию аминокислотных остатков M1-T35, M1-L36, M1-N37 или M1-F38 на N-конце SEQ ID NO: 1; и

делецию всех аминокислотных остатков после I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 или S490 на C-конце SEQ ID NO: 1.

7. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20 с последовательностью SEQ ID NO: 1, где вариант PH20 содержит

замены аминокислотных остатков T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T; и

делецию аминокислотных остатков M1-T35, M1-L36, M1-N37 или M1-F38 на N-конце SEQ ID NO: 1; и

делецию всех аминокислотных остатков после I465, F468 или P471 на C-конце SEQ ID NO: 1.

8. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20 с последовательностью SEQ ID NO: 1, где вариант PH20 содержит

замены аминокислотных остатков T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T; и

делецию аминокислотных остатков M1-T35, M1-L36, M1-N37 или M1-F38 на N-конце SEQ ID NO: 1; и

делецию всех аминокислотных остатков после F468 на C-конце SEQ ID NO: 1.

9. Фармацевтическая композиция по п.1, где вариант PH20 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

10. Фармацевтическая композиция по п.1, где вариант PH20 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, 5, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 22, 23, 24, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

11. Фармацевтическая композиция по п.1, где вариант PH20 состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44, 5, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 22, 23, 24, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

12. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая:

- (a) пембролизумаб и
(b) вариант PH20, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.
13. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая:
(a) пембролизумаб и
(b) вариант PH20, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44.
14. Фармацевтическая композиция по п.12 или 13, где композиция содержит 25 мг/мл пембролизумаба и 2000 ЕД/мл варианта PH20.
15. Фармацевтическая композиция по п.12 или 13, где композиция содержит 25 мг/мл пембролизумаба, 2000 ЕД/мл варианта PH20, 10 мМ гистидинового буфера (pH 5,5), 7% сахарозы и 10 мМ метионина.
16. Фармацевтическая композиция по п.15, которая дополнительно содержит 0,005 или 0,02% полисорбата 80.
17. Фармацевтическая композиция по п.12 или 13, где композиция содержит 25 мг/мл пембролизумаба, 2000 ЕД/мл варианта PH20, 10 мМ гистидинового буфера (pH 5,5), 210 мМ трегалозы, 10 мМ метионина и 0,02% полисорбата 80.
18. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-17, где композиция предназначена для подкожной инъекции субъекту.
19. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-18, где рак представляет собой рак кожи, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, рак желудка, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак бронхов, рак носоглотки, рак гортани, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак головного мозга, рак предстательной железы, рак кости, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак почки, рак пищевода, рак желчных путей, рак яичка, рак прямой кишки, рак головы и шеи, рак шейки матки, рак мочеочника, остеосаркому, нейробластому, фибросаркому, рабдомиосаркому, астроцитому или глиому.
20. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-18, где рак представляет собой меланому, гепатоцеллюлярную карциному, рак желудка, рак молочной железы, рак легкого, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак почки, рак пищевода или рак головы и шеи.
21. Подкожно вводимая фармацевтическая композиция для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, при этом фармацевтическая композиция содержит пембролизумаб, при этом фармацевтическая композиция вводится подкожно субъекту в комбинации с вариантом PH20, и при этом вариант PH20 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, 5, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 22, 23, 24, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.
22. Подкожно вводимая фармацевтическая композиция для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, при этом фармацевтическая композиция содержит пембролизумаб, при этом фармацевтическая композиция вводится подкожно субъекту в комбинации с вариантом PH20, и при этом вариант PH20 состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44, 5, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 22, 23, 24, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.
23. Подкожно вводимая фармацевтическая композиция для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, при этом фармацевтическая композиция содержит пембролизумаб, при этом фармацевтическая композиция вводится подкожно субъекту в комбинации с вариантом PH20, и при этом вариант PH20 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.
24. Подкожно вводимая фармацевтическая композиция для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, при этом фармацевтическая композиция содержит пембролизумаб, и фармацевтическая композиция вводится подкожно субъекту в комбинации с вариантом PH20, и при этом вариант PH20 состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44.
25. Подкожно вводимая фармацевтическая композиция по любому из пп.21-24, где рак представляет собой рак кожи, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, рак желудка, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак бронхов, рак носоглотки, рак гортани, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак головного мозга, рак предстательной железы, рак кости, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак почки, рак пищевода, рак желчных путей, рак яичка, рак прямой кишки, рак головы и шеи, рак шейки матки, рак мочеочника, остеосаркому, нейробластому, фибросаркому, рабдомиосаркому, астроцитому или глиому.
26. Подкожно вводимая фармацевтическая композиция по любому из пп.21-24, где рак представляет собой меланому, гепатоцеллюлярную карциному, рак желудка, рак молочной железы, рак легкого, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак почки, рак пищевода или рак головы и шеи.
27. Применение фармацевтической композиции при производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем фармацевтическая композиция содержит:
(a) пембролизумаб и
(b) вариант PH20 с последовательностью SEQ ID NO: 1, обладающий гиалуронидазной активностью, где вариант PH20 содержит замены аминокислотных остатков M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D

и I361T в SEQ ID NO: 1; и

делецию аминокислотных остатков M1-T35, M1-L36, M1-N37, M1-F38, M1-R39, M1-A40 или M1-P41 на N-конце SEQ ID NO: 1; и

делецию всех аминокислотных остатков после I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 или S490 на C-конце SEQ ID NO: 1.

28. Применение по п.27, где вариант PH20 дополнительно содержит одну или несколько замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из T341S, L342W, S343E, I344N и N363G.

29. Применение по п.27, где вариант PH20 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков T341S, L342W, S343E, I344N и N363G.

30. Применение фармацевтической композиции при производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем фармацевтическая композиция содержит:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20 с последовательностью SEQ ID NO: 1, где вариант PH20 содержит:

(i) делецию аминокислотных остатков M1-T35, M1-L36, M1-N37, M1-F38, M1-R39, M1-A40 или M1-P41 на N-конце SEQ ID NO: 1,

(ii) делецию всех аминокислотных остатков после I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 или S490 на C-конце SEQ ID NO: 1 и

(iii) замены аминокислотных остатков, перечисленные в любой из следующих групп:

(A) T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T;

(B) L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T;

(C) M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T и

(D) M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T и N363G.

31. Применение фармацевтической композиции при производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем фармацевтическая композиция содержит:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20 с последовательностью SEQ ID NO: 1, где вариант PH20 содержит:

(i) делецию аминокислотных остатков M1-T35, M1-L36, M1-N37, M1-F38, M1-R39, M1-A40 или M1-P41 на N-конце SEQ ID NO: 1,

(ii) делецию всех аминокислотных остатков после I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 или S490 на C-конце SEQ ID NO: 1 и

(iii) замены аминокислотных остатков, перечисленные в любой из следующих групп:

(A) I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T и

(B) S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T.

32. Применение фармацевтической композиции при производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем фармацевтическая композиция содержит:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20 с последовательностью SEQ ID NO: 1, где вариант PH20 содержит

замены аминокислотных остатков T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T; и

делецию аминокислотных остатков M1-T35, M1-L36, M1-N37 или M1-F38 на N-конце SEQ ID NO: 1; и

делецию всех аминокислотных остатков после I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 или S490 на C-конце SEQ ID NO: 1.

33. Применение фармацевтической композиции при производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем фармацевтическая композиция содержит:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20 с последовательностью SEQ ID NO: 1, где вариант PH20 содержит

замены аминокислотных остатков T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T; и

делецию аминокислотных остатков M1-T35, M1-L36, M1-N37 или M1-F38 на N-конце SEQ ID NO: 1; и

делецию всех аминокислотных остатков после I465, F468 или P471 на C-конце SEQ ID NO: 1.

34. Применение фармацевтической композиции при производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем фармацевтическая композиция содержит:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20 с последовательностью SEQ ID NO: 1, где вариант PH20 содержит

замены аминокислотных остатков T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D и I361T; и

делецию аминокислотных остатков M1-T35, M1-L36, M1-N37 или M1-F38 на N-конце SEQ ID NO: 1; и

делецию всех аминокислотных остатков после F468 на C-конце SEQ ID NO: 1.

35. Применение по п.27, где вариант PH20 содержит любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

36. Применение по п.27, где вариант PH20 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, 5, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 22, 23, 24, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

37. Применение по п.27, где вариант PH20 состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44, 5, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 22, 23, 24, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

38. Применение фармацевтической композиции при производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем фармацевтическая композиция содержит:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

39. Применение фармацевтической композиции при производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем фармацевтическая композиция содержит:

(a) пембролизумаб и

(b) вариант PH20, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44.

40. Применение по п.38 или 39, где композиция содержит 25 мг/мл пембролизумаба и 2000 ЕД/мл варианта PH20.

41. Применение по п.38 или 39, где композиция содержит 25 мг/мл пембролизумаба, 2000 ЕД/мл варианта PH20, 10 мМ гистидинового буфера (pH 5,5), 7% сахарозы и 10 мМ метионина.

