



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104909** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)
A61K 9/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2012 04338	(72) Винахідник(и):	Адлер Міхаель (DE/CH), Малер Ганнс-Крістіан (DE/CH), Штаух Олівер Боріс (DE)
(22) Дата подання заявки:	10.09.2010	(73) Власник(и):	Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.03.2014	(74) Представник:	Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	09170110.2	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2007005608 A2, 11.01.2007. US 2007071675 A1, 29.03.2007. WO 2006091871 A1, 31.08.2006. WO 2009080541 A1, 02.07.2009. US 6991790 B1, 31.01.2006. WO 2005044859 A2, 19.05.2005. BOOKBINDER ET AL: "A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 114, no. 2, 28 August 2006 (2006-08-28), pages 230-241.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	11.09.2009		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.07.2012, Бюл.№ 13		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.03.2014, Бюл.№ 6		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2010/063271, 10.09.2010		

(54) ВИСОКОКОНЦЕНТРОВАНА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МІСТИТЬ АНТИТІЛО ДО CD20

(57) Реферат:

Винахід належить до висококонцентрованої стабільної фармацевтичної композиції антитіла до CD20, що має фармацевтичну активність, такого, наприклад, як ритуксимаб, окрелізумаб або HuMab<CD20>, або суміші зазначених молекул антитіл, призначеної для підшкірної ін'єкції. Зокрема, описана композиція, яка містить в ефективній кількості антитіло до CD20, принаймні один фермент гуалуронідазу, у вигляді об'єднаної композиції або у вигляді форми, яку застосовують для спільного введення. Зазначені композиції містять також принаймні один забуферуючий агент, такий, наприклад, як гістидиновий буфер, стабілізатор або суміш двох або більшої кількості стабілізаторів (наприклад, сахарид, такий, наприклад, як дигідрат α, α -трегалози або сахароза, і необов'язково метіонін як другий стабілізатор), неіоногенну поверхнево-активну речовину та принаймні один фермент гуалуронідазу в ефективній кількості. Описані також спосіб застосування композиції.

UA 104909 C2

Даний винахід відноситься до висококонцентрованих стабільних фармацевтичних композицій антитіла до CD20, що має фармацевтичну активність, або суміші зазначених молекул антитіл, призначених для підшкірної ін'єкції. Зазначені композиції містять крім антитіла або суміші антитіл у високих концентраціях забуферуючий агент, стабілізатор або суміш двох або більшої кількості стабілізаторів, неіоногенну поверхнево-активну речовину та застосовуваний в ефективній кількості, принаймні, один фермент гіалуронідазу. Винахід відноситься також до способу одержання зазначеної композиції та до варіантів застосування зазначеної композиції.

Передумови створення винаходу

В останні роки зросло застосування антитіл у фармацевтиці. У багатьох випадках ці антитіла вводять шляхом внутрішньовенної (IV) ін'єкції або інфузії. При цьому недоліком є те, що кількість антитіла, яку можна вводити внутрішньовенним шляхом, обмежена фізико-хімічними властивостями антитіла, насамперед його розчинністю та стабільністю в прийнятній рідкій композиції та обсягом застосовуваної для інфузії рідини. Альтернативними шляхами введення є підшкірна або внутрішньом'язова ін'єкція. Для таких шляхів введення потрібна висока концентрація білка в кінцевому призначеному для ін'єкції розчині (Shire S.J., Shahrokh Z. та ін., «Challenges in the development of high protein concentration formulations», J. Pharm. Sci., 93(6), 2004, сс. 1390-1402; Roskos L.K., Davis C.G. та ін., «The clinical pharmacology of therapeutic antibodies», Drug Development Research, 61(3), 2004, сс. 108-120). Для збільшення обсягу та, як наслідок, терапевтичної дози, яка є безпечною та яку зручно вводити підшкірно, запропоновано застосування ферментів(у) глікозаміногліканаз(и) з метою збільшення інтерстиціального простору, у який можна ін'єкувати композицію антитіла (WO 2006/091871).

Прикладами присутніх у цей час на ринку стабільних композицій фармацевтично активних антитіл, призначених для терапевтичного застосування, є наступні антитіла:

RITUXAN®/MABTHERA® (ритуксимаб), що представляє собою химерне антитіло, яке зв'язується з антигеном CD20 на В-клітинах. Препаративна форма, що поступає у продаж, представляє собою стерильний, прозорий, безбарвний, що не містить консервантів рідкий концентрат, призначений для внутрішньовенного (IV) введення. Ритуксимаб поставляється в концентрації 10 мг/мл (10 мл) в 100-міліграмових або 500-міліграмових (50 мл) одноразових пляшечках. Продукт виготовляється у вигляді препаративної форми, яка містить хлорид натрію в концентрації 9 мг/мл, дигідрат цитрату натрію в концентрації 7,35 мг/мл, полісорбат 80 у концентрації 0,7 мг/мл і воду для ін'єкцій. Значення рН регулюється на рівні 6,5. Інша рідка препаративна форма ритуксимабу, придатна для IV-введення, описана в US 6991790.

HERCEPTIN™ (трастузумаб), що представляє собою моноклональне антитіло до рецептора HER2 (антитіло до HER2), який у цей час надходить у продаж у Європі у вигляді препарату, що містить 150 мг ліофілізованого порошку (що включає антитіло, дигідрат α, α -трегалози, L-гістидин і гідрохлорид L-гістидину та полісорбат 20), який перед здійсненням інфузій підлягає відновленню водою для ін'єкцій з одержанням призначеної для ін'єкції дози, що становить приблизно 21 мг/мл. В США та багатьох інших країнах трастузумаб надходить у продаж у вигляді продукту, який представляє собою багатодозову пляшечку, що містить 440 мг діючої речовини.

AVASTIN™ (бевасизумаб), що представляє собою моноклональне антитіло до судинного ендотеліального фактору росту (VEGF), який у цей час надходить у продаж у Європі у вигляді рідкої композиції в пляшечках двох типів: а) 100 мг бевасизумабу в 4 мл та б) 400 мг бевасизумабу в 16 мл відповідно, що забезпечує кінцеву концентрацію 25 мг/мл після розведення водою для ін'єкцій, що містить наступні ексципієнти: дигідрат трегалози, фосфат натрію та полісорбат 20.

Хоча встановлено, що зазначені вище препаративні форми антитіл придатні для внутрішньовенного введення, існує необхідність у створенні висококонцентрованих стабільних фармацевтичних композицій, що мають терапевтичну активність антитіл, призначених для підшкірної ін'єкції. Перевага підшкірних ін'єкцій складається в тому, що вони дають можливість медичному персоналу здійснювати їх за допомогою відносно нетривалого втручання в організм пацієнта. Крім того, пацієнта можна навчити здійснювати підшкірну ін'єкцію самостійно. Як правило, обсяги розчину, що ін'єкується підшкірним шляхом, не перевищують приблизно 2 мл. Для пацієнтів, яким потрібно вводити декілька доз, можна ін'єкувати композицію у вигляді кількох стандартних доз у декілька областей на поверхні тіла.

У продаж уже надходять два наступні продукти, що містять антитіла, які призначені для підшкірного введення.

HUMIRA™ (адаліумаб), що представляє собою моноклональне антитіло до фактора некрозу пухлини-альфа (TNF-альфа), який у цей час надходить у продаж у Європі у формі 40-

міліграмової дози в ін'єкуємому обсязі 0,8 мл для підшкірного застосування (концентрація: 50 мг антитіла/мл об'єму, що ін'єкується).

XOLAIR™ (омалізумаб), що представляє собою моноклональне антитіло до імуноглобуліну Е (антитіло до IgE), який у цей час надходить у продаж у формі продукту, що містить 150 мг ліофілізованого порошку (що включає антитіло, сахарозу, гістидин і моногідрат гідрохлориду гістидину та полісорбат 20), який для здійснення підшкірної ін'єкції підлягає відновленню водою з одержанням призначеної для ін'єкції дози, що становить приблизно 125 мг/мл.

У цей час на ринку відсутня висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20, придатна для підшкірного введення. Таким чином, існує необхідність у розробці зазначених висококонцентрованих стабільних фармацевтичних композицій, що мають терапевтичну активність антитіл, призначених для підшкірної ін'єкції.

Ін'єкуємий об'єм лікарських засобів, призначених для парентерального введення в гіподерму, як правило, не перевищує 2 мл з причини в'язкоеластичного опору до гідралічної провідності в підшкірній (SC) тканині, що є результатом протитиску при ін'єкції (Auckland K. та Reed R., «Interstitial-Lymphatic Mechanisms in the control of Extracellular Fluid Volume», Physiology Reviews, 73, 1993, сс. 1-78), а також через болючі відчуття.

Приготування висококонцентрованих білкових композицій є відносно складним завданням і вимагає адаптації кожної композиції до конкретних застосовуваних білків, оскільки кожний білок має різні особливості агрегації. Вважається, що принаймні в ряді випадків агрегати обумовлюють імуногенність терапевтичних білків. Імуногенна реакція на агрегати білка або антитіла може приводити до нейтралізації антитіл, що може робити неефективним терапевтичний білок або антитіло. Імовірно, імуногенність білкових агрегатів представляє собою основну проблему при підшкірних ін'єкціях, причому повторне введення підвищує ризик виникнення імунної відповіді.

Хоча антитіла мають дуже схожу загальну структуру, зазначені антитіла відрізняються складом амінокислот (зокрема, в CDR-ділянках, відповідальних за зв'язування з антигеном) і схемою глікозилування. Крім того, можуть мати місце додаткові пост-трансляційні модифікації, такі як заряд і варіанти глікозилування.

Короткий виклад суті винаходу

Цей винахід відноситься до висококонцентрованої стабільної фармацевтичної композиції, що має фармацевтичну активність антитіла до CD20 або суміші зазначених молекул антитіл, переважно призначеної для підшкірної ін'єкції.

Більш конкретно висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція, що має фармацевтичну активність антитіла до CD20, що пропонується в цьому винаході, містить:

- антитіло до CD20 у концентрації приблизно від 50 до 350 мг/мл;
- забуферуючий агент, що забезпечує значення pH $5,5 \pm 2,0$, у концентрації приблизно від 1 до 100 mM;
- стабілізатор або суміш двох або більшої кількості стабілізаторів у концентрації приблизно від 1 до 500 mM, при цьому необов'язково в якості вторинного стабілізатора присутній метіонін, наприклад, у концентрації від 5 до 25 mM;
- неіоногенну поверхнево-активну речовину в концентрації від 0,01 до 0,1 %; і
- переважно, принаймні, один фермент гіалуронідазу в ефективній кількості.

Докладний опис винаходу

У контексті цього опису поняття «антитіло» використовують у його найбільш широкому змісті, і воно відноситься конкретно до повнорозмірних антитіл, створених за допомогою генетичної інженерії антитіл типу моноклональних антитіл, або рекомбінантних антитіл, поліклональних антитіл, мультиспецифічних антитіл (наприклад, біспецифічних антитіл), утворених, принаймні, із двох повнорозмірних антитіл, химерних антитіл, гуманізованих антитіл, повністю людських антитіл, а також до фрагментів зазначених антитіл, якщо вони мають необхідну біологічну активність.

У контексті цього опису поняття «моноклональне антитіло» відноситься до антитіла, одержаного з популяції практично гомогенних антитіл, тобто з популяції індивідуальних антитіл, які є ідентичними та/або зв'язуються з тим самим епітопом за винятком можливих варіантів, які можуть виникати при одержанні моноклонального антитіла, такі варіанти, як правило, присутні в невеликих кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які включають різні антитіла до різних детермінантів (епітопів), мішенню кожного моноклонального антитіла є одна детермінанта антигену. Крім своєї специфічності, моноклональні антитіла мають ту перевагу, що вони не забруднені іншими імуноглобулінами. Прикметник «моноклональний» вказує на ту відмітну ознаку, що антитіло одержане із практично гомогенної популяції антитіл, і воно не має на увазі вимоги, що антитіло повинно бути одержане за допомогою будь-якого конкретного

методу. Наприклад, моноклональні антитіла, призначені для застосування відповідно до цього винаходу, можна створювати за допомогою методу гібридом, уперше описаного в Köhler та ін., Nature, 256, 1975, с. 495, або їх можна створювати методами рекомбінантної ДНК (див., наприклад, US 4816567). «Моноклональні антитіла» можна виділяти також з фагових бібліотек антитіл за допомогою методів, які описані в Clarkson та ін., Nature, 352, 1991, сс. 624-628 і Marks та ін., J. Mol. Biol., 222, 1991, сс. 581-597. Поняття «моноклональне антитіло» або «композиція моноклонального антитіла» у контексті цього опису відносяться до препарату, що містить молекули антитіла, які мають однаковий склад амінокислот. Таким чином, поняття «людське моноклональне антитіло» відноситься до антитіл, що характеризуються однією специфічністю зв'язування, які мають варіабельні та константні області, виведені з послідовностей імунoglobulinу людської зародкової лінії. Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу людські моноклональні антитіла одержують за допомогою гібридоми, яка включає В-клітину, одержану із трансгенної тварини крім людини, наприклад, трансгенної миші, що має геном, який містить трансген людського важкого ланцюга та трансген людського легкого ланцюга, зливу з іморталізованою клітиною. У контексті цього опису під поняття «моноклональні антитіла» підпадають, зокрема так звані химерні антитіла, у яких частина важкого та/або легкого ланцюга є ідентичними або гомологічними відповідним послідовностям антитіл, які виведені з конкретних видів або належать до конкретного класу або підкласу антитіл, а інший(і) ланцюг(и) є ідентичним(и) або гомологічним(и) відповідним послідовностям антитіл, які виведені з інших видів або належать до іншого класу або підкласу антитіл, а також фрагменти зазначених антитіл, якщо вони мають необхідну біологічну активність (US 4816,567; і Morrison та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1984, сс. 6851-6855). Химерні антитіла, що представляють інтерес відповідно до цього опису, включають «приматизовані» антитіла, які містять антигензв'язуючі послідовності варіабельних областей, виведені із примата крім людини (наприклад, мавп Старого Світу, людиноподібних мавп), і послідовності людських константних областей.

«Фрагменти антитіла» представляють собою частину повнорозмірного антитіла, зокрема, містять антигензв'язуючий центр або варіабельну область антитіла. Прикладами фрагментів антитіла є Fab-, Fab'-, F(ab')₂- і Fv-фрагменти; димерні антитіла, однокланцеві молекули антитіл, імунотоксини та мультиспецифічні антитіла, утворені із фрагменту(ів) антитіл. Крім того, фрагменти антитіл містять однокланцеві поліпептиди, які мають характеристики VH-ланцюга, а саме, мають здатність до складання з VL-ланцюгом, що зв'язується з антигеном CD20. Під поняття «фрагменти антитіл» підпадають також такі фрагменти, які самі не мають здатність виконувати ефекторні функції (ADCC/CDC), але забезпечують зазначену функцію після об'єднання за допомогою способу, запропонованого у винаході, з відповідною(ними) константною(ими) областю(ями) антитіла.

«Повнорозмірне антитіло» представляє собою антитіло, яке містить антигензв'язуючу варіабельну область і константну область (CL) легкого ланцюга та домени CH1, CH2 і CH3 константної області важкого ланцюга. Константні області можуть представляти собою константні області, що мають нативні послідовності (наприклад, константні області, що мають людську нативну послідовність), або варіанти їх амінокислотної послідовності. Переважно повнорозмірне антитіло має одну або декілька ефекторних функцій.

Поняття «варіант амінокислотної послідовності» антитіла в контексті цього опису відноситься до антитіла, амінокислотна послідовність якого відрізняється від послідовності основних видів антитіл. Як правило, варіанти амінокислотної послідовності повинні бути гомологічні, принаймні, приблизно на 70 % послідовностей основних видів антитіл і переважно повинні бути гомологічні, принаймні, приблизно на 80 %, більш переважно гомологічні, принаймні, приблизно на 90 % послідовностей основних видів антитіл. Варіанти амінокислотної послідовності несуть заміни, делеції та/або додавання в певних положеннях, що знаходяться усередині послідовностей, або в положеннях, що примикають до послідовностей основних видів антитіл. У контексті цього опису прикладами варіантів амінокислотної послідовності є кислий варіант (наприклад, деамідований варіант антитіла), основний варіант, антитіло, подовжене лідерною послідовністю (наприклад, VHS-) на амінокінці одного або двох його легких ланцюгів, антитіло з С-кінцевим залишком лізину на одному або двох його важких ланцюгах і т.д., та вони включають комбінації варіантів амінокислотних послідовностей важких та/або легких ланцюгів. найбільший інтерес, Варіант антитіла, що представляє найбільший інтерес відповідно до цього опису, представляє собою антитіло, подовжене лідерною послідовністю на амінокінці одного або двох його легких ланцюгів, що необов'язково містить також інші відмінності в амінокислотній послідовності та/або в глікозилюванні відносно основних видів антитіл.

У контексті цього опису поняття «варіант глікозилювання» відноситься до антитіла із приєднаними до нього одним або декількома вуглеводними фрагментами, які відрізняються від

вуглеводних фрагментів, приєднаних до антитіл основних видів. У контексті цього опису прикладами варіантів глікозилювання є антитіло, що несе олігосахаридну структуру G1 або G2 замість олігосахаридної структури G0, приєднаної до його Fc-області, антитіло з одним або двома вуглеводними фрагментами, приєднаними до одного або двох легких ланцюгів, антитіло, у якого відсутній вуглевод, приєднаний до одного або двох важких ланцюгів антитіла, і т.д. та комбінації варіацій глікозилювання. Крім того, поняття «варіант глікозилювання» відноситься також до антитіл, створених за допомогою глікоінженерії (зі сконструйованим глікозилюванням), які описані, наприклад, в WO 1331266 та USP 7517670.

Поняття «ефекторні функції» антитіла відноситься до видів біологічної активності, пов'язаною з Fc-областю (з Fc-областю, що має нативну послідовність, або з Fc-областю, що несе варіант амінокислотної послідовності) антитіла. Прикладами ефекторних функцій антитіла є зв'язування C1q; комплементзалежна цитотоксичність (CDC); зв'язування Fc-рецептора; антитіло-обумовлена клітиннозалежна цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; понижуюча регуляція рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептора, BCR) і т.д.

Залежно від амінокислотної послідовності константної області їх важких ланцюгів, повнорозмірні антитіла можна розділяти на різні «класи». Відомо п'ять основних класів повнорозмірних антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG та IgM, та деякі з них додатково підрозділяють на «підкласи» (ізотипи), наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, та IgA2. Константні області важких ланцюгів, що відповідають різним класам антитіл, позначають відповідно як α (альфа), δ (дельта), ϵ (епсилон), γ (гама) та μ (мю). Будова субодиниць та тривимірні конфігурації різних класів імуноглобулінів добре відомі.

У контексті цього опису поняття «біологічна активність» моноклонального антитіла відноситься до здатності антитіла зв'язуватись з антигеном і обумовлювати біологічну відповідь, що піддається вимірюванню, яку можна оцінювати *in vitro* або *in vivo*. Зазначена активність може представляти собою антагоністичну (наприклад, якщо антитіло представляє собою антитіло до CD20) або агоністичну активність.

Поняття «гуманізоване антитіло» відноситься до антитіл, у яких каркасна ділянка або «гіперваріабельні ділянки» (CDR) модифіковані таким чином, що вони містять CDR імуноглобуліну іншої специфічності в порівнянні зі специфічністю материнського імуноглобуліну. У переважному варіанті здійснення винаходу мишачий CDR трансплантують у каркасну ділянку людського антитіла, у результаті чого утворюється «гуманізоване антитіло». Особливо переважними CDR є CDR, які містять послідовності, що розпізнають антигени, зазначені нижче для химерних і біфункціональних антитіл. Гуманізовані антитіла представляють собою головним чином людські імуноглобуліни (антитіло-реципієнт), у яких залишки з гіперваріабельної ділянки реципієнта замінені на залишки з гіперваріабельної ділянки антитіла видів крім людини (антитіло-донор), таких як миші, пацюки, кролики або примати крім людини, що мають необхідну специфічність, афінність та активність. У деяких випадках залишки каркасної ділянки (FR) людського імуноглобуліну заміняють на відповідні залишки імуноглобуліну видів крім людини. Крім того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, які не присутні в антитілі-реципієнті або антитілі-донорі. Ці модифікації здійснюють для подальшого вдосконалення характеристик антитіла. У цілому, гуманізоване антитіло повинно містити практично повністю принаймні одну та, як правило, дві варіабельні області, у яких усі або практично всі гіперваріабельні петлі відповідають петлям імуноглобуліну видів крім людини та усі або практично всі FR мають послідовність людського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло необов'язково може містити також, принаймні, частину константної області (Fc) імуноглобуліну, як правило, людського імуноглобуліну (див., наприклад, Riechmann L. та ін., Nature 332, 1988, сс. 323-327 і Neuberger M.S. та ін., Nature 314, 1985, сс. 268-270).

Поняття «химерне антитіло» відноситься до моноклональному антитіла, що містить варіабельну область, тобто зв'язуючу область, виведену з одного джерела або видів, та, принаймні, частину константної області, виведену з іншого джерела або видів, яке, як правило, одержують методами рекомбінантної ДНК. Найбільш переважними є химерні антитіла, що містять мишачу варіабельну область і людську константну область. Такі мишачі/людські химерні антитіла є продуктом експресуємих генів імуноглобуліну, що містять сегменти ДНК, які кодують мишачі варіабельні області імуноглобуліну, та сегменти ДНК, які кодують людські константні області імуноглобуліну. Іншими формами «химерних антитіл», що підпадають під обсяг цього винаходу, є антитіла, у яких клас або підклас модифікований або змінений, у порівнянні з вихідним антитілом. Такі «химерні» антитіла називають також «антитілами переключеного класу». Методи одержання химерних антитіл засновані на загальноприйнятих методиках рекомбінантної ДНК і методиках генної трансфекції, та в цей час є добре відомими в даній

області (див., наприклад, Morrison S.L. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 6851-6855; US 5202238 і US 5204244).

Мається на увазі, що в контексті цього опису поняття «людське антитіло» включає антитіла, що мають варіабельну та константну області, виведені з послідовностей імуноглобуліну людської зародкової лінії. Людські антитіла добре відомі в даній області (van Dijk M.A. і van de Winkel J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 2001, сс. 368-374). На основі зазначеної технології можна одержувати людські антитіла до широкої різноманітності мішеней. Приклади людських антитіл описані в Kellermann S.A. та ін., Curr Opin Biotechnol. 13, 2002, сс. 593-597.

Мається на увазі, що поняття «рекомбінантне людське антитіло» у контексті цього опису включає всі людські антитіла, які одержують, експресують, створюють або виділяють методами рекомбінації, такі як антитіла, виділені із клітини-хазяїна, такої як NS0- або CHO-клітина, або із тварини (наприклад, з миші), яка є трансгенною відносно генів людського імуноглобуліну, або антитіла, що експресуються за допомогою рекомбінантного експресійного вектора, яким трансфекують клітину-хазяїна. Такі рекомбінантні людські антитіла мають варіабельну та константну області, виведені з послідовностей імуноглобуліну людської зародкової лінії, у перетвореній формі. Рекомбінантні людські антитіла, запропоновані у винаході, піддавали *in vivo* соматичній гіпермутації. Так, амінокислотні послідовності VH- і VL-областей рекомбінантного антитіла представляють собою послідовності, які, хоча й виведені з послідовностей VH- та VL-областей людської зародкової лінії та є спорідненими їм, але можуть не зустрічатись в існуючому в природних умовах *in vivo* спектрі зародкових ліній людського антитіла.

У контексті цього опису поняття «специфічно зв'язується» або «зв'язується специфічно з» відноситься до антитіла, що специфічно зв'язується з антигеном CD20. Переважно афінність зв'язування характеризується значенням KD, що становить 10^{-9} молей/л або менше (наприклад, 10^{-10} молей/л), переважно значенням KD, що становить 10^{-10} молей/л або менше (наприклад, 10^{-12} молей/л). Афінність зв'язування визначають за допомогою стандартного аналізу зв'язування, такого, наприклад, як метод поверхневого плазмонного резонансу (BIAcore®).

Мається на увазі, що поняття «молекула нуклеїнової кислоти» у контексті цього опису відноситься до молекул ДНК і молекул РНК. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одноланцюговою або дволанцюговою, але переважно вона представляє собою дволанцюгову ДНК.

«Константні області» не беруть участь у зв'язуванні антитіла з антигеном безпосередньо, але вони беруть участь в ефektorних функціях (таких як ADCC, зв'язування комплементу та CDC).

Поняття «варіабельна область» (варіабельна область легкого ланцюга (VL), варіабельна область важкого ланцюга (VH)) у контексті цього опису означає кожну з пар легких і важких ланцюгів, які беруть безпосередню участь у зв'язуванні антитіла з антигеном. Варіабельні області людських легкого та важкого ланцюгів мають однакову загальну структуру, і кожна область містить чотири каркасні ділянки (FR), послідовності яких у значній мірі є консервативними, з'єднані трьома «гіперваріабельними ділянками» (або ділянками, що визначають комплементарність, CDR). Каркасні ділянки адаптовані до β -складчастої конформації, та CDR можуть утворювати петлі, що з'єднують β -складчасту структуру. CDR у кожному ланцюзі підтримують свою тривимірну структуру за допомогою каркасних ділянок і утворюють разом з CDR з іншого ланцюга антигенсзв'язуючий центр. CDR3-ділянки важкого та легкого ланцюга антитіла відіграють найбільш важливу роль у специфічності/афінності зв'язування антитіл, запропонованих у винаході, і тому вони представляють собою ще один об'єкт винаходу.

Поняття «гіперваріабельна ділянка» або «антиген-зв'язуючий центр антитіла» у контексті цього опису відносяться до амінокислотних залишків антитіла, які відповідальні за зв'язування з антигеном. Гіперваріабельна ділянка містить амінокислотні залишки з «ділянок, що визначають комплементарність» або «CDR». «Каркасні» або «FR»- ділянки представляють собою ділянки варіабельної області, відмінні від залишків гіперваріабельної ділянки, як вона визначена у цьому описі. Таким чином, легкий та важкий ланцюги антитіла містять у напрямку від N- до C-кінця наступні ділянки: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. CDR3 важкого ланцюга представляє собою ділянку, яка насамперед вносить основний вклад у зв'язування з антигеном. CDR- та FR-ділянки визначають згідно зі стандартною номенклатурою Кебота (Kabat та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1991) та/або як ділянки з «гіперваріабельної петлі».

