

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041673**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.21

(21) Номер заявки
201792552

(22) Дата подачи заявки
2010.09.10

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

(54) **ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛО К CD20, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ТАКИХ КОМПОЗИЦИЙ**

(31) **09170110.2**

(32) **2009.09.11**

(33) **EP**

(43) **2018.09.28**

(62) **201200475; 2010.09.10**

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

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

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

(56) WO-A2-2007005608
US-A1-2007071675
WO-A1-2006091871
WO-A1-2009080541
US-B1-6991790

BOOKBINDER ET AL: "A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 114, no. 2, 28 August 2006 (2006-08-28), pages 230-241, XP005625403, ISSN: 0168-3659, DOI: DOI:10.1016/J.JCONREL.2006.05.027 Abstract, page 232 item 2.9; page 233, item 3.3 to page 237, item 3.6; page 239, item 4.1; the whole document
WO-A2-2005044859

(57) В изобретении описана высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция обладающего фармацевтической активностью антитела к CD20, такого, например, как ритуксимаб, окрелизумаб или HuMab<CD20>, предназначенная для внутримышечного или подкожного введения. Указанные композиции содержат также по меньшей мере один забуферивающий агент, такой, например, как гистидиновый буфер, стабилизатор или смесь двух или большего количества стабилизаторов (например, сахарид, такой, например, как дигидрат α, α -трегалозы или сахароза, и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора), а также неионогенное поверхностно-активное вещество. Описаны также пути их применения и способы лечения с их использованием.

B1**041673****041673****B1**

Настоящее изобретение относится к высококонцентрированным стабильным фармацевтическим композициям обладающего фармацевтической активностью антитела к CD20, предназначенным для подкожной инъекции. Указанные композиции содержат помимо антитела в высоких концентрациях забуферивающий агент, стабилизатор или смесь двух или большего количества стабилизаторов, неионогенное поверхностно-активное вещество и применяемый в эффективном количестве по меньшей мере один фермент гиалуронидазу.

Предпосылки создания изобретения

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

Примерами присутствующих в настоящее время на рынке стабильных композиций фармацевтически активных антител, предназначенных для терапевтического применения, являются следующие антитела: RITUXAN®/MABTHERA® (ритуксимаб), представляющий собой химерное антитело, которое связывается с антигеном CD20 на В-клетках. Поступающая в продажу препаративная форма представляет собой стерильный, прозрачный, бесцветный не содержащий консервантов жидкий концентрат, предназначенный для внутривенного (IV) введения. Ритуксимаб поставляется в концентрации 10 мг/мл (10 мл) в 100-миллиграммовых или 500-миллиграммовых (50 мл) одноразовых пузырьках. Продукт изготавливается в виде препаративной формы, которая содержит хлорид натрия в концентрации 9 мг/мл, дигидрат цитрата натрия в концентрации 7,35 мг/мл, полисорбат 80 в концентрации 0,7 мг/мл и воду для инъекций. Значение pH регулируется на уровне 6,5. Другая жидкая препаративная форма ритуксимаба, пригодная для IV-введения, описана в US 6991790.

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

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

Хотя установлено, что указанные выше препаративные формы антител пригодны для внутривенного введения, существует необходимость в создании высококонцентрированных стабильных фармацевтических композиций обладающих терапевтической активностью антител, предназначенных для подкожной инъекции. Преимущество подкожных инъекций состоит в том, что они дают возможность медицинскому персоналу осуществлять их посредством относительно непродолжительного вмешательства в организм пациента. Кроме того, пациента можно научить осуществлять подкожную инъекцию самостоятельно. Как правило, объемы инъектируемого подкожным путем раствора не превышают примерно 2 мл. Для пациентов, которым требуется вводить несколько доз, можно инъектировать композицию в виде несколько стандартных доз в несколько областей на поверхности тела.

В продажу уже поступают два следующих содержащих антитела продукта, которые предназначены для подкожного введения.

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

XOLAIR™ (омализумаб), представляющий собой моноклональное антитело к иммуноглобулину E (антитело к IgE), который в настоящее время поступает в продажу в форме продукта, содержащего 150

мг лиофилизированного порошка (включающего антитело, сахарозу, гистидин и моногидрат гидрохлорида гистидина и полисорбат 20), который для осуществления подкожной инъекции подлежит восстановлению водой с получением предназначенной для инъекции дозы, составляющей приблизительно 125 мг/мл.

В настоящее время на рынке отсутствует высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к CD20, пригодная для подкожного введения. Таким образом, существует необходимость в разработке указанных высококонцентрированных стабильных фармацевтических композиций обладающих терапевтической активностью антител, предназначенных для подкожной инъекции.

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

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

Хотя антитела обладают очень схожей общей структурой, указанные антитела различаются составом аминокислот (в частности, в CDR-участках, ответственных за связывание с антигеном) и схемой гликозилирования. Кроме того, могут иметь место дополнительные пост-трансляционные модификации, такие как заряд и варианты гликозилирования.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к высококонцентрированной стабильной фармацевтической композиции обладающей фармацевтической активностью антитела к CD20, которая содержит:

- а) антитело к CD20, где антитело выбрано из группы, включающей ритуксимаб, окрелизумаб и человеческое МАт к CD20 (HuMab<CD20>) в концентрации от 50 до 120 мг/мл или от 100 до 150 мг/мл;
- б) гистидиновый буфер, обеспечивающий значение pH $5,5 \pm 2,0$, в концентрации от 1 до 50 мМ;
- в) стабилизатор, представляющий собой дигидрат α, α -трегалозы в концентрации от 15 до 250 мМ и/или метионин в концентрации от 5 до 25 мМ;
- г) неионогенное поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, включающей полисорбат 20 и полисорбат 80, в концентрации от 0,02 до 0,06% (мас./об.); и фермент гиалуронидазу в концентрации от 1000 до 16000 ед./мл. В предпочтительном варианте осуществления изобретения в этой высококонцентрированной стабильной фармацевтической композиции концентрация антитела к CD20 составляет от 100 до 150 мг/мл, предпочтительно 120 ± 20 мг/мл собой полисорбат, предпочтительно выбранный из группы, включающей полисорбат 20, полисорбат 80 и сополимер полиэтилена-полипропилена.

Концентрация полисорбата при этом может составлять от 0,02 до 0,08% (мас./об.).

Предпочтительно в состав предложенной высококонцентрированной стабильной фармацевтической композиции антитела к CD20 может входить такое антитело, как ритуксимаб или окрелизумаб.

Эта высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к CD20 является стабильной при замораживании и оттаивании. Она предназначена для подкожного или внутримышечного введения и может находиться жидкой форме или в лиофилизированной форме. Еще одним объектом данного изобретения является применение фармацевтической композиции для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к CD20. При этом заболевание или нарушение может представлять собой опухоль.

Причем лекарственное средство может быть предназначено для совместного, одновременного или последовательного использования с химиотерапией. Наконец последним объектом данного изобретения является способ лечения заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к CD20, у индивидуума, заключающийся в том, что индивидууму вводят выше описанную композицию в количестве, эффективном для лечения указанного заболевания или нарушения.

При этом заболевание или нарушение может представлять собой опухоль. Фармацевтическую композицию можно вводить совместно, одновременно или последовательно с химиотерапевтическим средством. При этом индивидууму, который нуждается в этом, антитело к CD20 можно вводить в фиксированной дозе, составляющей от 1200 до 2200 мг, предпочтительно в фиксированной дозе, составляющей от 1200 до 1800 мг, наиболее предпочтительно в фиксированной дозе, составляющей от 1600 до 2200 мг.

Подробное описание изобретения

В контексте настоящего описания понятие "антитело" используют в его наиболее широком смысле, и оно относится конкретно к полноразмерным антителам, созданным с помощью генетической инженерии.

рии антителам типа моноклональных антител, или рекомбинантным антителам, поликлональным антителам, мультиспецифическим антителам (например, биспецифическим антителам), образованным по меньшей мере из двух полноразмерных антител, химерным антителам, гуманизированным антителам, полностью человеческим антителам, а также фрагментам указанных антител, если они обладают требуемой биологической активностью.

В контексте настоящего описания понятие "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. из популяции индивидуальных антител, которые являются идентичными и/или связываются с одним и тем же эпитопом за исключением возможных вариантов, которые могут возникать при получении моноклонального антитела, такие варианты, как правило, присутствуют в небольших количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые включают различные антитела к различным детерминантам (эпитопам), мишенью каждого моноклонального антитела является одна детерминанта антигена. Помимо своей специфичности моноклональные антитела обладают тем преимуществом, что они не загрязнены другими иммуноглобулинами. Прилагательное "моноклональный" указывает на тот отличительный признак, что антитело получено из практически гомогенной популяции антител, и оно не подразумевает требования, что антитело должно быть получено каким-либо конкретным методом. Например, моноклональные антитела можно создавать с помощью метода гибридом, впервые описанного у Köhler и др., *Nature*, 256, 1975, с. 495, или их можно создавать методами рекомбинантной ДНК (см., например, US 4816567). "Моноклональные антитела" можно выделять также из фаговых библиотек антител с помощью методов, которые описаны у Clarkson и др., *Nature*, 352, 1991, сс. 624-628 и Marks и др., *J. Mol. Biol.*, 222, 1991, сс. 581-597. Понятия "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" в контексте настоящего описания относятся к препарату, содержащему молекулы антитела, которые имеют одинаковый состав аминокислот. Таким образом, понятие "человеческое моноклональное антитело" относится к антителам, характеризующимся одной специфичностью связывания, которые имеют переменные и константные области, выведенные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие моноклональные антитела получают с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного животного кроме человека, например трансгенной мыши, имеющей геном, который содержит трансген человеческой тяжелой цепи и трансген человеческой легкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой. В контексте настоящего описания под понятие "моноклональные антитела" подпадают, в частности, так называемые химерные антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентичны или гомологичны соответствующим последовательностям антител, которые выведены из конкретных видов или принадлежат к конкретному классу или подклассу антител, а остальная(ые) цепь(и) идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям антител, которые выведены из других видов или принадлежат к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты указанных антител, если они обладают требуемой биологической активностью (US 4816,567; и Morrison и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1984, сс. 6851-6855). Химерные антитела включают "приматизированные" антитела, которые содержат антигенсвязывающие последовательности переменных областей, выведенные из примата кроме человека (например, обезьян Старого Света, человекообразных обезьян), и последовательности человеческих константных областей.