42. Применение по п.41, где композиция дополнительно содержит 0,005 или 0,02% полисорбата 80.

43. Применение по п.38 или 39, где композиция содержит 25 мг/мл пембролизумаба, 2000 ЕД/мл варианта PH20, 10 мМ гистидинового буфера (pH 5,5), 210 мМ трегалозы, 10 мМ метионина и 0,02% полисорбата 80.

44. Применение по любому из пп.27-43, где композиция предназначена для подкожной инъекции субъекту.

45. Применение по любому из пп.27-44, где рак представляет собой рак кожи, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, рак желудка, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак бронхов, рак носоглотки, рак гортани, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак головного мозга, рак предстательной железы, рак кости, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак почки, рак пищевода, рак желчных путей, рак яичка, рак прямой кишки, рак головы и шеи, рак шейки матки, рак мочеточника, остеосаркому, нейробластому, фибросаркому, рабдомиосаркому, астроцитому или глиому.

46. Применение по любому из пп.27-44, где рак представляет собой меланому, гепатоцеллюлярную карциному, рак желудка, рак молочной железы, рак легкого, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак почки, рак пищевода или рак головы и шеи.

47. Применение пембролизумаба в приготовлении лекарственного средства для лечения рака, где лекарственное средство следует вводить подкожно в комбинации с вариантом PH20, и где вариант PH20 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, 5, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 22, 23, 24, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

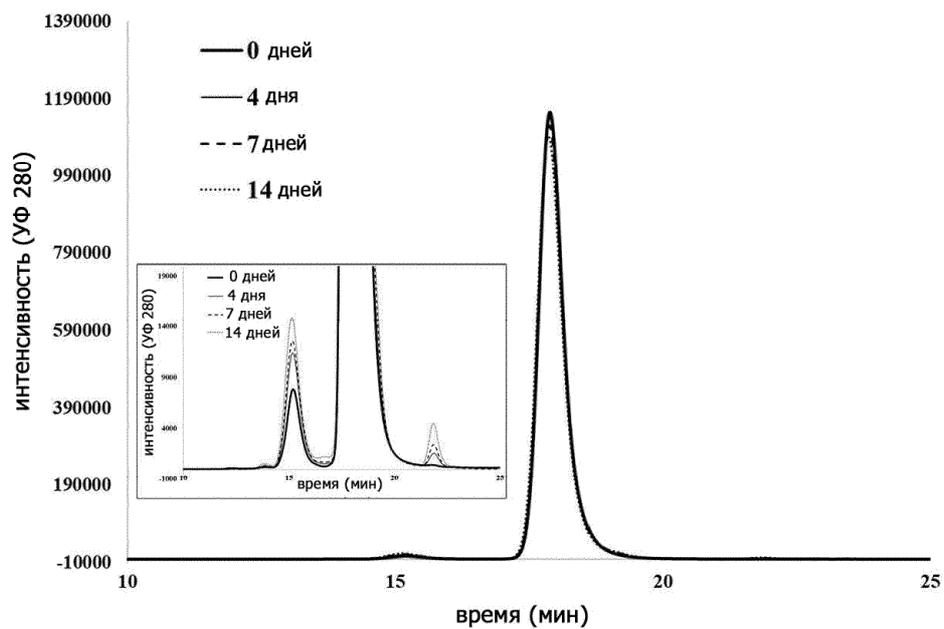
48. Применение пембролизумаба в приготовлении лекарственного средства для лечения рака, где лекарственное средство следует вводить подкожно в комбинации с вариантом PH20, и где вариант PH20 состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44, 5, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 22, 23, 24, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

49. Применение пембролизумаба в приготовлении лекарственного средства для лечения рака, где лекарственное средство следует вводить подкожно в комбинации с вариантом PH20, и где вариант PH20 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

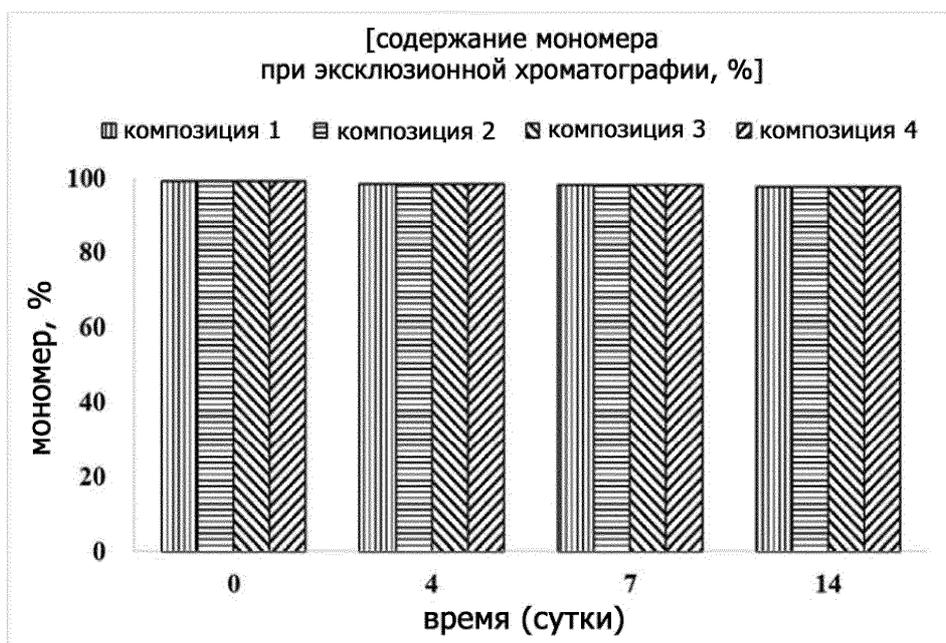
50. Применение пембролизумаба в приготовлении лекарственного средства для лечения рака, где лекарственное средство следует вводить подкожно в комбинации с вариантом PH20, и где вариант PH20 состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44.

51. Применение по любому из пп.47-50, где рак представляет собой рак кожи, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, рак желудка, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак бронхов, рак носоглотки, рак гортани, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак головного мозга, рак предстательной железы, рак кости, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак почки, рак пищевода, рак желчных путей, рак яичка, рак прямой кишки, рак головы и шеи, рак шейки матки, рак мочеточника, остеосаркому, нейробластому, фибросаркому, рабдомиосаркому, астроцитому или глиому.

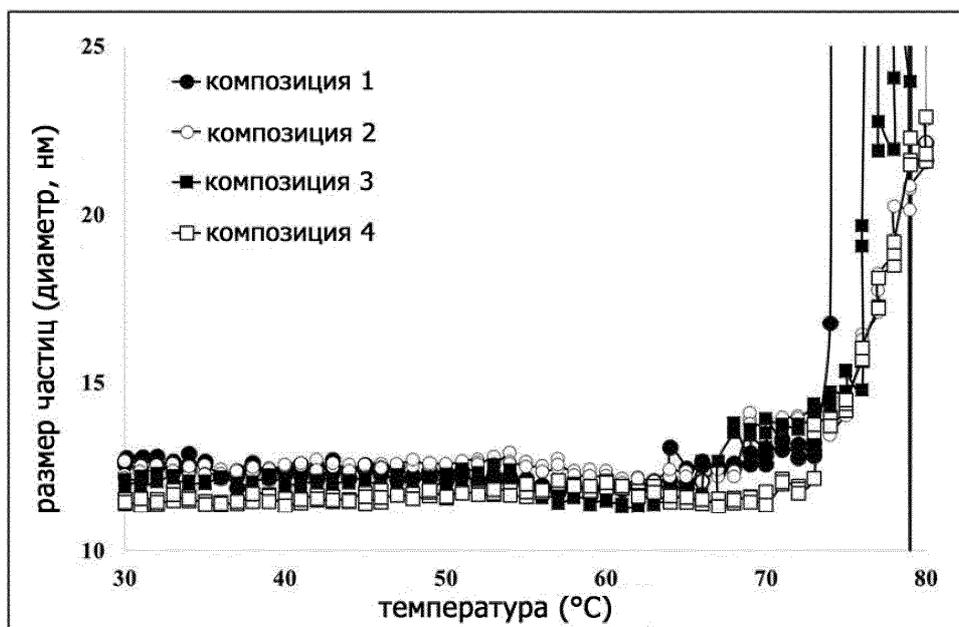
52. Применение по любому из пп.47-50, где рак представляет собой меланому, гепатоцеллюлярную карциному, рак желудка, рак молочной железы, рак легкого, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак почки, рак пищевода или рак головы и шеи.