Поняття «CD20» та «антиген CD20» у контексті цього опису використовують взаємозамінно, та вони включають будь-які варіанти, ізоформи та видові гомологи людського CD20, які в

природних умовах експресуються клітинами або експресуються на клітинах, трансфекованих геном CD20. Зв'язування антитіла, запропонованого у винаході, з антигеном CD20 опосередковує знищення клітин, що експресують CD20 (наприклад, пухлинної клітини), шляхом інактивації CD20. Знищення клітин, що експресують CD20, може відбуватись за допомогою одного або декількох з наступних механізмів: антитіло-обумовлена клітиннозалежна цитотоксичність (ADCC), комплементзалежна цитотоксичність (CDC), індукція клітинної загибелі/апоптозу, гомотипічна агрегація і т.д.

Синонімами CD20, прийнятими в даній області, є антиген CD20 В-лімфоцитів, поверхневий антиген В-лімфоцитів B1, Leu-16 та Bp35.

Поняття «антитіло до CD20», запропоноване у винаході, відноситься до антитіла, яке специфічно зв'язується з антигеном CD20. Залежно від характеристик зв'язування та біологічної активності антитіла до CD20 відносно антигену CD20, можна розрізнити два типи антитіл до CD20 (антитіла до CD20 типу I і типу II) згідно Cragg M.S. та ін., Blood 103, 2004, сс. 2738-2743; та Cragg M.S. та ін., Blood 101, 2003, сс. 1045-1052 (див. таблицю 1).

Таблиця 1

Властивості антитіл до CD20 типу I і типу II

Антитіла до CD20 типу I	Антитіла до CD20 типу II
Епітоп CD20 типу I	Епітоп CD20 типу II
Локалізують CD20 у ліпідних «плотиках»	Не локалізують CD20 у ліпідних «плотиках»
Підвищений рівень CDC (у випадку IgG1-ізотипу)	Знижений рівень CDC (у випадку IgG1-ізотипу)
ADCC-активність (у випадку IgG1-ізотипу)	ADCC-активність (у випадку IgG1-ізотипу)
Повна зв'язуюча активність	Знижена зв'язуюча активність
Гомотипічна агрегація	Більш сильна гомотипічна агрегація
Індукція апоптозу при перехресному зшиванні	Сильна індукція клітинної загибелі без перехресного зшивання

Одним з основних властивостей антитіл до CD20 типу I і типу II є їхній механізм зв'язування. Так, антитіла до CD20 типу I і типу II можна класифікувати за співвідношенням здатностей зазначеного антитіла до CD20 і ритуксимабу зв'язувати CD20 на Raji-клітинах (клітини лінії африканської лімфоми Беркитта) (ATCC № CCL-86).

У контексті цього опису «антитіло до CD20» може представляти собою антитіло або типу I, або типу II. Переважно воно представляє собою антитіло типу I, найбільш переважно ритуксимаб.

Антитіла до CD20 типу I характеризуються тим, що співвідношення здатностей зазначеного антитіла до CD20 і ритуксимабу зв'язувати CD20 на Raji-клітинах (ATCC № CCL-86) становить від 0,8 до 1,2, переважно від 0,9 до 1,1. Прикладами зазначених антитіл до CD20 типу I є, наприклад, ритуксимаб, описаний в EP 2000149B1 (Anderson та ін., див. фіг. 4 та 5), 1F5 IgG2a (ECACC, гібридома; Press та ін., Blood 69/2, 1987, сс. 584-591), H147 IgG3 (ECACC, гібридома), 2C6 IgG1 (описаний в WO 2005/103081), 2F2 IgG1 або офатумумаб (описаний в WO 2004/035607 та WO 2005/103081) і 2H7 IgG1 (описаний в WO 2004/056312) і в WO 2006/084264 (наприклад, варіанти, представлені в таблицях 1 і 2). Переважно зазначеним антитілом до CD20 типу I є моноклональне антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що й ритуксимаб.

Антитіла до CD20 типу II характеризуються тим, що співвідношення здатностей зазначеного антитіла до CD20 і ритуксимабу зв'язувати CD20 на Raji-клітинах (ATCC № CCL-86) становить від 0,3 до 0,6, переважно від 0,35 до 0,55, більш переважно від 0,4 до 0,5. Прикладами зазначених антитіл до CD20 типу II є, наприклад, тозитумумаб (B1 IgG2a), гуманізоване антитіло B-Ly1 ізотипу IgG1 (химерне гуманізоване антитіло ізотипу IgG1 описане в WO 2005/044859), 11B8 IgG1 (описане в WO 2004/035607) та AT80 IgG1. Переважним антитілом до CD20 типу II є моноклональне антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що й гуманізоване антитіло B-Ly1 (описане в WO 2005/044859).

«Співвідношення здатностей антитіла до CD20 і ритуксимабу зв'язувати CD20 на Raji-клітинах (ATCC № CCL-86)» визначають методом прямої імунофлуоресценції (вимірюють середню інтенсивність флуоресценції (MFI)) за допомогою обладнання FACSArya (фірма Becton Dickinson), використовуючи зазначене антитіло до CD20, кон'юговане з Cy5, та ритуксимаб, кон'югований з Cy5, на Raji-клітинах (ATCC № CCL-86), і розраховують у такий спосіб:

Співвідношення здатності зв'язувати CD20 на Raji-клітинах (ATCC № CCL-86) =

$$\frac{\text{MFI (Cy5 - антитіло до CD20)}}{\text{MFI (Cy5 - ритуксімаб)}} \times \frac{\text{рівень Cy5 - мічення (Cy5 - ритуксімаб)}}{\text{рівень Cy5 - мічення (Cy5 - антитіло до - CD20)}}$$

MFI означає середню інтенсивність флуоресценції. «Рівень Cy5-мічення» у контексті цього опису означає кількість мічених Cy5 молекул на молекулу антитіла.

5 Як правило, для зазначеного антитіла до CD20 типу I характерне співвідношення здатностей зазначеного першого антитіла до CD20 і ритуксімабу зв'язувати CD20 на Raji-клітинах (ATCC № CCL-86), що становить від 0,8 до 1,2, переважно від 0,9 до 1,1.

10 Як правило, для зазначеного антитіла до CD20 типу II характерне співвідношення здатностей зазначеного другого антитіла до CD20 і ритуксімабу зв'язувати CD20 на Raji-клітинах (ATCC № CCL-86), що становить від 0,3 до 0,6, переважно від 0,35 до 0,55, більш переважно від 0,4 до 0,5.

У переважному варіанті здійснення винаходу зазначене антитіло до CD20 типу II, переважно гуманізоване антитіло B-Ly1, має підвищену антитіло-обумовлену клітиннозалежну цитотоксичність (ADCC).

15 Під «антитілом, що має підвищену антитіло-обумовлену клітиннозалежну цитотоксичність (ADCC)» мається на увазі антитіло, характеристики якого описані вище, що має підвищену ADCC при визначенні за допомогою будь-якого придатного методу, відомого звичайним фахівцям у даній області. Один із прийнятих аналізів in vitro ADCC передбачає, що:

20 1) в аналізі використовують клітини-мішені, для яких відомо, що вони експресують антиген-мішень, розпізнаваний антиген-зв'язуючою областю антитіла;

2) у якості ефекторних клітин в аналізі використовують мононуклеарні клітини периферичної крові людини (PBMC), виділені із крові довільно обраного здорового донора;

3) аналіз здійснюють згідно з наступним протоколом:

25 I) виділяють PBMC за допомогою стандартних процесів центрифугування в градієнті щільності та суспендують з розрахунку 5×10^6 клітин/мл в RPMI-середовищі для культивування клітин;

30 II) вирощують клітини-мішені за допомогою стандартних методів культивування тканин, збирають клітини на експонентній фазі росту, життєздатність яких перевищує 90 %, відмивають в RPMI-середовищі для культивування клітин, мітять ^{51}Cr (100 мкКі), відмивають двічі в середовищі для культивування клітин і ресуспендують у середовищі для культивування клітин із щільністю 10^5 клітин/мл;

III) здійснюють трансфекцію, використовуючи по 100 мкл зазначеної вище кінцевої суспензії клітин-мішеней на кожну лунку 96-лункового титраційного мікропланшета;

35 IV) здійснюють серійне розведення антитіла від 4000 до 0,04 нг/мл у середовищі для культивування клітин і додають по 50 мкл розчинів, що утворились, антитіла до клітин-мішеней в 96-лунковому титраційному мікропланшеті, оцінюють у трьох повторностях антитіло в різних концентраціях, що покривають увесь діапазон зазначених вище концентрацій;

40 V) для контролю максимального вивільнення (MR) в 3 додаткові лунки в планшеті, що містять мічені клітини-мішені, вносять по 50 мкл 2 %-ного (VN) водяного розчину неіоногенної поверхнево-активної речовини (Nonidet, фірма Sigma, Сент-Луїс) замість розчину антитіла (пункт IV, вище);

VI) для контролю спонтанного вивільнення (SR) в 3 додаткові лунки в планшеті, що містять мічені клітини-мішені, вносять по 50 мкл RPMI-середовища для культивування клітин, замість розчину антитіла (пункт IV, вище);

45 VII) потім 96-лунковий титраційний мікропланшет центрифугують при $50 \times g$ протягом 1 хв та інкубують протягом 1 г при 4°C ;

VIII) додають по 50 мкл суспензії PBMC (пункт I, вище) у кожну лунку для забезпечення співвідношення ефекторна клітина: клітина-мішень 25:1, і планшети поміщають в інкубатор в атмосферу, що містить 5 % CO_2 , на 4 г при температурі 37°C ;

50 IX) збирають безклітковий супернатант із кожної лунки та кількісно оцінюють радіоактивність, що вивільнилась в експерименті (ER), за допомогою гамма-лічильника;

55 X) розраховують відсоток питомого лізису для кожної концентрації антитіла за допомогою формули $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$, де ER представляє собою середню радіоактивність (див. пункт IX, вище), визначену для зазначеної концентрації антитіла, MR представляє собою середню радіоактивність (див. пункт IX, вище), визначену для MR-контролів (див. пункт V, вище), а SR представляє собою середню радіоактивність (див. пункт IX, вище), визначену для SR-контролів (див. пункт VI, вище);

4) визначають «підвищений рівень ADCC» або за підвищенням максимального відсотка питомого лізису, виявленого в зазначеному вище діапазоні концентрацій антитіла, та/або за

зниженням концентрації антитіла, необхідної для досягнення половини від максимального відсотка специфічного лізису, виявленого в зазначеному вище діапазоні концентрацій антитіла. Підвищення рівня ADCC визначають відносно рівня ADCC, виміряного за допомогою описаного вище аналізу, опосередкованого таким же антитілом, одержаним з використанням такого ж

5 типу клітин-хазяїв, з використанням таких же стандартних методів очищення, приготування форм і зберігання, які добре відомі фахівцям у даній області, але яке не одержане з використанням клітин-хазяїв, сконструйованих так, що вони надекспресують GnTIII.

Зазначену «підвищену (підвищений рівень) ADCC» можна одержувати шляхом глікоінженерії зазначених антитіл, що означає досягнення підвищення опосередковуваних клітиною ефektorних функцій моноклональних антитіл, що зустрічаються в природних умовах, шляхом інженерії їх олігосахаридного компоненту згідно з методом, описаним в Umana, P. та ін., Nature Biotechnol. 17, 1999, сс. 176-180 і в US 6602684.

Поняття «комплементзалежна цитотоксичність (CDC)» відноситься до лізису людських пухлинних клітин-мішеней антитілом, запропонованим у винаході, у присутності комплекменту. CDC переважно оцінюють шляхом обробки препарату клітин, що експресують CD20, антитілом до CD20, запропонованим у винаході, у присутності комплекменту. Вважається, що має місце CDC, якщо антитіло при його використанні в концентрації 100 нМ індукує лізис (загибель клітин) 20 % або більше пухлинних клітин протягом 4 г. Аналіз переважно здійснюють за допомогою мічених ⁵¹Cr або Eu пухлинних клітин, та оцінюють вивільнення ⁵¹Cr або Eu. У якості контролю пухлинні клітини-мішені інкубують з комплекментом без антитіла.

Як правило, антитіла до CD20 типу I і типу II ізотипу IgG1 характеризуються наявністю CDC-активності. Антитіла до CD20 типу I мають підвищену CDC (якщо відносяться до ізотипу IgG1), а антитіла до CD20 типу II мають знижену CDC (якщо відносяться до ізотипу IgG1) у порівнянні один з одним. Переважно антитіла до CD20 типу I і типу II представляють собою антитіла ізотипу IgG1.

Антитіло «ритуксимаб» представляє собою створене за допомогою генетичної інженерії химерне людське/мишаче моноклональне антитіло до людського антигену CD20, що містить людську гама-1 константну область. Це химерне антитіло містить людські гама-1 константні області та воно ідентифіковане за назвою «C2B8» в EP 2000149B1 (Anderson K.C. та ін., див.,

30 наприклад, фіг. 4 і 5). Ритуксимаб дозволений для лікування пацієнтів, що страждають рецидивуючою або рефрактерною, низького ступеня злоякісності або фолікулярною, CD20-позитивною, В-клітинною не-ходжкінською лімфомою. Вивчення механізму дії в досліджах *in vitro* продемонструвало, що ритуксимаб має залежну від людського комплекменту цитотоксичність (CDC) (Reff M.E. та ін., Blood 83(2), 1994, сс. 435-445). Крім того, він має виражену активність в аналізах з оцінки антитіло-обумовленої клітиннозалежної цитотоксичності (ADCC).

Поняття «гуманізоване антитіло B-Ly1» відноситься до гуманізованого антитіла B-Ly1, описаного в WO 2005/044859, яке одержували з мишачого моноклонального антитіла до CD20 B-Ly1 (варіабельна область мишачого важкого ланцюга (VH): SEQ ID NO: 1; варіабельна область мишачого легкого ланцюга (VL): SEQ ID NO: 2- див. Poppema S. i Visser L., Biotest Bulletin 3, 1987, сс. 131-139;) шляхом химеризації з людською константною областю з IgG1 і наступної гуманізації (див. WO 2005/044859). Ці «гуманізовані антитіла B-Ly1» описані докладно в WO 2005/044859.

Переважно «гуманізоване антитіло B-Ly1» має варіабельну область важкого ланцюга (VH), вибрану з SEQ ID NO: 3 -SEQ ID NO: 20 (B-HH2 - B-HH9 і B-HL8 - B-HL17, які описані в WO 2005/044859). Найбільш переважно VH представляє собою BHH6. Переважно «гуманізоване антитіло B-Ly1» має варіабельну область легкого ланцюга (VL), яка представлена в SEQ ID NO: 20 (B-KV1 в WO 2005/044859). Крім того, гуманізоване антитіло B-Ly1 переважно представляє собою антитіло ізотипу IgG1. Переважно зазначені гуманізовані антитіла B-Ly1, запропоновані у винаході, створені за допомогою глікоінженерії (GE) в Fc-області згідно з методами, описаними в WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, в Umana P. та ін., Nature Biotechnol. 17, 1999, сс. 176-180 і WO 99/154342. Найбільш переважні створені за допомогою глікоінженерії гуманізовані антитіла B-Ly1 мають змінену схему глікозилування в Fc-області, переважно мають знижений рівень фукозних залишків. Переважно принаймні 40 % або більше (в одному з варіантів здійснення винаходу від 40 % до 60 %, в іншому варіанті здійснення винаходу принаймні 50 %, а в ще одному варіанті здійснення принаймні 70 % або більше) олігосахаридів Fc-області є нефукозилуваними. Крім того, олігосахариди Fc-області переважно є бісекційними. Найбільш переважно «гуманізоване антитіло B-Ly1» містить VH B-HH6 і VL B-KV1, які описані в WO 2005/044859. У контексті цього опису антитіло позначають також як «HuMab<CD20>». Зазначене антитіло має міжнародну непатентовану назву (INN) афутузумаб.

60 Відповідно до іншого переважного варіанту здійснення винаходу зазначене антитіло має

понижений рівень фукозних залишків, як зазначено вище, та/або олігосахариди в Fc-області найбільш переважно є бісекційними. Згідно з іншим найбільш переважним варіантом здійснення винаходу, зазначене антитіло характеризується підвищеною ADCC, як зазначено вище.

Олігосахаридний компонент може впливати на властивості, що мають відношення до ефективності терапевтичного глікопротеїну, включаючи фізичну стабільність, стійкість до впливу протеаз, взаємодії з імунною системою, фармакокінетичні параметри та специфічну біологічну активність. Зазначені властивості можуть залежати не тільки від присутності або відсутності олігосахаридів, але також від їхніх специфічних структур. Можна зробити певні узагальнення, що стосуються залежності структури олігосахариду та функції глікопротеїну. Наприклад, деякі структури олігосахариду опосередковують швидкий кліренс глікопротеїну із кровотоку в результаті взаємодій зі специфічними зв'язуючими вуглеводи білками, а інші можуть зв'язуватись антитілами та запускати небажані імунні реакції (Jenkins N. та ін., *Nature Biotechnol.* 14, 1996, сс. 975-981).

Клітини ссавців є переважними хазяями для виробництва терапевтичних глікопротеїнів завдяки їхній здатності глікозилувати білки з одержанням найбільш прийнятної для застосування на людині форми (Cumming D.A. та ін., *Glycobiology* 1, 1991, сс. 115-130; Jenkins N. та ін., *Nature Biotechnol.* 14, 1996, сс. 975-981). Бактерії дуже рідко глікозилують білки, і подібно іншим типам звичайних хазяїв, таких як клітини дріжджів, нитчатих грибів, комах і рослин, забезпечують схеми глікозилування, асоційовані зі швидким кліренсом із кровотоку, небажаними імунними взаємодіями та у деяких випадках зниженою біологічною активністю. Серед клітин ссавців, клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) знайшли найбільш широке застосування протягом двох останніх десятиліть. Крім забезпечення прийнятних схем глікозилування ці клітини дозволяють стійко одержувати генетично стабільні, високопродуктивні клональні клітинні лінії. Їх можна культивувати, досягаючи високої щільності, у простих біореакторах з використанням безсироваткових середовищ, і на їхній основі можна розробляти безпечні та відтворені біопроцеси. Іншими звичайно застосовуваними клітинами тварин є клітини нирки дитинчати хом'яка (BHK), клітини мишачої мієломи NS0 та SP2/0. В останні роки вивчали також можливість виробництва в трансгенних тварин (Jenkins N. та ін., *Nature Biotechnol.* 14, 1996, сс. 975-981).

Усі антитіла містять вуглеводні структури в консервативних положеннях у константних областях важкого ланцюга, при цьому кожний ізотип характеризується різною організацією N-зв'язаних вуглеводних структур, які проявляють різну дію на складання, секрецію та функціональну активність білка (Wright A. і Monison S. L., *Trends Biotech.* 15, 1997, сс. 26-32). Структура приєднаного N-зв'язаного вуглеводу значно варіюється залежно від ступеню процесування та може включати олігосахариди, що мають високий вміст маннози, безліч розгалужень, а також біантенні складні олігосахариди. Як правило, має місце гетерогенний процесинг структур корових олігосахаридів, приєднаних у конкретному сайті глікозилування, в результаті чого навіть моноклональні антитіла існують у вигляді декількох глікоформ. Було встановлено також, що основні відмінності в глікозилуванні антитіл мають місце між клітинними лініями, і навіть при вирощуванні даної клітинної лінії в інших умовах культивування виникають невеликі відмінності (Lifely M. R. та ін., *Glycobiology* 5(8), 1995, сс. 813-22).

Одним зі шляхів досягнення значного підвищення ефективності при збереженні простого процесу одержання та, який, очевидно, може забезпечити відсутність значних небажаних побічних дій, є посилення обумовлених клітиною ефекторних функцій моноклональних антитіл, що зустрічаються в природних умовах, шляхом конструювання їх олігосахаридного компоненту згідно з методом, описаним в Umana P. та ін., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180; і US 6602684. Антитіла IgG1-типу, які найбільш часто застосовують в імунотерапії раку, представляють собою глікопротеїни, що мають консервативний N-зв'язаний сайт глікозилування на Asn297 в кожному CH2-домені. Два складних біантенних олігосахариди, приєднаних до Asn297, розташовуються між CH2-доменами, формуючи великий контакт із поліпептидним каркасом, та їх присутність є важливою для того, щоб антитіло могло здійснювати ефекторні функції, такі як антитіло-обумовлена клітиннозалежна цитотоксичність (ADCC) (Lifely M.R. та ін., *Glycobiology* 5, 1995, сс. 813-822; Jefferis R. та ін., *Immunol. Rev.* 163, 1998, сс. 59-76; Wright A. і Morrison S.L., *Trends Biotechnol.* 15, 1997, сс. 26-32).

Раніше було встановлено, що надекспресія $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозамінтрансферази III («GnTIII»), тобто глікозилтрансферази, що каталізує утворення бісекційних олігосахаридів, значно підвищує *in vitro* ADCC-активність антинеобластомного химерного моноклонального антитіла (chCE7), що продукується сконструйованими CHO-клітинами (див. Umana P. та ін., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180; і WO 99/154342, повний зміст яких включено в цей опис як посилання). Антитіло chCE7 належить до великого класу некон'югованих моноклональних

антитіл, які мають високий рівень афінності та специфічності відносно пухлин, але мають занадто низьку ефективність для їхнього клінічного застосування при виробництві в стандартних застосовуваних в промисловості індустріальних клітинних лініях, у яких відсутній фермент GnTIII (Umana P. та ін., Nature Biotechnol. 17, 1999, сс. 176-180). У цьому дослідженні

5 вперше було продемонстровано, що значне підвищення ADCC-активності можна досягати шляхом створення клітин, що продукують антитіла, які експресують GnTIII, що приводить також до підвищення відносного вмісту асоційованих з константною областю (Fc) бісекційних олігосахаридів, включаючи бісекційні нефукозилізовані олігосахариди, у порівнянні з рівнями, характерними для антитіл, що зустрічаються в природних умовах.

10 Мається на увазі, що поняття «експресія антигену CD20» відноситься до значного рівня експресії антигену CD20 у клітині, переважно на клітинній поверхні В-клітини, більш переважно В-клітини з пухлини або раку відповідно, переважно з пухлини, що не відноситься до щільних пухлин. Пацієнтів, які мають «рак, при якому відбувається експресія CD20», можна виявляти за допомогою стандартних аналізів, відомих у даній області. Мається на увазі, що поняття

15 «експресія антигену CD20» переважно відноситься до значного рівня експресії антигену CD20 у клітині, переважно на клітинній поверхні В-клітини, більш переважно В-клітини, при аутоімунному захворюванні. Наприклад, експресію антигену CD20 оцінюють імуногістохімічним (ІГХ) методом, FACS або шляхом виявлення за допомогою ПЦР відповідної мРНК.

Поняття «пацієнти» або «індивідууми» відносяться до будь-яких ссавців, що страждають станами або захворюваннями, які зазначені у винаході, і переважно відносяться до людей.

У контексті цього опису поняття «рак, при якому відбувається експресія CD20», переважно відноситься до лімфом (переважно В-клітинних не-ходжкінських лімфом (НХЛ)) і лімфолейкозів. Зазначені лімфоми та лімфолейкози включають, наприклад, а) фолікулярні лімфоми, б) дрібноклітинні з нерозщепленими ядрами лімфоми/лімфому Беркітта (включаючи ендемічну

25 лімфому Беркітта, спорадичну лімфому Беркітта та не-Беркіттовську лімфому), в) лімфоми маргінальної зони (включаючи екстранодальну В-клітинну лімфому маргінальної зони (лімфоми лімфоїдної тканини слизових оболонок, MALT), нодальну В-клітинну лімфому маргінальної зони та лімфому маргінальної зони селезінки), г) лімфому із клітин зони мантиї (MCL), д) крупноклітинну лімфому (включаючи В-клітинну дифузійну крупноклітинну лімфому (DLCL),

30 дифузійну змішано-клітинну лімфому, імунобластну лімфому, первинну медіастинальну В-клітинну лімфому, ангіоцентричну лімфому- легенеvu В-клітинну лімфому), е) волосковоклітинний лейкоз, ж) лімфоцитарну лімфому, Вальденстрема макроглобулінемію, з) гострий лімфобластний лейкоз (ALL), хронічний лімфолейкоз (CLL)/дрібноклітинний лімфолейкоз (SLL), В-клітинний пролімфоцитарний лейкоз, і) неоплазми із плазматичних клітин, міеломи із плазматичних клітин, множинну міелому, плазмацитому, к) хворобу Ходжкіна.

Переважно рак, при якому відбувається експресія CD20, представляє собою В-клітинні не-ходжкінські лімфоми (НХЛ)). Іншими прикладами раку, при якому відбувається експресія CD20, є лімфома із клітин зони мантиї (MCL), гострий лімфобластний лейкоз (ALL), хронічний лімфолейкоз (CLL), В-клітинна дифузійна крупноклітинна лімфома (DLCL), лімфома Беркітта,

40 волосковоклітинний лейкоз, фолікулярна лімфома, множинна міелома, лімфома маргінальної зони, пост-трансплантаційне лімфопроліферативне порушення (PTLD), асоційована з ВІЛ лімфома, Вальденстрема макроглобулінемія або первинна лімфома ЦНС.