"Фрагменты антитела" представляют собой часть полноразмерного антитела, в частности, содержат антигенсвязывающий центр или переменную область антитела. Примерами фрагментов антитела являются Fab-, Fab'-, F(ab')₂-и Fv-фрагменты; димерные антитела, одноцепочечные молекулы антител, иммунотоксины и мультиспецифические антитела, образованные из фрагмента(ов) антител. Кроме того, фрагменты антител содержат одноцепочечные полипептиды, которые имеют характеристики VH-цепи, а именно, обладают способностью к сборке с VL-цепью, связывающейся с антигеном CD20. Под понятие "фрагменты антител" подпадают также такие фрагменты, которые сами не обладают способностью выполнять эффекторные функции (ADCC/CDC), но обеспечивают указанную функцию после объединения с соответствующей(ими) константной(ыми) областью(ями) антитела.

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

Понятие "вариант аминокислотной последовательности" антитела в контексте настоящего описания относится к антителу, аминокислотная последовательность которого отличается от последовательности основных видов антител. Как правило, варианты аминокислотной последовательности должны быть гомологичны по меньшей мере примерно на 70% последовательностям основных видов антител и предпочтительно должны быть гомологичны по меньшей мере примерно на 80%, более предпочтительно гомологичны по меньшей мере примерно на 90% последовательностям основных видов антител. Варианты аминокислотной последовательности несут замены, делеции и/или добавления в определенных положениях, находящихся внутри последовательностей, или в положениях, примыкающих к последовательно-

ствам основных видов антител. В контексте настоящего описания примерами вариантов аминокислотной последовательности являются кислый вариант (например, деамидированный вариант антитела), основной вариант, антитело, удлиненное лидерной последовательностью (например, VHS-) на аминоконце одной или двух его легких цепей, антитело с С-концевым остатком лизина на одной или двух его тяжелых цепях и т.д., и они включают комбинации вариантов аминокислотных последовательностей тяжелых и/или легких цепей. Вариант антитела может представлять собой антитело, удлиненное лидерной последовательностью на аминоконце одной или двух его легких цепей, необязательно содержащее также другие отличия в аминокислотной последовательности и/или в гликозилировании относительно основных видов антител.

В контексте настоящего описания понятие "вариант гликозилирования" относится к антителу с присоединенными к нему одним или несколькими углеводными фрагментами, которые отличаются от углеводных фрагментов, присоединенных к антителам основных видов. В контексте настоящего описания примерами вариантов гликозилирования являются антитело, несущее олигосахаридную структуру G1 или G2 вместо олигосахаридной структуры G0, присоединенной к его Fc-области, антитело с одним или двумя углеводными фрагментами, присоединенными к одной или двум легким цепям, антитело, у которого отсутствует углевод, присоединенный к одной или двум тяжелым цепям антитела, и т.д. и комбинации вариацией гликозилирования. Кроме того, понятие "вариант гликозилирования" относится также к антителам, созданным с помощью гликоинженерии (со сконструированным гликозилированием), которые описаны, например, в WO 1331266 и USP 7517670.

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

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

В контексте настоящего описания понятие "биологическая активность" моноклонального антитела относится к способности антитела связываться с антигеном и обуславливать поддающийся измерению биологический ответ, который можно оценивать *in vitro* или *in vivo*. Указанная активность может представлять собой антагонистическую (например, если антитело представляет собой антитело к CD20) или агонистическую активность.

Понятие "гуманизованное антитело" относится к антителам, в которых каркасный участок или "гипервариабельные участки" (CDR) модифицированы таким образом, что они содержат CDR иммуноглобулина другой специфичности по сравнению со специфичностью родительского иммуноглобулина. Мышинный CDR можно трансплантировать в каркасный участок человеческого антитела, в результате чего образуется "гуманизованное антитело". Особенно предпочтительными CDR являются CDR, которые содержат последовательности, распознающие антигены, указанные ниже для химерных и бифункциональных антител. Гуманизованные антитела представляют собой главным образом человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из гипервариабельного участка реципиента заменены на остатки из гипервариабельного участка антитела видов кроме человека (антитело-донор), таких как мыши, крысы, кролики или приматы кроме человека, обладающие требуемой специфичностью, аффинностью и активностью. В некоторых случаях остатки каркасного участка (FR) человеческого иммуноглобулина заменяют на соответствующие остатки иммуноглобулина видов кроме человека. Кроме того, гуманизованные антитела могут содержать остатки, которые не присутствуют в антителе-реципиенте или антителе-доноре. Эти модификации осуществляют для дальнейшего усовершенствования характеристик антитела. В целом, гуманизованное антитело должно содержать практически полностью по меньшей мере одну и, как правило, две вариабельные области, в которых все или практически все гипервариабельные петли соответствуют петлям иммуноглобулина видов кроме человека и все или практически все FR имеют последовательность человеческого иммуноглобулина. Гуманизованное антитело необязательно может содержать также, по меньшей мере, часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина (см., например, Riechmann L. и др., Nature 332, 1988, сс. 323-327 и Neuberger M.S. и др., Nature 314, 1985, сс. 268-270).

Понятие "химерное антитело" относится к моноклональному антителу, содержащему вариабельную область, т.е. связывающую область, выведенную из одного источника или видов, и, по меньшей мере, часть константной области, выведенную из другого источника или видов, которое, как правило, получа-

ют методами рекомбинантной ДНК. Наиболее предпочтительными являются химерные антитела, содержащие мышиную переменную область и человеческую константную область. Такие мышинные/человеческие химерные антитела являются продуктом экспрессируемых генов иммуноглобулина, содержащих сегменты ДНК, которые кодируют мышинные переменные области иммуноглобулина, и сегменты ДНК, которые кодируют человеческие константные области иммуноглобулина. Другими формами "химерных антител" являются антитела, в которых класс или подкласс модифицирован или изменен по сравнению с исходным антителом. Такие "химерные" антитела называют также "антителами переключенного класса". Методы получения химерных антител основаны на общепринятых методиках рекомбинантной ДНК и методиках генной трансфекции, и в настоящее время являются хорошо известными в данной области (см., например, Morrison S.L. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1984, сс. 6851-6855; US 5202238 и US 5204244).

Подразумевается, что в контексте настоящего описания понятие "человеческое антитело" включает антитела, имеющие переменную и константную области, выведенные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела хорошо известны в данной области (van Dijk M.A. и van de Winkel J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 2001, сс. 368-374). На основе указанной технологии можно получать человеческие антитела к широкому разнообразию мишеней. Примеры человеческих антител описаны у Kellermann S.A. и др., *Curr Opin Biotechnol.* 13, 2002, сс. 593-597.

Подразумевается, что понятие "рекомбинантное человеческое антитело" в контексте настоящего описания включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют методами рекомбинации, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, такой как NSO- или СНО-клетка, или из животного (например, из мыши), которое является трансгенным в отношении генов человеческого иммуноглобулина, или антитела, экспрессируемые с помощью рекомбинантного экспрессионного вектора, которым трансфектируют клетку-хозяина. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменную и константную области, выведенные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, в преобразованной форме. Рекомбинантные человеческие антитела подвергают *in vivo* соматической гипермутации. Так, аминокислотные последовательности VH-и VL-областей рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, хотя и выведены из последовательностей VH- и VL-областей человеческой зародышевой линии и являются родственными им, но могут не встречаться в существующем в естественных условиях *in vivo* спектре зародышевых линий человеческого антитела.

В контексте настоящего описания понятие "специфически связывается" или "связывается специфически с" относится к антителу, специфически связывающемуся с антигеном CD20. Предпочтительно аффинность связывания характеризуется значением KD, составляющим 10^{-9} молей/л или менее (например, 10^{-10} молей/л), предпочтительно значением KD, составляющим 10^{-10} молей/л или менее (например, 10^{-12} молей/л). Аффинность связывания определяют с помощью стандартного анализа связывания, такого, например, как метод поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®).

Подразумевается, что понятие "молекула нуклеиновой кислоты" в контексте настоящего описания относится к молекулам ДНК и молекулам РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно она представляет собой двухцепочечную ДНК.

"Константные области" не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но они участвуют в эффекторных функциях (таких как ADCC, связывание комплемента и CDC).

Понятия "переменная область" (переменная область легкой цепи (VL), переменная область тяжелой цепи (VH)) в контексте настоящего описания обозначает каждую из пар легких и тяжелых цепей, которые принимают непосредственное участие в связывании антитела с антигеном. Переменные области человеческих легкой и тяжелой цепей имеют одинаковую общую структуру, и каждая область содержит четыре каркасных участка (FR), последовательности которых в значительной степени являются консервативными, соединенные тремя "гиперпеременными участками" (или определяющими комплементарность участками, CDR). Каркасные участки адаптированы к β -складчатой конформации, и CDR могут образовывать петли, соединяющие β -складчатую структуру. CDR в каждой цепи поддерживают свою трехмерную структуру с помощью каркасных участков и образуют вместе с CDR из другой цепи антигенсвязывающий центр. CDR3-участки тяжелой и легкой цепи антитела играют наиболее важную роль в специфичности/аффинности связывания антител.

Понятия "гиперпеременный участок" или "антигенсвязывающий центр антитела" в контексте настоящего описания относятся к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание с антигеном. Гиперпеременный участок содержит аминокислотные остатки из "определяющих комплементарность участков" или "CDR". "Каркасные" или "FR"-участки представляют собой участки переменной области, отличные от остатков гиперпеременного участка, как он определен в настоящем описании.

Таким образом, легкая и тяжелая цепи антитела содержат в направлении от N- к C-концу следующие участки: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR3 тяжелой цепи представляет собой участок, который прежде всего вносит основной вклад в связывание с антигеном. CDR- и FR-участки опре-

деляют согласно стандартной номенклатуре Кэбота (Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1991) и/или как участки из "гипервариабельной петли". Понятия "CD20" и "антиген CD20" в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо, и они включают любые варианты, изоформы и видовые гомологи человеческого CD20, которые в естественных условиях экспрессируются клетками или экспрессируются на клетках, трансфектированных геном CD20. Связывание антитела с антигеном CD20 опосредует уничтожение клеток, экспрессирующих CD20 (например, опухолевой клетки), путем инактивации CD20. Уничтожение клеток, экспрессирующих CD20, может происходить посредством одного или нескольких из следующих механизмов: антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC), индукция клеточной гибели/апоптоза, гомотипическая агрегация и т.д.