Фиг. 1А



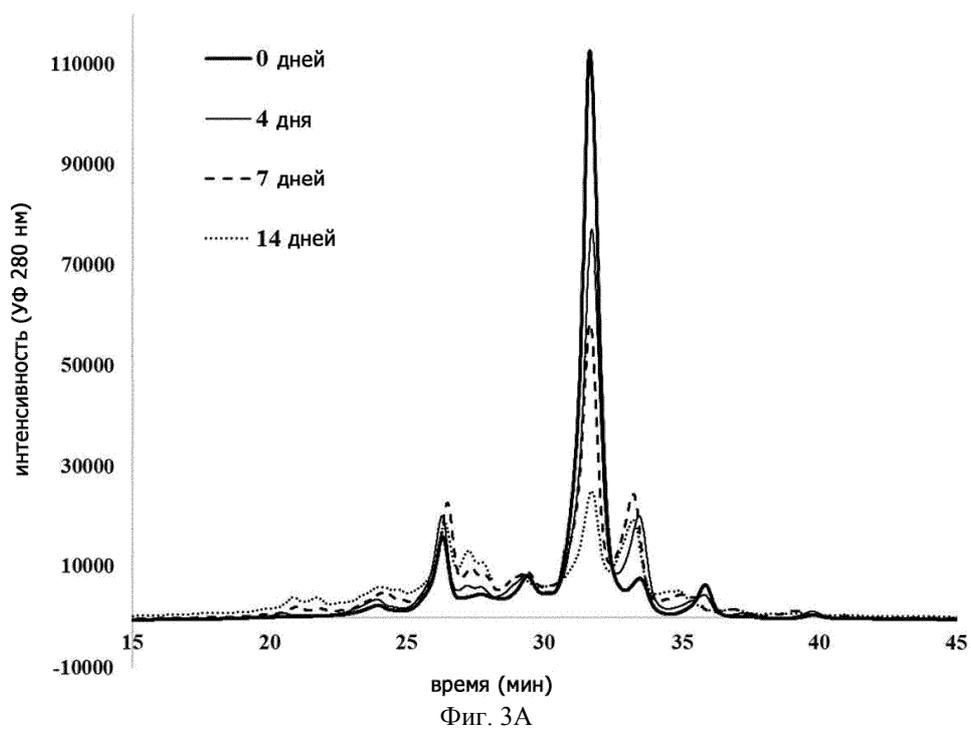
Фиг. 1В



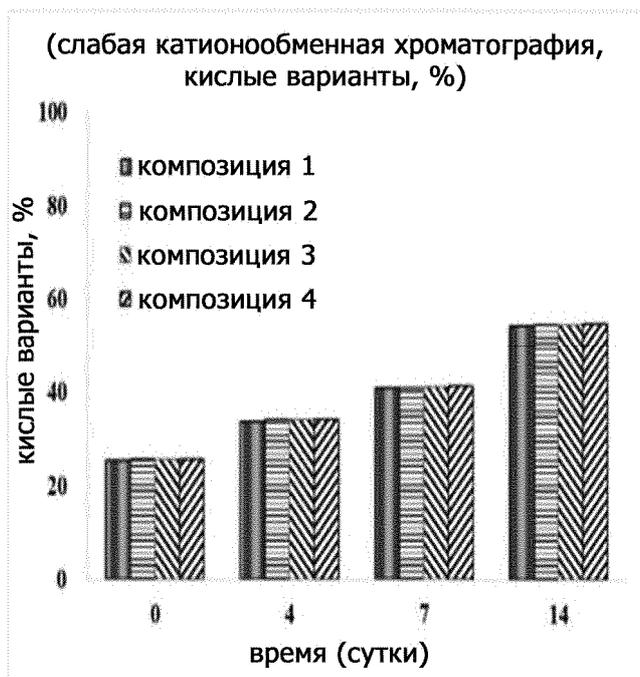
Фиг. 2А

	температура агрегации (°C)
КОМПОЗИЦИЯ 1	74°C
КОМПОЗИЦИЯ 2	76°C
КОМПОЗИЦИЯ 3	76°C
КОМПОЗИЦИЯ 4	76°C

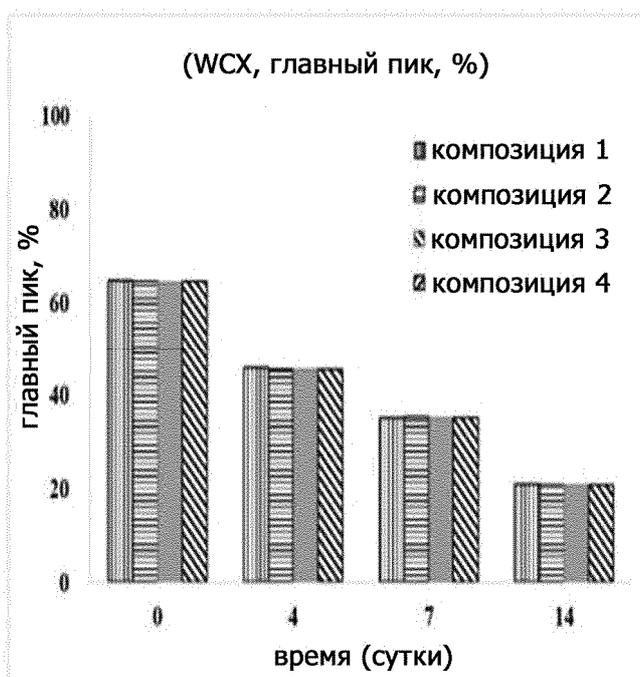
Фиг. 2В



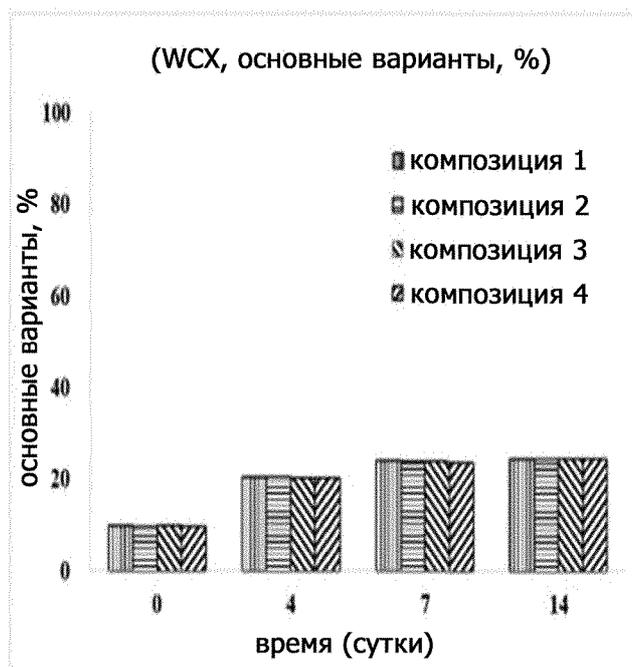
Фиг. 3А



Фиг. 3В

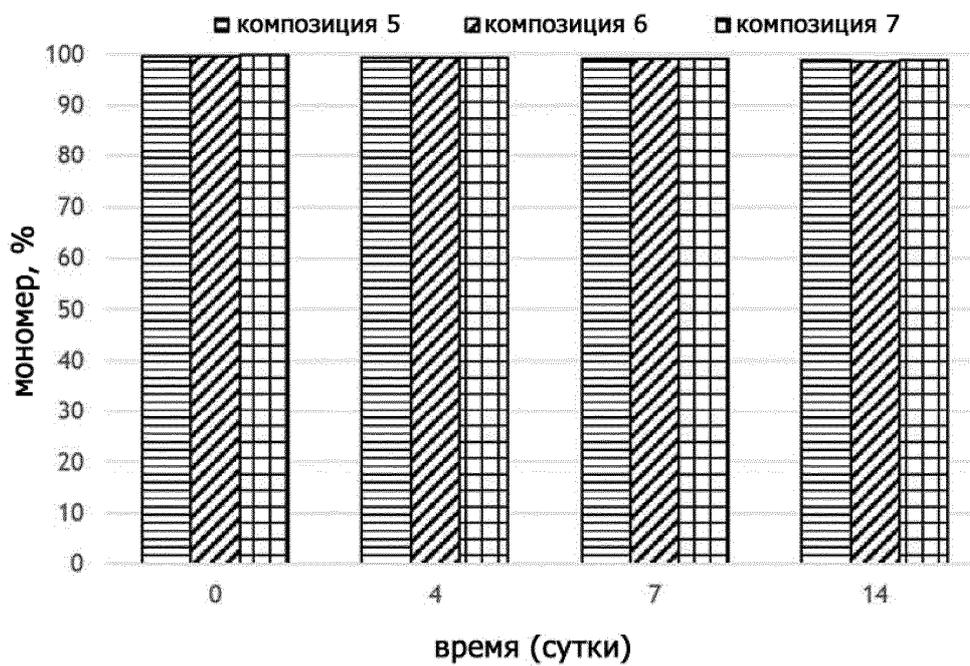


Фиг. 3С



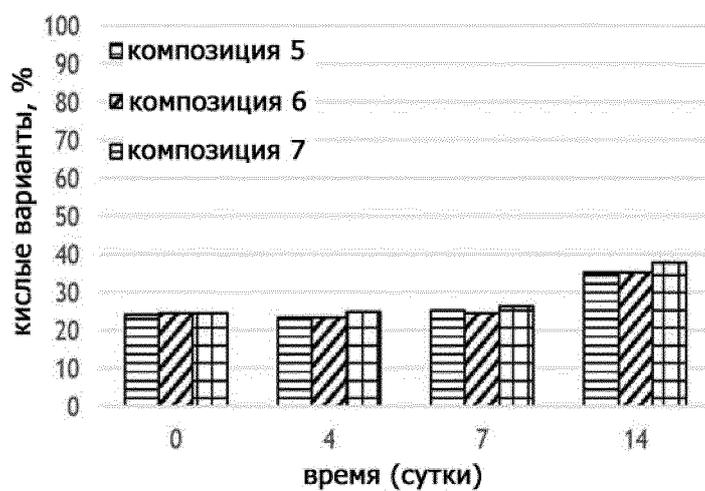
Фиг. 3D

[экслюзионная хроматография,
мономер, %]