У контексті цього опису «аутоімунне захворювання» відноситься до захворювання або порушення, яке виникає в результаті впливу на власні тканини індивідуума та спрямоване проти

45 власних тканин індивідуума. Прикладами аутоімунних захворювань або порушень є (але не обмежуючись тільки ними) артрити (ревматоїдний артрит, юнацький ревматоїдний артрит, остеоартрит, псоріатичний артрит), псоріаз, дерматит, поліміозит/дерматомиозит, токсичний епідермальний некроліз, системна склеродерма та склероз, відповіді, асоційовані із запальним захворюванням кишечника, хвороба Крона, неспецифічний виразковий коліт, респіраторний

50 дистрес-синдром, респіраторний дистрес-синдром дорослих (ARDS), менінгіт, енцефаліт, увеїт, коліт, гломерулонефрит, алергійні стани, екзема, астма, стани, що включають інфільтрацію Т-клітин і хронічні запальні відповіді, атеросклероз, аутоімунний міокардит, дефіцит адгезії лейкоцитів, системний червоний вовчок (SLE), юнацький діабет, розсіяний склероз, алергійний енцефаломієліт, імунні відповіді, асоційовані з гострою та відкладеною гіперчутливістю,

55 опосередкованою цитокінами та Т-лімфоцитами, туберкульоз, саркоїдоз, грануломатоз, включаючи грануломатоз Вегенера, агранулоцитоз, васкуліт (включаючи АНЦА-асоційований васкуліт), апластична анемія, анемія Даймонда-Блекфана, імунна гемолітична анемія, включаючи аутоімунну гемолітичну анемію (AIHA), перніціозна анемія, есенційна апластична анемія (PRCA), дефіцит фактора VIII, гемофілія А, аутоімунна нейтропенія, панцитопенія,

60 лейкопенія, захворювання, включаючи діapedез лейкоцитів, запальні порушення центральної

нервової системи (ЦНС), синдром множинних ушкоджень органів, важка псевдопаралітична міастенія, хвороби, опосередковувані комплексом антиген-антитіло, хвороба, пов'язана з антигломерулярними антитілами до базальної мембрани, синдром, пов'язаний з антитілами до фосфоліпідів, алергійний неврит, хвороба Бехчета, синдром Кастлемена, синдром Гудпасчера, міастенічний синдром Лемберта-Ітона, синдром Рейно, синдром Шегрена, синдром Стівенса-Джонсона, бульозний пемфігоїд, пупирчатка, аутоімунні поліендокринопатії, нефропатія, пов'язані з IgM поліневропатії або опосередковувана IgM невропатія, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура (ITP), тромбоцитна тромбоцитопенічна пурпура (ТТР), аутоімунна тромбоцитопенія, аутоімунне захворювання яєчок та яєчника, включаючи аутоімунний орхіт і оофорит, первинний гіпотиреоз; аутоімунні ендокринні хвороби, включаючи аутоімунний тиреоїдит, хронічний тиреоїдит (тиреоїдит Хашімото), підгострий тиреоїдит, ідіопатичний гіпотиреоз, хвороба Аддісона, хвороба Грейвса, аутоімунні полігландулярні синдроми (або синдроми полігландулярної І ендокринопатії), діабет типу І, відомий також як інсулінозалежний цукровий діабет (IDDM) та синдром Шіхена; аутоімунний гепатит, лімфоїдний інтерстиціальний пневмоніт (ВІЛ), облітеруючий бронхіоліт (не пов'язаний із трансплантацією) vs NSIP (неспецифічна інтерстиціальна пневмонія), синдром Гієна-Барре, васкуліт крупних судин (включаючи ревматичну поліміалгію та гігантоклітинний артеріїт (Такаясу), васкуліт середніх судин (включаючи хворобу Кавасаки та нодозний поліартеріїт), анкілозуючий спондилоартрит, хвороба Берже (IgA-нефропатія), швидко прогресуючий гломерулонефрит, первинний біліарний цироз, спру-целиакія (глютенова ентеропатія), кріоглобулінемія, аміотрофічний бічний склероз (ALS), хвороба коронарної артерії і т.д.

«Інгібуючий ріст агент» у контексті цього опису відноситься до сполуки або композиції, яка інгібує ріст клітини, насамперед ракової клітини, яка експресує CD20, або *in vitro*, або *in vivo*. Так, інгібуючий ріст агент може представляти собою агент, який значно знижує відсоток клітин, що експресують CD20, на S-фазі. Прикладами інгібуючих ріст агентів є агенти, які блокують етапи розвитку клітинного циклу (відмінні від S-фази), наприклад, агенти, що індукують припинення G1-фази та припинення M-фази. Класичними блокаторами M-фази є алкалоїди барвінку (вінкристин і вінбластин), таксани та інгібітори топо II, такі як доксорубіцин, епірубіцин, даунорубіцин, етопозид і блеомицин. Ті агенти, які припиняють G1-фазу, поширюють свою дію також на припинення S-фази, наприклад, ДНК-алкілюючі агенти, такі як тамоксифен, преднізон, дакарбазин, мехлоретамін, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил і ара-С. Додаткову інформацію можна почерпнути з наступної публікації: «The Molecular Basis of Cancer», під ред. Mendelsohn та Israel, розділ 1, озглавлена «Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs», Murakami та ін. (вид-во WB Saunders: Philadelphia, 1995), див., насамперед с. 13.

Поняття «лікування» відноситься як до терапевтичних, так і профілактичних або превентивних заходів. До потребуючих лікування індивідуумів відносяться як уже страждаючі захворюванням індивідууми, так та індивідууми, у яких потрібно попереджати хворобу. Таким чином, пацієнт, що підлягає лікуванню, може представляти собою пацієнта, у якого захворювання вже діагностовано або який може бути схильний, або який має чутливість до захворювання.

Поняття «цитотоксичний агент» у контексті цього опису відноситься до субстанції, яка інгібує або запобігає функції клітин та/або викликає руйнування клітин. Під поняття підпадають радіоактивні ізотопи (наприклад, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² і радіоактивні ізотопи Lu), хіміотерапевтичні засоби та токсини, такі як низькомолекулярні токсини або токсини, що мають ферментативну активність бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, включаючи їх фрагменти та/або варіанти.

«Хіміотерапевтичний засіб» представляє собою хімічну сполуку, яку можна застосовувати для лікування раку. Прикладами хіміотерапевтичних засобів є алкілюючі засоби, такі як тіотепа та циклофосфамід (CYTOXAN[™]); алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпротосульфан і піпосульфан; азирідини, такі як бензодоба, карбоквон, метуредоба та уредоба; етиленіміни та метиламеламіни, такі як алтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметиллоломеларнін; ацетогеніни (насамперед буллатацин і буллатацінон); дельта-9-тетрагідроканнабінол (дронабінол, MARENOL[™]); бета-лапахон; лапахол; колхіцини; бетулінова кислота; камптотекін (включаючи синтетичні аналоги топотекан (HYCAMTIN[™]), CPT-11 (іринотекан, CAMPTOSAR[™]), ацетилкамптотекін, скополектин і 9-амінокамптотекін); бріостатин; каллістатин; CC-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адозелезин, карзелезин і бізелезин); подофіллотоксин; подофіллинова кислота; теніпозид; криптофіцини (насамперед криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги KW-2189 і CBI-TMI); елеутеробин; панкратистатин; саркодиктиїн; спонгістатин; азотні аналоги гірчичного газу, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин,

холофосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, гідрохлорид оксиду мехлоретаміну, мелфалан, новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфанід, урациловий аналог гірчичного газу; нітрозомочевини, такі як кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімустин; антибіотики, такі як енедіїнові антибіотики (наприклад, каліхеаміцин, насамперед каліхеаміцин гама 11 і каліхеаміцин омега 11, див., наприклад, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33, 1994, сс. 183-186); дінеміцин, включаючи дінеміцин А; еспераміцин; а також неокарциностатину хромофор і споріднені хромопротеїнові енедіїнові антибактеріальні хромофори), аклациноміцини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцини, карабіцин, карміноміцин, карцинофілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин (ADRIAMYCIN™), морфолінодоксорубіцин, ціанморфолінодоксорубіцин, 2-пірролінодоксорубіцин, доксорубіцин·HCl для ін'єкцій у вигляді ліпосом (DOXIL™), ліпосомальний доксорубіцин TLC D-99 (MYOCET™), пегілований ліпосомальний доксорубіцин (CAELYX™) та дезоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцелломіцин, мітоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенолова кислота, ногаламіцин, оливоміцини, пепломіцини, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зиностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат, гемцитабін GEMZAR™, тегафур (UFTORAL™), капецитабін (XELODA™), епотилон та 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуринові аналоги, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; піримідинові аналоги, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксиуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; антиадренальні засоби, такі як аміноглутетимід, мітотан, трилостан; поповнювач фолієвої кислоти, такий як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфаміду глікозид; амінолевулінова кислота; енилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бізантрен; едатраксат; дефофамін; демеколцин; діазиквон; елфорнітин; еліптинію ацетат; етоглуцид; нітрат галію; гідроксимочевина; лентінан; лонідаїнін; майтанзиноїди, такі як майтанзин та ансамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітракрин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантрон; 2-етилгідрозид; прокарбазин; полісахаридний комплекс PSKL™ (фірма JHS Natural Products, Юджин, шт. Орегон); разоксан; різоксин; сизофіран; спірогерманій; тенуазонова кислота; тріазиквон; 2,2',2"-трихлортриетиламін; трихотецени (перш за все токсин Т-2, верракурин А, рорідин А та ангвідин); уретан; дакарбазин; манномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид («Ara-C»); тіопета; таксоїд, наприклад, паклітаксел (TAXOL™), композиція паклітакселу, сконструйована на основі наночасток альбуміну (ABRAXANE™) та доцетаксел (TAXOTERE™); хлорамбуцил; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин, оксаліптин і карбоплатин; алкалоїди вінки, які перешкоджають полімеризації тубуліну при утворенні мікротрубочок, включаючи вінбластин (VELBAN™), вінкрисин (ONCOVIN™), віндезин (ELDISINE™), (FILDESIN™) і вінорелбін (NAVELBINE™); етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоксантрон; леуковорин; новантрон; едатрексат; дауноміцин; аміноптерин; ібандронат; інгібітор топоізомерази RFS 2000; дифторметилорнітин (DMFO); ретиноїди, такі як ретиноева кислота, включаючи бексаротен (TARGRETIN™); бісфосфонати, такі як клодронат (наприклад, BONEFOS™ або OSTAC™), етидронат (DIDROCAL™), NE- 58095, золедроновая кислота/золедронат (ZOMETA™), алендронат (FOSAMAJX™), памідронат (AREDIA™), тілудронат (SKELID™) або різедронат (ACTONEL™); троксацитабін (1,3-діоксолановий аналог нуклеозиду цитозину); антисмислові олігонуклеотиди, насамперед, такі, що інгібують експресію генів шляхів передачі сигналів аномальної проліферації клітин, такі, наприклад, як PKC-альфа, Raf, H-Ras, і рецептора епідермального фактора росту (EGF-R); вакцини, такі як вакцина THERATOPE™ і вакцини для генної терапії, наприклад, вакцина ALLOVECTIN™, вакцина LEUVECTIN™ і вакцина VAXID™; інгібітор топоізомерази 1 (наприклад, LURTOTECAN™); rmRH (наприклад, ABARELIX™); BAY439006 (сорафеніб; фірма Bayer); SU-11248 (фірма Pfizer); періфозин, інгібітор COX-2 (наприклад, целекоксиб або еторикоксиб), інгібітор протеосом (наприклад, PS341); бортезоміб (VELCADE™); CCI-779; типіфарніб (RI 1577); орафеніб, ABT510; інгібітор Bcl-2, такий як облімерсен натрію (GENA SENSE™); піксантрон; інгібітори EGFR (див. визначення нижче); інгібітори тірозинкіназ (див. визначення нижче); і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні кожного з вищевказаних засобів; а також комбінації двох або більшої кількості зазначених засобів, такі як CHOP, скорочене позначення комбінованої терапії на основі циклофосфаміду, доксорубіцину, вінкристину та преднізолону (необов'язково також у комбінації з інтерфероном -γ (CHVP/інтерферон-γ), FOLFOX, скорочене позначення схеми лікування на основі оксаліплатину (ELOXATIN™) у комбінації з 5-ФУ та леуковорином, CVP (циклофосфамід, вінкрисин і преднізолон), MCP (мітозантрон, хлорамбуцил і преднізолон), FC (флударабін і

циклофосфамід), ICE (іфосфамід, карбоплатин і етопозид) і дексаметазон, цитарабін і цисплатин (DHAP), дексаметазон, доксорубіцин ліпосомальний та вінкристин (DVD) і т.д.

«Антиангіогенний засіб» представляє собою сполуку, яка блокує або виявляє певний інтерферуючий вплив на розвиток кровоносних судин. Антиангіогенний фактор може представляти собою, наприклад, низькомолекулярну сполуку або антитіло, яке зв'язується з фактором росту або рецептором фактора росту, що бере участь у прискоренні ангіогенезу. У контексті цього опису переважним антиангіогенним фактором є антитіло, яке зв'язується із судинним ендотеліальним фактором росту (VEGF), таке як бевасізумаб (AVASTIN™).

Поняття «цитокін» є родовою назвою білків, які вивільняються однією клітинною популяцією та впливають на іншу клітину як міжклітинні медіатори. Прикладами зазначених цитокінів є лімфокіни, монокіни та традиційні поліпептидні гормони. До цитокінів відносяться такі ростові гормони, як людський гормон росту, N-метіонілований людський гормон росту та бичачий гормон росту, гормон паразитовидних залоз, тіроксин, інсулін, проінсулін, релаксин, прорелаксин, глікопротеїнові гормони, такі як фолікулостимулюючий гормон (ФСГ), тиреотропний гормон (ТТГ) і лютеїнізуючий гормон (ЛГ), гепатоцитарний фактор росту; фактор росту фібробластів, пролактин, плацентарний лактоген, фактор некрозу пухлин α і β , інгібуюча речовина Мюллера, мишачий гонадотропінасоційований пептид, інгібін; активін, судинний ендотеліальний фактор росту, інтегрин, тромбопоетин (TPO), фактори росту нервів, такі як NGF- β , тромбоцитарний фактор росту; трансформуючі фактори росту (TGF), такі як TGF- α і TGF- β , інсуліноподібний фактор росту-I і -II, еритропоетин (EPO), остеоіндуктивні фактори; інтерферони, такі як інтерферон- α , - β і - γ ,

колонієстимулюючі фактори (CSF), такі як CSF макрофагів (M-CSF), CSF гранулоцитів-мікрофагів (GM-CSF) і CSF гранулоцитів (G-CSF), інтерлейкіни (IL), такі як IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, фактор некрозу пухлин, такий як TNF- α або TNF- β , та інші поліпептидні фактори, включаючи LIF (фактор, інгібуючий міграцію лейкоцитів) і набір лігандів (KL). У контексті цього опису поняття «цитокін» відноситься до білків, виведених із джерел, що зустрічаються в природних умовах, або з рекомбінантної клітинної культури, і до біологічно активних еквівалентів нативних послідовностей цитокінів.

Поняття «ефективна кількість» відноситься до кількості, що забезпечує необхідну дію. У випадку присутності ферменту гіалуронідази в якості інгредієнта композиції, запропонованої в цьому винаході, ефективна кількість представляє собою кількість, необхідну для підвищення диспергування та абсорбції антитіла до CD20, що вводиться разом, так, щоб антитіло до CD20 могло виявляти зазначену вище терапевтичну дію. У випадку фармацевтичної лікарської субстанції воно представляє собою кількість діючої речовини, ефективну відносно лікування захворювання у пацієнта. Коли захворювання представляє собою рак, ефективну кількість лікарського засобу може знижувати кількість ракових клітин; зменшувати розмір пухлини; інгібувати (тобто деякою мірою сповільнювати та переважно припиняти) інфільтрацію ракових клітин у периферичні органи; інгібувати (тобто деякою мірою сповільнювати та переважно припиняти) метастазовані пухлини; інгібувати деякою мірою ріст пухлини; та/або полегшувати деякою мірою один або декілька асоційованих з раком симптомів. Для того щоб лікарський засіб міг деякою мірою попереджати ріст та/або знищувати існуючі ракові клітини, він повинен мати цитостатичну та/або цитотоксичну дію. Ефективна кількість може подовжувати період життя без прогресуючого розвитку захворювання, приводити до цільової відповіді на лікування (включаючи часткову відповідь, PR, або повну відповідь, CR), підвищувати загальну тривалість життя та/або полегшувати один або декілька симптомів раку.

Поняття «фармацевтична композиція» відноситься до препарату в такій формі, яка забезпечує ефективний прояв біологічної активності діючої речовини і яка не містить додаткових компонентів, які мають неприйнятну токсичність для індивідуума, якому потрібно вводити композицію. Зазначені композиції є стерильними.

«Стерильна» композиція є асептичною або вільною від усіх живих мікроорганізмів та їх спор.

«Стабільна» композиція представляє собою форму, у якій усі вхідні білки практично зберігають їхню фізичну стабільність та/або хімічну стабільність, та/або біологічну активність при зберіганні при відповідній температурі зберігання, наприклад при 2 - 8 °C. Переважно при зберіганні композиція практично зберігає свою фізичну та хімічну стабільність, а також біологічну активність. Період зберігання вибирають, як правило, на основі відповідного періоду зберігання композиції. Крім того, композиція повинна мати стабільність після заморожування (наприклад, до -20 °C) і відтавання композиції, наприклад, після 1 або декількох циклів заморожування та відтавання. У даній області відомі різні аналітичні методи вимірювання стабільності білків, і вони узагальнені, наприклад, в: Peptide and Protein Drug Delivery, під ред. Vincent Lee, вид-во Marcel Dekker, Inc., New York, New York, 1991, сс. 247-301, і в Jones A., Adv.

Drug Delivery Rev. 10, 1993, сс. 29-90. Стабільність можна оцінювати при вибраній температурі протягом вибраного періоду часу. Стабільність можна оцінювати якісно та/або кількісно різними шляхами, включаючи оцінку утворення агрегатів (наприклад, за допомогою гель-фільтрації, шляхом вимірювання мутності та/або за допомогою візуальної оцінки); шляхом оцінки гетерогенності заряду за допомогою катіонообмінної хроматографії або капілярного зонального електрофорезу; на основі ДСН-ПААГ для порівняння вкороченого та інтактного антитіла; шляхом оцінки біологічної активності антитіла або його здатності зв'язуватись з антигеном і т.д. Нестабільність може проявлятися в наявності одного або декількох наступних ознак: агрегація, деамідування (наприклад, деамідування Asp), окислення (наприклад, окислення Met), ізомеризація (наприклад, ізомеризація Asp), відщиплення/гідроліз/фрагментація (наприклад, фрагментація шарнірної області), утворення сукциніміду, наявність неспареного(их) залишку(ів) цистеїну і т.д.

Терапевтичні композиції антитіл, які застосовують відповідно до цього винаходу, приготують для зберігання шляхом змішання антитіла, що має необхідний ступінь чистоти, необов'язково в комбінації з фармацевтично прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, під ред. Osol A.E., 166e вид., 1980), у формі ліофілізованих препаративних форм або водних розчинів. Придатні носії, ексципієнти або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів в застосовуваних дозах і концентраціях.

Поняття «поверхнево-активна речовина» у контексті цього опису означає фармацевтично прийнятну поверхнево-активну речовину. У композиції, запропонованій у винаході, кількість поверхнево-активної речовини виражають у вигляді процентів (мас./об.). Найбільш часто застосовуваною мас./об. одиницею є мг/мл. Прийнятними прикладами фармацевтично прийнятних поверхнево-активних речовин є ефіри поліоксиетиленсорбітану та жирних кислот (Твін), поліетилен-поліпропіленгліколі, поліоксиетиленстеарати, прості поліоксиетиленалкілові ефіри, наприклад, простий поліоксиетиленмонолауриловий ефір, прості алкілфенілполіоксиетиленові ефіри (Тритон-Х), сополімери поліоксиетилену-поліоксипропілену (полоксамер, плуронік) і додецилсульфат натрію (ДСН). Найбільш прийнятними ефірами поліоксиетиленсорбітану та жирних кислот є полісорбат 20 (надходить у продаж під товарним знаком Tween 20™) і полісорбат 80 (надходить у продаж під товарним знаком Tween 80™). Найбільш прийнятними сополімерами поліетилену-поліпропілену є продукти, що надходять у продаж під товарними знаками Pluronic® F68 або Poloxamer 188™. Переважними поліоксиетиленстеаратами є продукти, що надходять у продаж під товарним знаком Murj™. Найбільш прийнятними простими поліоксиетиленалкіловими ефірами є продукти, що надходять у продаж під товарним знаком Brij™. Найбільш прийнятними простими алкілфенілполіоксиетиленовими ефірами є продукти, що надходять у продаж під товарним знаком Triton-X.

Поняття «буфер» у контексті цього опису відноситься до фармацевтично прийнятного буферу. У контексті цього опису поняття «забуферовуючий агент, що забезпечує значення рН на рівні $5,5 \pm 2,0$ » відноситься до агента, який перешкоджає зміні значення рН в утримуючому його розчині завдяки дії, що вводить у кон'югат кислотних/основних компонентів. Придатними фармацевтично прийнятними буферами, запропонованими у винаході, є (але не обмежуючись тільки ними) гістидинові буфери, цитратні буфери, глюконатні буфери, сукцинатні буфери, ацетатні буфери, гліцилгліцинові та інші буфери на основі органічних кислот, а також фосфатні буфери. Переважні буфери містять L-гістидин або суміші L-гістидину та гідрохлориду L-гістидину з агентами, що надають ізотонічність, та має здатність регулювати значення рН за допомогою кислоти або основи, відомих у даній області. Найбільш переважним є L-гістидин.

«Гістидиновий буфер» представляє собою буфер, що містить амінокислоту гістидин. Прикладами гістидинових буферів є хлорид гістидину, ацетат гістидину, фосфат гістидину, сульфат гістидину. Наведений у прикладах у якості найбільш прийнятного гістидиновий буфер представляє собою хлорид гістидину. У переважному варіанті здійснення винаходу буфер, що включає хлорид гістидину, одержують титруванням L-гістидину (у вигляді твердої вільної основи) розведеною соляною кислотою або розчиненням L-гістидину та гідрохлориду L-гістидину (наприклад, у вигляді моногідрату) у певній кількості та співвідношенні.

Поняття «ізотонічний» означає, що композиція, що представляє інтерес, має практично такий ж осмотичний тиск, що й людська кров. Ізотонічні композиції, як правило, мають осмотичний тиск ~ 300 мОсм. Ізотонічність можна вимірювати за допомогою осмометра тиску пари або криоскопічного осмометра.

Поняття «агенти, що надають ізотонічність» відноситься до фармацевтично прийнятних агентів, що надають ізотонічність. Агенти, що надають ізотонічність, застосовують для одержання ізотонічної композиції. Ізотонічна композиція представляє собою рідину або рідину,

відновлену із твердої форми, наприклад, ліофілізованої форми, і означає розчин, що має таку ж тонічність, що й деякий інший розчин, з яким його порівнюють, такий, наприклад, як фізіологічний соляний розчин і сироватка крові. Прийнятними агентами, що надають ізотонічність, є (але не обмежуючись тільки ними) хлорид натрію (NaCl) або хлорид калію, цукри та цукрові спирти, такі як (але не обмежуючись тільки ними) глюкоза, сахароза, трегалоза або гліцерин, і будь-який компонент, вибраний із групи, що включає амінокислоти, цукри, солі та їх комбінації. Агенти, що надають ізотонічність, як правило, застосовують у загальній кількості, що становить від приблизно 5 до приблизно 350 мМ.

Поняття «рідка» у контексті цього опису стосовно до композиції, запропонованої у винаході, означає композицію, яка є рідкою при температурі принаймні від приблизно 2 до приблизно 8 °C.

Поняття «ліофілізована» у контексті цього опису стосовно до композиції, запропонованої у винаході, означає композицію, яку сушать шляхом заморожування композиції та наступної сублімації льоду із замороженого складу за допомогою будь-якого з методів сушіння виморожуванням, відомих у даній області, наприклад, з використанням обладнання для сушіння виморожуванням, що поступає у продаж.

Поняття «солі» у контексті цього опису відноситься до солі, узятій в кількості від приблизно 1 до приблизно 500 мМ. Прикладами солей є (але не обмежуючись тільки ними) солі, що складаються із будь-яких комбінацій катіонів натрію, калію, кальцію або магнію з аніонами хлориду, фосфату, цитрату, сукцинату, сульфату, або їх суміші.

Поняття «амінокислота» у контексті цього опису відноситься до амінокислоти, узятій в кількості від приблизно 1 до приблизно 100 мг/мл, такої як (але не обмежуючись тільки ними) аргінін, гліцин, орнітин, глутамін, аспарагін, лізин, гістидин, глутамінова кислота, аспарагінова кислота, ізолейцин, лейцин, аланін, фенілаланін, тірозин, триптофан, метіонін, серин і пролін.

У контексті цього опису поняття «сахарид» відноситься до сполук, як мають загальну формулу $(CH_2O)_n$, та його похідним, включаючи моносахариди, дисахариди, трисахариди, полісахариди, цукрові спирти, редукуючі цукри, нередукуючі цукри і т.д. У контексті цього опису прикладами сахаридів є глюкоза, сахароза, трегалоза, лактоза, фруктоза, мальтоза, декстран, гліцерин, еритрит, арабіт, силіт, сорбіт, манніт, мелібіоза, мелезітоза, рафіноза, манотріоза, стахіоза, мальтоза, лактулоза, мальтулоза, глюцит, мальтит, лактит, ізомальтулоза і т.д. Під визначення згідно з винаходом підпадають також глюкозамін, N-метилглюкозамін (так званий «меглумін»), галактозамін і нейрамінова кислота та комбінації сахаридів, запропонованих відповідно до винаходу. Переважним сахаридом відповідно до цього винаходу є нередукуючий дисахарид, такий як трегалоза. Найбільш переважним сахаридом відповідно до цього винаходу є трегалоза.

Поняття «стабілізатор» відноситься до фармацевтично прийнятних стабілізаторів, таких, наприклад, як (але не обмежуючись тільки ними) амінокислоти та цукри, описані в наведених вище розділах, а також поступаючі в продаж декстрини будь-якого типу та з будь-якою молекулярною масою, які відомі в даній області.

Поняття «антиоксидант» відноситься до фармацевтично прийнятного антиоксиданту. Вони можуть представляти собою ексципієнти, такі як метіонін, бензиловий спирт або будь-який інший ексципієнт, застосовуваний для мінімізації окислення.

Поняття «метод лікування» або його еквівалент відносно, наприклад, до раку, відноситься до процедури або курсу лікування, яку/який розробляють із метою зниження або усунення деякої кількості ракових клітин в організмі пацієнта або для полегшення симптомів раку. «Метод лікування» раку або іншого проліферативного порушення не обов'язково має на увазі, що ракові клітини або інші порушення повинні бути фактично еліміновані, що кількість клітин або рівень порушення фактично повинні бути знижені, або що інші симптоми раку або іншого порушення фактично повинні бути полегшені. Часто метод лікування раку можна здійснювати навіть із невеликою ймовірністю успіху, але, проте, він з урахуванням історії хвороби пацієнта та оціненої перспективи виживаності пацієнта, як передбачається, може виявляти загальний сприятливий вплив.