Синонимами CD20, принятыми в данной области, являются антиген CD20 В-лимфоцитов, поверхностный антиген В-лимфоцитов B1, Leu-16 и Bp35.

Понятие "антитело к CD20" относится к антителу, которое специфически связывается с антигеном CD20. В зависимости от характеристик связывания и биологической активности антитела к CD20 в отношении антигена CD20 можно различать два типа антител к CD20 (антитела к CD20 типа I и типа II) согласно Cragg M.S. и др., Blood 103, 2004, сс. 2738-2743; и Cragg M.S. и др., Blood 101, 2003, сс. 1045-1052 (см. табл. 1).

Таблица 1. Свойства антител к CD20 типа I и типа II

Антитела к CD20 типа I	Антитела к CD20 типа II
Эпитоп CD20 типа I	Эпитоп CD20 типа II
Локализуют CD20 в липидных «плотиках»	Не локализуют CD20 в липидных «плотиках»
Повышенный уровень CDC (в случае IgG1-изотипа)	Пониженный уровень CDC (в случае IgG1-изотипа)
ADCC-активность (в случае IgG1-изотипа)	ADCC-активность (в случае IgG1-изотипа)
Полная связывающая активность	Пониженная связывающая активность
Гомотипическая агрегация	Более сильная гомотипическая агрегация
Индукция апоптоза при перекрестном сшивании	Сильная индукция клеточной гибели без перекрестного сшивания

Одним из основных свойств антител к CD20 типа I и типа II является их механизм связывания. Так, антитела к CD20 типа I и типа II можно классифицировать по соотношению способностей указанного антитела к CD20 и ритуксимаба связывать CD20 на Raji-клетках (клетки линии африканской лимфомы Беркитта) (ATCC № CCL-86).

В контексте настоящего описания "антитело к CD20" может представлять собой антитело либо типа I, либо типа II. Предпочтительно оно представляет собой антитело типа I, наиболее предпочтительно ритуксимаб.

Антитела к CD20 типа I характеризуются тем, что соотношение способностей указанного антитела к CD20 и ритуксимаба связывать CD20 на Raji-клетках (ATCC № CCL-86) составляет от 0,8 до 1,2, предпочтительно от 0,9 до 1,1. Примерами указанных антител к CD20 типа I являются, например, ритуксимаб, описанный в EP 2000149B1 (Anderson и др., см. фиг. 4 и 5), 1F5 IgG2a (ECACC, гибридома; Press и др., Blood 69/2, 1987, сс. 584-591), H147 IgG3 (ECACC, гибридома), 2C6 IgG1 (описанный в WO 2005/103081), 2F2 IgG1 или офатумумаб (описанный в WO 2004/035607 и WO 2005/103081) и 2H7 IgG1 (описанный в WO 2004/056312) и в WO 2006/084264 (например, варианты, представленные в таблицах 1 и 2). Указанным антителом к CD20 типа I может служить моноклональное антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и ритуксимаб.

Антитела к CD20 типа II характеризуются тем, что соотношение способностей указанного антитела к CD20 и ритуксимаба связывать CD20 на Raji-клетках (ATCC № CCL-86) составляет от 0,3 до 0,6, предпочтительно от 0,35 до 0,55, более предпочтительно от 0,4 до 0,5. Примерами указанных антител к CD20 типа II являются, например, тозитумумаб (B1 IgG2a), гуманизированное антитело B-Lyl изотипа IgG1 (химерное гуманизированное антитело изотипа IgG1 описано в WO 2005/044859), 11B8 IgG1 (описано в WO 2004/035607) и AT80 IgG1. Предпочтительным антителом к CD20 типа II является моноклональное антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и гуманизированное антитело B-Lyl (описанное в WO 2005/044859).

"Соотношение способностей антитела к CD20 и ритуксимаба связывать CD20 на Raji-клетках (ATCC № CCL-86)" определяют методом прямой иммунофлуоресценции (измеряют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI)) с помощью устройства FACS Array (фирма Becton Dickinson), используя

указанное антитело к CD20, конъюгированное с Cy5, и ритуксимаб, конъюгированный с Cy5, на Raji-клетках (ATCC № CCL-86), и рассчитывают следующим образом: Соотношение способности связывать CD20 на Raji-клетках (ATCC № CCL-86)=

$$\frac{\text{MFI}(\text{Cy5-антитело к CD20})}{\text{MFI}(\text{Cy5-ритуксимаб})} \times \frac{\text{уровень Cy5-мечения (Cy5-ритуксимаб)}}{\text{уровень Cy5-мечения (Cy5-антитело к CD20)}}$$

MFI обозначает среднюю интенсивность флуоресценции. "Уровень Cy5-мечения" в контексте настоящего описания означает количество меченных Cy5 молекул на молекулу антитела.

Как правило, для указанного антитела к CD20 типа I характерно соотношение способностей указанного первого антитела к CD20 и ритуксимаба связывать CD20 на Raji-клетках (ATCC № CCL-86), составляющее от 0,8 до 1,2, предпочтительно от 0,9 до 1,1.

Как правило, для указанного антитела к CD20 типа II характерно соотношение способностей указанного второго антитела к CD20 и ритуксимаба связывать CD20 на Raji-клетках (ATCC № CCL-86), составляющее от 0,3 до 0,6, предпочтительно от 0,35 до 0,55, более предпочтительно от 0,4 до 0,5.

Указанное антитело к CD20 типа II, предпочтительно гуманизированное антитело B-Ly1, может обладать повышенной антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC).

Под "антителом, обладающим повышенной антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC)" подразумевается антитело, характеристики которого описаны выше, обладающее повышенной ADCC при определении с помощью любого пригодного метода, известного обычным специалистам в данной области. Один из приемлемых анализов in vitro ADCC предусматривает, что:

1) в анализе используют клетки-мишени, для которых известно, что они экспрессируют антиген-мишень, распознаваемый антигенсвязывающей областью антитела;

2) в качестве эффекторных клеток в анализе используют мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), выделенные из крови произвольно выбранного здорового донора;

3) анализ осуществляют согласно следующему протоколу:

I) выделяют PBMC с помощью стандартных процессов центрифугирования в градиенте плотности и суспендируют из расчета 5×10^6 клеток/мл в RPMI-среде для культивирования клеток;

II) выращивают клетки-мишени с помощью стандартных методов культивирования тканей, собирают клетки на экспоненциальной фазе роста, жизнеспособность которых превышает 90%, отмывают в RPMI-среде для культивирования клеток, метят ^{51}Cr (100 мКи), отмывают дважды в среде для культивирования клеток и ресуспендируют в среде для культивирования клеток с плотностью 10 клеток/мл;

III) осуществляют трансфекцию, используя по 100 мкл указанной выше конечной суспензии клеток-мишеней на каждую лунку 96-луночного титрационного микропланшета;

IV) осуществляют серийное разведение антитела от 4000 до 0,04 нг/мл в среде для культивирования клеток и добавляют по 50 мкл образовавшихся растворов антитела к клеткам-мишеням в 96-луночном титрационном микропланшете, оценивают в трех повторностях антитело в различных концентрациях, покрывающих весь диапазон указанных выше концентраций;

V) для контроля максимального высвобождения (MR) в 3 дополнительные лунки в планшете, содержащие меченые клетки-мишени, вносят по 50 мкл 2%-ного (VN) водного раствора неионогенного поверхностно-активного вещества (Nonidet, фирма Sigma, Сент-Луис) вместо раствора антитела (пункт IV, выше);

VI) для контроля спонтанного высвобождения (SR) в 3 дополнительные лунки в планшете, содержащие меченые клетки-мишени, вносят по 50 мкл RPMI-среды для культивирования клеток вместо раствора антитела (пункт IV, выше);

VII) затем 96-луночный титрационный микропланшет центрифугируют при $50 \times g$ в течение 1 мин и инкубируют в течение 1 ч при 4°C ;

VIII) добавляют по 50 мкл суспензии PBMC (пункт I, выше) в каждую лунку для обеспечения соотношения эффекторная клетка:клетка-мишень 25:1, и планшеты помещают в инкубатор в атмосферу, содержащую 5% CO_2 , на 4 ч при 37°C ;

IX) собирают бесклеточный супернатант из каждой лунки и количественно оценивают высвободившуюся в эксперименте радиоактивность (ER) с помощью гамма-счетчика;

X) рассчитывают процент удельного лизиса для каждой концентрации антитела с помощью формулы $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$, где ER представляет собой среднюю радиоактивность (см. пункт IX, выше), определенную для указанной концентрации антитела, MR представляет собой среднюю радиоактивность (см. пункт IX, выше), определенную для MR-контролей (см. пункт V, выше), а SR представляет собой среднюю радиоактивность (см. пункт IX, выше), определенную для SR-контролей (см. пункт VI, выше);

4) определяют "повышенный уровень ADCC" или по повышению максимального процента удельного лизиса, обнаруженного в указанном выше диапазоне концентраций антитела, и/или по снижению концентрации антитела, требуемой для достижения половины от максимального процента специфического лизиса, обнаруженного в указанном выше диапазоне концентраций антитела. Повышение уровня ADCC определяют относительно уровня ADCC, измеренного с помощью описанного выше анализа, опосредуемого таким же антителом, полученным с использованием такого же типа клеток-хозяев, с исполь-

зованием таких же стандартных методов очистки, приготовления форм и хранения, которые хорошо известны специалистам в данной области, но которое не получено с использованием клеток-хозяев, сконструированных так, что они сверхэкспрессируют GnTIII.

Указанную "повышенную (повышенный уровень) ADCC" можно получать путем гликоинженерии указанных антител, что означает достижение повышения встречающихся в естественных условиях опосредуемых клеткой эффекторных функций моноклональных антител путем инженерии их олигосахаридного компонента согласно методу, описанному у Umana, P. и др., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180 и в US 6602684.

Понятие "комплементзависимая цитотоксичность (CDC)" относится к лизису человеческих опухолевых клеток-мишеней антителом в присутствии комплемента. CDC предпочтительно оценивают путем обработки препарата экспрессирующих CD20 клеток антителом к CD20 в присутствии комплемента. Считается, что имеет место CDC, если антитело при его использовании в концентрации 100нМ индуцирует лизис (гибель клеток) 20% или более опухолевых клеток в течение 4 ч. Анализ предпочтительно осуществляют с помощью меченных ⁵¹Cr или Eu опухолевых клеток и оценивают высвобождение ⁵¹Cr или Eu. В качестве контроля опухолевые клетки-мишени инкубируют с комплементом без антитела.