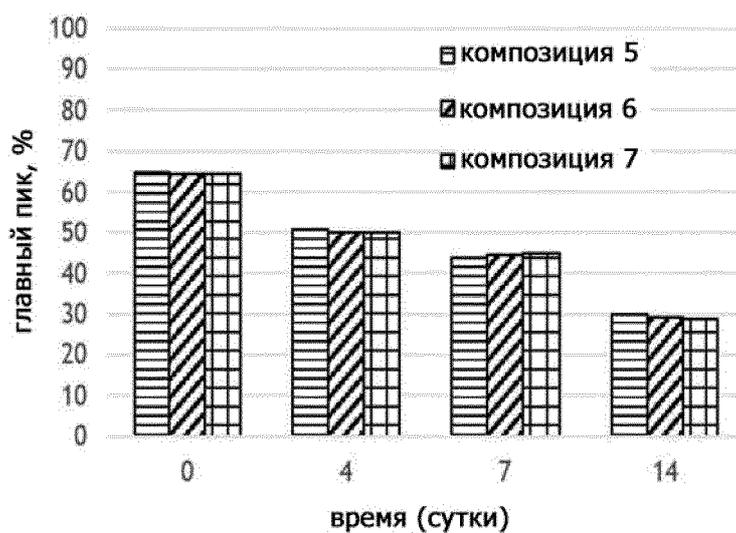
Фиг. 4

(WCX, кислые варианты, %)



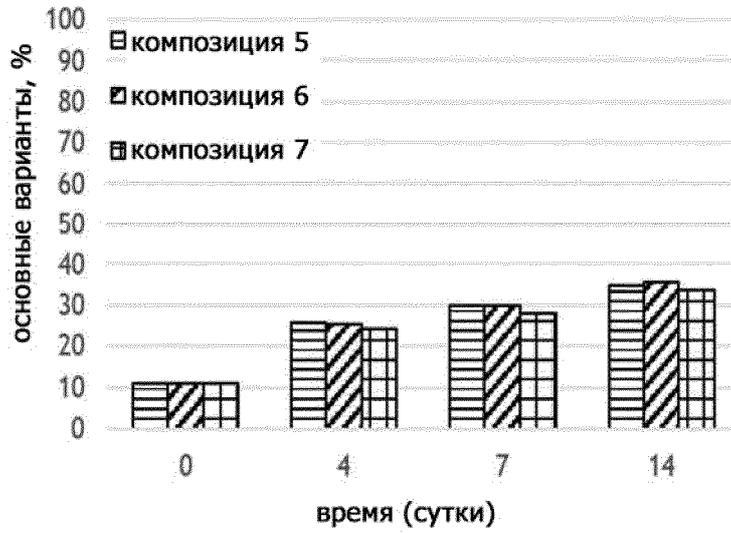
Фиг. 5А

(WCX, главный пик, %)

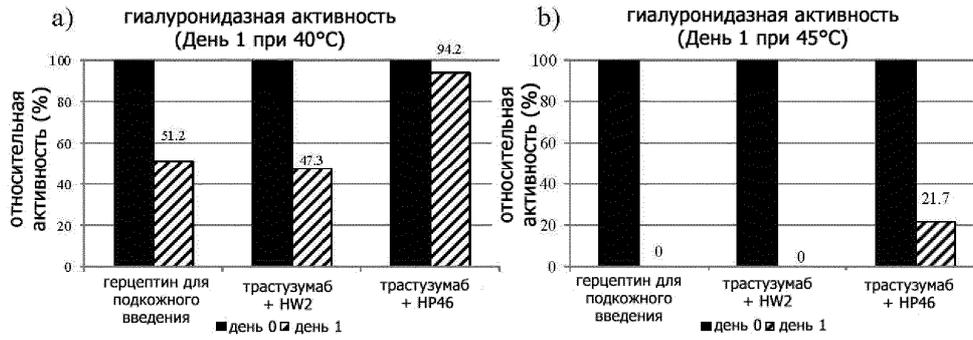


Фиг. 5В

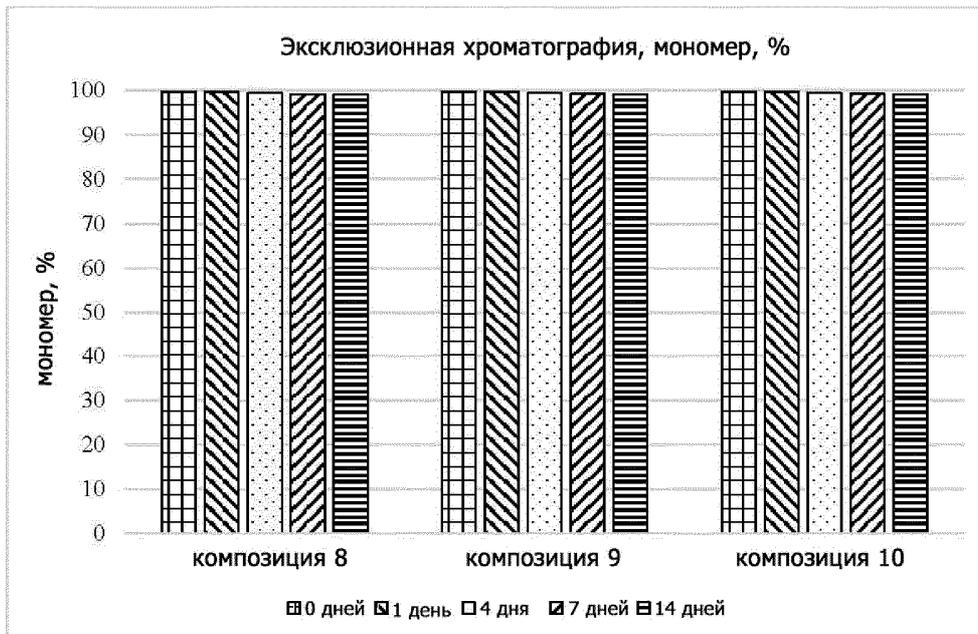
(WCX, основные варианты, %)