Таким чином, в основу цього винаходу покладено завдання розробити нові висококонцентровані стабільні фармацевтичні композиції, що мають фармацевтичну активність антитіла до CD20, або суміші зазначених молекул антитіл, призначені для підшкірної ін'єкції. Зазначені композиції містять крім антитіла до CD20 або суміші антитіл, що присутні у високих концентраціях, забуферуючий агент, стабілізатор або суміш двох або більшої кількості стабілізаторів, неіоногенну поверхнево-активну речовину та застосовуваний в ефективній кількості, принаймні, один фермент гіалуронідазу. Одержання висококонцентрованих композицій антитіл є складним завданням через можливе підвищення в'язкості при більш

високій концентрації білка та можливого посилення агрегації білка, явища, яке саме по собі залежить від концентрації. Висока в'язкість впливає на можливість здійснення процесу приготування (наприклад, на стадіях перекачування насосом і фільтрації) і введення (наприклад, на можливість введення за допомогою шприца) композицій антитіл. У деяких випадках високу в'язкість можна знижувати за допомогою додавання ексціпієнтів. Необхідність у здійсненні контролю та аналізу агрегації білків підвищує складність процесу одержання. Агрегація може відбуватись на різних стадіях процесу приготування, таких як ферментація, очищення, приготування препарату, і в процесі зберігання. На агрегаційну поведінку терапевтичного білка можуть впливати різні фактори, такі як температура, концентрація білка, стрес, пов'язаний з перемішуванням, заморожування та відтавання, вплив розчинника та поверхнево-активні речовини, а також хімічні модифікації. У процесі створення висококонцентрованої композиції антитіла необхідно здійснювати моніторинг і контроль тенденції до агрегації білка шляхом додавання різних ексціпієнтів і поверхнево-активних речовин (Kiese S. та ін., J. Pharm. Sci., 97(10), 2008, сс. 4347-4366).

Першим об'єктом цього винаходу є висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція, що має фармацевтичну активність антитіла до CD20, або суміші зазначених молекул антитіл, призначені для парентерального введення. Переважно шлях введення представляє собою внутрішньовенне введення у вигляді болюса або постійної інфузії протягом певного періоду часу, за допомогою внутрішньом'язового, внутрішньочеревинного, спинномозкового, підшкірного, внутрішньосуглобного, інтрасиновіального або підболоноквого шляхів введення. Переважним є внутрішньовенне або підшкірне введення антитіл; підшкірне введення є найбільш переважним. Як відзначалось вище, до теперішнього часу створення висококонцентрованої стабільної фармацевтичної композиції антитіла до CD20, що практично не містить часток, не є загальноприйнятим. Якщо зазначена композиція призначена для підшкірного застосування, то в переважному варіанті здійснення винаходу зазначену композицію поєднують із ферментом гіалуронідазою.

Більш конкретно, висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція, що має фармацевтичну активність антитіла до CD20, що пропонується в цьому винаході, містить:

- антитіло до CD20 у концентрації приблизно від 20 до 350 мг/мл;
- забуферуючий агент, що забезпечує значення рН $5,5 \pm 2,0$, у концентрації приблизно від 1 до 100 мМ;
- стабілізатор або суміш двох або більшої кількості стабілізаторів у концентрації приблизно від 1 до 500 мМ, при цьому необов'язково в якості вторинного стабілізатора застосовують метіонін, наприклад, у концентрації від 5 до 25 мМ;
- неіоногенну поверхнево-активну речовину в концентрації від 0,01 до 0,1 %; і
- принаймні, один фермент гіалуронідазу в ефективній кількості.

Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція, що має фармацевтичну активність антитіла до CD20, що пропонується в цьому винаході, може представляти собою рідку форму або може представляти собою ліофілізовану форму. Концентрацію антитіла у відновленій композиції можна підвищувати шляхом відновлення ліофілізованої композиції з одержанням концентрації білка у відновленій композиції, що перевищує приблизно в 2-40 раз концентрацію білка в суміші перед здійсненням стадії ліофілізації.

Переважаюча концентрація антитіла до CD20 становить від 50 до 150 мг/мл, більш переважно від 75 до 150 мг/мл, ще більш переважно 120 ± 20 мг/мл, найбільш переважно приблизно 120 мг/мл.

Переважаюча концентрація забуферуючого агента становить від 1 до 50 мМ, більш переважно від 10 до 30 мМ; найбільш переважно концентрація становить приблизно 20 мМ. Нижче додатково представлені різні забуферуючі агенти, відомі фахівцям в даній області. Переважний забуферуючий агент вибирають із групи, що включає гістидиновий буфер, ацетатний буфер і цитратний буфер, найбільш переважно буфер L-гістидин/HCl. Гістидиновий буфер, запропонований у винаході, застосовують у кількості від приблизно 1 до приблизно 50 мМ, переважно від приблизно 10 до приблизно 30 мМ і ще більш переважно приблизно 20 мМ. Ацетатний буфер, запропонований у винаході, переважно застосовують у кількості від приблизно 10 до приблизно 30 мМ і найбільш переважно приблизно 20 мМ. Цитратний буфер, запропонований у винаході, переважно застосовують у кількості від приблизно 10 до приблизно 30 мМ і найбільш переважно приблизно 20 мМ.

Незалежно від застосовуваного буфера значення рН повинно регулюватись на рівні від приблизно 4,5 до приблизно 7,0 і переважно від приблизно 5,5 до приблизно 6,5, переважно також на рівні, вибраному із групи, що включає наступні значення: 5,5, 6,0, 6,1 і 6,5. Для одержання вказаного, значення рН можна регулювати за допомогою кислоти або основи, як

відомо в даній області, або використовуючи відповідні суміші компонентів буфера, або застосовуючи обидва зазначених підходи.

Стабілізатор(и) (зазначене поняття в контексті цього опису застосовується як синонім поняття «стабілізуєчий агент») вибирають із групи, що включає сіль, вуглевод, сахарид та амінокислоту(и), більш переважно вуглевод або сахарид, найбільш переважно цукор, який визнається фахівцями в якості прийнятної добавки або ексципієнта у фармацевтичних композиціях, найбільш переважно вибирають із групи, що включає дигідрат α, α -трегалози, NaCl і метіонін. Переважна концентрація стабілізатора становить від 15 до 250 мМ або більш переважно від 150 до 250 мМ. Найбільш переважно концентрація становить приблизно 210 мМ. Композиція може містити вторинний стабілізатор, при цьому зазначений вторинний стабілізатор переважно представляє собою метіонін, переважно в концентрації від 5 до 25 мМ, більш переважно в концентрації від 5 до 15 мМ. Найбільш переважна концентрація метіоніну становить приблизно 10 мМ.

Неіоногенна поверхнево-активна речовина переважно представляє собою полісорбат, більш переважно вибраний із групи, що включає полісорбат 20, полісорбат 80 і сополімер поліетилену-поліпропілену. Концентрація неіоногенної поверхнево-активної речовини становить від 0,01 до 0,1 % (мас./об.) або від 0,01 до 0,08 % (мас./об.), і переважно від 0,02 до 0,06 % (мас./об.), найбільш переважно приблизно 0,06 % (мас./об.).

Поняття «цукор» у контексті цього опису відноситься до фармацевтично прийнятного цукру, який застосовують у кількості від приблизно 25 до приблизно 500 мМ. Переважна концентрація становить від 100 до 300 мМ. Більш переважна концентрація становить від 180 до 240 мМ. Найбільш переважна концентрація становить 210 мМ.

Концентрація ферменту гіалуронідази залежить від конкретного ферменту гіалуронідази, застосовуваного для приготування композиції, запропонованої у винаході. Фахівець у даній області на основі представленого нижче опису легко може визначати ефективну кількість ферменту гіалуронідази. Зазначений фермент повинен бути присутнім у кількості, необхідній та достатній для підвищення диспергування та абсорбції антитіла до CD20, що вводиться разом. Ефективна кількість ферменту гіалуронідази становить приблизно від 1000 до 16000 од./мл, ця кількість відповідає приблизно від 0,01 до 0,16 мг білка з урахуванням питомої активності, що становить 100000 од./мг. Переважна концентрація ферменту гіалуронідази становить приблизно від 1500 до 12000 од./мл. Найбільш переважна концентрація становить приблизно 2000 од./мл або приблизно 12000 од./мл. Зазначені вище кількості відповідають кількості ферменту гіалуронідази, що спочатку додається в композицію. Фермент гіалуронідаза є присутнім або у вигляді комбінованої кінцевої композиції, або у формі, призначений для спільного застосування, наприклад, у вигляді допоміжної композиції, як буде викладено нижче. Важливою особливістю запропонованої в цьому винаході композиції є те, що в момент, коли вона є готовою до застосування, та/або коли її ін'єкують, вона має склад, представлений у прикладеній формулі винаходу.

Фермент гіалуронідазу можна одержувати зі зразків, виділених з організму тварин, людини або виробляти з використанням технології рекомбінантної ДНК, що буде описано нижче.

Більш конкретно, висококонцентровані стабільні фармацевтичні композиції, запропоновані в цьому винаході, мають один з наступних складів:

а) антитіло до CD20, де антитіло переважно вибране із групи, що включає ритуксимаб, окрелізумаб або людське МАт до CD20 (HuMab<CD20>), у концентрації від 100 до 150 мг/мл; гістидиновий буфер, переважно L-гістидин/HCl з рН приблизно 5,5, у концентрації від 1 до 50 мМ; стабілізатор, переважно дигідрат α, α -трегалози, у концентрації від 15 до 250 мМ і необов'язково метіонін в якості другого стабілізатора у концентрації від 5 до 25 мМ; неіоногенна поверхнево-активна речовина, вибрана із групи, що включає полісорбат 20 і полісорбат 80, переважно в концентрації приблизно від 0,02 до 0,06 % (мас./об.); і необов'язково фермент гіалуронідазу в концентрації від 1000 од./мл до 16000 од./мл, переважно гHuPH20, найбільш переважно в концентрації 2000 од./мл або 12000 од./мл;

б) антитіло до CD20, де антитіло переважно вибране із групи, що включає ритуксимаб, окрелізумаб або HuMab<CD20>, у концентрації 120 ± 20 мг/мл; гістидиновий буфер, переважно L-гістидин/HCl з рН приблизно 5,5, у концентрації від 10 до 30 мМ, переважно 20 мМ; стабілізатор, переважно дигідрат α, α -трегалози, у концентрації від 150 до 250 мМ, переважно 210 мМ, і необов'язково метіонін в якості другого стабілізатора у концентрації від 5 до 25 мМ, переважно від 5 до 15 мМ, найбільш переважно 10 мМ; неіоногенна поверхнево-активна речовина, вибрана із групи, що включає полісорбат 20 і полісорбат 80, переважно в концентрації приблизно від 0,02 до 0,06 % (мас./об.); і необов'язково фермент гіалуронідазу,

переважно гHuPH20, у концентрації від 1000 до 16000 од./мл, переважно від 1500 до 12000 од./мл, найбільш переважно 2000 од./мл або 12000 од./мл;

в) антитіло до CD20, де антитіло переважно вибране із групи, що включає ритуксимаб, окрелізумаб або HuMab<CD20>, у концентрації 120 мг/мл; гістидиновий буфер, переважно L-гістидин/HCl з pH приблизно 5,5, у концентрації від 10 до 30 мМ, переважно 20 мМ; стабілізатор, переважно дигідрат α,α -трегалози, у концентрації від 150 до 250 мМ, переважно 210 мМ, і необов'язково метіонін в якості другого стабілізатора у концентрації від 5 до 25 мМ, переважно від 5 до 15 мМ, найбільш переважно 10 мМ; неіоногенна поверхнево-активна речовина, вибрана із групи, що включає полісорбат 20 і полісорбат 80, переважно в концентрації приблизно від 0,02 до 0,06 % (мас./об.); і необов'язково фермент гіалуронідазу, переважно гHuPH20, у концентрації від 1000 до 16000 од./мл, переважно від 1500 до 12000 од./мл, найбільш переважно 2000 од./мл або 12000 од./мл;

г) антитіло до CD20, переважно ритуксимаб, у концентрації 120 мг/мл; гістидиновий буфер, переважно L-гістидин/HCl з pH приблизно 5,5, у концентрації 20 мМ; дигідрат α,α -трегалози в концентрації 210 мМ і необов'язково метіонін в якості другого стабілізатора у концентрації 10 мМ; неіоногенна поверхнево-активна речовина, вибрана із групи, що включає полісорбат 20 і полісорбат 80, переважно в концентрації від 0,02 до 0,06 % (мас./об.); і необов'язково фермент гіалуронідазу, переважно гHuPH20, у концентрації 2000 од./мл або 12000 од./мл;

д) ліофілізована форма, що містить антитіло до CD20, переважно ритуксимаб, у концентрації 120 мг/мл; гістидиновий буфер, переважно L-гістидин/HCl з pH приблизно 5,5, у концентрації 20 мМ; дигідрат α,α -трегалози в концентрації 210 мМ і необов'язково метіонін в якості другого стабілізатора у концентрації 10 мМ; неіоногенна поверхнево-активна речовина, вибрана із групи, що включає полісорбат 20 і полісорбат 80, переважно в концентрації від 0,02 до 0,06 % (мас./об.); і необов'язково фермент гіалуронідазу, переважно гHuPH20, у концентрації 2000 од./мл або 12000 од./мл.

Винахід відноситься до стабільної фармацевтичної композиції, що має фармацевтичну активність антитіла до CD20, яка містить окрелізумаб (наприклад, гуманізований 2H7.v16) у концентрації приблизно від 30 до 350 мг/мл, наприклад, приблизно від 30 до 100 мг/мл (у тому числі приблизно 30 мг/мл, приблизно 50 мг/мл або приблизно 100 мг/мл); забуферуючий агент (наприклад, ацетат натрію), що забезпечує значення pH $5,5 \pm 2,0$ (наприклад, pH 5,3) у концентрації приблизно від 1 до 100 мМ; стабілізатор або суміш двох або більшої кількості стабілізаторів (у тому числі трегалозу, наприклад, дигідрат трегалози в концентрації приблизно 8 %) у концентрації приблизно від 15 до 250 мМ; неіоногенну поверхнево-активну речовину в концентрації приблизно від 0,01 до 0,1 % (мас./об.) і необов'язково принаймні фермент гіалуронідазу (наприклад гHuPH20) в ефективній кількості, переважно в концентрації приблизно від 1500 до приблизно 12000 од./мл.

Інші складки кращих композицій представлені в прикладах

Для полегшення підшкірної ін'єкції терапевтичних білків запропоновано використовувати в невеликих кількостях розчинні глікопротеїни з гіалуронідазною активністю (sHASEGP) (див. WO 2006/091871). Встановлено, що додавання зазначених розчинних глікопротеїнів з гіалуронідазною активністю (або в складі комбінованої композиції, або шляхом спільного введення) полегшує введення терапевтичного лікарського засобу в гіподерму. Шляхом швидкої деполімеризації гіалуронану (HA) у позаклітинному просторі фермент sHASEGP знижує в'язкість інтерстиціальної тканини, підвищуючи тим самим гідралічну провідність і роблячи можливим безпечне та зручне введення в підшкірну тканину більш значних обсягів. Підвищена гідралічна провідність, яка індукується sHASEGP за допомогою зниження інтерстиціальної в'язкості, обумовлює більш високе диспергування, потенційно підвищуючи системну біологічну доступність терапевтичного лікарського засобу, що вводиться SC-шляхом.

Таким чином, висококонцентровані стабільні фармацевтичні композиції, запропоновані в цьому винаході, які містять розчинний глікопротеїн з гіалуронідазною активністю, є найбільш придатними для підшкірної ін'єкції. Фахівцеві в даній області повинно бути очевидно, що зазначену композицію, що містить антитіло до CD20 і розчинний глікопротеїн з гіалуронідазною активністю, можна приготувати для введення у вигляді однієї комбінованої композиції, або в альтернативному варіанті у вигляді двох різних композицій, які можна змішувати безпосередньо перед здійсненням підшкірної ін'єкції. В альтернативному варіанті антитіло до CD20 і розчинний глікопротеїн з гіалуронідазною активністю можна вводити шляхом роздільних ін'єкцій у різні області тіла, переважно в області, що безпосередньо примикають один до одного. Можна також ін'єкувати терапевтичні засоби, які присутні в композиції, запропонованої в цьому винаході, у вигляді послідовних ін'єкцій, здійснюючи, наприклад, спочатку ін'єкцію розчинного глікопротеїну з гіалуронідазною активністю, а потім ін'єкцію композиції, що містить антитіло до CD20.

Зазначені ін'єкції можна здійснювати також і у зворотному порядку, тобто спочатку здійснювати ін'єкцію композиції, що містить антитіло до CD20, а потім ін'єкцію розчинного глікопротеїну з гіалуронідазною активністю. У тому випадку, коли антитіло до CD20 і розчинний глікопротеїн з гіалуронідазною активністю вводять у вигляді різних ін'єкцій, то один або обидва білки слід приготувати в комбінації із забуферовуючим агентом, стабілізатором(ами) та неіоногенною поверхнево-активною речовиною, взятими в концентраціях, які представлені в прикладеній формулі винаходу, але без ферменту гіалуронідази. Фермент гіалуронідазу можна приготувати, наприклад, у суміші, що містить буфер L-гістидин/HCl, pH приблизно 6,5, NaCl у концентрації 100-150 mM і полісорбат 20 або полісорбат 80 у концентрації від 0,01 до 0,1 % (мас./об.). У переважному варіанті здійснення винаходу антитіло до CD20 застосовують у комбінації із забуферовуючим агентом, стабілізатором(ами) і неіоногенною поверхнево-активною речовиною, взятими в концентраціях, які представлені в прикладеній формулі винаходу.

Як відзначалось вище, розчинний глікопротеїн з гіалуронідазною активністю можна розглядати в якості додаткового ексципієнта в композиції антитіла до CD20. Розчинний глікопротеїн з гіалуронідазною активністю можна додавати в композицію антитіла до CD20 у момент приготування композиції антитіла до CD20 або його можна додавати незадовго до ін'єкції. В альтернативному варіанті розчинний глікопротеїн з гіалуронідазною активністю можна вводити за допомогою іншої ін'єкції. В останньому випадку розчинний глікопротеїн з гіалуронідазною активністю можна приготувати в окремій пляшечці або в ліофілізованій формі, яку необхідно відновлювати прийнятними розріджувачами перед здійсненням підшкірної ін'єкції, або виробник може приготувати його у вигляді рідкої композиції. Композицію антитіла до CD20 і розчинний глікопротеїн з гіалуронідазною активністю можна поставляти у вигляді окремих продуктів або можна приготувати у вигляді наборів, що включають обидва призначених для ін'єкції компоненти та відповідні інструкції з їх підшкірного введення. Можна постачати також одну або обидві композиції з відповідними інструкціями по відновленню та/або введенню.

Таким чином, даний винахід відноситься також до фармацевтичних композицій, що включають висококонцентровану стабільну фармацевтичну композицію, що має фармацевтичну активність антитіла до CD20, або суміші зазначених антитіл, і взятий у відповідній кількості, принаймні, один фермент гіалуронідазу, у формі набору, який містить обидва призначених для ін'єкції компоненти та відповідні інструкції з їх підшкірного застосування.

Наступним об'єктом цього винаходу є обладнання для ін'єкцій, які містять висококонцентровану стабільну фармацевтичну композицію, запропоновану в цьому винаході. Зазначена композиція може складатись з антитіла до CD20, що має фармацевтичну активність, або суміші зазначених молекул антитіл і прийнятних ексципієнтів, зазначених нижче, і вона може містити також розчинний глікопротеїн з гіалуронідазною активністю, який або входить до складу комбінованої композиції, або знаходиться у вигляді окремої композиції, призначеної для спільного введення.

З існуючого рівня техніки відомі різні антитіла до CD20. Переважно такі антитіла представляють собою моноклональні антитіла. Вони можуть представляти собою так звані химерні антитіла, гуманізовані антитіла, або повністю людські антитіла. Вони можуть представляти собою будь-які з наступних видів антитіл: повнорозмірні антитіла до CD20; фрагменти антитіл до CD20, що мають таку ж біологічну активність; включаючи варіанти амінокислотних послідовностей та/або варіанти глікозилювання зазначених антитіл або фрагментів. Прикладами гуманізованих антитіл до CD20 є антитіла, відомі під Міжнародними непатентованими назвами (INN) як ритуксимаб, окрелізумаб та афутузумаб (HuMab<CD20>). Найбільш ефективним терапевтичним антитілом до CD20 є ритуксимаб, який надходить у продаж від фірм Genentech Inc. та F. Hoffmann-La Roche Ltd під товарним знаком MABTHERA™ або RITUXAN™.

Антитіло до CD20, представлене в цьому описі, переважно вибирають із групи, що включає ритуксимаб (див., наприклад, US 7381560 та EP 2000149B1 на ім'я Anderson та ін., див., наприклад, фіг. 4 і 5), окрелізумаб (описаний у WO 2004/056312 та в WO 2006/084264 (наприклад, варіанти, представлені в таблицях 1 і 2, переважно варіант v.16 або v.114, або v.511)) та афутузумаб (HuMab<CD20>; див. WO 2005/044859). Найбільш переважним антитілом до CD20 є ритуксимаб. Поняття «ритуксимаб», «окрелізумаб» і «афутузумаб» (HuMab<CD20>) всі відносяться до відповідних антитіл до CD20, які задовольняють вимогам, необхідним для одержання дозволу на продаж у якості ідентичного або біологічно подібного продукту в країні або на території, вибраній із групи країн, що включає США, країни Європи та Японію. Ритуксимаб має CDR-ділянки, описані в US 7381560 та EP 2000149B1.

У даній області відомо декілька розчинних глікопротеїнів з гіалуронідазною активністю. Для додаткової оцінки функції, механізму дії та властивостей зазначених розчинних глікопротеїнів з гіалуронідазною активністю нижче представлена наступна основна інформація.

Гіподермальний (SC) інтерстиціальний матрикс складається з мережі волокнистих білків, зануреної у в'язкоеластичний гель глікозаміногліканів. Гіалуронан (HA), несультурований лінійний дисахарид, що складається з повторюваних ланок, є основним глікозаміногліканом в SC-тканині. HA секретується в інтерстиціальну тканину фібробластами у вигляді високомолекулярного в'язкого полімеру з молекулярною масою порядку декількох мегадальтонів, який потім локально розщеплюється в лімфі та у печінці під дією лізосомальних гіалуронідаз та екзоглікозидаз. Приблизно 50 % гіалуронану, присутнього в організмі, продукується в SC-тканині, у якій він присутній у кількості, що становить приблизно 0,8 мг/г ваги тканини у вологому стані (Aukland K. і Reed R., вище). Вважається, що в дорослої людини вагою 70 кг кількість HA становить 15 г, з яких 30 % щодня зазнає круговороту (синтезується та розщеплюється) (Laurent L.B. та ін., «Catabolism of Hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver», Exp. Physiol., 76, 1991, сс. 695-703). HA, який є основною складовою гелеподібного компоненту гіподермального матриксу, у значній мірі визначає його в'язкість.

Глікозаміноглікани (GAG) представляють собою складні лінійні полісахариди позаклітинного матриксу (ECM). GAG відрізняються наявністю повторюваних структур дисахаридів N-заміщеного гексозаміну та уронової кислоти (у випадку гіалуронану (HA), хондроїтинсульфату (CS), хондроїтину (C), дерматансульфату (DS), гепарансульфату (HS) і гепарину (H)) або галактози (у випадку кератансульфату (KS)). За винятком HA усі вони ковалентно пов'язані з коровими білками. GAG з їх коровими білками з погляду структури позначають як протеоглікани (PG).

У ссавців гіалуронан (HA) виявлений головним чином у сполучних тканинах, шкірі, хрящі та у синовіальній рідині. Гіалуронан представляє собою також основний компонент склоподібного тіла ока. У сполучній тканині вода при гідратації, асоційованій з гіалуронаном, створює гідратовані матрикси між тканинами. Гіалуронан відіграє вирішальну роль у біологічних явищах, асоційованих з рухливістю клітин, включаючи швидкий розвиток, регенерацію, репарацію, ембріогенез, ембріональний розвиток, загоєння ран, ангиогенез та онкогенез (Toole, Cell Biol. Extracell. Matrix, під ред. Hay, вид-во Plenum Press, New York, 1991, сс. 1384-1386; Bertrand та ін., Int. J. Cancer, 52, 1992, сс. 1-6; Knudson та ін., FASEB J., 7, 1993, сс. 1233-1241). Крім того, рівень гіалуронану корелює з агресивністю пухлин (Ozello та ін., Cancer Res., 20, 1960, сс. 600-604; Takeuchi та ін., Cancer Res., 36, 1976, сс. 2133-2139; Kimata та ін., Cancer Res., 43, 1983, сс. 1347-1354).

HA виявлено в позаклітинному матриксі багатьох типів клітин, насамперед у м'яких сполучних тканинах. З HA пов'язані різні фізіологічні функції, такі як білковий гомеостаз у воді та плазмі (Laurent T.C. та ін., FASEB J., 6, 1992, сс. 2397-2404). Виробництво HA підвищується в проліферуючих клітинах, і це може відігравати роль при мітозі. Він приймає також участь у локомоції та клітинній міграції. HA, імовірно, відіграє важливі ролі в регуляції, розвитку та диференціюванні клітин (Laurent та ін., див. вище).

HA знайшов широке застосування в клінічній медицині. Встановлено, що його тканинозахисні та реологічні властивості можна використовувати в хірургії ока (наприклад, для захисту ендотелію роговиці в процесі хірургії катаракти). Сироватковий HA є діагностичним маркером хвороби печінки та різних запальних станів, таких як ревматоїдний артрит. Інтерстиціальний набряк, пов'язаний з нагромадженням HA, може викликати дисфункцію різних органів (Laurent та ін., вище).

Взаємодії гіалуронан-білок беруть участь також у структурі позаклітинного матриксу або «основної речовини».

Гіалуронідази представляють собою групу, як правило, активних у нейтральних або кислих умовах ферментів, широко розповсюджених у царстві тварин. Гіалуронідази варіюються за субстратною специфічністю та механізмом дії (WO 2004/078140). Відомо три загальні класи гіалуронідаз:

1. Гіалуронідази ссавців (КФ 3.2.1.35), які представляють собою ендо-бета-N-ацетилгексозамінідази, основними кінцевими продуктами яких є тетрасахариди та гексасакхариди. Вони мають гідролітичну та трансглікозидазну активність та можуть розщеплювати гіалуронан і хондроїтинсульфати (CS), як правило, хондроїтин-4-сульфат (C4-S) і хондроїтин-6-сульфат (C6-S).

2. Бактеріальні гіалуронідази (КФ 4.2.99.1), які розщеплюють гіалуронан і в різному ступені CS і DS. Вони представляють собою ендо-бета-N-ацетилгексозамінідази, які беруть участь у реакції бета-елімінування, основними кінцевими продуктами якої є дисахариди.

3. Гіалуронідази (КФ 3.2.1.36) з п'явок, інших паразитів і ракоподібних, які представляють собою ендо-бета-глюкуронідази, що гідролізують бета-1-3-зв'язки, в результаті чого утворюються кінцеві продукти, що представляють собою тетрасахариди та гексасахариди.