Как правило, антитела к CD20 типа I и типа II изотипа IgG1 характеризуются наличием CDC-активности. Антитела к CD20 типа I обладают повышенной CDC (если относятся к изотипу IgG1), а антитела к CD20 типа II обладают пониженной CDC (если относятся к изотипу IgG1) по сравнению друг с другом. Предпочтительно антитела к CD20 типа I и типа II представляют собой антитела изотипа IgG1.

Антитело "ритуксимаб" представляет собой созданное с помощью генетической инженерии химерное человеческое/мышинное содержащее человеческую гамма-1 константную область моноклональное антитело к человеческому антигену CD20. Это химерное антитело содержит человеческие гамма-1 константные области, и оно идентифицировано под названием "C2B8" в EP 2000149B1 (Anderson K.C. и др., см., например, фиг. 4 и 5). Ритуксимаб разрешен для лечения пациентов, страдающих рецидивирующей или рефрактерной, низкой степени злокачественности или фолликулярной, CD20-позитивной, В-клеточной не-ходжкинской лимфомой. Изучение механизма действия в опытах *in vitro* продемонстрировало, что ритуксимаб обладает зависимой от человеческого комплемента цитотоксичностью (CDC) (Reff M.E. и др., *Blood* 83(2), 1994, сс. 435-445). Кроме того, он обладает выраженной активностью в анализах по оценке антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности (ADCC).

Понятие "гуманизированное антитело B-Ly1" относится к гуманизированному антителу B-Ly1, описанному в WO 2005/044859, которое получали из мышинного моноклонального антитела к CD20 B-Ly1 (вариабельная область мышинной тяжелой цепи (VH): SEQ ID NO: 1; вариабельная область мышинной легкой цепи (VL): SEQ ID NO: 2 - см. Poppema S. и Visser L., *Biotest Bulletin* 3, 1987, сс. 131-139;) путем химеризации с человеческой константной областью из IgG1 и последующей гуманизации (см. WO 2005/044859). Эти "гуманизированные антитела B-Ly1" описаны подробно в WO 2005/044859.

Предпочтительно "гуманизированное антитело B-Ly1" имеет вариабельную область тяжелой цепи (VH), выбранную из SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 20 (B-HH2 - B-HH9 и B-HL8 - B-HL17, которые описаны в WO 2005/044859). Наиболее предпочтительно VH представляет собой BHH6. Предпочтительно "гуманизированное антитело B-Ly1" имеет вариабельную область легкой цепи (VL), которая представлена в SEQ ID NO: 20 (B-KV1 в WO 2005/044859). Кроме того, гуманизированное антитело B-Ly1 предпочтительно представляет собой антитело изотипа IgG1. Предпочтительно указанные гуманизированные антитела B-Ly1 созданы с помощью гликоинженерии (GE) в Fc-области согласно методам, описанным в WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, у Umana P. и др., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180 и WO 99/154342. Наиболее предпочтительные созданные с помощью гликоинженерии гуманизированные антитела B-Ly1 имеют измененную схему гликозилирования в Fc-области, предпочтительно имеют пониженный уровень фукозных остатков. Предпочтительно по меньшей мере 40% или более (40% до 60%, по меньшей мере 50% и по меньшей мере 70% или более) олигосахаридов Fc-области являются нефукозилированными. Кроме того, олигосахариды Fc-области предпочтительно являются бисекционными. Наиболее предпочтительно "гуманизированное антитело B-Ly1" содержит VH B-HH6 и VL B-KV1, которые описаны в WO 2005/044859. В контексте настоящего описания антитело обозначают также как "HuMab<CD20>". Указанное антитело имеет международное непатентованное название (INN) афутузумаб. Указанное антитело имеет пониженный уровень фукозных остатков, как указано выше, и/или олигосахариды в Fc-области наиболее предпочтительно являются бисекционными. Указанное антитело характеризуется повышенной ADCC, как указано выше.

Олигосахаридный компонент может оказывать существенное влияние на свойства, имеющие отношение к эффективности терапевтического гликопротеина, включая физическую стабильность, устойчивость к воздействию протеаз, взаимодействия с иммунной системой, фармакокинетические параметры и специфическую биологическую активность. Указанные свойства могут зависеть не только от присутствия или отсутствия олигосахаридов, но также от их специфических структур. Можно сделать определенные обобщения, касающиеся зависимости структуры олигосахарида и функции гликопротеина. Например, некоторые структуры олигосахарида опосредуют быстрый клиренс гликопротеина из кровотока в результате взаимодействий со специфическими связывающими углеводы белками, а другие могут связы-

ваться антителами и запускать нежелательные иммунные реакции (Jenkins N. и др., *Nature Biotechnol.* 14, 1996, сс. 975-981).

Клетки млекопитающих являются предпочтительными хозяевами для производства терапевтических гликопротеинов благодаря их способности гликозилировать белки с получением наиболее приемлемой для применения на человеке формы (dimming D.A. и др., *Glycobiology* 1, 1991, сс. 115-130; Jenkins N. и др., *Nature Biotechnol.* 14, 1996, сс. 975-981). Бактерии очень редко гликозилируют белки, и подобно другим типам обычных хозяев, таких как клетки дрожжей, нитчатых грибов, насекомых и растений, обеспечивают схемы гликозилирования, ассоциированные с быстрым клиренсом из кровотока, нежелательными иммунными взаимодействиями и в некоторых случаях пониженной биологической активностью. Среди клеток млекопитающих клетки яичника китайского хомячка (CHO) нашли наиболее широкое применение в течение двух последних десятилетий. Помимо обеспечения приемлемых схем гликозилирования эти клетки позволяют устойчиво получать генетически стабильные, высокопродуктивные клональные клеточные линии. Их можно культивировать, достигая высокой плотности, в простых биореакторах с использованием бессывороточных сред, и на их основе можно разрабатывать безопасные и воспроизводимые биопроцессы. Другими обычно применяемыми клетками животных являются клетки почки детеныша хомяка (BHK), клетки мышинной миеломы NSO и SP2/0. В последние годы изучали также возможность производства в трансгенных животных (Jenkins N. и др., *Nature Biotechnol.* 14, 1996, сс. 975-981).

Все антитела содержат углеводные структуры в консервативных положениях в константных областях тяжелой цепи, при этом каждый изотип характеризуется различной организацией N-связанных углеводных структур, которые оказывают различное действие на сборку, секрецию и функциональную активность белка (Wright A. и Monison S. L., *Trends Biotech.* 15, 1997, сс. 26-32). Структура присоединенного N-связанного углевода значительно варьируется в зависимости от степени процессирования и может включать имеющие высокое содержание маннозы, множество разветвлений, а также биантенные сложные олигосахариды. Как правило, имеет место гетерогенный процессинг структур коровых олигосахаридов, присоединенных в конкретном сайте гликозилирования, в результате чего даже моноклональные антитела существуют в виде нескольких гликоформ. Было установлено также, что основные различия в гликозилировании антител имеют место между клеточными линиями, и даже при выращивании данной клеточной линии в других условиях культивирования возникают небольшие различия (Lifely M. R. и др., *Glycobiology* 5(8), 1995, сс. 813-22).

Одним из путей достижения значительного повышения эффективности при сохранении простого процесса получения и, который, по-видимому, может обеспечить отсутствие значительных нежелательных побочных действий, является усиление встречающихся в естественных условиях обусловленных клеткой эффекторных функций моноклональных антител путем конструирования их олигосахаридного компонента согласно методу, описанному у Umana P. и др., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180; и US 6602684. Антитела IgG1-типа, которые наиболее часто применяют в иммунотерапии рака, представляют собой гликопротеины, имеющие консервативный N-связанный сайт гликозилирования на Asn297 в каждом CH2-домене. Два сложных биантенных олигосахарида, присоединенных к Asn297, располагаются между CH2-доменами, формируя обширный контакт с полипептидным каркасом, и их присутствие является важным для того, чтобы антитело могло осуществлять эффекторные функции, такие как антитело-обусловленная клеточная зависимость цитотоксичность (ADCC) (Lifely M.R. и др., *Glycobiology* 5, 1995, сс. 813-822; Jefferis R. и др., *Immunol. Rev.* 163, 1998, сс. 59-76; Wright A. и Morrison S.L., *Trends Biotechnol.* 15, 1997, сс. 26-32).

Ранее было установлено, что сверхэкспрессия $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминтрансферазы III ("GnTIII"), т.е. гликозилтрансферазы, катализирующей образование бисекционных олигосахаридов, значительно повышает *in vitro* ADCC-активность антинеопластического химерного моноклонального антитела (chCE7), продуцируемого сконструированными CHO-клетками (см. Umana P. и др., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180; и WO 99/154342, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки). Антитело chCE7 принадлежит к большому классу неконъюгированных моноклональных антител, которые обладают высоким уровнем аффинности и специфичности в отношении опухолей, но обладают слишком низкой эффективностью для их клинического применения при производстве в стандартных применяемых в промышленности промышленных клеточных линиях, в которых отсутствует фермент GnTIII (Umana P. и др., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180). В этом исследовании впервые было продемонстрировано, что значительное повышение ADCC-активности можно достигать путем создания продуцирующих антитела клеток, которые экспрессируют GnTIII, что приводит также к повышению относительного содержания ассоциированных с константной областью (Fc) бисекционных олигосахаридов, включая бисекционные нефукозилированные олигосахариды, по сравнению с уровнями, характерными для встречающихся в естественных условиях антител.

Подразумевается, что понятие "экспрессия антигена CD20" относится к значительному уровню экспрессии антигена CD20 в клетке, предпочтительно на клеточной поверхности В-клетки, более предпочтительно В-клетки из опухоли или рака соответственно, предпочтительно из опухоли, не относящейся к плотным опухолям. Пациентов, которые имеют "рак, при котором происходит экспрессия CD20", можно

выявлять с помощью стандартных анализов, известных в данной области. Подразумевается, также, что понятие "экспрессия антигена CD20" предпочтительно относится к значительному уровню экспрессии антигена CD20 в клетке, предпочтительно на клеточной поверхности В-клетки, более предпочтительно В-клетки, при аутоиммунном заболевании. Например, экспрессию антигена CD20 оценивают иммуногистохимическим (ИГХ) методом, FACS или путем выявления с помощью ПЦР соответствующей мРНК.

Понятия "пациенты" или "индивидуумы" относятся к любым млекопитающим, страдающим состояниями или заболеваниями, и предпочтительно относятся к людям.