Фиг. 5С



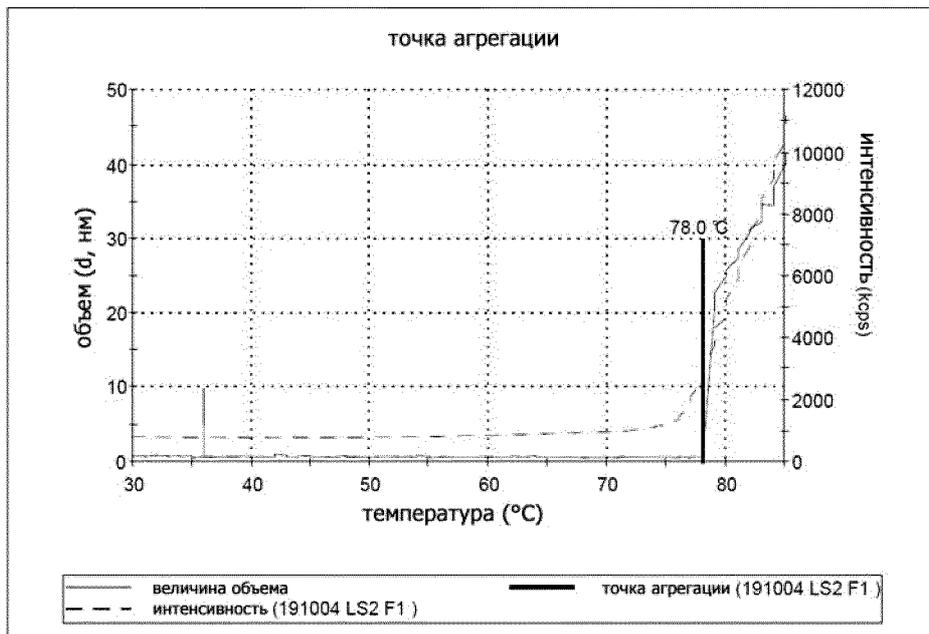
Фиг. 6



Фиг. 7

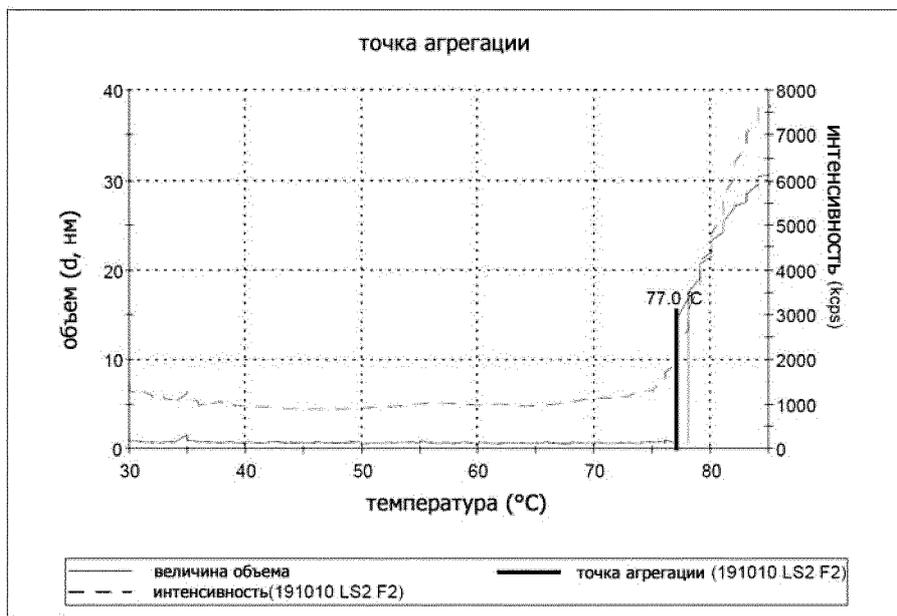
[композиция 8]

точка агрегации (°C): 78.0



[композиция 9]

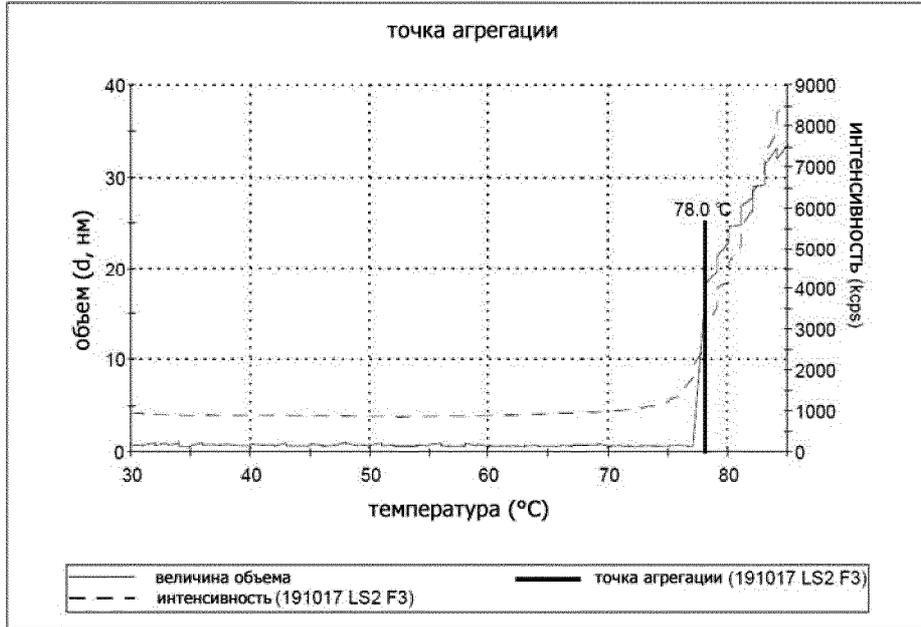
точка агрегации (°C): 77.0



Фиг. 8А

[композиция 10]

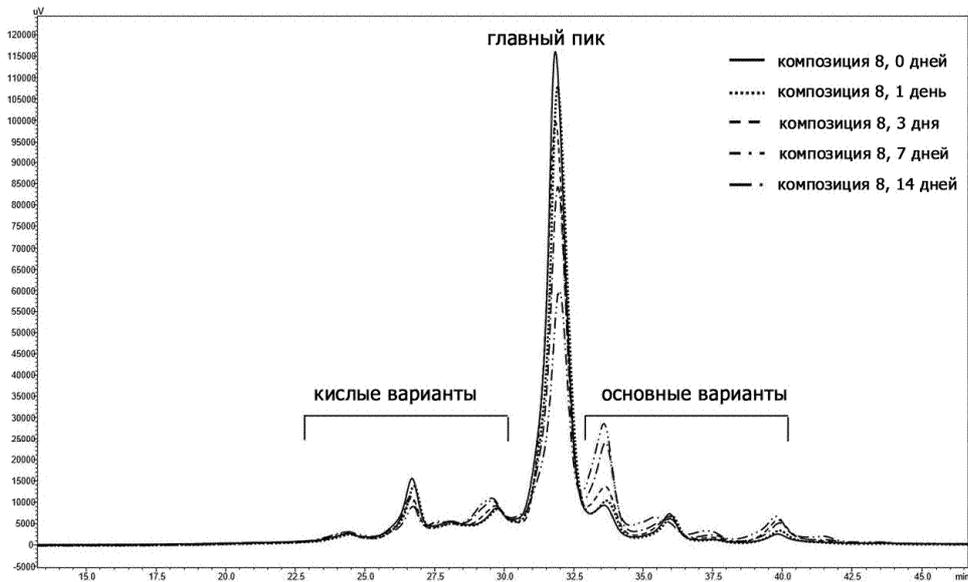
точка агрегации (°C): 78.0



Фиг. 8а продолжение

	1	2	3	среднее значение	коэффициент Стьюдента	относительное стандартное отклонение, %
композиция 8	78°C	79°C	78°C	78.3°C	0.6	0.7
композиция 9	78°C	77°C	77°C	77.3°C	0.6	0.7
композиция 10	77°C	78°C	78°C	77.7°C	0.6	0.7