Гіалуронідази ссавців можна додатково підрозділити на дві групи: ферменти, активні в нейтральному середовищі, і ферменти, активні в кислому середовищі. У людському геномі виявлено шість гіалуронідазоподібних генів, а саме, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALPI і RH20/SPAM1. HYALPI представляє собою псевдоген, а в HYAL3 не виявлена ферментативна активність відносно відомих субстратів. HYAL4 представляє собою хондроїтиназу та відрізняється невисоким рівнем активності у відношенні гіалуронану. HYAL1 є прототипом активного в кислому середовищі ферменту, а RH20 є прототипом активного в нейтральному середовищі ферменту. Активні в кислому середовищі гіалуронідази, такі як HYAL1 і HYAL2, звичайно не мають каталітичної активності при нейтральному значенні рН (тобто при рН 7). Наприклад, HYAL1 має слабку каталітичну активність *in vitro* при значенні рН, що перевищує 4,5 (Frost I.G. і Stern R., «A microtiter-based assay for Hyaluronidase activity not requiring specialized reagents», Anal. Biochemistry, 251, 1997, ss. 263-269). HYAL2 представляє собою активний у кислому середовищі фермент із дуже низькою питомою активністю *in vitro*.

Гіалуронідазоподібні ферменти можна охарактеризувати також як ферменти, які, як правило, пов'язані із плазматичною мембраною за допомогою глікозилфосфатидилінозитольного (GPI) якоря, їх прикладами є людська HYAL2 і людська RH20 (Danilkovitch-Miagkova та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(8), 2003, ss. 4580-4585; Phelps та ін., Science, 240(4860), 1988, ss. 1780-1782), і ферменти, які, як правило, є розчинними, їх прикладом служить людська HYAL1 (Frost I.G. та ін., «Purification, cloning, and expression of human plasma Hyaluronidase», Biochem. Biophys. Res. Commun., 236(1), 1997, ss. 10-15). Однак мають місце варіації від виду до виду: наприклад, бичача RH20 дуже слабо пов'язана із плазматичною мембраною та не «заякорена» через чутливий до фософліпази якір (Lalancette та ін., Biol. Reprod., 65(2), 2001, ss. 628- 636). Ця унікальна особливість бичачої гіалуронідази забезпечила клінічне застосування розчинної гіалуронідази з яєчок бика у вигляді екстракту (Wydase[™], Hyalase[™]). Інші види RH20 представляють собою «заякорені» за допомогою ліпиду ферменти, які, як правило, є нерозчинними без використання детергентів або ліпаз. Наприклад, людська RH20 «заякорена» на плазматичній мембрані через GPI-якір. Спроби створити ДНК-конструкції людської RH20, для яких не потрібна інтродукція ліпідного якоря в поліпептид, привели до одержання або каталітично неактивного ферменту, або нерозчинного ферменту (Arming та ін., Eur. J. Biochem., 247(3), 1997, ss. 810-814). Встановлено, що гіалуронідаза сперми макака, яка зустрічається в природних умовах, присутня як у розчинній, так і в пов'язаній з мембраною формі. У той час як пов'язана з мембраною форма з молекулярною масою 64 кДа має ферментативну активність при рН 7,0, форма з молекулярною масою 54 кДа має активність тільки при рН 4,0 (Cheng та ін., Dev. Biol., 10, 175(1), 1996, ss. 142-153). Таким чином, у розчинних форм RH20 часто відсутня ферментативна активність при нейтральних умовах.

Як відзначалось вище та згідно з даними, представленими у WO 2006/091871, у композицію можна в невеликих кількостях додавати розчинні глікопротеїни, що мають гіалуронідазну активність (sHASEGP), для полегшення введення терапевтичного лікарського засоби в гіподерму. В результаті швидкої деполімеризації HA у позаклітинному просторі sHASEGP знижує в'язкість інтерстиціальної тканини, підвищуючи тим самим гідралічну провідність, і це забезпечує можливість безпечного та зручного введення більш значних обсягів в SC-тканину. Підвищена гідралічна провідність, яка індукується sHASEGP за допомогою зниження в'язкості інтерстиціальної тканини, забезпечує підвищене диспергування, потенційно підвищує системну біологічну доступність, що вводиться SC-шляхом терапевтичного лікарського засобу.

При ін'єкції HA у гіподерму його деполімеризація за допомогою sHASEGP відбувається в обмеженій області SC-тканини, а саме в місці ін'єкції. Згідно з експериментальними даними для sHASEGP характерна локальна інактивація в інтерстиціальному просторі, так, у мишей час напівжиття становить від 13 до 20 хв, при цьому в мишей лінії CD-1 не виявлена помітна абсорбція в кров після однократного внутрішньовенного введення дози. Для sHASEGP характерний час напівжиття в судинному компартменті, що становить 2,3 і 5 хв у мишей і мавп циномогус (яванський макак-крабоїд) відповідно при використанні доз аж до 0,5 мг/кг. Швидкий кліренс sHASEGP у комбінації з постійним синтезом HA-субстрату в Sc-тканині приводить до короточасного та локально активного підвищення проникності для інших спільно ін'єкуємих молекул, це явище є повністю зворотним через 24-48 г після введення (Bywaters G.L. та ін., «Reconstitution of the dermal barrier to dye spread after Hyaluronidase», Br. Med. J., 2 (4741), 1951, ss. 1178-1183).

Крім впливів на локальне диспергування в рідині, sHASEGP діє також у якості підсилювача абсорбції. Макромолекули з молекулярною масою, що перевищує 16 кілодальтонів (кДа), як правило, не можуть абсорбуватись через капіляри за допомогою дифузії та головним чином абсорбуються через дренуючі лімфатичні вузли. Таким чином, введені підшкірно

5 макромолекули, такі, наприклад, як терапевтичне антитіло (молекулярна маса приблизно 150 кДа), повинні перетнути інтерстиціальний матрикс перш, ніж вони досягнуть дренуючої лімфатичної системи для наступної абсорбції в судинний компартмент. В результаті підвищення локального диспергування sHASEGP підвищує швидкість (Ka) абсорбції багатьох

10 макромолекул. Це приводить до підвищених пікових рівнів у крові (C_{max}) і потенційно до підвищеної біологічної доступності в порівнянні з SC-введенням без використання sHASEGP (Bookbinder L.H. та ін., «A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics», J. Control. Release, 114, 2006, сс. 230-241).

Продукти тваринного походження, що містять гіалуронідазу, вже застосовували в клінічних умовах протягом більш ніж 60 років, насамперед для підвищення диспергування та абсорбції

15 інших лікарських засобів, що вводяться разом, і для гіподермоклізу (SC-ін'єкція/інфузія рідини у великому обсязі) (Frost G.I., «Recombinant human Hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration», Expert Opinion on Drug Delivery, 4, 2007, сс. 427-440). Особливості механізму дії гіалуронідаз описані докладно в наступних публікаціях: Duran-Reynolds F., «A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action», CR Soc Biol Paris, 1938, сс. 69-81; Chain E., «A mucolytic enzyme in testes extracts», Nature, 1939, сс. 977-978; Weissmann B., «The transglycosylative action of testicular Hyaluronidase», J. Biol. Chem., 216, 1955, сс. 783-794; Tammi R., Saamanen A.M., Maibach H.I., Tammi M., «Degradation of newly synthesized high molecular mass Hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture», J. Invest. Dermatol., 97, 1991, сс. 126-130; Laurent U.B.G., Dahl L.B., Reed R.K., «Catabolism of Hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver», Exp. Physiol., 76, 1991, сс. 695-703; Laurent T.C. і Fraser J.R.E., «Degradation of Bioactive Substances: Physiology and Pathophysiology», під ред. Henriksen J.H., вид-во CRC Press, Boca Raton, FL; 1991, сс. 249-265; Harris E.N. та ін., «Endocytic function, glycosaminoglycan specificity, and antibody sensitivity of the recombinant human 190-kDa Hyaluronan receptor for endocytosis (HARE)», J. Biol. Chem., 279, 2004, сс. 36201-36209; Frost G.I., «Recombinant human Hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration», Expert Opinion on Drug Delivery, 4, 2007, сс. 427-440. Продукти, що містять гіалуронідазу, дозволені для застосування в країнах

20 Європейського союзу (EU), представляють собою Hylase® «Dessau» і Hyalase®. Продукти тваринного походження, що містять гіалуронідазу, дозволені для застосування в США, включають Vitrase™, Hydase™ та Amphadase™.

Безпека та ефективність продуктів, що містять гіалуронідазу, інтенсивно вивчалися. Було встановлено, що найбільш важливим ризиком, що стосуються безпеки, є гіперчутливість та/або алергенність, яка, очевидно, пов'язана з недостатньою чистотою препаратів тваринного походження (Frost G.I., «Recombinant human Hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration», Expert Opinion on Drug Delivery, 4, 2007, сс. 427-440).

40 Слід зазначити, що існують відмінності відносно дозволених доз гіалуронідаз тваринного походження у Великобританії, Німеччині та США. У Великобританії прийнятна доза при використанні в якості ад'юванта для підшкірної або внутрішньом'язової ін'єкції становить 1500 од., її додають безпосередньо в ін'єкційний розчин. У США звичайна застосовувана для цієї мети доза становить 150 од. При здійсненні гіподермоклізу гіалуронідазу застосовують із метою підшкірного введення стосовно більших обсягів рідини. У Великобританії, як правило, додають 1500 од. гіалуронідази до кожних 500-1000 мл рідини для підшкірного застосування. У США вважається, що для будь-якого літра розчину для гіподермоклізу потрібно 150 од. У Німеччині вважається, що для цієї мети слід застосовувати 150-300 од. У Великобританії для підвищення

50 дифузії місцевих анестезуючих засобів додають 1500 од. У Німеччині та США вважається, що для цієї мети слід застосовувати 150 од. Незважаючи на відмінності в дозах (доза у Великобританії в 10 раз вище, чим у США), відсутні дані стосовно будь-яких помітних відмінностей в профілях безпеки продуктів, що містять гіалуронідазу тваринного походження, у США та Великобританії відповідно.

2 грудня 2005 р. фірма Halozyme Therapeutics Inc. одержала дозвіл FDA на застосування ін'єкційної композиції рекомбінантної людської гіалуронідази, rHuPH20 (HYLENEX™). Від FDA одержаний дозвіл на застосування HYLENEX™ у дозі 150 од. для SC-введення при наступних показаннях:

-у якості ад'юванта для підвищення абсорбції та диспергування інших ін'єкційних лікарських засобів,

-для гіподермокліізу,
 -у якості допоміжного засобу для SC-урографії для поліпшення резорбції рентгеноконтрастних агентів.

У якості частини резюме, зробленого в процесі реєстрації, зазначено, що rHuPH20 має таку ж здатність підвищувати диспергування та абсорбцію інших ін'єкційних лікарських засобів, що й раніше дозволені препарати гіалуронідази тваринного походження, але відрізняється поліпшеним профілем безпеки. Зокрема, застосування рекомбінантної людської гіалуронідази (rHuPH20) мінімізує потенційний ризик забруднення патогенами тварин і трансмісивними спонгіформними енцефалопатіями, в порівнянні з гіалуронідазами тваринного походження.

Розчинні глікопротеїни з гіалуронідазною активністю (sHASEGP), спосіб їх одержання та їх застосування у фармацевтичних композиціях описані у WO 2004/078140.

У докладному експериментальному дослідженні, викладеному додатково нижче, неочікувано було встановлено, що композиції, запропоновані в цьому винаході, відрізняються кращою стабільністю при зберіганні та задовольняють усім необхідним вимогам для схвалення службою охорони здоров'я.

Фермент гіалуронідаза в композиціях, запропонованих у цьому винаході, підвищує ступінь введення антитіла до CD20 у системний кровоток, наприклад, підвищуючи абсорбцію діючої речовини (тобто діє в якості підсилювача проникнення). Фермент гіалуронідаза підвищує також ступінь введення терапевтичного антитіла до CD20 у системний кровоток при підшкірному шляху застосування в результаті зворотного гідролізу гіалуронану, позаклітинного компоненту інтерстиціальної SC-тканини. Гідроліз гіалуронану в гіподермі приводить до тимчасового відкриття каналів в інтерстиціальному просторі SC-тканини та тим самим підвищує ступінь введення терапевтичного антитіла до CD20 у системний кровоток. Крім того, введення стає менш хворобливим для людини та приводить до меншого набрякання SC-тканини, пов'язаного з обсягом, що вводиться.

Гіалуронідаза при її місцевому застосуванні повністю проявляє свою дію локально. Інакше кажучи, гіалуронідаза інактивується та метаболізує місцево протягом декількох хвилин і, як встановлено, не має системної або пролонгованої дії. Швидка інактивація гіалуронідази протягом декількох хвилин при її проникненні в кровоток обумовлює реальну можливість здійснювати порівняльні експерименти по оцінці біологічної доступності різних продуктів, що містять гіалуронідазу. Ця властивість мінімізує також будь-які проблеми, пов'язані з потенційною системною безпекою, оскільки містячий гіалуронідазу продукт не може впливати на віддалені області.

Загальною особливістю всіх ферментів гіалуронідаз є їхня здатність здійснювати деполімеризацію гіалуронану незалежно від відмінностей у хімічній структурі, виді-джерелі, у тканинах-джерелах або в партіях лікарського продукту, одержаного з тих самих видів і тканин. Їхньою відмінною рисою є те, що їх активність є однаковою (за винятком ефективності), не зважаючи на відмінність у структурах.

Фермент гіалуронідаза, застосовуваний у композиції, запропонованої в цьому винаході, відрізняється тим, що не виявляє негативного впливу на молекулярну цілісність антитіла до CD20 у стабільній фармацевтичній композиції, представленої в цьому описі. Крім того, фермент гіалуронідаза модифікує тільки введення антитіла до CD20 у системний кровоток, але не має ніяких властивостей, які можуть обумовлювати або брати участь у терапевтичних впливах абсорбованого системно антитіла до CD20. Фермент гіалуронідаза не має системну біологічну доступність і не виявляє негативного впливу на молекулярну цілісність антитіла до CD20 при зберіганні в рекомендованих умовах стабільної фармацевтичної композиції, запропонованої у винаході. Тому її можна розглядати в якості ексціпієнта в композиції антитіла до CD20, запропонованої в цьому винаході. Оскільки вона не має ніякої терапевтичної дії, вона представляє собою допоміжну складову частину фармацевтичної форми, на відміну від антитіла до CD20, що має терапевтичну активність.

У даній області відомо декілька прийнятних ферментів гіалуронідаз, які можна застосовувати відповідно до цього винаходу. Переважним ферментом є людська гіалуронідаза, найбільш переважно фермент, відомий як rHuPH20. rHuPH20 є представником сімейства, що має активність в нейтральному і кислому середовищі β -1,4-глікозилгідролаз, які каталізують деполімеризацію гіалуронану шляхом гідролізу β -1,4-зв'язку між C₁-положенням N-ацетилглюкозаміну та C₄-положенням глюкуронової кислоти. Гіалуронан представляє собою полісахарид, присутній у внутрішньоклітинній основній речовині сполучної тканини, такої як підшкірна інтерстиціальна тканина, і в певних спеціалізованих тканинах, таких як пупочний канатик і рідина склоподібного тіла. Гідроліз гіалуронану приводить до тимчасового зниження в'язкості інтерстиціальної тканини та прискорює диспергування ін'єкційних рідин або

локалізованих трансудатів або ексудатів, полегшуючи тим самим їхню абсорбцію. Вплив гіалуронідази є місцевим і зворотним і супроводжується повним відновленням тканинного гіалуронану протягом 24-48 г (Frost G.I., «Recombinant human Hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration», Expert Opinion on Drug Delivery, 4, 2007, сс. 427-440). Підвищення проникності сполучної тканини в результаті гідролізу гіалуронану корелює з ефективністю гіалуронідази в якості речовини, що має здатність підвищувати диспергування та абсорбцію молекул, що вводяться разом.

У людському геномі присутні декілька генів гіалуронідаз. Тільки генний продукт PH20 має виражену гіалуронідазну активність у фізіологічних позаклітинних умовах і діє в якості агента, що сприяє поширенню, у той час як гіалуронідази, що мають активність в кислому середовищі, не мають зазначеної властивості.

rHuPH20 представляє собою перший і єдиний рекомбінантний людський фермент гіалуронідазу, який у цей час доступний для терапевтичного застосування. Людський білок, що зустрічається в природних умовах, PH20 має ліпідний якір, приєднаний до амінокислоти, що знаходиться на карбоксильному кінці, який «заякорює» її в плазматичній мембрані. Фермент rHuPH20, розроблений на фірмі Halozyme, представляє собою вкорочений делеційний варіант, позбавлений амінокислот на карбоксильному кінці, відповідальних за приєднання ліпиду. Це дозволяє одержувати розчинний фермент, що має активність при нейтральному значенні рН, подібний з білком, який виявлений у препаратах бичачих яєчок. Білок rHuPH20 синтезують із сигнальним пептидом, що складається з 35 амінокислот, який видаляється з N-кінця в процесі секреції. Зрілий білок rHuPH20 містить ортолог N-кінцевої амінокислотної послідовності, автентичний з виявленням у деяких препаратах бичачої гіалуронідази.

PH20-гіалуронідази, включаючи PH20 тваринного походження та рекомбінантну людську rHuPH20, каталізують деполімеризацію гіалуронану шляхом гідролізу β -1,4-зв'язку між C₁-положенням N-ацетилглюкозаміну та C₄-положенням глюкуронової кислоти. Найменшим продуктом розщеплення є тетрасахарид (Weissmann B., «The transglycosylative action of testicular Hyaluronidase», J. Biol. Chem., 216, 1955, сс. 783-794). Ця структура N-ацетилглюкозамін/глюкуронова кислота не виявлена в N-зчеплених гліканах рекомбінантних біологічних продуктів і тому rHuPH20 не впливає на глікозилювання антитіл, що входять разом з нею в препаративну форму, таких, наприклад, як трастузумаб. Фермент rHuPH20 сам несе шість N-зчеплених гліканів на молекулу, що має корові структури, подібні з виявленими в моноклональних антитілах. Встановлено, що ці N-зчеплені структури не змінюються згодом, підтверджуючи тим самим відсутність ферментативної активності rHuPH20 у відношенні цих N-зчеплених гліканових структур. Короткий час напівжиття rHuPH20 і постійний синтез гіалуронану обумовлюють короточасну та локальну дію ферменту на тканині.

Фермент гіалуронідазу, який є ексціпієнтом у підшкірній композиції, запропонованої в цьому винаході, можна одержувати за допомогою технології рекомбінантної ДНК. Такий шлях гарантує, що в будь-які моменти часу одержують той самий білок (ідентична амінокислотна послідовність), і що в такий спосіб можна уникати алергійної реакції, наприклад, що викликається забруднюючими білками, які утворюються при спільному очищенні в процесі екстракції із тканини. Фермент гіалуронідаза, застосовуваний у композиції, наведений як приклад у контексті цього опису, представляє собою людський фермент, а саме rHuPH20.

Амінокислотна послідовність rHuPH20 (HYLENEX™) добре відома та представлена в CAS під реєстраційним номером 75971-58-7. Приблизна молекулярна маса становить 61 кДа.

Були здійснені множинні порівняння структури та функції клонів кДНК гіалуронідази ссавців, одержаних із природних джерел, і PH-20 людини та інших ссавців. Ген PH-20 представляє собою ген, застосовуваний для одержання рекомбінантного продукту rHuPH20; однак рекомбінантний лікарський продукт представляє собою вкорочену версію, що складається з 447 амінокислот, повнорозмірного білка, що кодується геном PH-20. При будь-якому порівнянні структурні подібності відносно амінокислотних послідовностей рідко перевищували 60 %. Порівняння функціональних характеристик продемонстрували, що активність rHuPH20 дуже подібна з активністю раніше зареєстрованих продуктів, що містять гіалуронідазу. Ця інформація узгоджується із клінічними даними, одержаними протягом останніх 50 років, про те, що незалежно від джерела гіалуронідази клінічна безпека та ефективність одиниць гіалуронідази є еквівалентними.

Застосування rHuPH20 в композиції, що містить антитіло до CD20, для SC-введення, запропонованої в цьому винаході, дозволяє здійснювати введення більш значних обсягів лікарського продукту та потенційно приводить до підвищення абсорбції антитіла до CD20, що вводиться підшкірно, переважно ритуксимабу, у системний кровоток.

Осмотичний тиск стабільної фармацевтичної композиції, запропонованої у винаході, становить 350 ± 50 мОсм/кг.

У стабільній фармацевтичній композиції, запропонованій у винаході, практично відсутні видимі (при оцінці людським оком) частки. Частки, невидимі неозброєним оком (при оцінці із затемненням світла), повинні задовольняти наступним критеріям:

- максимальна кількість на флакон часток розміром ≥ 10 мкм $\rightarrow 6000$
- максимальна кількість на флакон часток розміром ≥ 25 мкм $\rightarrow 600$.

Наступним об'єктом цього винаходу є застосування композиції для приготування лікарського засобу, придатного для лікування в індивідуума захворювання або порушення, яке можна лікувати за допомогою антитіла до CD20, переважно такого, наприклад, як рак або незлоякісне захворювання, шляхом введення індивідуумові композиції, представленої в цьому описі, у кількості, ефективній для лікування зазначеного захворювання або порушення. Переважно антитіло до CD20 слід вводити разом, одночасно або послідовно з хіміотерапевтичним засобом.

Наступним об'єктом цього винаходу є спосіб лікування захворювання або порушення, яке можна лікувати за допомогою антитіла до CD20, (наприклад, раку (переважно) або незлоякісного захворювання), в індивідуума, що полягає в тому, що індивідуумові вводять композицію, представлену в цьому описі, в кількості, ефективному для лікування зазначеного захворювання або порушення. При раку або незлоякісному захворюванні, як правило, повинні бути присутні експресуючі CD20 клітини, у результаті чого антитіло до CD20 у терапевтичній фармацевтичній композиції, призначеній для SC-введення, запропонованої в цьому винаході, повинно мати здатність зв'язуватись з ураженими клітинами. Рак переважно представляє собою рак, при якому відбувається експресія CD20. Незлоякісне захворювання, яке можна лікувати за допомогою композиції, запропонованої в цьому винаході, переважно представляє собою зазначене вище аутоімунне захворювання. Переважно антитіло до CD20 вводять разом, одночасно або послідовно з хіміотерапевтичним засобом.

Додавання гіалуронідази в композицію дозволяє підвищувати ін'єкуємий об'єм, який можна безпечно та комфортно вводити підшкірно. Загальноприйнятий ін'єкуємий об'єм становить від 1 до 15 мл. Встановлено, що введення композиції, запропонованої в цьому винаході, підвищує диспергування, абсорбцію та біологічну доступність терапевтичного антитіла. Великі молекули (тобто > 16 кДа), які вводять SC-шляхом, абсорбуються в судинний компартмент головним чином разом із дренуючими лімфатичними рідинами (Supersaxo A. та ін., «Effect of Molecular Weight on the Lymphatic Absorption of Water-Soluble Compounds Following Subcutaneous Administration», 2, 1990, сс. 167-169; Swartz M. A., «Advanced Drug Delivery Review, The physiology of the lymphatic system», 50, 2001, сс. 3-20). Таким чином, у цьому випадку швидкість інтродукції цих великих молекул у системний кровоток уповільнюється в порівнянні із внутрішньовенною інфузією, що може приводити до зниження частоти/інтенсивності пов'язаних з інфузією реакцій.

Для одержання призначеної для підшкірного введення композиції антитіла до CD20 (переважно ритуксимабу), запропонованої у винаході, потрібні високі концентрації антитіла (приблизно 120 мг/мл) на кінцевій стадії очищення процесу виготовлення. Тому до загальноприйнятого процесу одержання антитіла до CD20 (переважно ритуксимабу) додають додаткову стадію (стадію ультрафільтрації/діафільтрації). Висококонцентровану стабільну фармацевтичну препаративну форму антитіла до CD20, запропоновану в цьому винаході, можна одержувати також у вигляді стабілізованої композиції білка, яку можна відновлювати прийнятним розріджувачем з одержанням відновленої композиції з високою концентрацією антитіла до CD20.

Антитіло до CD20 в SC-композиції, запропонованій в цьому винаході, переважно застосовують для лікування раку, переважно раку, при якому відбувається експресія CD20.

Поняття «приблизно» у контексті цього опису означає, що конкретне представлене значення може варіюватись в певних межах, наприклад, означає, що вказане значення включає варіації в діапазоні ± 10 %, переважно ± 5 %, найбільш переважно ± 2 %.

Крім зазначених вище аналізів, практикуючим фахівцям у даній області відомі різні аналізи *in vivo*. Наприклад, можна експонувати клітини в організмі пацієнта антитілом, яке необов'язково може містити мітку, що виявляється, наприклад, радіоактивний ізотоп, і зв'язування антитіла із клітинами пацієнта можна оцінювати, наприклад, зовнішнім скануванням з виміром радіоактивності або шляхом аналізу біопсії, одержаної в пацієнта до обробки антитілом.

Очевидно, що композицію, яка містить антитіло до CD20, призначену для SC-введення, запропоновану в цьому винаході, можна застосовувати також для лікування різних незлоякісних захворювань або порушень, таких як аутоімунні захворювання, згадані в цьому описі; ендометриоз; склеродерму; рестеноз; поліпи, такі як поліпи обідкової кишки, носові поліпи або поліпи шлунково-кишкового тракту; фіброаденому; респіраторне захворювання; холецистит;

нейрофіброматоз; полікістоз нирок; запальні захворювання; шкірні порушення, включаючи псоріаз і дерматит; судинне захворювання; стани, що включають аномальну проліферацію судинних епітеліальних клітин; виразки шлунково-кишкового тракту; хворобу Менетріє, секретуючі аденоми або синдром втрати білка; ниркові порушення; ангіогенні порушення; захворювання очей, такі як вікова дегенерація жовтої плями, синдром очікуваного очного гістоплазмозу, неоваскуляризація сітківки в результаті проліферативної діабетичної ретинопатії, васкуляризація сітківки, діабетична ретинопатія або вікова дегенерація жовтої плями; пов'язані з кістковою тканиною патології, такі як остеоартрит, рахіт і остеопороз; ушкодження після церебрального ішемічного інсульту; захворювання, пов'язані з фіброзом або набряком, такі як цироз печінки, фіброз легені, саркоїдоз, тиреоїдит, синдром системної гіперв'язкості, хвороба Рандю-Ослера-Вебера, хронічне облітеруюче захворювання легких або набряк, пов'язаний з опіками, травмою, опроміненням, «ударом», гіпоксією або ішемією; реакція гіперчутливості шкіри; діабетична ретинопатія та діабетична нефропатія; синдром Гійєна-Барре; реакція «трансплантат-проти-хазяїна» або відторгнення трансплантату; хвороба Педжетта; запалення кістки або суглоба; фотостаріння (наприклад, викликане УФ-опроміненням людської шкіри); доброякісна гіпертрофія передміхурової залози; певні мікробні інфекції, включаючи такі, що викликаються мікробними патогенами, вибраними з аденовірусів, хантавірусів, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp. і *Bordetella pertussis*; тромбоз, пов'язаний з агрегацією тромбоцитів; пов'язані з репродуктивною системою стани, такі як ендометриоз, синдром гіперстимуляції яєчників, прееклампсія, дисфункціональна маткова кровотеча або менометрорагія; синовіт; атерома; гострі та хронічні нефропатії (включаючи проліферативний гломерулонефрит та захворювання нирок що індукується діабетом); екзема; утворення гіпертрофованих рубців; ендотоксичний шок і грибова інфекція; сімейний аденоматозний поліпоз; нейродегенеративні хвороби (наприклад, хвороба Альцгеймера, пов'язана зі СНІДом деменція, хвороба Паркінсона, аміотрофічний бічний склероз, пігментний ретиніт, спинальна м'язова атрофія та дегенерація мозочка); мієлодиспластичні синдроми; гіпопластична анемія; ішемічне ушкодження; фіброз легені, нирки або печінки; опосередковувана Т-клітинами реакція гіперчутливості; дитячий гіпертрофічний стеноз воротаря; синдром затримки сечі; псоріатичний артрит і тиреоїдит Хашімото. Переважні для лікування незлоякісні стани згадані в цьому описі.