В контексте настоящего описания понятие "рак, при котором происходит экспрессия CD20", предпочтительно относится к лимфомам (предпочтительно В-клеточным не-ходжкинским лимфомам (НХЛ)) и лимфолейкозам. Указанные лимфомы и лимфолейкозы включают, например, а) фолликулярные лимфомы, б) мелкоклеточные с нерасщепленными ядрами лимфомы/лимфому Беркитта (включая эндемическую лимфому Беркитта, спорадическую лимфому Беркитта и не-беркиттовскую лимфому), в) лимфомы маргинальной зоны (включая экстранодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны (лимфомы лимфоидной ткани слизистых оболочек, MALT), нодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны и лимфому маргинальной зоны селезенки), г) лимфому из клеток зоны мантии (MCL), д) крупноклеточную лимфому (включая В-клеточную диффузную крупноклеточную лимфому (DLCL), диффузную смешанно-клеточную лимфому, иммунобластную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, ангиоцентрическую лимфому-легочную В-клеточную лимфому), е) волосовоклеточный лейкоз, ж) лимфоцитарную лимфому, Вальденстрема макроглобулинемию, з) острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфолейкоз (CLL)/мелкоклеточный лимфолейкоз (SLL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, и) неоплазмы из плазматических клеток, миеломы из плазматических клеток, множественную миелому, плазмацитому, к) болезнь Ходжкина.

Предпочтительно рак, при котором происходит экспрессия CD20, представляет собой В-клеточные не-ходжкинские лимфомы (НХЛ). Другими примерами рака, при котором происходит экспрессия CD20, являются лимфома из клеток зоны мантии (MCL), острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфолейкоз (CLL), В-клеточная диффузная крупноклеточная лимфома (DLCL), лимфома Беркитта, волосовоклеточный лейкоз, фолликулярная лимфома, множественная миелома, лимфома маргинальной зоны, пост-трансплантационное лимфопролиферативное нарушение (PTLD), ассоциированная с ВИЧ лимфома, Вальденстрема макроглобулинемия или первичная лимфома ЦНС.

В контексте настоящего описания "аутоиммунное заболевание" относится к заболеванию или нарушению, которое возникает в результате воздействия на собственные ткани индивидуума и направлено против собственных тканей индивидуума. Примерами аутоиммунных заболеваний или нарушений являются (но, не ограничиваясь только ими) артриты (ревматоидный артрит, юношеский ревматоидный артрит, остеоартрит, псориаз, псориатический артрит), псориаз, дерматит, полимиозит/дерматомиозит, токсический эпидермальный некролиз, системная склеродерма и склероз, ответы, ассоциированные с воспалительным заболеванием кишечника, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, респираторный дистресс-синдром, респираторный дистресс-синдром взрослых (ARDS), менингит, энцефлит, увеит, колит, гломерулонефрит, аллергические состояния, экзема, астма, состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток и хронические воспалительные ответы, атеросклероз, аутоиммунный миокардит, дефицит адгезии лейкоцитов, системная красная волчанка (SLE), юношеский диабет, рассеянный склероз, аллергический энцефаломиелит, иммунные ответы, ассоциированные с острой и отложенной гиперчувствительностью, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами, туберкулез, саркоидоз, грануломатоз, включая грануломатоз Вегенера, агранулоцитоз, васкулит (включая АНЦА-ассоциированный васкулит), апластическая анемия, анемия Даймонда-Блекфана, иммунная гемолитическая анемия, включая аутоиммунную гемолитическую анемию (AIHA), пернициозная анемия, эссенциальная апластическая анемия (PRCA), дефицит фактора VIII, гемофилия А, аутоиммунная нейтропения, панцитопения, лейкопения, заболевания, включая диapedез лейкоцитов, воспалительные нарушения центральной нервной системы (ЦНС), синдром множественных повреждений органов, тяжелая псевдопаралитическая миастения, болезни, опосредуемые комплексом антиген-антитело, болезнь, связанная с антигломерулярными антителами к базальной мембране, синдром, связанный с антителами к фосфолипидам, аллергический неврит, болезнь Бехчета, синдром Кастлемана, синдром Гудпасчера, миастенический синдром Лэмберта-Итона, синдром Рейно, синдром Шегрена, синдром Стивенса-Джонсона, буллезный пемфигоид, пузырчатка, аутоиммунные полиэндокринопатии, нефропатия, связанные с IgM полиневропатии или опосредуемая IgM невропатия, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP), тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP), аутоиммунная тромбоцитопения, аутоиммунное заболевание яичек и яичника, включая аутоиммунный орхит и оофорит, первичный гипотиреоз; аутоиммунные эндокринные болезни, включая аутоиммунный тиреоидит, хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото), подострый тиреоидит, идиопатический гипотиреоз, болезнь Аддисона, болезнь Грейвса, аутоиммунные полигландулярные синдромы (или синдромы полигландулярной I эндокринопатии), диабет типа I, известный также как инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM) и синдром Шихена; аутоиммунный гепатит, лимфоидный интерстициальный пневмонит (ВИЧ), облитерирующий бронхиолит (не связанный с трансплантацией) vs NSIP (неспецифическая интерстициальная пневмония), синдром Гийена-Барре, васкулит крупных сосудов (включая ревматическую

полимиалгию и гигантоклеточный артерит (Такаясу), васкулит средних сосудов (включая болезнь Кавасаки и нодозный полиартрит), анкилозирующий спондилоартрит, болезнь Берже (IgA-нефропатия), быстро прогрессирующий гломерулонефрит, первичный билиардный цирроз, спру-целиакия (глютенная энтеропатия), криоглобулинемия, амиотрофический боковой склероз (ALS), болезнь коронарной артерии и т.д.

"Ингибирующий рост агент" в контексте настоящего описания относится к соединению или композиции, которое/которая ингибирует рост клетки, прежде всего экспрессирующей CD20 раковой клетки, либо *in vitro*, либо *in vivo*. Так, ингибирующий рост агент может представлять собой агент, который значительно снижает процент экспрессирующих CD20 клеток на S-фазе. Примерами ингибирующих рост агентов являются агенты, которые блокируют этапы развития клеточного цикла (отличные от S-фазы), например агенты, индуцирующие приостановку G1-фазы и приостановку M-фазы. Классическими блокаторами M-фазы являются алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топо II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Те агенты, которые приостанавливают G1-фазу, распространяют свое действие также на приостановку S-фазы, например ДНК-алкилирующие агенты, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлоретамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C. Дополнительную информацию можно почерпнуть из следующей публикации: "The Molecular Basis of Cancer", под ред. Mendelsohn и Israel, глава 1, озаглавленная "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", Murakami и др. (изд-во WB Saunders: Philadelphia, 1995), см., прежде всего с. 13.

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

Понятие "цитотоксический агент" в контексте настоящего описания относится к субстанции, которая ингибирует или предотвращает функцию клеток и/или вызывает разрушение клеток. Под понятие попадают радиоактивные изотопы (например, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi_{212} , P^{32} и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или обладающие ферментативной активностью токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты. "Химиотерапевтическое средство" представляет собой химическое соединение, которое можно применять для лечения рака. Примерами химиотерапевтических средств являются алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXANTM); алкилсульфонаты, такие как бусульфат, импросульфат и пипосульфат; азиридины, такие как бензодопа, карбоксон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, такие как алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеларнин; ацетогенины (прежде всего буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARENOLTM); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновая кислота; камптотецин (включая синтетические аналоги топотекан (HYCAMTINTM), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSARTM), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновая кислота; тенипозид; криптофицины (прежде всего криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотные аналоги горчичного газа, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлоретамин, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый аналог горчичного газа; нитрозомочевина, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энедин-новые антибиотики (например, калихеамицин, прежде всего калихеамицин гамма 11 и калихеамицин омега 11, см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33, 1994, сс. 183-186); динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; а также неокарциностатина хромофор и родственные хромопротеиновые энедин-новые антибактериальные хромофоры), аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицины, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин (ADRIAMYCINTM), морфолиндоксорубин, цианморфолиндоксорубин, 2-пирролиндоксорубин, доксорубин- HCl для инъекций в виде липосом (DOXILTM), липосомальный доксорубин TLC D-99 (MYOCETTM), пэгиллированный липосомальный доксорубин (CAELYXTM и дезоксидоксорубин), эпирубин, эзрубин, идарубин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин GEMZARTM, тегафур (UFTORALTM), капецитабин (XELODATM), эпотилон и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые ана-

логи, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; антиадренальные средства, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; пополнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдтраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSKL™ (фирма JHS Natural Products, Юджин, шт. Орегон); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (прежде всего токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангвидин); уретан; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); тиопета; таксоид, например паклитаксел (TAXOL™), композиция паклитаксела, сконструированная на основе наночастиц альбумина (ABRAXANE™) и доцетаксел (TAXOTERE™); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин, оксалиптин и карбоплатин; алкалоиды винка, которые препятствуют полимеризации тубулина при образовании микротрубочек, включая винбластин (VELBAN™), винкристин (ONCOVIN™), виндезин (ELDISINE™), (FILDESIN™) и винорелбин (NAVELBINE™); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; леуковорин; новантрон; эдтрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (TARGRETIN™); бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS™ или OSTAC™), этидронат (DIDROCAL™), NE- 58095, золедроновая кислота/золедронат (ZOMETA™), алендронат (FOSAMAJX™), памидронат (AREDIA™), тилудронат (SKELID™) или ризедронат (ACTONEL™); троксацитабин (1,3-диоксолановый аналог нуклеозида цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, прежде всего, ингибирующие экспрессию генов путей передачи сигналов аномальной пролиферации клеток, такие, например, как PKC-альфа, Raf, H-Ras, и рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERATOPE™ и вакцины для генной терапии, например вакцина ALLOVECTIN™, вакцина LEUVECTIN™ и вакцина VAXID™; ингибитор топоизомеразы 1 (например, LURTOTECAN™); gmRH (например, ABA-RELIX™); BAY439006 (сорафениб; фирма Bayer); SU-11248 (фирма Pfizer); перифозин, ингибитор COX-2 (например, целекоксиб или эторикооксиб), ингибитор протеосом (например, PS341); бортезомиб (VELCADE™); CCI-779; типифарниб (R1 1577); орафениб, ABT510; ингибитор Bcl-2, такой как облимерсен натрия (GENA-SENSE™); пиксантрон; ингибиторы EGFR (см. определение ниже); ингибиторы тирозинкиназы (см. определения ниже); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных средств; а также комбинации двух или большего количества указанных средств, такие как CHOP, сокращенное обозначение комбинированной терапии на основе циклофосфамида, доксорубицина, винкристина и преднизолона (необязательно также в сочетании с интерфероном- γ (CHVP/интерферон- γ), FOLFOX, сокращенное обозначение схемы лечения на основе оксалиплатина (ELOXATIN™) в сочетании с 5-ФУ и леуковорином, CVP (циклофосфамид, винкристин и преднизолон), MCP (митозантрон, хлорамбуцил и преднизолон), FC (флударабин и циклофосфамид), ICE (ифосфамид, карбоплатин и этопозид) и дексаметазон, цитарабин и цисплатин (DHAP), дексаметазон, доксорубицин липосомальный и винкристин (DVD) и т.д.