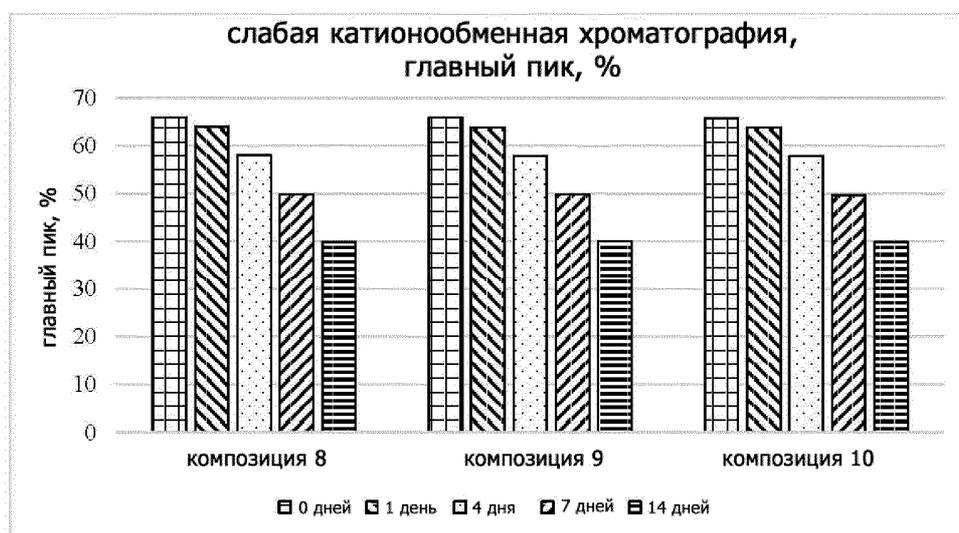
Фиг. 8В



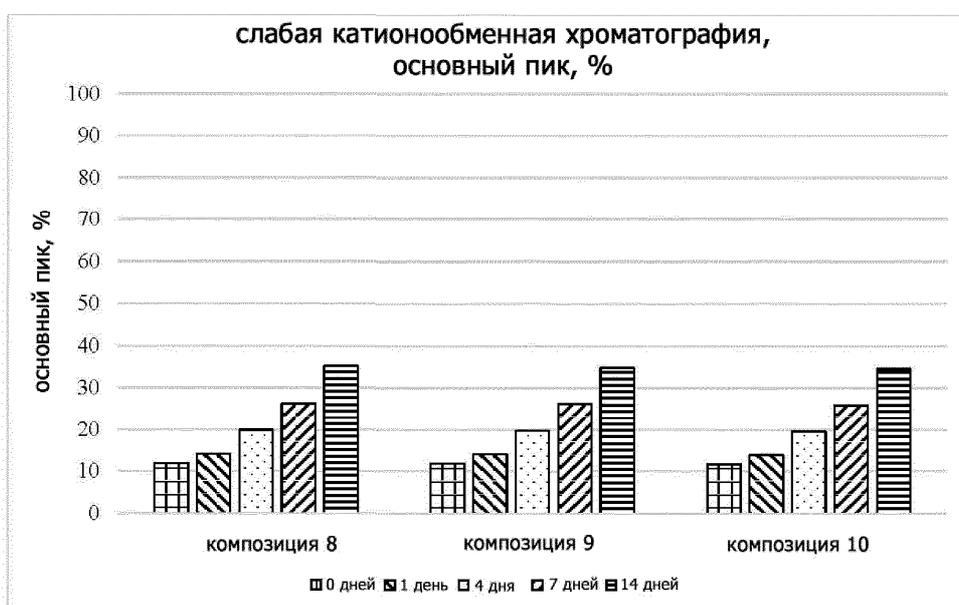
Фиг. 9А



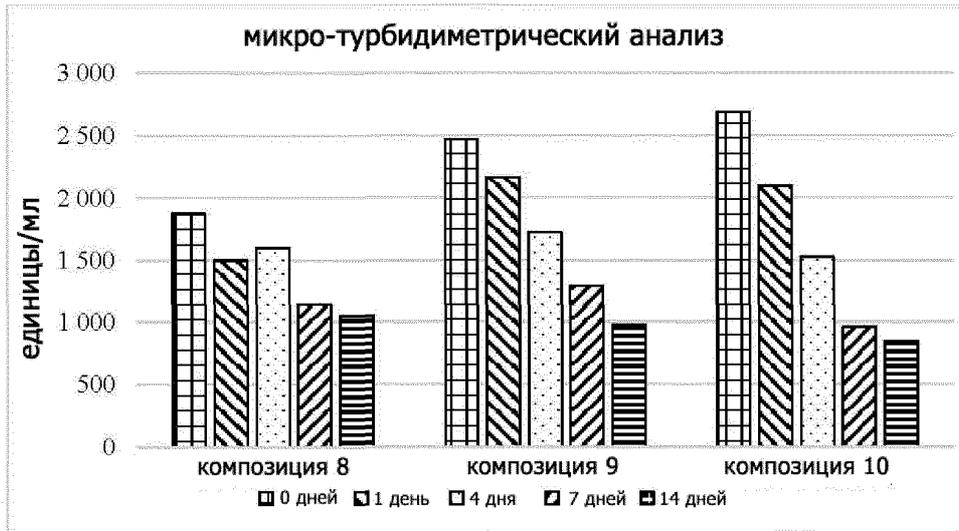
Фиг. 9В



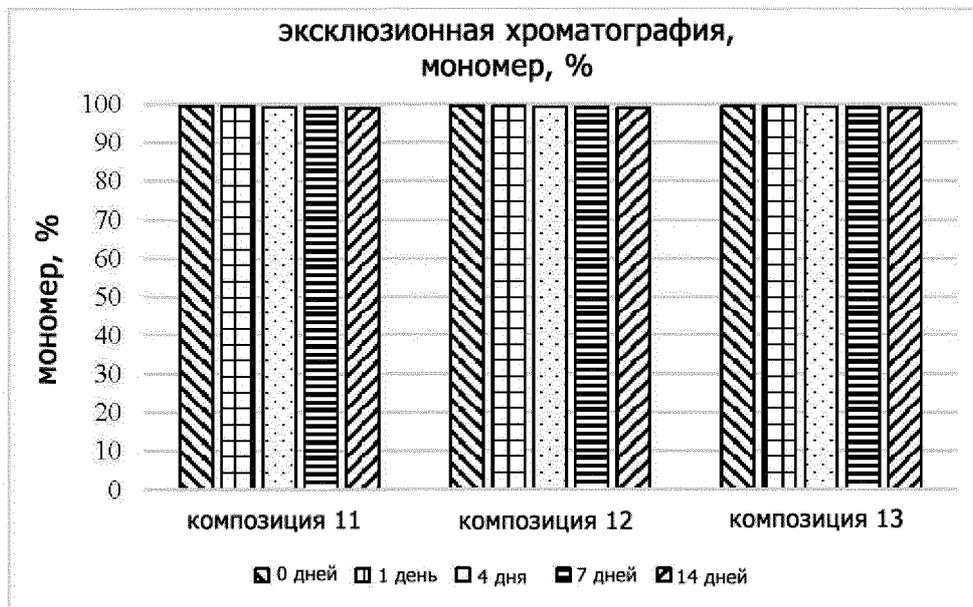
Фиг. 9С



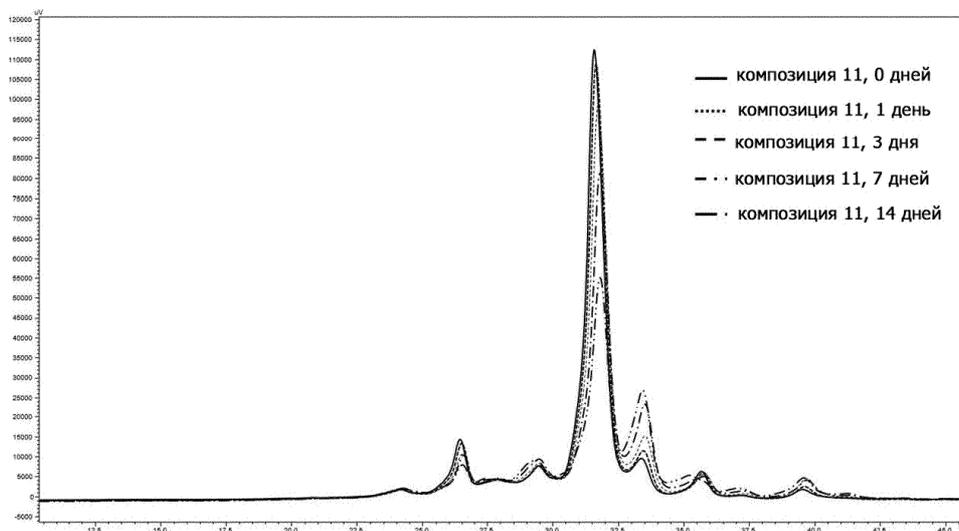
Фиг. 9D



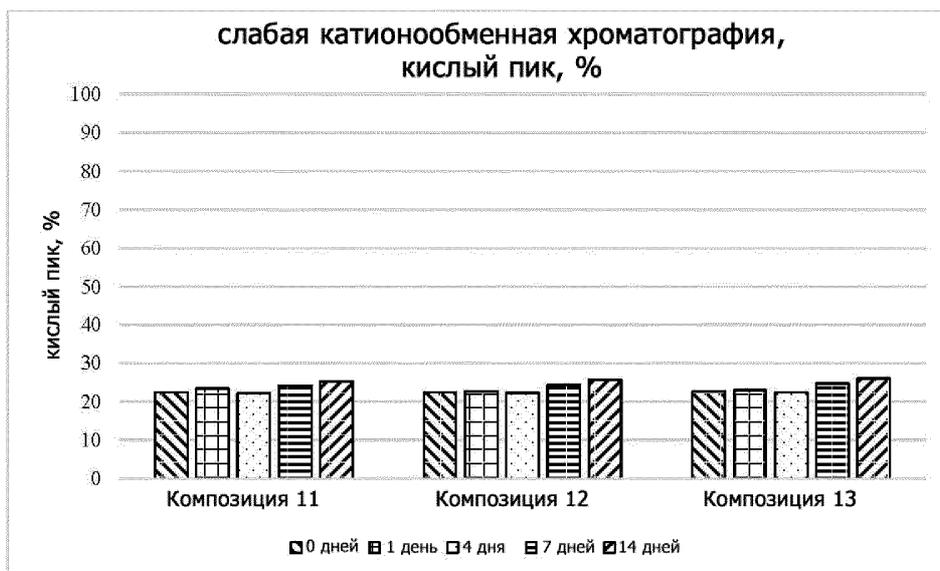