Коли показанням для лікування є рак, для лікування пацієнта можна застосовувати комбінацію композиції, що містить антитіло, та хіміотерапевтичного засобу. Комбіноване застосування включає спільне введення або одночасне введення з використанням різних композицій або однієї фармацевтичної композиції, або послідовне введення в будь-якому порядку, переважно протягом періоду часу, при якому обидві (або всі) діючі речовини одночасно проявляють свою біологічну активність. Так, хіміотерапевтичний засіб можна вводити до або після введення композиції, що містить антитіло, запропонованої в цьому винаході. Відповідно до цього варіанту здійснення винаходу, проміжок часу між, принаймні, одним введенням хіміотерапевтичного засобу та, принаймні, одним введенням композиції, що містить антитіло, запропонованої в цьому винаході, становить переважно приблизно 1 місяць або менше та найбільш переважно приблизно 2 тижні або менше. В альтернативному варіанті хіміотерапевтичний засіб і композицію, яка містить антитіло, запропоновану в цьому винаході, вводять пацієнтові одночасно у вигляді однієї композиції або різних композицій.

Лікування за допомогою зазначеної композиції, що містить антитіло, повинно приводити до поліпшення ознак або симптомів раку або захворювання. Наприклад, коли захворювання, що підлягає лікуванню, представляє собою рак, то така терапія може приводити до збільшення тривалості життя (загальної тривалості життя та/або тривалості життя без прогресування захворювання) та/або може приводити до конкретної клінічної відповіді (часткової або повної). Крім того, лікування з використанням комбінації хіміотерапевтичного засобу та композиції, що містить антитіло, може привести до синергічної або перевищуючої аддитивну дію терапевтичний користі для пацієнта.

Переважно антитіло, що входить в композицію, вводять у вигляді «голого» антитіла. Однак антитіло, що вводиться, можна кон'югувати із цитотоксичним агентом. Переважно імунокон'югат та/або антиген, з яким воно зв'язане, потім інтерналізується клітиною, що приводить до підвищеної терапевтичної ефективності імунокон'югата у відношенні знищення ракової клітини, з якою він зв'язаний. У переважному варіанті здійснення винаходу, цитотоксичний агент виявляє спрямований або інтерферируючий вплив на нуклеїнову кислоту в раковій клітині. Прикладами таких цитотоксичних агентів є майтанзиноїди, каліхеаміцини, рибонуклеази та ДНК-ендонуклеази. Переважними імунокон'югатами є імунокон'югати ритуксимаб-майтанзиноїд, які є аналогічними імунокон'югату трастузумаб-майтанзиноїд (DM1) (T-DM1), описані в WO 2003/037992, більш переважним імунокон'югатом є T-MCC-DM1.

При підшкірному введенні композицію можна вводити за допомогою прийнятного обладнання, такого як (але не обмежуючись тільки ними) шприц; обладнання для ін'єкції (наприклад, обладнання INJECT-EASE™ і GENJECT™); інфузійний насос (такий, наприклад, як Ассі-Чек™); ручка-інжектор (наприклад, GENPEN™); безголке обладнання (наприклад, MEDDECTOR™ і BIOJECTOR™); або за допомогою системи введення на основі пластиру для підшкірного застосування.

Кількість композиції зазначеного антитіла до CD20, що вводиться з метою попередження або лікування захворювання, і час введення повинні залежати від типу (вид, стать, вік, вага і т.д.) і стану пацієнта, що підлягає лікуванню, та серйозності захворювання або стану, що підлягає лікуванню. Для правильного визначення дози важливі також такі показники, як протікання захворювання, чи застосовують антитіло в превентивних або терапевтичних цілях, попередня терапія, історія хвороби пацієнта та його відповідь на антитіло. Остаточне рішення про дозу, що вводиться, приймає лікар. Антитіло можна вводити пацієнтові в однократній обробці або серії обробок. Залежно від типу та серйозності захворювання, доза антитіла до CD20, яка становить приблизно від 1 мкг/кг до 50 мкг/кг (наприклад, 0,1-20 мкг/кг), представляє собою можливу початкову дозу, призначену для введення пацієнтові.

Переважаюча доза зазначеного антитіла до CD20 повинна становити від приблизно 0,05 до приблизно 30 мкг/кг ваги тіла. Так, пацієнтові можна вводити одну або декілька доз, які становлять приблизно 0,5, 2,0, 4,0, 10 або 30 мкг/кг (або будь-яку їх комбінацію). Залежно від типу (вид, стать, вік, вага і т.д.) і стану пацієнта та від типу антитіла до CD20, доза зазначеного першого антитіла може відрізнитись від дози другого антитіла до CD20. Зазначені дози можна вводити щодня або періодично, наприклад, кожний 3-6 день або навіть кожні 1-3 тижні. Можна вводити також початкову більш високу ударну дозу з наступним введенням однієї або декількох більш низьких доз. На основі клінічних досліджень (див. також приклади 3 і 4, у яких як приклад, який не обмежує обсяг винаходу, описано застосування ритуксимабу) у якості переважних вибрані дози від 300 до 900 мкг/м². Більш переважно дози антитіла до CD20 знаходяться у діапазоні від приблизно 375 до приблизно 800 мкг/м². Переважними конкретними дозами зазначеного антитіла до CD20 є дози, що становлять приблизно 375 мкг/м², приблизно 625 мкг/м² і приблизно 800 мкг/м². Переважними є також фіксовані дози зазначеного антитіла до CD20.

В одному з варіантів здійснення винаходу, в якості фіксованих доз, які застосовують у випадку В-клітинних лімфом, переважно неходжкінської лімфоми, використовують наступні дози. Переважно застосовують від приблизно 1200 до приблизно 1800 мг зазначеного антитіла до CD20 на дозу. Більш переважними є дози, вибрані із групи, що включає приблизно 1300, приблизно 1500, приблизно 1600 і приблизно 1700 мг зазначеного антитіла до CD20 на дозу. Найбільш переважно фіксована доза, яку вводять пацієнтам, що страждають В-клітинними лімфомами, переважно неходжкінською лімфоною, становить приблизно 1400 мг зазначеного антитіла до CD20 (наприклад, ритуксимабу) на дозу, яку можна вводити згідно з різними схемами лікування, включаючи приблизно кожні 2 місяця (у тому числі приблизно кожні 8 тижнів), приблизно кожні 3 місяця (у тому числі приблизно кожні 12 тижнів), приблизно 2 роки (або більше) і т.д. (див. також приклади 3 і 4, у яких в якості прикладу, який не обмежує обсяг винаходу, описано застосування ритуксимабу).

В іншому варіанті здійснення винаходу в якості фіксованих доз, які вводять пацієнтам, що страждають лейкозом, переважно хронічним лімфолейкозом (CLL), застосовують наступні дози. Переважно застосовують від приблизно 1600 до приблизно 2200 мг зазначеного антитіла до CD20 на дозу. Більш переважними є дози, вибрані із групи, що включає приблизно 1700, приблизно 1800, приблизно 1900 і приблизно 2100 мг зазначеного антитіла до CD20 на дозу. В одному з варіантів здійснення винаходу, фіксована доза, яку вводять пацієнтам, страждаючим лейкозом, переважно CLL, становить приблизно 1870 мг зазначеного антитіла до CD20 (наприклад, ритуксимабу) на дозу.

В іншому варіанті здійснення винаходу в якості фіксованих доз, які вводять пацієнтам, що страждають аутоімунним захворюванням, таким як ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, вовчковий нефрит, діабет, ІТР і васкуліт, застосовують наступні дози. Переважно застосовують від приблизно 1200 до приблизно 2200 мг зазначеного антитіла до CD20 на дозу, наприклад, приблизно 1500 мг зазначеного антитіла до CD20 (наприклад, ритуксимабу) на дозу.

Якщо застосовують хіміотерапевтичний засіб, то його, як правило, вводять у відомих дозах або необов'язково в більш низькій дозі, що може бути пов'язано зі спільною дією лікарських засобів або з негативними побічними діями, пов'язаними із застосуванням хіміотерапевтичного засобу. Для підготовки та розробки схем застосування зазначених хіміотерапевтичних засобів можна використовувати інструкції виробника або їх може визначати емпірично практикуючий фахівець у даній області. Підготовка та схеми застосування зазначеної хіміотерапії описані

також в: Chemotherapy Service, під ред. M.C. Perry, вид-во Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992.

Стабільну фармацевтичну композицію, яка містить антитіло до CD20, що має фармацевтичну активність, запропоноване у винаході, переважно вводять за допомогою підшкірної ін'єкції, при цьому переважно введення повторюють декілька разів із інтервалом 3 тижні (q3w). Найбільш переважно повний обсяг ін'єкуємої рідини в більшості випадків вводять протягом періоду часу, що становить від 1 до 10 хв, переважно від 2 до 6 хв, найбільш переважно 3 ± 1 хв. Найбільш переважно вводять 2 мл/хв, тобто, наприклад, приблизно 240 мг/хв. Для багатьох пацієнтів, яким не вводять інші внутрішньовенні (IV) хіміотерапевтичні засоби, зазначене підшкірне застосування приводить до підвищення зручності для пацієнтів, оскільки його можна здійснювати шляхом самовведення в домашніх умовах. Це підвищує строгість дотримання хворим режиму та схеми лікування та знижує/усуває витрати, пов'язані з IV-введенням (тобто витрати на здійснення IV-введення, орендну оплату ліжко-днів, перевезення пацієнта і т.д.). З підшкірним введенням, запропонованим у цьому винаході, досить імовірно повинні бути зв'язані зниження частоти та/або інтенсивності пов'язаних з інфузією реакцій.

У переважному варіанті здійснення винаходу, лікарський засіб можна застосовувати для попередження або зниження метастазів або подальшої дисемінації в зазначеного пацієнта, який страждає раком, при якому відбувається експресія CD20. Лікарський засіб можна застосовувати для подовження тривалості життя зазначеного пацієнта, подовження періоду життя без прогресуючого розвитку захворювання в зазначеного пацієнта, подовження тривалості відповіді, що приводить до статистично значимого та клінічно помітного поліпшення в пацієнта, що зазнає лікування, згідно з такими критеріями, як тривалість життя, період життя без прогресуючого розвитку захворювання, рівень відповіді або тривалість відповіді. У переважному варіанті здійснення винаходу лікарський засіб можна застосовувати для підвищення рівня відповіді в групі пацієнтів.

У контексті цього винаходу один або декілька додаткових інших ріст-інгібуючих, цитотоксичних, хіміотерапевтичних, антиангіогенних, протиракових засобів або цитокіну(ів) або сполук, які підвищують дію зазначених агентів, можна застосовувати в комбінації з антитілом до CD20 для лікування раку, при якому відбувається експресія CD20. Переважно лікування за допомогою антитіла до CD20 здійснюють без зазначених інших цитотоксичних, хіміотерапевтичних або протиракових засобів або сполук, які підвищують дію зазначених агентів.

Зазначені засоби представляють собою, наприклад: алкілюючі засоби або засоби з алкілюючою дією, такі як циклофосфамід (CTX; наприклад, cytoxan®), хлорамбуцил (CHL; наприклад, leukeran®), цисплатин (CisP; наприклад, platinol®), бусульфан (наприклад, myleran®), мелфалан, кармустин (BCNU), стрептозоцин, триетиленмеламін (TEM), мітоміцин C і т.д.; антиметаболіти, такі як метотрексат (MTX), етопозид (VP16; наприклад, vepesid®), 6-меркаптопурин (6MP), 6-тіогуанін (6TG), цитарабін (Ara-C), 5-фторурацил (5-FU), капецитабін (наприклад, Xeloda®), дакарбазин (DTIC) і т.д.; антибіотики, такі як актиноміцин D, доксорубіцин (DXR; наприклад, adriamycin®), даунорубіцин (дауноміцин), блеоміцин, мітраміцин і т.д.; алкалоїди, такі як алкалоїди барвінку, наприклад, вінкристин (VCR), вінбластин і т.д.; та інші протипухлинні засоби, такі як паклітаксел (наприклад, taxol®) похідні паклітакселу, цитостатичні засоби, глюкокортикоїди, такі як дексаметазон (DEX; наприклад, decadron®) і кортикостероїди, такі як преднізон, інгібітори нуклеозидні, інгібітори ферментів, такі як гідроксимочевина, виснажуючі амінокислоти ферменти, такі як аспарагіназа, леуковорин та інші похідні фолієвої кислоти, та аналогічні різні протипухлинні засоби. У якості додаткових засобів можна застосовувати також наступні агенти: арніфостин (наприклад, ethyol®), дактиноміцин, мехлоретамін (азотний аналог гірчичного газу), стрептозоцин, циклофосфамід, ломустин (CCNU), доксорубіцин ліпо (наприклад, doxil®), гемцитабін (наприклад, gemzar®), даунорубіцин ліпо (наприклад, daunoxome®), прокарбазин, мітоміцин, доцетаксел (наприклад, taxotere®), алдеслейкін, карбоплатин, оксалиплатин, кладрибін, кампотекін, CPT 11 (іринотекан), 10-гідрокси-7-етилкампотекін (SN38), флоксурідін, флударабін, іфосфамід, ідарубіцин, месна, інтерферон бета, інтерферон альфа, мітоксантрон, топотекан, леупролід, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, плікаміцин, мітотан, пегаспаргаза, пентостатин, піпоброман, плікаміцин, тамоксифен, теніпозид, тестолактон, тіогуанін, тіотепа, урациловий аналог гірчичного газу, вінорелбін, хлорамбуцил. Переважно лікування антитілом до CD20 здійснюють без зазначених додаткових засобів.

Застосування цитотоксичних і протиракових засобів, описаних вище, а також антипроліферативних специфічних у відношенні мішені протиракових лікарських засобів типу

інгібіторів протеїнази у хіміотерапевтичних схемах, як правило, добре відоме в області протиракової терапії, та їх застосування відповідно до цього винаходу передбачає такі ж принципи моніторингу толерантності та ефективності та контролю шляхів введення та доз, з деяким коректуванням. Наприклад, фактичні дози цитотоксичних агентів можуть варіюватись залежно від відповідей клітин пацієнта, що культивуються, визначених за допомогою гістокультур. Як правило, доза повинна бути знижена в порівнянні з кількістю, яку застосовують у відсутності інших додаткових засобів.

Типові дози ефективних цитотоксичних засобів можуть перебувати в діапазонах, рекомендованих виробником, і якщо це встановлено за відповідями *in vitro* або відповідями на створених на тваринах моделях, то їх концентрацію або кількість можна знижувати приблизно аж до 10 раз. Так, фактична доза повинна залежати від рішення лікаря, стану пацієнта та ефективності терапевтичного методу, заснованого на оцінці чутливості *in vitro* первинних культур злоякісних клітин або зразка тканини в гістокультурі, або відповідей, виявлених на відповідних створених на тваринах моделях.

У контексті цього винаходу ефективну кількість іонізуючого випромінювання та/або радіофармацевтичних засобів можна застосовувати на додаток до лікування з використанням антитіла до CD20, раку, при якому відбувається експресія CD20. Джерело випромінювання може бути внутрішнім або зовнішнім відносно пацієнта, що підлягає лікуванню. Коли джерело є зовнішнім відносно пацієнта, то терапію називають зовнішньою променевою терапією (EBRT). Коли джерело випромінювання є внутрішнім стосовно пацієнта, то лікування позначають як брахітерапія (BT). Радіоактивні атоми, які можна застосовувати відповідно до цього винаходу, можна вибирати із групи, що включає (але не обмежуючись тільки ними) радій, цезій-137, іридій-192, америцій-241, золото-198, кобальт-57, мідь-67, технецій-99, йод-123, йод-131 та індій-111. Можна також мітити антитіло відповідними радіоактивними ізотопами. Переважно терапію з використанням антитіла до CD20 застосовують без іонізуючого випромінювання.

Променева терапія є стандартним засобом лікування для контролю нерезектабельних або неоперабельних пухлин та/або метастазів пухлин. Поліпшені результати були одержані, коли променеву терапію поєднували з хіміотерапією. Променева терапія заснована на принципі, що висока доза випромінювання, що поставляється до області-мішені, може призводити до загибелі репродуктивних клітин як у пухлині, так і в здорових тканинах. Схему введення випромінювання, як правило, визначають у поняттях абсорбованої дози випромінювання (Гр), часу та фракціонування, та її повинен ретельно підбирати онколог. Кількість випромінювання, одержане пацієнтом, повинно залежати від різних обставин, але двома найбільш важливими є локалізація пухлини щодо інших структур або органів в організмі, що мають вирішальне значення, та ступінь поширення пухлини. Типовий курс лікування пацієнта, що зазнає променевої терапії, представляє собою схему лікування протягом періоду часу, що становить від 1 до 6 тижнів, при цьому загальну дозу, що становить від 10 до 80 Гр, вводять пацієнтові у вигляді однократної добової фракціонованої дози, що становить від 1,8 до 2,0 Гр, 5 днів на тиждень. У переважному варіанті здійснення цього винаходу має місце синергія, коли пухлини у хворих людей піддають комбінованій терапії, запропонованій у винаході, та випромінюванню. Інакше кажучи, інгібування росту пухлин за допомогою агентів, що входять у комбінацію, яка містить антитіло до CD20, запропоновану у винаході, підвищується при об'єднанні з випромінюванням, необов'язково в комбінації з додатковими хіміотерапевтичними або протираковими засобами. Параметри допоміжної променевої терапії описані, наприклад, у WO 99/60023.

Інші терапевтичні схеми, які можна поєднувати з антитілом, включають (але не обмежуючись тільки ними) застосування другого (третього, четвертого і т.д.) хіміотерапевтичного(их) засобу(ів) (іншими словами «коктейлю» різних хіміотерапевтичних засобів); іншого моноклонального антитіла; інгібуючого ріст агента; цитотоксичного агента; хіміотерапевтичного засобу; антиангіогенного засобу та/або цитокіну і т.д.; або будь-якої їх прийнятної комбінації.

Крім зазначених вище терапевтичних схем, пацієнта можна піддавати хірургічному втручанню для видалення ракових клітин та/або променевої терапії.

Іншим варіантом здійснення винаходу є виріб, який містить фармацевтичну композицію, запропоновану в цьому винаході, та інструкцію з її застосування. Цей виріб містить контейнер. Прийнятними контейнерами є, наприклад, банки, пляшечки (наприклад, пляшечки з декількома або двома камерами), шприци (наприклад, шприци з декількома або двома камерами) і лабораторні пробірки. Контейнер можна виготовляти з різних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер містить композицію та етикетку на ньому або приєднану до нього, на контейнері можна розміщати вказівки по застосуванню. Контейнер, що містить композицію,

може представляти собою флакон для багаторазового використання, який можна застосовувати для повторних введень (наприклад, від 2 до 6 введень) відновленої композиції. Виріб може включати також додаткові продукти, важливі з комерційної точки зору або для споживача, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки, шприци та листівку-вкладиш в

упакуванні з інструкціями із застосування.

Антитіло, яке включають до складу композиції, запропонованої в цьому винаході, переважно є практично чистим і бажано практично гомогенним (тобто не містить білків-забруднювачів і т.д., при цьому фермент гіалуронідаза в композиції, запропонованій в цьому винаході, не розглядається як білок-забруднювач моноклонального антитіла до CD20, запропонованого в

цьому винаході). Для переважного розуміння винаходу, він проілюстрований за допомогою представлених нижче прикладів. Однак їх не слід розглядати в якості обмежуючих обсяг винаходу. Усі процитовані літературні та патентні публікації включені в цей опис як посилання.

Приклади

Запропоновані у винаході композиції, що містять антитіло до CD20, призначені для підшкірного введення, створювали з урахуванням представлених нижче експериментальних результатів з використанням загальної методології одержання та аналітичних методів та аналізів, які викладені далі.

Приклад 1: Одержання висококонцентрованих рідких композицій

Ритуксимаб одержували за допомогою методів, добре відомих для одержання рекомбінантних білків. Генетично сконструйовану лінію клітин яєчника китайського хом'ячка (СНО), для створення якої використовували метод, описаний в EP-B-590058, розмножували в культурі клітин з майстер-банку клітин. З рідкої культури клітин збирали моноклональне антитіло ритуксимаб та очищали за допомогою заснованої на застосуванні іммобілізованого білка А афінної хроматографії, катіонообмінної хроматографії, фільтрації для видалення вірусних забруднювачів зі здійсненням наступної аніонообмінної хроматографії та стадії ультрафільтрації/діафільтрації.

гHuPH20 одержували за допомогою методів, добре відомих для одержання рекомбінантних білків. Цей процес починали з відтавання клітин з робочого банку клітин (WCB) або майстер-банку клітин (МСВ) і розмножували в культурі клітин у серіях колб, що обертаються, із наступним розмноженням у біореакторі. Клітинну культуру об'ємом аж до 6 л застосовували для створення безперервного джерела для підтримки клітин під тиском відбору метотрексатом. Після досягнення об'єму культури, що розмножується, приблизно 36 л, культуру переносили в 400-літровий біореактор для одержання кінцевої партії об'ємом приблизно 300 л. Біореактор для одержання продукту працював у режимі з періодичним підживленням у відсутності тиску відбору, і тривалість фази одержання становила приблизно 2 тижні. Білок гHuPH20 секретувався в культуральну рідину. Можна застосовувати також 1000-літровий біореактор для одержання кінцевої партії об'ємом 500 л. Після завершення стадії одержання, культуру освітлювали фільтрацією та потім обробляли розчинником/детергентом для інактивації вірусів. Потім білок очищали шляхом здійснення 4 серій процесів хроматографії на колонках для видалення домішок, пов'язаних зі здійсненням процесу та пов'язаних із продуктом. Здійснювали стадію фільтрації вірусів і потім одержану після фільтрації партію продукту концентрували в кінцевому буфері: 10 мг/мл гHuPH20 в 20 мМ L-гістидин/HCl-буфері, рН 6,5, 130 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) полісорбата 80. Партію гHuPH20 зберігали при температурі нижче -70 °C.

Інші ексципієнти, застосовувані в композиції, запропонованої в цьому винаході, широко використовують на практиці та вони відомі фахівцям в даній області. Тому немає необхідності пояснювати їх докладно.

Запропоновані у винаході рідкі композиції лікарського засобу, призначені для підшкірного введення, створювали відповідно до описаного нижче методу.

Для приготування рідких композицій ритуксимабу здійснювали обмін буфера на буфер для діафільтрації, що містить необхідну буферну композицію, і при необхідності здійснювали концентрування шляхом діафільтрації до одержання концентрації антитіла приблизно 200 мг/мл. Після завершення процедури діафільтрації, до розчину антитіла додавали ексципієнти (наприклад, трегалозу, гHuPH20, поверхнево-активну речовину) у вигляді маткових розчинів. І, нарешті, концентрацію білка доводили буфером до досягнення кінцевої концентрації ритуксимабу, що становить приблизно 120 мг/мл.

Усі композиції стерилізували фільтрацією через 0,22 мкм-фільтри з низькою здатністю зв'язувати білки та фільтрували в асептичних умовах у стерильні 6-мілілітрові скляні пляшечки, постачені покритими ETFE (сополімер етилену та тетрафторетилену) гумовими пробками та затискними алюмінієвими кришками. Об'єм заповнення становив приблизно 3,0 мл. Ці

композиції зберігали в різних кліматичних умовах (5 °C, 25 °C і 40 °C) протягом різних інтервалів часу та піддавали стресу шляхом струшування (1 тиждень з частотою струшування 200 об/хв при 5 °C і 25 °C) та стресу методом заморожування-відтавання. Зразки аналізували до та після впливу зазначених варіантів стресу за допомогою наступних аналітичних методів:

- 5 1) УФ-спектрофотометрія;
- 2) гель-фільтрація (SEC);
- 3) іонообмінна хроматографія (IEC);
- 4) визначення мутності розчину;
- 5) визначення видимих часток; і
- 10 6) визначення активності гHuPH20.

УФ-спектроскопію, застосовували для визначення вмісту білків, здійснювали з використанням УФ-спектрофотометра Perkin Elmer λ35 при діапазоні довжин хвиль від 240 до 400 нм. Зразки «чистого» білка розводили до концентрації приблизно 0,5 мг/мл за допомогою буфера, відповідного даній композиції. Концентрацію білка розраховували згідно з рівнянням 1.

15 Рівняння 1:

$$\text{Вміст білка} = \frac{A(280) - A(320) \times \text{ф.розв.}}{\epsilon \left(\frac{\text{см}^2}{\text{мг}} \right) \times d(\text{см})}$$

Абсорбцію УФ-світла при 280 нм коректували з урахуванням розсіювання світла при 320 нм і множили на фактор розведення (ф. розв.), який визначали на основі зважених мас і плотностей «чистого» зразка та буфера для розведення. Чисельник ділили на добуток довжини шляху кювети (d) на коефіцієнт екстинкції (ε).

Для виявлення розчинних високомолекулярних субстанцій (агрегати) і низькомолекулярних продуктів гідролізу (LMW) у композиціях застосовували гель-фільтрацію (SEC). Метод здійснювали за допомогою обладнання для PXPB, постаченого УФ-детектором (визначення при довжині хвилі 280 нм) і колонкою TosoHaas TSK G3000SWXL (7,8×300 мм). Продукти, що представляють собою інтактні мономери, агрегати та продукти гідролізу, розділяли із застосуванням ізократичного профілю елюції, використовуючи 0,2 М вторинного кислого фосфорнокислого натрію, 0,25 М хлориду калію, pH 7,0, при швидкості потоку 0,5 мл/хв.