"Антиангиогенное средство" представляет собой соединение, которое блокирует или оказывает определенное интерферирующее воздействие на развитие кровеносных сосудов. Антиангиогенный фактор может представлять собой, например, низкомолекулярное соединение или антитело, которое связывается с фактором роста или рецептором фактора роста, участвующим в ускорении ангиогенеза. В контексте настоящего описания предпочтительным антиангиогенным фактором является антитело, которое связывается с сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF), такое как бевасизумаб (AVASTIN™).

Понятие "цитокин" является родовым названием белков, которые высвобождаются одной клеточной популяцией и оказывают воздействие на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами указанных цитокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. К цитокинам относятся такие ростовые гормоны, как человеческий гормон роста, N-метионилированный человеческий гормон роста и бычий гормон роста, гормон паразитовидных желез, тироксин, инсулин, проинсулин, релаксин; прорелаксин, гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреотропный гормон (ТТГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ), гепатоцитарный фактор роста; фактор роста фибробластов, пролактин, плацентарный лактоген, фактор некроза опухолей α и β , ингибирующее вещество Мюллера, мышинный гонадотропинассоциированный пептид, ингибин; активин, сосудистый эндотелиальный фактор роста, интегрин, тромбопоэтин (ТРО), факторы роста нервов, такие как NGF- β , тромбоцитарный фактор роста; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF- α и TGF- β , инсулиноподобный фактор роста-I и -II, эритропоэтин (ЕРО), остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон- α , - β и - γ , колониестимулирующие факторы (CSF), такие как CSF макрофагов (M-CSF), CSF гранулоцитов-микрофагов (GM-CSF) и CSF

гранулоцитов (G-CSF), интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, фактор некроза опухолей, такой как TNF- α или TNF- β , и другие полипептидные факторы, включая LIF (фактор, ингибирующий миграцию лейкоцитов) и набор лигандов (KL). В контексте настоящего описания понятие "цитокин" относится к белкам, выведенным из встречающихся в естественных условиях источников или из рекомбинантной клеточной культуры, и к биологически активным эквивалентам нативных последовательностей цитокинов.

Понятие "эффективное количество" относится к количеству, обеспечивающему требуемое действие. В случае присутствия фермента гиалуронидазы в качестве ингредиента композиции эффективное количество представляет собой количество, необходимое для повышения диспергирования и абсорбции вводимого совместно антитела к CD20, так, чтобы антитело к CD20 могло оказывать указанное выше терапевтическое действие. В случае фармацевтической лекарственной субстанции оно представляет собой количество действующего вещества, эффективное в отношении лечения заболевания у пациента. Когда заболевание представляет собой рак, эффективное количество лекарственного средства может снижать количество раковых клеток; уменьшать размер опухоли; ингибировать (т.е. в определенной степени замедлять и предпочтительно прекращать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. в определенной степени замедлять и предпочтительно прекращать) метастазирование опухоли; ингибировать в определенной степени рост опухоли; и/или облегчать в определенной степени один или несколько ассоциированных с раком симптомов. Для того чтобы лекарственное средство могло в определенной степени предупреждать рост и/или уничтожать существующие раковые клетки, оно должно обладать цитостатическим и/или цитотоксическим действием. Эффективное количество может удлинять период жизни без прогрессирующего развития заболевания, приводить к целевому ответу на лечение (включая частичный ответ, PR, или полный ответ, CR), повышать общую продолжительность жизни и/или облегчать один или несколько симптомов рака.

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

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

"Стабильная" композиция представляет собой форму, в которой все входящие белки практически сохраняют их физическую стабильность и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность при хранении при соответствующей температуре хранения, например при 2-8°C. Предпочтительно при хранении композиция практически сохраняет свою физическую и химическую стабильность, а также биологическую активность. Период хранения выбирают, как правило, на основе соответствующего периода хранения композиции. Кроме того, композиция должна обладать стабильностью после замораживания (например, до -20°C) и оттаивания композиции, например, после 1 или нескольких циклов замораживания и оттаивания. В данной области известны различные аналитические методы измерения стабильности белков, и они обобщены, например, в: *Peptide and Protein Drug Delivery*, под ред. Vincent Lee, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, New York, 1991, сс. 247-301, и у Jones A., *Adv. Drug Delivery Rev.* 10, 1993, сс. 29-90. Стабильность можно оценивать при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Стабильность можно оценивать качественно и/или количественно разнообразными различными путями, включая оценку образования агрегатов (например, с помощью гель-фильтрации, путем измерения мутности и/или посредством визуальной оценки); путем оценки гетерогенности заряда с помощью катионообменной хроматографии или капиллярного зонального электрофореза; на основе ДСН-ПААГ для сравнения укороченного и интактного антитела; путем оценки биологической активности антитела или его способности связываться с антигеном и т.д. Нестабильность может проявляться в наличии одного или нескольких следующих признаков: агрегация, деамидирование (например, деамидирование Asn), окисление (например, окисление Met), изомеризация (например, изомеризация Asp), отщепление/гидролиз/фрагментация (например, фрагментация шарнирной области), образование сукцинимидов, наличие неспаренного(ых) остатка(ов) цистеина и т.д.

Терапевтические композиции антител приготавливают для хранения путем смешения антитела, имеющего требуемую степень чистоты, необязательно в сочетании с фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, под ред. Osol A.E., 16-е изд., 1980), в форме лиофилизированных препаративных форм или водных растворов. Пригодные носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях.

Понятие "поверхностно-активное вещество" в контексте настоящего описания обозначает фармацевтически приемлемое поверхностно-активное вещество. В композиции количество поверхностно-активного вещества выражают в виде процентов (мас./об.). Наиболее часто применяемой мас./об. единицей является мг/мл. Приемлемыми примерами фармацевтически приемлемых поверхностно-активных веществ являются эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (Твин), полиэтилен-

полипропиленгликоли, полиоксиэтиленстеараты, простые полиоксиэтиленалкиловые эфиры, например простой полиоксиэтиленмонолауриловый эфир, простые алкилфенилполиоксиэтиленовые эфиры (Тритон-Х), сополимеры полиоксиэтилена-полиоксипропилена (полоксамер, плуроник) и додецилсульфат натрия (ДСН). Наиболее приемлемыми эфирами полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот являются полисорбат 20 (поступает в продажу под товарным знаком Tween 20™) и полисорбат 80 (поступает в продажу под товарным знаком Tween 80™). Наиболее приемлемыми сополимерами полиэтилена-полипропилена являются продукты, поступающие в продажу под товарными знаками Pluronic® F68 или Poloxamer 188™. Предпочтительными полиоксиэтиленстеаратами являются продукты, поступающие в продажу под товарным знаком Mupj™. Наиболее приемлемыми простыми полиоксиэтиленалкиловыми эфирами являются продукты, поступающие в продажу под товарным знаком Brij™. Наиболее приемлемыми простыми алкилфенолполиоксиэтиленовыми эфирами являются продукты, поступающие в продажу под товарным знаком Triton-X.

Понятие "буфер" в контексте настоящего описания относится к фармацевтически приемлемому буферу. В контексте настоящего описания понятие "забуферивающий агент, обеспечивающий значение pH на уровне $5,5 \pm 2,0$ " относится к агенту, который препятствует изменению значения pH в содержащем его растворе благодаря действию водящих в конъюгат кислотных/основных компонентов. Пригодными фармацевтически приемлемыми буферами являются (но, не ограничиваясь только ими) гистидиновые буферы, цитратные буферы, глюконатные буферы, сукцинатные буферы, ацетатные буферы, глицилглициновые и другие буферы на основе органических кислот, а также фосфатные буферы. Предпочтительные буферы содержат L-гистидин или смеси L-гистидина и гидрохлорида L-гистидина с придающими изотоничность агентами и обладает способностью регулировать значение pH с помощью кислоты или основания, известных в данной области. Наиболее предпочтительным является L-гистидин.

"Гистидиновый буфер" представляет собой буфер, содержащий аминокислоту гистидин. Примерами гистидиновых буферов является хлорид гистидина, ацетат гистидина, фосфат гистидина, сульфат гистидина. Приведенный в примерах в качестве наиболее приемлемого гистидиновый буфер представляет собой хлорид гистидина. Включающий хлорид гистидина буфер можно получать титрованием L-гистидина (в виде твердого свободного основания) разбавленной соляной кислотой или растворением L-гистидина и гидрохлорида L-гистидина (например, в виде моногидрата) в определенном количестве и соотношении.

Понятие "изотонический" означает, что представляющая интерес композиция имеет практически такое же осмотическое давление, что и человеческая кровь. Изотонические композиции, как правило, имеют осмотическое давление ~ 300 мОсм. Изотоничность можно измерять с помощью осмометра давления пара или криоскопического осмометра.

Понятие "придающие изотоничность агенты" относится к фармацевтически приемлемым придающим изотоничность агентам. Придающие изотоничность агенты применяют для получения изотонической композиции. Изотоническая композиция представляет собой жидкость или жидкость, восстановленную из твердой формы, например лиофилизированной формы, и обозначает раствор, имеющий такую же тоничность, что и некоторый другой раствор, с которым его сравнивают, такой, например, как физиологический соляной раствор и сыворотка крови. Приемлемыми придающими изотоничность агентами являются (но, не ограничиваясь только ими) хлорид натрия (NaCl) или хлорид калия, сахара и сахарные спирты, такие как (но, не ограничиваясь только ими) глюкоза, сахароза, трегалоза или глицерин, и любой компонент, выбранный из группы, включающей аминокислоты, сахара, соли и их комбинации. Придающие изотоничность агенты, как правило, применяют в общем количестве, составляющем от примерно 5 до примерно 350 мМ.