Фиг. 10



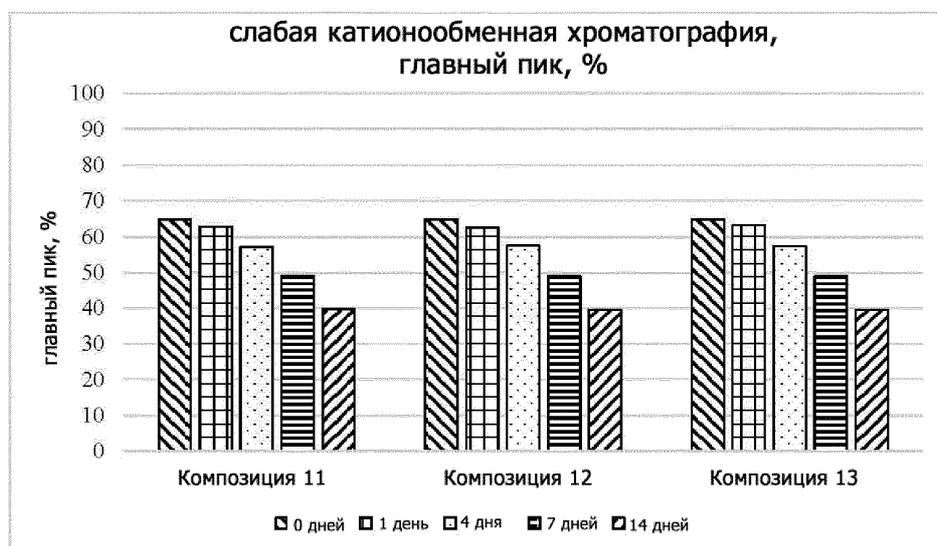
Фиг. 11



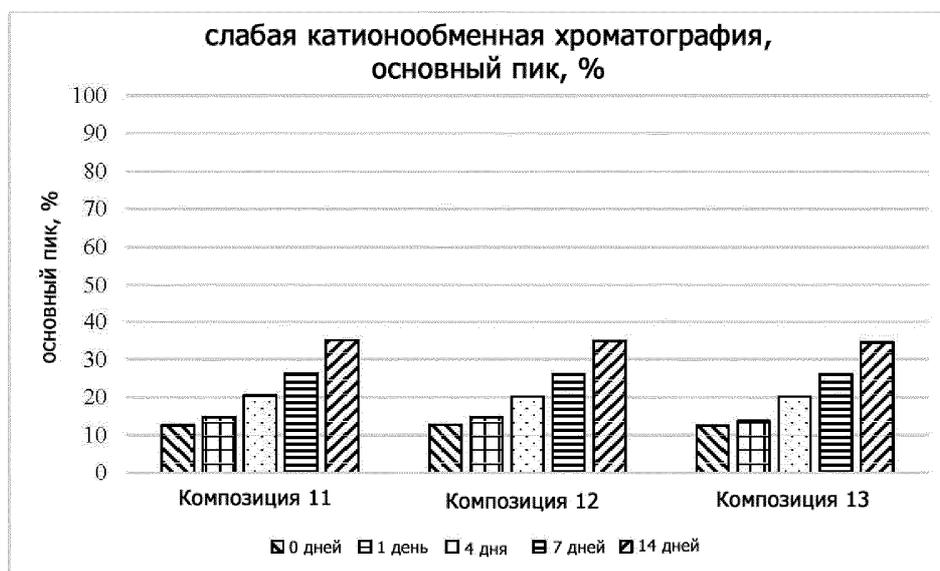
Фиг. 12А



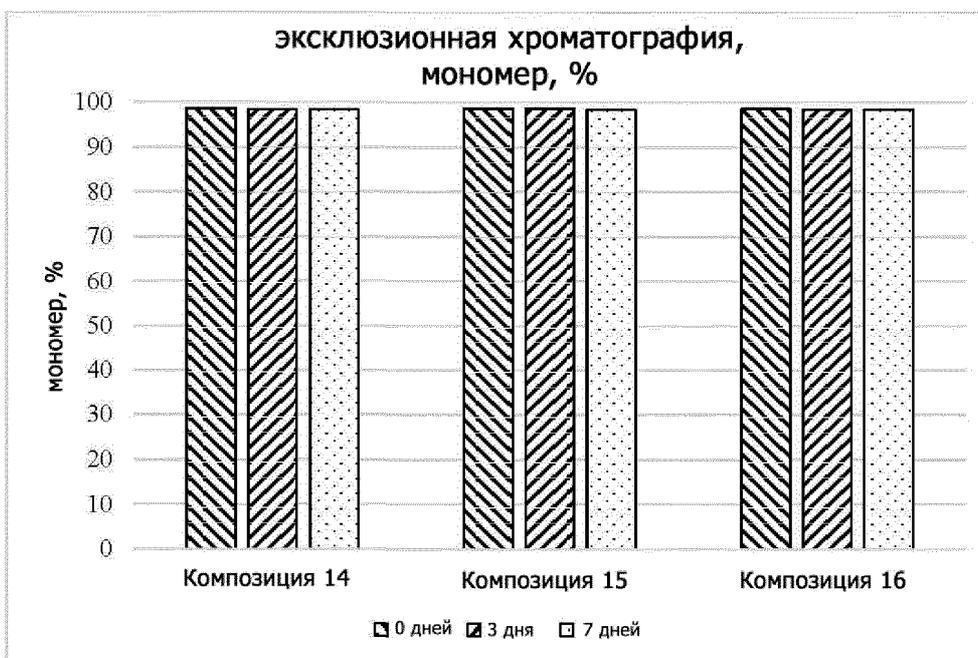
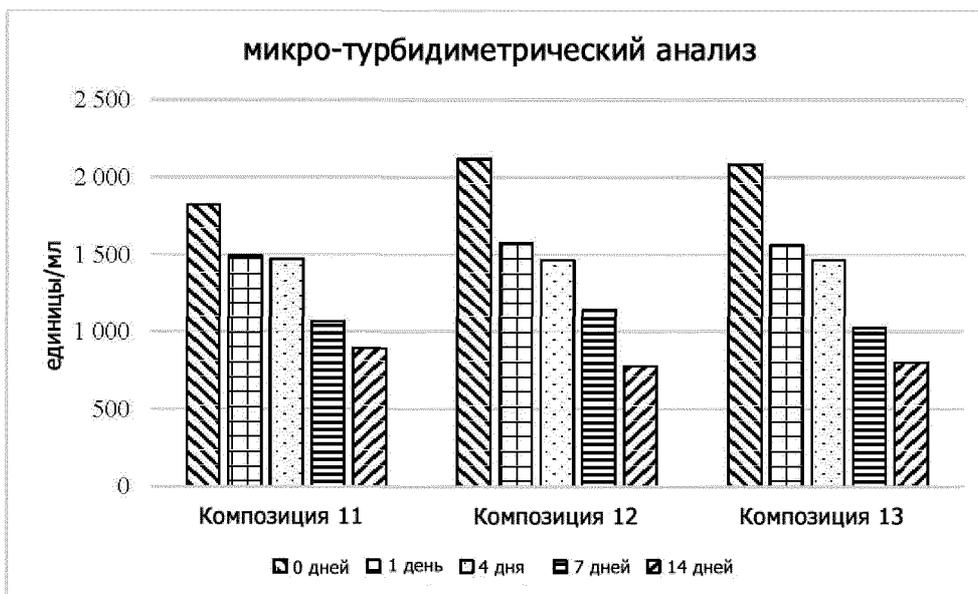
Фиг. 12В

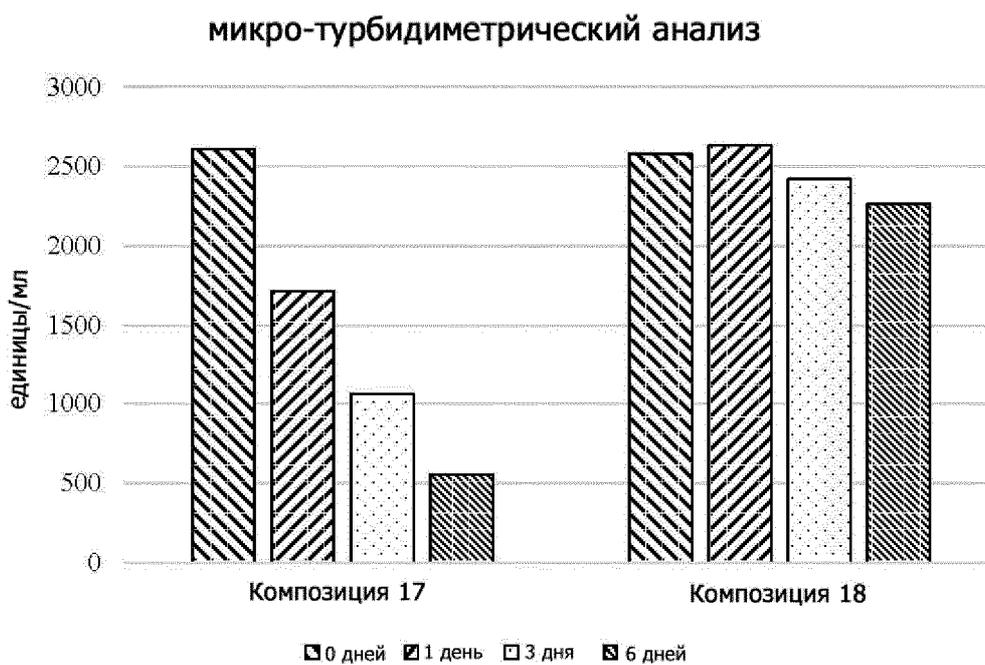
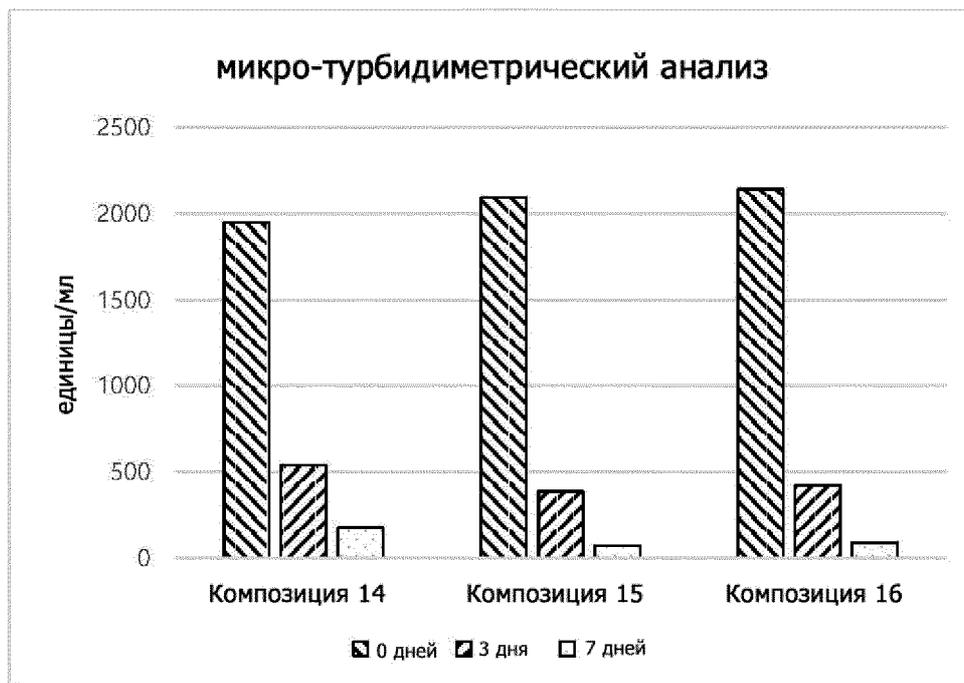