Іонообмінну хроматографію (IEC) здійснювали для виявлення продуктів хімічного розщеплення, що змінюють заряд ритуксимабу в композиціях. Для цієї мети ритуксимаб розщеплювали папаїном. Для здійснення методу використовували прийнятне обладнання для PXPB, постачене УФ-детектором (виявлення при довжині хвилі 280 нм), аналітичну катіонообмінну колонку типу Polymer Labs PL-SCX 1000A. У якості рухливих фаз А та Б використовували відповідно 10 mM MES, pH 6,0 і 10 mM MES, 0,2 М хлориду натрію, pH 6,0 зі швидкістю потоку 1 мл/хв.

Для оцінки мутності опалесценцію визначали в FTU (одиниця мутності за формазином), використовуючи турбидиметр HACH 2100AN при кімнатній температурі.

У зразках аналізували присутність видимих часток за допомогою обладнання для візуальної оцінки Seidenader V90-T.

Аналіз in vitro ферменту гіалуронідази гHuPH20 використовували в якості аналізу активності. Цей аналіз заснований на утворенні нерозчинного осаду при зв'язуванні гіалуронану (гіалуронат натрію) з катіонним осаджувачем. Активність ферменту визначали шляхом інкубації гHuPH20 із застосуванням у якості субстрату гіалуронаном і наступного осадження нерозщепленого гіалуронану за допомогою підкисленого сироваткового альбуміну (кінська сироватка). Мутність оцінювали при довжині хвилі 640 нм і зниження мутності в результаті активності ферменту відносно субстрату гіалуронану використовували в якості міри ферментативної активності. Процедуру здійснювали з використанням стандартної кривої, створеної на основі оцінки розведень стандартного референ-зразка гHuPH20, та активність зразка визначали на основі цієї кривої.

Результати оцінки стабільності композицій А – І представлені нижче в таблицях.

50 Склади та результати визначення стабільності рідких композицій, що містять у якості лікарського продукту ритуксимаб, запропонованих у цьому винаході

Композиція А представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 120 мг/мл ритуксимабу, 20 mM L-гістидину, 210 mM дигідрату трегалози, 10 mM метіоніну, 0,06 % полісорбату 80, 2000 од./мл гHuPH20, pH 5,5.

Температура зберігання/умови стресу	Тривалість зберігання	Концентрація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР		Мутність (FTU)	Видимі частки	Активність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Початок	114	2,2	97,8	0,1	24	65	4,2	Вільна від часток	1970
Струшування при 5 °C	1 тиждень	114	2,4	97,5	0,1	n.d.	n.d.	4,2	Вільна від часток	1760
Струшування при 25 °C	1 тиждень	115	2,3	97,6	0,1	n.d.	n.d.	4,4	Вільна від часток	1676
Заморожування/відтавання	(5 циклів)	114	2,4	97,5	0,1	n.d.	n.d.	4,4	Вільна від часток	2123
5 °C	4 тижні	114	2,2	97,8	0,1	25	65	4,7	Вільна від часток	1979
	13 тижнів	114	2,1	97,8	0,1	26	62	4,6	Вільна від часток	2219
	26 тижнів	114	2,1	97,8	0,2	25	63	4,4	Вільна від часток	2412
25 °C	4 тижні	114	2,0	97,9	0,1	25	64	4,7	Вільна від часток	1975
	13 тижнів	n.d.	1,9	97,8	0,3	24	61	4,8	Вільна від часток	2215
	26 тижнів	n.d.	1,9	97,6	0,5	22	60	4,3	Вільна від часток	2409
40 °C	4 тижні	114	2,1	97,3	0,6	19	61	5,5	Вільна від часток	n.d.
	13 тижнів	n.d.	3,2	91,4	5,4	13	55	8,1	Вільна від часток	n.d.

n.d. - не визначали.

Композиція Б представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 120 мг/мл ритуксимабу, 20 mM L-гістидину, 210 mM дигідрату трегалози, 10 mM метіоніну, 0,06 %
 5 полісорбату 80, 2000 од./мл gHuPH20, pH 6,1.

Температура зберігання/умови стресу	Тривалість зберігання	Концентрація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР		Мутність (FTU)	Видимі частки	Активність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Початок	117	2,3	97,7	0,1	25	63	7,1	Вільна від часток	2463
Струшування при 5 °C	1 тиждень	116	2,2	97,7	0,1	n.d.	n.d.	7,2	Вільна від часток	2288
Струшування при 25 °C	1 тиждень	118	2,1	97,8	0,1	n.d.	n.d.	6,9	Вільна від часток	2613
Заморожування/відтавання	(5 циклів)	116	2,3	97,7	0,1	n.d.	n.d.	6,6	Практично вільна від часток	2259
5 °C	4 тижні	117	2,2	97,8	0,1	25	62	6,3	Вільна від часток	2485
	13 тижнів	114	2,3	97,6	0,1	25	62	6,3	Вільна від часток	2237
	26 тижнів	119	2,2	97,7	0,1	25	61	6,8	Вільна від часток	2344
25 °C	4 тижні	n.d.	2,0	97,9	0,1	25	62	6,6	Вільна від часток	2179
	13 тижнів	n.d.	2,1	97,7	0,2	24	61	6,3	Вільна від часток	2083
	26 тижнів	n.d.	2,1	96,2	1,8	23	60	6,9	Вільна від часток	2397
40 °C	4 тижні	n.d.	2,2	96,1	1,7	21	59	8,6	Вільна від часток	n.d.
	13 тижнів	n.d.	3,3	92,2	4,5	14	53	21,0	Вільна від часток	n.d.

n.d. не визначали.

Композиція В представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 120 мг/мл ритуксимабу, 20 мМ L-гістидину, 210 мМ дигідрату трегалози, 10 мМ метіоніну, 0,06 % полісорбату 80, 12000 од./мл gHuPH20, pH 5,5.

5

Темпера- тура збері- гання/умови стресу	Тривалість зберігання	Концен- трація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР		Мут- ність (FTU)	Видимі частки	Актив- ність фер- менту (од./мл)
			HMW (%)	Моно- мер (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Початок	126	1,7	98,3	0,0	27	58	4,4	Вільна від часток	11963
Струшу- вання при 5 °C	1 тиждень	127	1,6	98,3	0,0	n.d.	n.d.	4,0	Вільна від часток	12083
Струшу- вання при 25 °C	1 тиждень	127	1,6	98,4	0,1	n.d.	n.d.	4,5	Вільна від часток	11150
Заморо- жування/ відтавання	(5 циклів)	126	1,6	98,4	0,0	n.d.	n.d.	4,2	Практично вільна від часток	11869
5 °C	7 тижнів	124	1,5	98,5	0,0	26	62	5,0	Вільна від часток	12206
	19 тижнів	120	1,5	98,5	0,1	26	62	4,1	Вільна від часток	11945
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Вільна від часток	n.d.
25 °C	7 тижнів	n.d.	1,5	97,8	0,7	25	63	5,8	Вільна від часток	12259
	19 тижнів	n.d.	1,5	97,3	1,2	24	61	4,8	Вільна від часток	13137
	26 тижнів	n.d.	1,8	96,6	1,6	24	60	4,4	Вільна від часток	12948
40 °C	7 тижнів	n.d.	2,5	94,6	2,9	18	60	10,2	Вільна від часток	n.d.
	19 тижнів	n.d.	3,7	89,8	6,5	12	55	20,0	Вільна від часток	n.d.

n.d. - не визначали.

Композиція Г представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 120 мг/мл ритуксимабу, 20 мМ оцтової кислоти, 210 мМ дигідрату трегалози, 10 мМ метіоніну, 0,06 % полісорбату 20, 12000 од./мл rHuPH20, pH 5,5.

5

Температура зберігання/ умови стресу	Тривалість зберігання	Концентрація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР		Мутність (FTU)	Видимі частки	Активність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Початок	127	1,6	98,4	0,0	26	62	4,9	Вільна від часток	12619
Струшування при 5 °С	1 тиждень	125	1,5	98,4	0,0	n.d.	n.d.	4,3	Вільна від часток	12507
Струшування при 25 °С	1 тиждень	123	1,5	98,4	0,1	n.d.	n.d.	4,3	Вільна від часток	12923
Заморожування/відтавання	(5 циклів)	124	1,5	98,4	0,0	n.d.	n.d.	4,4	Практично вільна від часток	12394
5 °С	7 тижнів	125	1,5	98,4	0,0	26	63	5,0	Практично вільна від часток	10030
	19 тижнів	123	1,5	98,5	0,1	26	62	4,7	Вільна від часток	15324
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Вільна від часток	n.d.
25 °С	7 тижнів	n.d.	1,6	97,7	0,7	25	62	4,9	Вільна від часток	13099
	19 тижнів	n.d.	1,6	97,2	1,2	24	61	5,1	Вільна від часток	13031
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Вільна від часток	n.d.
40 °С	7 тижнів	n.d.	2,6	94,8	2,6	17	60	28,7	Вільна від часток	n.d.
	19 тижнів	n.d.	3,6	90,5	6,0	9	56	51,9	Вільна від часток	n.d.

n.d. - не визначали.

Композиція Д представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 120 мг/мл ритуксимабу, 20 мМ L-гістидину, 210 мМ дигідрату трегалози, 10 мМ метіоніну, 0,06 % полісорбату 20, 12000 од./мл гHuPH20, pH 5,5.

Температура зберігання/ умови стресу	Тривалість зберігання	Концентрація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР		Мутність (FTU)	Видимі частки	Активність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Мон-омер (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Початок	126	1,5	98,5	0,0	26	62	4,6	Практично вільна від часток	12231
Струшування при 5 °С	1 тиждень	128	1,5	98,5	0,0	n.d.	n.d.	4,4	Практично вільна від часток	12524
Струшування при 25 °С	1 тиждень	127	1,5	98,5	0,1	n.d.	n.d.	4,2	Вільна від часток	11438
Заморожування/Відтавання	(5 циклів)	127	1,5	98,5	0,0	n.d.	n.d.	4,3	Вільна від часток	14440
5 °С	7 тижнів	125	1,5	98,5	0,0	26	62	4,7	Вільна від часток	12824
	19 тижнів	125	1,5	98,5	0,1	26	62	4,5	Вільна від часток	13891
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Вільна від часток	n.d.
25 °С	7 тижнів	n.d.	1,5	97,8	0,7	25	62	4,3	Вільна від часток	13540
	19 тижнів	n.d.	1,5	97,4	1,1	24	61	4,6	Вільна від часток	11243
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Вільна від часток	n.d.
40 °С	7 тижнів	n.d.	2,5	94,6	2,9	18	60	10,6	Вільна від часток	n.d.
	19 тижнів	n.d.	3,9	89,6	6,5	12	55	22,7	Вільна від часток	n.d.

n.d. - не визначали.

Композиція Е представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 120 мг/мл ритуксимабу, 20 мМ L-гістидину, 120 мМ хлориду натрію, 10 мМ метіоніну, 0,02 % полісорбату 80, 12000 од./мл rHuPH20, pH 5,5.

5

Температура зберігання/умови стресу	Тривалість зберігання	Концентрація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР			Мутність (FTU)	Видимі частки	Активність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fab NS укорочення a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Початок	124	1,6	98,3	0,0	3	26	62	28,7	Вільна від часток	12034
Струшування при 5 °C	1 тиждень	127	1,6	98,4	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	31,0	Вільна від часток	12083
Струшування при 25 °C	1 тиждень	125	2,4	97,5	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	31,1	Вільна від часток	11150
Заморожування/Відтавання	(5 циклів)	125	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	30,4	Вільна від часток	11869
5 °C	7 тижнів	122	1,6	98,4	0,0	3	25	63	31,4	Вільна від часток	10368
	19 тижнів	118	1,5	98,4	0,1	3	26	62	31,8	Вільна від часток	11654
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Вільна від часток	n.d.
25 °C	7 тижнів	n.d.	1,7	97,6	0,7	3	25	63	31,1	Вільна від часток	13853
	19 тижнів	n.d.	1,7	97,1	1,2	3	24	61	31,6	Вільна від часток	12556
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Вільна від часток	n.d.
40 °C	7 тижнів	n.d.	2,9	94,1	3,1	5	19	59	87,0	Вільна від часток	n.d.
	19 тижнів	n.d.	4,3	88,8	6,9	6	13	55	211,0	Вільна від часток	n.d.

n.d. - не визначали.

Композиція Є представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 120 мг/мл ритуксимабу, 20 мМ лимонної кислоти, 120 мМ хлориду натрію, 10 мМ метіоніну, 0,02 % полісорбату 80, 12000 од./мл гHuPH20, pH 6,5.

5

Температура зберігання/умови стресу	Тривалість зберігання	Концентрація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР			Мутність (FTU)	Видимі частки	Активність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fab NS укорочення a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Початок	126	1,8	98,1	0,0	4	26	62	40,3	Вільна від часток	10808
Струшування при 5 °С	1 тиждень	122	1,8	98,2	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	35,6	Вільна від часток	9324
Струшування при 25 °С	1 тиждень	125	2,3	97,7	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	35,7	Вільна від часток	n.a.
Заморожування/Відтавання	(5 циклів)	126	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	34,5	Вільна від часток	11270
5 °С	7 тижнів	124	1,8	98,2	0,0	3	24	63	38,5	Практично вільна від часток	12854
	19 тижнів	118	1,7	98,2	0,1	3	26	62	37,6	Вільна від часток	11202
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		Вільна від часток	n.d.
25 °С	7 тижнів	n.d.	1,9	97,4	0,7	2	24	63	40,2	Практично вільна від часток	11645
	19 тижнів	n.d.	2,1	96,9	1,1	3	24	60	36,9	Вільна від часток	14233
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		Вільна від часток	n.d.
40 °С	7 тижнів	n.d.	3,1	94,3	2,6	5	19	58	101,0	Практично вільна від часток	n.d.
	19 тижнів	n.d.	4,8	89,4	5,8	7	12	52	385,0	Вільна від часток	n.d.

n.d. - не визначали.

Композиція Ж представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 120 мг/мл ритуксимабу, 20 мМ лимонної кислоти, 210 мМ дигідрату трегалози, 10 мМ метіоніну, 0,06 % полісорбату 80, 12000 од./мл rHuPH20, pH 6,5.

5

Температура зберігання/умови стресу	Тривалість зберігання	Концентрація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР			Мутність (FTU)	Видимі частки	Активність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fab NS укорочення a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Початок	127	2,0	98,0	0.0	3	26	62	33,4	Вільна від часток	11951
Струшування при 5 °C	1 тиждень	128	1,9	98,1	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	30,3	Вільна від часток	10936
Струшування при 25 °C	1 тиждень	127	1,9	98,0	0.1	n.d.	n.d.	n.d.	29,7	Вільна від часток	12595
Заморожування/Відтавання	(5 циклів)	127	1,9	98,1	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	32,0	Вільна від часток	11442
5 °C	7 тижнів	124	1,8	98,2	0.0	3	24	63	33,8	Вільна від часток	11723
	19 тижнів	122	1,7	98,2	0.1	3	26	62	30,8	Вільна від часток	12180
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Вільна від часток	n.d.
25 °C	7 тижнів	n.d.	2,0	97,3	0.7	3	25	62	30,8	Вільна від часток	12328
	19 тижнів	n.d.	2,1	96,9	1.1	4	24	60	31,4	Вільна від часток	12017
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Вільна від часток	n.d.
40 °C	7 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5	20	58	84,8	Вільна від часток	n.d.
	19 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7	11	50	295,0	Вільна від часток	n.d.

n.d. - не визначали.

Композиція 3 представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 120 мг/мл ритуксимабу, 20 мМ L-гістидину, 120 мМ хлориду натрію, 10 мМ метіоніну, 0,04 % полісорбату 80, 12000 од./мл rHuPH20, pH 6,0.

5

Температура зберігання/умови стресу	Тривалість зберігання	Концентрація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР			Мутність (FTU)	Видимі частки	Активність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fab NS укорочення a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Початок	123	1,7	98,3	0,0	3	25	62	34,0	Вільна від часток	11022
Струшування при 5 °C	1 тиждень	125	1,6	98,3	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	33,3	Вільна від часток	12231
Струшування при 25 °C	1 тиждень	124	1,7	98,3	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	32,1	Вільна від часток	8371
Заморожування/Відтавання	(5 циклів)	123	1,8	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	32,9	Вільна від часток	12058
5 °C	7 тижнів	122	1,6	98,4	0,0	3	25	62	33,5	Вільна від часток	11108
	19 тижнів	119	1,6	98,4	0,1	3	26	62	34,4	Вільна від часток	11548
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Вільна від часток	n.d.
25 °C	7 тижнів	n.d.	1,7	97,7	0,6	3	25	62	34,8	Вільна від часток	12679
	19 тижнів	n.d.	1,8	97,2	1,1	4	24	60	34,6	Вільна від часток	13252
	26 тижнів	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Вільна від часток	n.d.
40 °C	7 тижнів	n.d.	2,5	94,9	2,6	5	20	58	88,1	Вільна від часток	n.d.
	19 тижнів	n.d.	3,7	90,4	5,9	7	14	53	292,0	Вільна від часток	n.d.

n.d. - не визначали.

Композиція И представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 5 мг/мл GA101 (HuMab<CD20>), 20 мМ L-гістидину, 240 мМ дигідрату трегалози, 0,02 % полоксамер 188, 2000 од./мл rHuPH20, pH 6,0.

5

Темпе- ратура зберігання/ умови стресу	Тривалість зберігання	Концен- трація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР		Мут- ність (FTU)	Видимі частки	Актив- ність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Моно- мер (%)	LMW (%)	Кислот- на об- ласть (%)	Основ- ний пік (%)			
-	Початок	25,1	0,6	98,5	0,9	18,5	68,6	6,0	Вільна від часток	1833
-20 °C	26 тижнів	26,2	0,6	98,6	0,8	18,7	68,3	5,8	Вільна від часток	2078
5 °C	26 тижнів	25,7	0,7	98,4	0,9	19,1	67,9	5,6	Вільна від часток	1380
25 °C	26 тижнів	25,9	0,9	97,3	1,9	26,7	60,8	6,0	Вільна від часток	978
40 °C	26 тижнів	26,1	3,0	86,8	9,7	40,9	19,5	7,2	Практично вільна від часток	< межі вияв- лення

n.d. - не визначали.

Приклад 2: Одержання рідких композицій, що містять гуманізовану версію 2H7 антитіла до CD20

Для одержання рідких композицій, що містять рекомбінантну гуманізовану версію 2H7 антитіла до CD20 (2H7.v16, описана у WO 2006/084264) здійснювали обмін буфера на буфер для діалізації, що містить необхідну буферну композицію, і при необхідності здійснювали концентрування до одержання концентрації антитіла приблизно 60 і 120 мг/мл. Після досягнення необхідної концентрації до розчину антитіла додавали ексципієнти (наприклад, трегалозу, gHuPH20, полісорбат 20) у вигляді маткових розчинів. І, нарешті, концентрацію білка доводили буфером для кінцевої композиції до досягнення концентрації гуманізованого 2H7, що становить приблизно 30, 50 і 100 мг/мл.

Усі композиції стерилізували фільтрацією через 0,22 мкм-фільтри з низькою здатністю зв'язувати білки та фільтрували в асептичних умовах у стерильні 3-мілілітрові скляні пляшечки, постачені пробками з бутилової гуми, ламіновані смолою, що містить фтор, і затискними алюмінієвими кришками. Об'єм заповнення становив приблизно 1,2 мл. Ці композиції зберігали в різних кліматичних умовах (5 °C, 25 °C і 40 °C) протягом різних інтервалів часу. Зразки аналізували в кожний момент часу, коли оцінювали стабільність, за допомогою наступних аналітичних методів:

- 1) УФ-спектрофотометрія;
- 2) гель-фільтрація (SEC);
- 3) іонообмінна хроматографія (IEC);
- 4) аналіз комплементзалежної цитотоксичності (CDC) для визначення активності гуманізованого 2H7;

- 5) турбидометричний аналіз активності gHuPH20.

- 1). Концентрацію білка визначали за допомогою ультрафіолетової абсорбційної спектроскопії з використанням спектрофотометра типу Agilent 8453 при діапазоні довжин хвиль від 240 до 400 нм. Зразки гравіметрично розводили до концентрації приблизно 0,5 мг/мл за допомогою відповідного буфера для композиції. Концентрацію білка розраховували на основі рівняння 1:

$$\text{Концентрація білка} = ((A_{\max} - A_{320}) \times DF) / (\epsilon(\text{см}^2/\text{мг}) \times d(\text{см})) \quad (\text{рівняння 1}),$$

де DF означає фактор розведення, d означає довжини шляху кювети та ϵ означає коефіцієнт екстинції, який становить $1,75 (\text{см}^2/\text{мг}^{-1})$ для 2H7 при A_{\max} . Абсорбцію УФ-світла при A_{\max} (як правило, 278-280 нм) коректували на розсіювання світла при 320 нм і множили на фактор розведення, який визначали на основі зважених мас і плотностей «чистого» зразка та буфера для розведення. Чисельник ділили на добуток довжини шляху кювети d на коефіцієнт екстинції ϵ .

- 2). Гель-фільтрацію (SEC) застосовували для виявлення розчинних високомолекулярних субстанцій (агрегати) і низькомолекулярних продуктів гідролізу (фрагменти) у композиціях. SEC

здійснювали за допомогою обладнання для PXBP фірми Agilent Technologies, Inc., 1100 серії, постаченого УФ-детектором (визначення при довжині хвилі 280 нм) і колонкою TSK G3000SWXL (7,8×300 мм). Продукти, що представляють собою інтактні мономери, агрегати та продукти гідролізу, розділяли із застосуванням ізократичного профілю елюції, використовуючи 0,2 М фосфату калію та 0,25 М хлориду калію, pH 6,2, при швидкості потоку 0,3 мл/хв.

3). Іонообмінну хроматографію (IEC) здійснювали для виявлення продуктів хімічного розщеплення, що змінюють чистий заряд антитіла до CD20 у композиціях. Для цієї мети антитіло до CD20 інкубували у присутності карбоксипептидази В для каталізу гідролізу основних амінокислот. Для здійснення іонообмінної хроматографії використовували обладнання для PXBP фірми Agilent Technologies, Inc., 1100 серії, постачене УФ-детектором (визначення при довжині хвилі 280 нм) і колонкою Dionex ProPac WCX-10 (4 × 250 мм). Кислі та основні варіанти розділяли за допомогою лінійного градієнта 25 мМ фосфату калію, pH 6,9 (рухлива фаза А) і 120 мМ хлориду калію, розчиненого в 25 мМ фосфату калію (рухлива фаза Б), при швидкості потоку 0,5 мл/хв.

4). Аналіз комплементзалежної цитотоксичності (CDC) здійснювали для визначення *in vitro* активності антитіла до CD20. Аналіз рівня комплементзалежної цитотоксичності (CDC) застосовували для оцінки здатності антитіла викликати лізис людських В-лімфобластоїдних клітин (WIL2-S) у присутності людського комплементу. Аналіз здійснювали в 96-лункових титраційних мікропланшетах для культури тканини. У цьому аналізі взяті в різних концентраціях: застосовуване в якості еталона антитіло до CD20, контроль або зразок(и), розведені в розріджувачі, застосовуваному для аналізу, інкубували із клітинами WIL2-S (50000 клітин/лунку) у присутності фіксованої кількості людського комплементу. Планшет інкубували при 37 °C/5 % CO₂ у вологій камері протягом 1-2 г. Наприкінці періоду інкубації в кожен лунку додавали по 50 мкл редокс-барвника ALAMARBLUE™ і планшет інкубували протягом 15-26 г. ALAMARBLUE™ представляє собою редокс-барвник, для якого характерна флуоресценція при довжині хвилі збудження 530 нм і довжині хвилі випущення 590 нм при його відновленні в живих клітинах. Таким чином, зміни кольору та флуоресценції пропорційні кількості життєздатних клітин. Результати виражали у вигляді відносних одиниць флуоресценції (RFU), залежно від концентрації антитіл до CD20, і паралельно застосовували програму для оцінки активності зразків антитіл до CD20 щодо еталонного зразка.

5). Турбидиметричний метод аналізу застосовували для визначення активності гіалуронідази та концентрації ферменту. Цей метод заснований на утворенні нерозчинного осаду, який утворюється при зв'язуванні гіалуронової кислоти з підкисленим сироватковим альбуміном. У цілому, метод полягав у наступному: серійні розведення гіалуронідази гHuPH20 (фірма Halozyme, Inc.), які застосовували в якості референс-стандарту зі вмістом від 2,5 до 0,25 од./мл, приготували в розріджувачі для ферменту (70 мМ NaCl, 25 мМ PIPES, pH 5,5, 0,66 мг/мл гідролізату желатину, 0,1 % людського сироваткового альбуміну). Тест-зразки розводили до кінцевої концентрації 1,5 од./мл розріджувачем для ферменту. По 30 мкл розведення стандарту та зразка переносили в чорний 96-лунковий планшет із прозорим дном (фірма Nunc). Потім планшет покривали та попередньо нагрівали протягом 5 хв при температурі 37 °C. Потім реакцію ініціювали, додаючи по 30 мкл попередньо нагрітого розчину гіалуронової кислоти з концентрацією 0,25 мг/мл, який застосовували як субстрат (70 мМ NaCl, 25 мМ PIPES, pH 5,5, 0,25 мг/мл висушеного гіалуронату натрію, фірма Lifecore Biomedical). Планшет струшували протягом нетривалого періоду часу та інкубували протягом 10 хв при 37 °C. Після здійснення зазначеної стадії інкубації реакцію припиняли, додаючи 240 мкл робочого розчину сироватки (2,5 % кінської сироватки, 500 мМ ацетату калію, pH 4,25). Після витримання протягом 30 хв при кімнатній температурі оцінювали мутність реакційної суміші при довжині хвилі 640 нм за допомогою рідера для мікропланшетів. Зниження мутності, пов'язане з активністю ферменту при використанні в якості субстрату гіалуронової кислоти, використовували в якості міри гіалуронідазної активності. Активність зразка оцінювали щодо каліброваної кривої, для побудови якої застосовували розведення гHuPH20, що використовувався у якості робочого референс-стандарту.

Результати, одержані при використанні композицій, що містять різні гуманізовані версії антитіла 2H7, представлені нижче в таблицях:

Композиція I представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 30 мг/мл гуманізованого 2H75, 30 мМ ацетату натрію, 8 % дигідрату трегалози, 0,02 % полісорбату 20, 0 од./мл гHuPH20, pH 5,3.