Понятие "жидкая" в контексте настоящего описания применительно к композиции обозначает композицию, которая является жидкой при температуре по меньшей мере от примерно 2 до примерно 8°C.

Понятие "лиофилизированная" в контексте настоящего описания применительно к композиции обозначает композицию, которую сушат путем замораживания композиции и последующей сублимации льда из замороженного состава с помощью любого из методов сушки вымораживанием, известных в данной области, например, с использованием поступающих в продажу устройств для сушки вымораживанием. Понятие "соли" в контексте настоящего описания относится к соли, взятой в количестве от примерно 1 до примерно 500 мМ.

Примерами солей являются (но, не ограничиваясь только ими) соли, состоящие из любых комбинаций катионов натрия, калия, кальция или магния с анионами хлорида, фосфата, цитрата, сукцината, сульфата, или их смеси.

Понятие "аминокислота" в контексте настоящего описания относится к аминокислоте, взятой в количестве от примерно 1 до примерно 100 мг/мл, такой как (но, не ограничиваясь только ими) аргинин, глицин, орнитин, глутамин, аспарагин, лизин, гистидин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, изолейцин, лейцин, аланин, фенилаланин, тирозин, триптофан, метионин, серин и пролин.

В контексте настоящего описания понятие "сахарид" относится к соединению, которое имеет общую формулу $(\text{CH}_2\text{O})_n$, и его производным, включая моносахариды, дисахариды, трисахариды, полиса-

хариды, сахарные спирты, редуцирующие сахара, нередуцирующие сахара и т.д. В контексте настоящего описания примерами сахаридов являются глюкоза, сахароза, трегалоза, лактоза, фруктоза, мальтоза, декстран, глицерин, эритрит, арабит, силит, сорбит, маннит, меллибиоза, мелезитоза, раффиноза, маннотриоза, стахиоза, мальтоза, лактулоза, мальтулоза, глюцит, мальтит, лактит, изомальтулоза и т.д. Под это определение подпадают также глюкозамин, N-метилглюкозамин (так называемый "меглумин"), галактозамин и нейраминаовая кислота и комбинации сахаридов. Предпочтительным сахаридом является нередуцирующий дисахарид, такой как треглоза или сахароза. Наиболее предпочтительным сахаридом является трегалоза.

Понятие "стабилизатор" относится к фармацевтически приемлемым стабилизаторам, таким, например, как (но, не ограничиваясь только ими) аминокислоты и сахара, описанные в приведенных выше разделах, а также поступающие в продажу декстраны любого типа и с любой молекулярной массой, которые известны в данной области.

Понятие "антиоксидант" относится к фармацевтически приемлемому антиоксиданту. Они могут представлять собой эксципиенты, такие как метионин, бензиловый спирт или любой другой эксципиент, применяемый для минимизации окисления.

Понятие "способ лечения" или его эквивалент применительно, например, к раку, относится к процедуре или курсу лечения, которую/который разрабатывают с целью снижения или устранения некоторого количества раковых клеток в организме пациента или для облегчения симптомов рака. "Способ лечения" рака или другого пролиферативного нарушения не обязательно подразумевает, что раковые клетки или другие нарушения должны быть фактически элиминированы, что количество клеток или уровень нарушения фактически должны быть снижены, или что другие симптомы рака или другого нарушения фактически должны быть облегчены. Часто метод лечения рака можно осуществлять даже с небольшой вероятностью успеха, но, тем не менее, он с учетом истории болезни пациента и оцененной перспективы выживаемости пациента, как предполагается, может оказывать общее благоприятное воздействие.

Таким образом, в основу настоящего изобретения положена задача разработать новые высококонцентрированные стабильные фармацевтические композиции обладающего фармацевтической активностью антитела к CD20, предназначенные для подкожной инъекции. Указанные композиции содержат помимо антитела к CD20, присутствующих в высоких концентрациях, забуферивающий агент, стабилизатор или смесь двух или большего количества стабилизаторов, неионогенное поверхностно-активное вещество и применяемый в эффективном количестве по меньшей мере один фермент гиалуронидазу. Получение высококонцентрированных композиций антител является сложной задачей из-за возможного повышения вязкости при более высокой концентрации белка и возможного усиления агрегации белка, явления, которое само по себе зависит от концентрации. Высокая вязкость оказывает отрицательное воздействие на возможность осуществления процесса приготовления (например, на стадиях перекачки насосом и фильтрации) и введения (например, на возможность введения с помощью шприца) композиций антител. В некоторых случаях высокую вязкость можно снижать посредством добавления эксципиентов. Необходимость в осуществлении контроля и анализа агрегации белков повышает сложность процесса получения. Агрегация может происходить на различных стадиях процесса приготовления, таких как ферментация, очистка, приготовление препарата, и в процессе хранения. На агрегационное поведение терапевтического белка могут влиять различные факторы, такие как температура, концентрация белка, стресс, связанный с перемешиванием, замораживание и оттаивание, влияние растворителя и поверхностно-активного вещества, а также химические модификации. В процессе создания высококонцентрированной композиции антитела необходимо осуществлять мониторинг и контроль тенденции к агрегации белка путем добавления различных эксципиентов и поверхностно-активных веществ (Kiese S. и др., J. Pharm. Sci., 97(10), 2008, сс. 4347-4366).

Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция обладающего фармацевтической активностью антитела к CD20 может быть предназначена для парентерального введения. Предпочтительно путь введения представляет собой внутривенное введение в виде болюса или постоянной инфузии в течение определенного периода времени, с помощью внутримышечного, внутривенного, спинномозгового, подкожного, внутрисуставного, интрасиновиального или подоболочечного путей введения. Предпочтительным является внутривенное или подкожное введение антител; подкожное введение является наиболее предпочтительным. Как отмечалось выше, к настоящему времени создание высококонцентрированной стабильной фармацевтической композиции антитела к CD20, практически не содержащей частиц, не является общепринятым. Если указанная композиция предназначена для подкожного применения, то композицию можно объединить с ферментом гиалуронидазой.

Как отмечалось, высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция обладающего фармацевтической активностью антитела к CD20 может представлять собой жидкую форму или может представлять собой лиофилизированную форму. Концентрацию антитела в восстановленной композиции можно повышать путем восстановления лиофилизированной композиции с получением концентрации белка в восстановленной композиции, превышающей примерно в 2-40 раз концентрацию белка в смеси перед осуществлением стадии лиофилизации.

Предпочтительная концентрация антитела к CD20 может составлять от 50 до 150 мг/мл, более

предпочтительно от 75 до 150 мг/мл, еще более предпочтительно 120 ± 20 мг/мл, наиболее предпочтительно примерно 120 мг/мл.

Предпочтительная концентрация забуферивающего агента может составлять от 1 до 50 мМ, более предпочтительно от 10 до 30 мМ; наиболее предпочтительно концентрация составляет примерно 20 мМ. Ниже дополнительно представлены различные забуферивающие агенты, известные специалисту в данной области. Предпочтительный забуферивающий агент выбирают из группы, включающей гистидиновый буфер, ацетатный буфер и цитратный буфер, наиболее предпочтительно буфер L-гистидин/HCl. Гистидиновый буфер можно применять в количестве от примерно 1 до примерно 50 мМ, предпочтительно от примерно 10 до примерно 30 мМ и еще более предпочтительно примерно 20 мМ. Ацетатный буфер можно применять в количестве от примерно 10 до примерно 30 мМ и наиболее предпочтительно примерно 20 мМ. Цитратный буфер можно применять в количестве от примерно 10 до примерно 30 мМ и наиболее предпочтительно примерно 20 мМ.

Вне зависимости от применяемого буфера значение pH должно регулироваться на уровне от примерно 4,5 до примерно 7,0 и предпочтительно от примерно 5,5 до примерно 6,5, предпочтительно также на уровне, выбранном из группы, включающей следующие значения: 5,5, 6,0, 6,1 и 6,5. Для получения указанного значения pH можно регулировать с помощью кислоты или основания, как известно в данной области, или используя соответствующие смеси компонентов буфера, или применяя оба указанных подхода.

Стабилизатор(ы) (указанное понятие в контексте настоящего описания применяется в качестве синонима понятия "стабилизирующий агент") выбирают из группы, включающей соль, углевод, сахарид и аминокислоту(ы), более предпочтительно углевод или сахарид, наиболее предпочтительно сахар, который признается специалистами в качестве приемлемой добавки или эксципиента в фармацевтических композициях, наиболее предпочтительно выбирают из группы, включающей дигидрат α, α -трегалозы, NaCl и метионин. Предпочтительная концентрация стабилизатора может составлять от 15 до 250 мМ или более предпочтительно от 150 до 250 мМ. Наиболее предпочтительно концентрация может составлять примерно 210 мМ. Композиция может содержать вторичный стабилизатор, при этом указанный вторичный стабилизатор предпочтительно представляет собой метионин, предпочтительно в концентрации от 5 до 25 мМ, более предпочтительно в концентрации от 5 до 15 мМ. Наиболее предпочтительная концентрация метионина составляет примерно 10 мМ.

Неионогенное поверхностно-активное вещество предпочтительно представляет собой полисорбат, более предпочтительно выбранный из группы, включающей полисорбат 20, полисорбат 80 и сополимер полиэтилена-полипропилена. Концентрация неионогенного поверхностно-активного вещества может составлять от 0,01 до 0,1% (мас./об.) или от 0,01 до 0,08% (мас./об.), и предпочтительно от 0,02 до 0,06% (мас./об.), наиболее предпочтительно примерно 0,06% (мас./об.).

Понятие "сахар" в контексте настоящего описания относится к фармацевтически приемлемому сахару, который применяют в количестве от примерно 25 до примерно 500 мМ. Предпочтительная концентрация может составлять от 100 до 300 мМ. Более предпочтительная концентрация может составлять от 180 до 240 мМ. Наиболее предпочтительная концентрация может составлять 210 мМ.