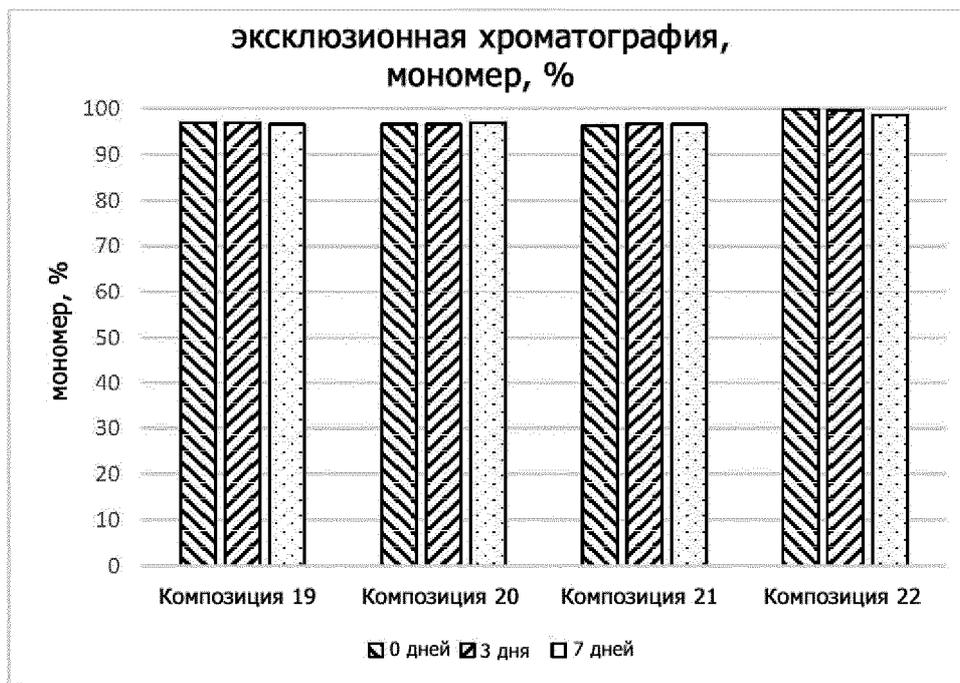
Фиг. 12С



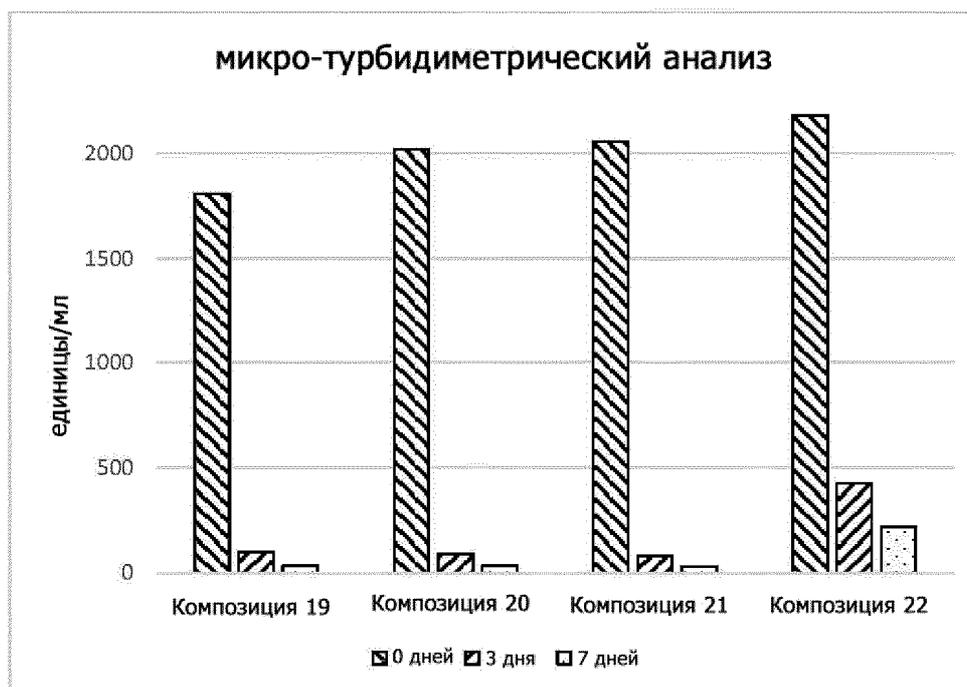
Фиг. 12D



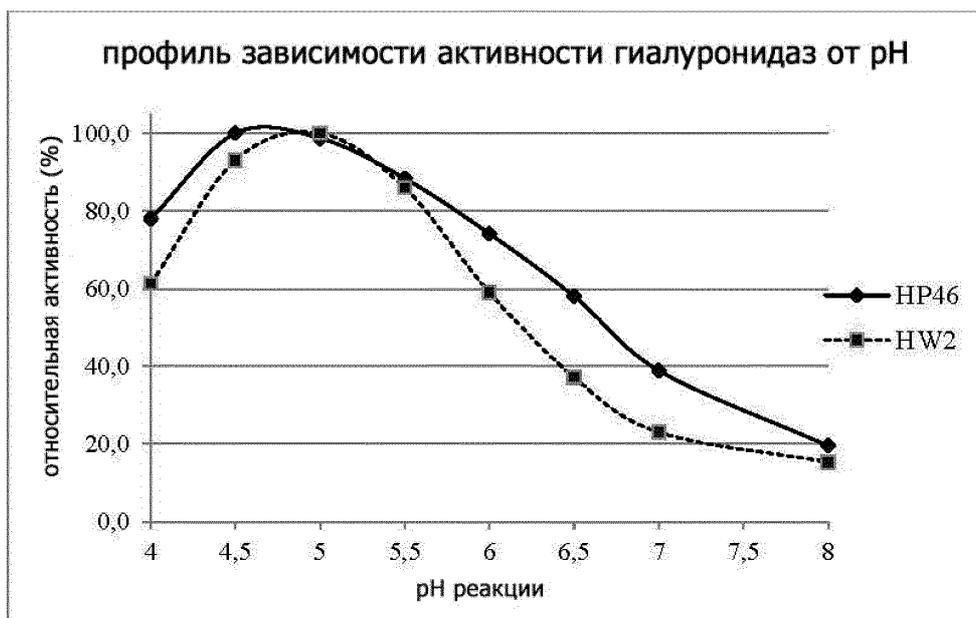




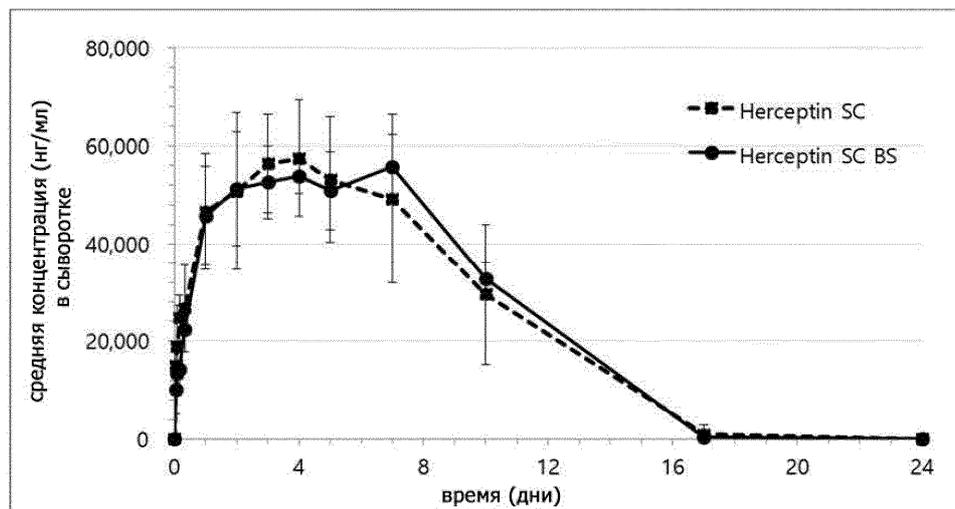
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