Темпе- ратура зберігання	Тривалість зберігання	Конце- нтрація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - PXBP			Іонообмінна хроматографія - PXBP		Рівень CDC (% питомої актив- ності)	Актив- ність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Моно- мер (%)	LMW (%)	Кислотний варіант (%)	Основний пік (%)		
-	Початок	32	0,9	98,9	0,2	27,1	67,5	103	ND
5 °C	12 тижнів	ND	0,8	98,1	1,1	27,8	65,9	110	ND
	24 тижні	ND	0,8	98,1	1,1	25,6	68,1	89	ND
	36 тижнів	ND	0,9	98,6	0,5	27,0	68,3	97	ND
	48 тижнів	ND	1,0	97,4	1,6	25,9	68,3	96	ND
	72 тижні	ND	0,9	97,9	1,2	25,2	68,2	109	ND
	96 тижнів	ND	0,9	97,8	1,3	28,1	66,1	96	ND
25 °C	4 тижні	ND	0,7	98,0	1,2	29,5	64,7	ND	ND
	8 тижнів	ND	0,8	97,7	1,5	32,5	61,9	ND	ND
	12 тижнів	ND	0,8	97,4	1,8	35,0	59,1	83	ND
	24 тижні	ND	1,0	96,8	2,2	40,9	52,1	ND	ND
40 °C	2 тижні	ND	0,7	97,8	1,6	36,0	57,7	ND	ND
	4 тижні	ND	0,8	96,6	2,5	45,1	47,4	ND	ND
	8 тижнів	ND	1,0	94,9	4,1	60,3	33,3	ND	ND

*ND - не визначали.

Композиція І представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 30 мг/мл гуманізованого 2H75, 30 мМ ацетату натрію, 8 % дигідрату трегалози, 0,02 % полісорбату 20, 1500 од./мл rHuPH20, pH 5,3.

Темпе- ратура зберігання	Тривалість зберігання	Концен- трація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - PXBP			Іонообмінна хроматографія - PXBP		Рівень CDC (% питомої активності)	Актив- ність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Моно- мер (%)	LMW (%)	Кислотний варіант (%)	Основний пік (%)		
-	Початок	32	0,9	98,9	0,2	27,1	67,4	114	1309
5 °C	12 тижнів	ND	0,8	97,9	1,3	27,6	65,7	110	1520
	24 тижні	ND	0,8	98,1	1,2	26,1	67,1	82	1112
	36 тижнів	ND	0,9	97,3	1,8	27,0	67,9	98	1166
	48 тижнів	ND	0,9	97,3	1,8	26,2	67,9	100	1620
	72 тижні	ND	0,9	97,9	1,3	26,0	68,2	97	ND
	96 тижнів	ND	0,9	97,8	1,3	28,1	66,0	96	ND
25 °C	4 тижні	ND	0,7	98,0	1,3	29,5	64,7	ND	1147
	8 тижнів	ND	0,8	97,8	1,4	32,1	61,9	ND	847
	12 тижнів	ND	0,8	97,3	1,9	35,1	59,3	89	892
	24 тижні	ND	1,0	96,8	2,2	41,3	51,9	ND	777
40 °C	2 тижні	ND	0,8	97,6	1,6	35,3	57,4	ND	ND
	4 тижні	ND	0,8	96,7	2,4	45,2	46,9	ND	ND
	8 тижнів	ND	1,0	95,0	4,0	59,8	34,3	ND	ND

*ND - не визначали.

Композиція ІІ представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 30 мг/мл гуманізованого 2H75, 30 мМ ацетату натрію, 8 % дигідрату трегалози, 0,02 % полісорбату 20, 12000 од./мл rHuPH20, pH 5,3.

Темпе- ратура зберігання	Тривалість зберігання	Концен- трація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - PXBP			Іонообмінна хроматографія - PXBP		Рівень CDC (% питомої активності)	Актив- ність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Моно- мер (%)	LMW (%)	Кислотний варіант (%)	Основний пік (%)		
-	Початок	33	0,9	98,9	0,2	27,2	67,4	103	10584
5 °C	12 тижнів	ND	0,8	97,7	1,6	26,5	66,8	111	8864
	24 тижні	ND	0,8	97,8	1,4	25,8	68,1	85	14319
	36 тижнів	ND	0,8	97,5	1,7	27,1	68,0	96	11408
	48 тижнів	ND	0,9	96,7	2,4	26,2	67,9	95	13817
	72 тижні	ND	0,9	97,6	1,6	26,4	68,0	98	ND
	96 тижнів	ND	0,9	97,4	1,6	28,3	65,8	108	ND
25 °C	4 тижні	ND	0,8	97,7	1,5	29,6	64,7	ND	13464
	8 тижнів	ND	0,8	97,4	1,7	32,1	61,9	ND	10975
	12 тижнів	ND	0,9	97,0	2,1	35,4	58,7	92	10394
	24 тижні	ND	1,0	96,5	2,5	41,0	51,8	ND	819
40 °C	2 тижні	ND	1,1	97,3	1,6	35,7	57,2	ND	ND
	4 тижні	ND	0,8	96,6	2,5	45,5	47,5	ND	ND
	8 тижнів	ND	1,0	94,9	4,1	59,9	33,3	ND	ND

*ND - не визначали.

Композиція К представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 50 мг/мл гуманізованого 2H75, 30 мМ ацетату натрію, 8 % дигідрату трегалози, 0,02 % полісорбату 20, 0 од./мл gHuPH20, pH 5,3.

Темпе- ратура зберігання	Тривалість зберігання	Концен- трація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - PXBP			Іонообмінна хроматографія - PXBP		Рівень CDC (% питомої активності)	Активність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Моно- мер (%)	LMW (%)	Кислотний варіант (%)	Основний пік (%)		
-	Початок	50	0,9	98,9	0,2	27,0	67,6	107	ND
5 °C	12 тижнів	ND	0,9	98,1	1,0	26,9	66,6	86	ND
	24 тижні	ND	0,9	97,9	1,1	25,8	67,7	88	ND
	36 тижнів	ND	1,0	97,9	1,1	27,1	68,5	92	ND
	48 тижнів	ND	1,0	97,8	1,2	26,2	67,8	95	ND
	72 тижні	ND	1,0	97,8	1,2	26,5	67,9	101	ND
	96 тижнів	ND	1,1	97,6	1,3	28,4	65,8	98	ND
25 °C	4 тижні	ND	0,9	97,9	1,2	29,5	64,9	ND	ND
	8 тижнів	ND	0,9	97,6	1,5	32,1	61,8	ND	ND
	12 тижнів	ND	1,0	97,4	1,6	35,3	58,9	86	ND
	24 тижні	ND	0,9	97,9	1,1	40,0	52,8	ND	ND
40 °C	2 тижні	ND	0,9	97,5	1,6	35,3	56,9	ND	ND
	4 тижні	ND	1,1	96,2	2,7	45,2	47,8	ND	ND
	8 тижнів	ND	1,4	94,1	4,4	59,7	32,9	ND	ND

*ND - не визначали.

Композиція Л представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 50 мг/мл гуманізованого 2H75, 30 мМ ацетату натрію, 8 % дигідрату трегалози, 0,02 % полісорбату 20, 1500 од./мл gHuPH20, pH 5,3.

Темпе- ратура зберігання	Тривалість зберігання	Концен- трація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР		Рівень CDC (% питомої активності)	Актив- ність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Моно- мер (%)	LMW (%)	Кислотний варіант (%)	Основний пік (%)		
-	Початок	51	0,9	98,9	0,2	27,1	67,4	116	1537
5 °C	12 тижнів	ND	0,9	97,8	1,3	25,8	67,4	109	1454
	24 тижні	ND	0,9	97,9	1,2	26,0	67,7	84	1372
	36 тижнів	ND	1,0	97,5	1,5	27,7	67,3	93	1432
	48 тижнів	ND	1,1	97,0	2,0	26,0	68,4	102	1356
	72 тижні	ND	1,1	97,6	1,4	26,5	68,0	97	ND
	96 тижнів	ND	1,2	97,6	1,3	28,2	65,9	104	ND
25 °C	4 тижні	ND	0,9	97,9	1,3	29,7	64,6	ND	1269
	8 тижнів	ND	0,9	97,4	1,6	32,1	62,0	ND	966
	12 тижнів	ND	1,0	97,5	1,5	35,2	58,9	89	1002
	24 тижні	ND	1,3	96,5	2,2	40,5	52,2	ND	ND
40 °C	2 тижні	ND	0,9	97,5	1,6	35,9	56,1	ND	ND
	4 тижні	ND	1,1	96,3	2,6	46,5	45,7	ND	ND
	8 тижнів	ND	1,4	94,6	4,0	60,5	31,9	ND	ND

*ND - не визначали

Композиція М представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 50 мг/мл гуманізованого 2H75, 30 мМ ацетату натрію, 8 % дигідрату трегалози, 0,02 % полісорбату 20, 12000 од./мл rHuPH20, pH 5,3.

Темпе- ратура зберігання	Тривалість зберігання	Концен- трація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР		Рівень CDC (% питомої активності)	Активність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Моно- мер (%)	LMW (%)	Кислотний варіант (%)	Основний пік (%)		
-	Початок	52	0,9	98,9	0,2	27,2	67,4	110	9932
5 °C	12 тижнів	ND	0,9	97,7	1,4	26,8	67,6	102	9668
	24 тижні	ND	0,9	97,7	1,4	25,7	68,2	ND	11292
	36 тижнів	ND	1,0	97,5	1,5	27,5	67,0	96	15469
	48 тижнів	ND	1,1	97,4	1,6	26,1	68,2	100	10832
	72 тижні	ND	1,0	97,7	1,3	26,3	68,0	106	ND
	96 тижнів	ND	1,2	97,4	1,5	29,3	64,8	100	ND
25 °C	4 тижні	ND	0,9	97,6	1,5	29,7	64,6	ND	11765
	8 тижнів	ND	1,0	97,6	1,4	32,3	61,9	ND	11594
	12 тижнів	ND	1,1	97,1	1,8	35,4	58,8	86	10119
	24 тижні	ND	1,2	96,.	2,4	41,1	51,8	ND	8960
40 °C	2 тижні	ND	1,1	97,3	1,6	35,9	55,5	ND	ND
	4 тижні	ND	1,1	96,4	2,5	44,9	46,5	ND	ND
	8 тижнів	ND	1,4	94,5	4,1	60,4	33,2	ND	ND

*ND - не визначали.

Композиція Н представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 100 мг/мл гуманізованого 2H75, 30 мМ ацетату натрію, 8 % дигідрату трегалози, 0,02 % полісорбату 20, 0 од./мл rHuPH20, pH 5,3.

Темпе- ратура зберігання	Тривалість зберігання	Концен- трація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - PXBP			Іонообмінна хроматографія - PXBP		Рівень CDC (% питомої активності)	Активність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Моно- мер (%)	LMW (%)	Кислотний варіант (%)	Основний пік (%)		
-	Початок	102	1,0	98,8	0,2	27,2	67,5	101	ND
5 °C	12 тижнів	ND	1,2	97,7	1,1	26,7	68,0	106	ND
	24 тижні	ND	1,3	97,6	1,2	25,8	67,5	84	ND
	36 тижнів	ND	1,3	97,2	1,5	27,4	67,4	95	ND
	48 тижнів	ND	1,3	97,2	1,6	26,2	68,3	89	ND
	72 тижні	ND	1,4	97,4	1,2	26,4	68,3	106	ND
	96 тижнів	ND	1,5	97,2	1,2	28,1	66,4	96	ND
25 °C	4 тижні	ND	1,2	97,5	1,2	31,0	63,7	ND	ND
	8 тижнів	ND	1,5	97,2	1,4	32,4	61,9	ND	ND
	12 тижнів	ND	1,6	96,7	1,7	35,4	58,9	90	ND
	24 тижні	ND	1,9	96,0	2,1	40,6	52,1	ND	ND
40 °C	2 тижні	ND	1,4	97,1	1,6	35,4	57,7	ND	ND
	4 тижні	ND	1,8	95,5	2,7	45,6	47,3	ND	ND
	8 тижнів	ND	2,3	93,5	4,3	60,3	32,9	ND	ND

*ND - не визначали.

Композиція О представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 100 мг/мл гуманізованого 2H75, 30 мМ ацетату натрію, 8 % дигідрату трегалози, 0,02 % полісорбату 20, 1500 од./мл rHuPH20, pH 5,3.

Темпе- ратура зберігання	Тривалість зберігання	Концен- трація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - PXBP			Іонообмінна хроматографія - PXBP		Рівень CDC (% питомої активності)	Актив- ність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Моно- мер (%)	LMW (%)	Кислотний варіант (%)	Основний пік (%)		
-	Початок	101	1,0	98,8	0,2	27,3	67,5	98	1389
5 °C	12 тижнів	ND	1,2	97,7	1,2	25,3	67,7	104	1655
	24 тижні	ND	1,3	97,6	1,2	26,0	67,6	82	1381
	36 тижнів	ND	1,3	96,6	2,2	26,7	68,7	95	1644
	48 тижнів	ND	1,3	96,5	2,2	26,2	68,2	94	1381
	72 тижні	ND	1,4	97,5	1,2	26,7	68,1	106	ND
	96 тижнів	ND	1,5	97,2	1,3	28,1	66,2	95	ND
25 °C	4 тижні	ND	1,2	97,5	1,2	29,2	64,2	ND	1376
	8 тижнів	ND	1,4	97,3	1,3	32,5	60,4	ND	1018
	12 тижнів	ND	1,6	96,9	1,5	35,3	58,9	91	942
	24 тижні	ND	1,9	96,0	2,2	40,7	53,8	ND	616
40 °C	2 тижні	ND	1,3	97,1	1,5	35,8	55,8	ND	ND
	4 тижні	ND	1,8	95,6	2,7	45,8	47,6	ND	ND
	8 тижнів	ND	2,3	93,6	4,0	59,3	32,4	ND	ND

*ND - не визначали

Композиція П представляє собою рідку композицію, що має наступний склад: 100 мг/мл гуманізованого 2H75, 30 мМ ацетату натрію, 8 % дигідрату трегалози, 0,02 % полісорбату 20, 12000 од./мл rHuPH20, pH 5,3.

Темпе- ратура зберігання	Тривалість зберігання	Концен- трація білка (мг/мл)	Гель-фільтрація - РХВР			Іонообмінна хроматографія - РХВР		Рівень CDC (% питомої активності)	Активність ферменту (од./мл)
			HMW (%)	Моно- мер (%)	LMW (%)	Кислотний варіант (%)	Основний пик (%)		
-	Початок	101	1,0	98,8	0,2	27,4	67,4	99	11692
5 °C	12 тижнів	ND	1,1	97,6	1,2	25,8	68,1	97	10599
	24 тижні	ND	1,2	97,6	1,2	26,1	67,2	80	11946
	36 тижнів	ND	1,2	97,1	1,7	26,1	69,3	95	14894
	48 тижнів	ND	1,3	97,0	1,8	25,7	68,4	89	11820
	72 тижні	ND	1,4	97,4	1,3	26,4	68,3	102	ND
	96 тижнів	ND	1,5	97,1	1,4	28,1	66,2	97	ND
25 °C	4 тижні	ND	1,3	97,4	1,3	29,8	64,6	ND	11897
	8 тижнів	ND	1,4	97,1	1,4	32,5	61,6	ND	11117
	12 тижнів	ND	1,5	96,6	1,8	35,5	58,7	89	10763
	24 тижні	ND	1,9	95,9	2,3	41,1	51,1	ND	7783
40 °C	2 тижні	ND	1,4	97,0	1,6	35,6	55,9	ND	ND
	4 тижні	ND	1,8	95,6	2,6	46,0	48,0	ND	ND
	8 тижнів	ND	2,2	93,8	4,0	61,4	32,7	ND	ND

*ND - не визначали.

Приклад 3: Лікування пацієнтів за допомогою композиції

Схеми лікування, що включають застосування ритуксимабу, стали стандартними для догляду за пацієнтами, що страждають різними типами CD20-позитивних В-клітинних злоякісних захворювань. Звичайно ритуксимаб вводять шляхом внутрішньовенної (IV) інфузії протягом декількох годин. Ці довгочасні інфузії та побічні дії, пов'язані з інфузією, розглядаються деякими пацієнтами як некомфортабельні умови сучасного терапевтичного лікування. Крім того, необхідна процедура внутрішньовенної обробки розглядається як інвазивна та може бути хворобливою, насамперед для пацієнтів, що страждають злоякісними захворюваннями, яких піддають повторюваним циклам лікування. Підшкірне (SC) введення може представляти собою суттєво більш просте лікування, час введення скорочується до менш ніж 10 хв, і це поліпшує відчуття пацієнта. Рекомбінантна людська гіалуронідаза (rHuPH20) створена та дозволена для поліпшення диспергування та абсорбції лікарських засобів, що вводяться разом. Її поєднували з ритуксимабом для досягнення більш безпечного та комфортабельного введення обсягу, що перевищує 10 мл, за допомогою SC-ін'єкції. Метою зазначеного дослідження був вибір дози застосовуваної для SC-введення композиції, що містить ритуксимаб, що включає rHuPH20, яку одержували згідно з методом, описаним у прикладі 1 (композиція А), у порівнянні з IV-введенням ритуксимабу та оцінка її безпеки та переносимості чоловіками та жінками, що страждають фолікулярною лімфомою (FL), у процесі підтримуючої терапії.

У цьому прикладі представлені дані, одержані на стадії 1 рандомізованого відкритого багатоцентрового адаптивного дослідження Ib фази. 124 пацієнта довільно розподіляли по чотирьом групам для оцінки підтримуючої терапії за допомогою ритуксимабу: 16 пацієнтів включали в контрольну групу, яку обробляли за допомогою IV-ін'єкцій, 34 пацієнта включали в групу, яку обробляли SC дозою 1 (375 мг/м²), 34 пацієнта включали в групу, яку обробляли SC дозою 2 (625 мг/м²), і 40 пацієнтів обробляли SC дозою 3 (800 мг/м²). Перед рандомізацією придатних для включення в дослід пацієнтів обробляли принаймні один раз IV-дозою ритуксимабу, що становить 375 мг/м², у підтримуючому режимі. Для пацієнтів, довільно включених в одну із груп з SC-обробкою, одну IV-дозу заміняли на SC-дозу. Пацієнтам вводили ритуксимаб або кожні 2 місяця (q2m), або кожні 3 місяця (q3m) згідно з місцевою практикою. Дані про безпеку одержували в цілому для 119 пацієнтів. Ритуксимаб при його SC-введенні, як правило, добре переносився. Не виявлено ніяких виражених клінічних симптомів або пов'язаних з обробкою серйозних небажаних явищ. У цілому 95 небажаних явищ (НЯ) виявлене у 46 пацієнтів (39 %). Найбільш частим зареєстрованим НЯ була "асоційована із введенням реакція" (AAR, що включає почервоніння, еритему та слабкий дискомфорт). Ці AAR виявилися зворотними, в основному слабкими за інтенсивністю та тільки в 1 випадку необхідне було лікування (метоклопрамід для лікування нудоти). У цілому, профіль НЯ не суттєво відрізнявся від профілю, характерного для пацієнтів, яким ритуксимаб вводили IV (після AAR, найбільш

частими випадками були шлунково-кишкові порушення та слабкі інфекції). Описано 4 серйозних побічних дії (СПД) в 4 різних пацієнтів, всі вони не залежали від досліджуваної лікарської обробки. Не виявлено НЯ, що приводять до смерті, відмови або припинення лікування.

Загальний об'єм, що вводиться за допомогою SC-ін'єкції кожному пацієнтові, варіювався від 4,4 до 15,0 мл. Середня тривалість ін'єкції становила 2 мл/хв. Максимальні концентрації ритуксимабу в сироватці в оброблюваних за допомогою SC-ін'єкції групах, виявлені між днем 2 та днем 8 (48 г та 168 г). Фармакокінетичні параметри виявились лінійними відносно дози для всіх доз, що вводяться SC-шляхом (375, 625 і 800 мг/м²). Концентрації ритуксимабу на день 28 (C₂₈) і рівень експозиції сироватки (AUC₀₋₅₇) у пацієнтів, яким вводили SC ритуксимаб у дозі 625 мг/м², виявились порівнянними з показниками, виявленими в пацієнтів, яких обробляли стандартною для IV-введення дозою ритуксимабу, що становить 375 мг/м² SC.

Таким чином, підшкірне застосування ритуксимабу забезпечує швидке введення, є комфортабельним і безпечним, при цьому досягається експозиція сироватки, порівнянна з виявленою у випадку застосування дозволених внутрішньовенних композицій, для страждаючих FL-пацієнтів при підтримуючій терапії. Відсуття пацієнтів виявились сприятливими. Ці результати підтверджують необхідність додаткового вивчення призначених для підшкірного введення композицій, що містять ритуксимаб, і фіксована доза ритуксимабу для SC-введення, яка становить 1400 мг, була вибрана для формального визначення C_{trough} за допомогою дослідження "не меншої ефективності" на стадії 2.

Приклад 4: Лікування за допомогою застосовуваного у вигляді SC-ін'єкції ритуксимабу в порівнянні із застосовуванням у вигляді IV-ін'єкції ритуксимабом пацієнтів, що страждають фолікулярною неходжкінською лімфомою

Пацієнтів, що страждають фолікулярною (низького ступеню злоякісності) лімфомою, яких раніше не піддавали лікуванню, обробляли в режимі підтримуючої терапії або: (а) композиції, що містить ритуксимаб, призначеної для SC-введення (яку приготувлювали згідно з методом, описаним у прикладі 1, композиція А) у комбінації з CHOP або CVP, або (б) композиції, що містить ритуксимаб, призначеної для IV-введення у комбінації з CHOP або CVP.

Пацієнтів довільно розділяли на групи, у яких здійснювали обробку з використанням 375 мг/м² ритуксимабу у вигляді внутрішньовенної інфузії або 1400 мг ритуксимабу, який вводили підшкірно. Крім того, пацієнтів піддавали стандартній хіміотерапії (CVP або CHOP). Пацієнтів, у яких виявлений повна або часткова відповідь після 8 циклів лікування, можна піддавати підтримуючій терапії протягом максимум 12 додаткових циклів. Цикли підтримуючої терапії слід повторювати кожні 8 тижнів. Передбачувана тривалість обробки становить 96 тижнів.

Передбачається, що лікування з використанням 1400 мг антитіла до CD20 ритуксимабу у вигляді SC-введення як підтримуючої терапії кожні 8 тижнів протягом аж до 12 циклів, виявиться безпечним та ефективним при лікуванні фолікулярної лімфоми, необов'язково в комбінації з хіміотерапією (включаючи CHOP або CVP).

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20, що має фармацевтичну активність, призначена для підшкірного введення, яка містить:

- а) антитіло до CD20 у концентрації приблизно від 50 до 350 мг/мл;
- б) забуферуючий агент, що забезпечує значення pH 5,5±2,0, у концентрації приблизно від 1 до 100 мМ;
- в) стабілізатор або суміш двох або більшої кількості стабілізаторів у концентрації приблизно від 1 до 500 мМ;
- г) неіоногенну поверхнево-активну речовину в концентрації приблизно від 0,01 до 0,1 % та
- д) фермент гуалуронідазу в концентрації, що становить приблизно від 1000 до 16000 од./мл, переважно приблизно 2000 од./мл або 12000 од./мл.

2. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за п. 1, у якій концентрація антитіла до CD20 становить від 100 до 150 мг/мл, переважно 120±20 мг/мл.

3. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-2, у якій забуферуючий агент присутній у концентрації від 1 до 50 мМ.

4. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-3, у якій забуферуючий агент забезпечує значення pH від 5,5 до 6,5, переважно значення pH, вибране із групи, що включає 5,5, 6,0, 6,1 і 6,5.

5. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-4, у якій забуферуючий агент являє собою гістидиновий буфер.

6. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-5, у якій стабілізатор являє собою сахарид, такий, наприклад, як α, α -дигідрат трегалози або сахароза.
- 5 7. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-6, у якій стабілізатор присутній у концентрації від 15 до 250 мМ.
8. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за п. 6 або п. 7, у якій метіонін застосовують як другий стабілізатор.
9. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за п. 8, у якій метіонін присутній у концентрації від 5 до 25 мМ.
- 10 10. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-9, у якій неіоногенна поверхнево-активна речовина являє собою полісорбат, переважно вибраний із групи, що включає полісорбат 20, полісорбат 80 та сополімер поліетилену-поліпропілену.
11. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за п. 10, у якій концентрація полісорбату становить від 0,02 % до 0,08 % (мас./об.).
- 15 12. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-11, у якій фермент гіалуронідаза являє собою gHuPH20.
13. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-12, у якій антитіло до CD20 являє собою ритуксимаб.
- 20 14. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-12, у якій антитіло до CD20 являє собою окрелізумаб.
15. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-12, у якій антитіло до CD20 являє собою HuMab<CD20>.
- 25 16. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-15, яка є стабільною при заморожуванні та відтаванні.
17. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-16 у рідкій формі.
18. Висококонцентрована стабільна фармацевтична композиція антитіла до CD20 за одним із пп. 1-17 у ліофілізованій формі.
- 30 19. Застосування композиції за одним із пп. 1-18 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування в індивідуума захворювання або порушення, яке можна лікувати за допомогою антитіла до CD20, переважно раку або незлоякісного захворювання, яке полягає в тому, що індивідуумові вводять композицію, вказану в цьому описі, в кількості, ефективній для лікування зазначеного захворювання або порушення.
- 35 20. Застосування за п. 19, у якому композицію вводять разом, одночасно або послідовно зі здійсненням хіміотерапії.
21. Застосування за п. 19 або п. 20, у якому індивідуумові, який потребує цього, вводять антитіло до CD20 у фіксованій дозі, що становить від 1200 до приблизно 2200 мг.
22. Застосування за п. 19 або п. 20, у якому індивідуумові, який потребує цього, вводять антитіло до CD20 у фіксованій дозі, що становить від приблизно 1200 до приблизно 1800 мг.
- 40 23. Застосування за п. 19 або п. 20, у якому індивідуумові, який потребує цього, вводять антитіло до CD20 у фіксованій дозі, що становить від 1600 до приблизно 2200 мг.
24. Спосіб лікування в індивідуума захворювання або порушення, яке можна лікувати за допомогою антитіла до CD20, переважно раку або незлоякісного захворювання, який полягає в тому, що індивідуумові вводять композицію за одним із пп. 1-18 в кількості, ефективній для лікування зазначеного захворювання або порушення.
- 45 25. Спосіб за п. 24, у якому композицію вводять разом, одночасно або послідовно з хіміотерапевтичним засобом.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601