Концентрация фермента гиалуронидазы зависит от конкретного фермента гиалуронидазы, применяемого для приготовления композиции. Специалист в данной области на основе представленного ниже описания легко может определять эффективное количество фермента гиалуронидазы. Указанный фермент должен присутствовать в количестве, необходимом и достаточном для повышения диспергирования и абсорбции вводимого совместно антитела к CD20. Эффективное количество фермента гиалуронидазы может составлять примерно от 1000 до 16000 ед./мл, это количество соответствует примерно от 0,01 до 0,16 мг белка с учетом удельной активности, составляющей 100000 ед./мг. Предпочтительная концентрация фермента гиалуронидазы может составлять примерно от 1500 до 12000 ед./мл. Наиболее предпочтительная концентрация может составлять примерно 2000 ед./мл или примерно 12000 ед./мл. Указанные выше количества соответствуют количеству фермента гиалуронидазы, первоначально добавляемому в композицию. Фермент гиалуронидаза присутствует либо в виде комбинированной конечной композиции, либо в форме, предназначенной для совместного применения, например, в виде вспомогательной композиции, как будет изложено ниже.

Фермент гиалуронидазу можно получать из образцов, выделенных из организма животных, человека или производить с использованием технологии рекомбинантной ДНК, что будет описано ниже.

Итак, стабильные фармацевтические композиции могут иметь один из следующих составов:

а) антитело к CD20, где антитело предпочтительно выбрано из группы, включающей ритуксимаб, окрелизумаб или человеческое МАт к CD20 (HuMab<CD20>), в концентрации от 100 до 150 мг/мл; гистидиновый буфер, предпочтительно L-гистидин/HCl с pH примерно 5,5, в концентрации от 1 до 50 мМ; стабилизатор, предпочтительно дигидрат α, α -трегалозы, в концентрации от 15 до 250 мМ и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора в концентрации от 5 до 25 мМ; неионогенное поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, включающей полисорбат 20 и полисорбат 80, предпочтительно в концентрации примерно от 0,02 до 0,06% (мас./об.); и необязательно фермент гиалуронидазу в

концентрации от 1000 до 16000 ед./мл, предпочтительно гHuPH20, наиболее предпочтительно в концентрации 2000 или 12000 ед./мл;

б) антитело к CD20, где антитело предпочтительно выбрано из группы, включающей ритуксимаб, окрелизумаб или HuMab<CD20>, в концентрации 120±20 мг/мл; гистидиновый буфер, предпочтительно L-гистидин/HCl с pH примерно 5,5, в концентрации от 10 до 30 мМ, предпочтительно 20 мМ; стабилизатор, предпочтительно дигидрат α,α-трегалозы, в концентрации от 150 до 250 мМ, предпочтительно 210 мМ, и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора в концентрации от 5 до 25 мМ, предпочтительно от 5 до 15 мМ, наиболее предпочтительно 10 мМ; неионогенное поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, включающей полисорбат 20 и полисорбат 80, предпочтительно в концентрации примерно от 0,02 до 0,06% (мас./об.); и необязательно фермент гиалуронидазу, предпочтительно гHuPH20, в концентрации от 1000 до 16000 ед./мл, предпочтительно от 1500 до 12000 ед./мл, наиболее предпочтительно 2000 или 12000 ед./мл;

в) антитело к CD20, где антитело предпочтительно выбрано из группы, включающей ритуксимаб, окрелизумаб или HuMab<CD20>, в концентрации 120 мг/мл; гистидиновый буфер, предпочтительно L-гистидин/HCl с pH примерно 5,5, в концентрации от 10 до 30 мМ, предпочтительно 20 мМ; стабилизатор, предпочтительно дигидрат α,α-трегалозы, в концентрации от 150 до 250 мМ, предпочтительно 210 мМ, и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора в концентрации от 5 до 25 мМ, предпочтительно от 5 до 15 мМ, наиболее предпочтительно 10 мМ; неионогенное поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, включающей полисорбат 20 и полисорбат 80, предпочтительно в концентрации примерно от 0,02 до 0,06% (мас./об.); и необязательно фермент гиалуронидазу, предпочтительно гHuPH20, в концентрации от 1000 до 16000 ед./мл, предпочтительно от 1500 до 12000 ед./мл, наиболее предпочтительно 2000 или 12000 ед./мл;

г) антитело к CD20, предпочтительно ритуксимаб, в концентрации 120 мг/мл; гистидиновый буфер, предпочтительно L-гистидин/HCl с pH примерно 5,5, в концентрации 20 мМ; дигидрат α,α-трегалозы в концентрации 210 мМ и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора в концентрации 10 мМ; неионогенное поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, включающей полисорбат 20 и полисорбат 80, предпочтительно в концентрации от 0,02 до 0,06% (мас./об.); и необязательно фермент гиалуронидазу, предпочтительно гHuPH20, в концентрации 2000 ед./мл или 12000 ед./мл;

д) лиофилизированная форма, содержащая антитело к CD20, предпочтительно ритуксимаб, в концентрации 120 мг/мл; гистидиновый буфер, предпочтительно L-гистидин/HCl с pH примерно 5,5, в концентрации 20 мМ; дигидрат α,α-трегалозы в концентрации 210 мМ и необязательно метионин в качестве второго стабилизатора в концентрации 10 мМ; неионогенное поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, включающей полисорбат 20 и полисорбат 80, предпочтительно в концентрации от 0,02 до 0,06% (мас./об.); и необязательно фермент гиалуронидазу, предпочтительно гHuPH20, в концентрации 2000 или 12000 ед./мл.

Фармацевтическая композиция обладающего фармацевтической активностью антитела к CD20 может содержать окрелизумаб (например, гуманизированный 2H7.v16) в концентрации примерно от 30 до 350 мг/мл, например примерно от 30 до 100 мг/мл (в том числе примерно 30 мг/мл, примерно 50 мг/мл или примерно 100 мг/мл); забуферивающий агент (например, ацетат натрия), обеспечивающий значение pH 5,5±2,0 (например, pH 5,3) в концентрации примерно от 1 до 100 мМ; стабилизатор или смесь двух или большего количества стабилизаторов (в том числе трегалозу, например дигидрат трегалозы в концентрации примерно 8%) в концентрации примерно от 15 до 250 мМ; неионогенное поверхностно-активное вещество в концентрации примерно от 0,01 до 0,1% (мас./об.) и необязательно, по меньшей мере, фермент гиалуронидазу (например гHuPH20) в эффективном количестве, предпочтительно в концентрации примерно от 1500 до примерно 12000 ед./мл.

Для облегчения подкожной инъекции терапевтических белков предложено использовать в небольших количествах растворимые гликопротеины с гиалуронидазной активностью (sHASEGP) (см. WO 2006/091871). Установлено, что добавление указанных растворимых гликопротеинов с гиалуронидазной активностью (либо в составе комбинированной композиции, либо путем совместного введения) облегчает введение терапевтического лекарственного средства в гиподерму. Путем быстрой деполимеризации гиалуронана (НА) во внеклеточном пространстве фермент sHASEGP снижает вязкость интерстициальной ткани, повышая тем самым гидравлическую проводимость и делая возможным безопасное и удобное введение в подкожную ткань более значительных объемов. Повышенная гидравлическая проводимость, индуцируемая sHASEGP посредством снижения интерстициальной вязкости, обуславливает более высокое диспергирование, потенциально повышая системную биологическую доступность вводимого SC-путем терапевтического лекарственного средства.

Таким образом, высококонцентрированные стабильные фармацевтические композиции, которые содержат растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью, наиболее пригодны для подкожной инъекции. Специалисту в данной области должно быть очевидно, что указанную композицию, содержащую антитело к CD20 и растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью, можно приготавливать для введения в виде одной комбинированной композиции или в альтернативном варианте в

виде двух различных композиций, которые можно смешивать непосредственно перед осуществлением подкожной инъекции. В альтернативном варианте антитело к CD20 и растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью можно вводить путем отдельных инъекций в различные области тела, предпочтительно в области, непосредственно примыкающие друг к другу. Можно также инъектировать терапевтические средства, которые присутствуют в композиции, в виде последовательных инъекций, осуществляя, например, сначала инъекцию растворимого гликопротеина с гиалуронидазной активностью, а затем инъекцию содержащей антитело к CD20 композиции. Указанные инъекции можно осуществлять также и в обратном порядке, т.е. сначала осуществлять инъекцию композиции, содержащей антитело к CD20, а затем инъекцию растворимого гликопротеина с гиалуронидазной активностью. В том случае, когда антитело к CD20 и растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью вводят в виде различных инъекций, то один или оба белка следует приготавливать в сочетании с забуферивающим агентом, стабилизатором(ами) и неионогенным поверхностно-активным веществом, но без фермента гиалуронидазы. Фермент гиалуронидазу можно приготавливать, например, в смеси, содержащей буфер L-гистидин/HCl, pH примерно 6,5, NaCl в концентрации 100-150 мМ и полисорбат 20 или полисорбат 80 в концентрации от 0,01 до 0,1% (мас./об.). Как отмечалось выше, растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью можно рассматривать в качестве дополнительного эксципиента в композиции антитела к CD20. Растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью можно добавлять в композицию антитела к CD20 в момент приготовления композиции антитела к CD20 или его можно добавлять незадолго до инъекции. В альтернативном варианте растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью можно вводить посредством другой инъекции. В последнем случае растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью можно приготавливать в отдельном пузырьке либо в лиофилизированной форме, которую необходимо восстанавливать приемлемыми разбавителями перед осуществлением подкожной инъекции, либо производитель может приготавливать его в виде жидкой композиции. Композицию антитела к CD20 и растворимый гликопротеин с гиалуронидазной активностью можно поставлять в виде отдельных продуктов или можно приготавливать в виде наборов, включающих оба предназначенных для инъекции компонента и соответствующие инструкции по их подкожному введению. Можно снабжать также одну или обе композиции соответствующими инструкциями по восстановлению и/или введению. Из существующего уровня техники известны различные антитела к CD20. Предпочтительно такие антитела представляют собой моноклональные антитела. Они могут представлять собой так называемые химерные антитела, гуманизированные антитела, либо полностью человеческие антитела. Они могут представлять собой любые из следующих видов антител: полноразмерные антитела к CD20; фрагменты антител к CD20, обладающие такой же биологической активностью; включая варианты аминокислотных последовательностей и/или варианты гликозилирования указанных антител или фрагментов. Примерами гуманизированных антител к CD20 являются антитела, известные под Международными непатентованными названиями (INN) ритуксимаб, окрелизумаб и афутузумаб (HuMab<CD20>). Наиболее эффективным терапевтическим антителом к CD20 является ритуксимаб, который поступает в продажу от фирм Genentech Inc. и F. Hoffmann-La Roche Ltd под товарным знаком MABTHERA™ или RITUXAN™.

Антитело к CD20 можно выбирать из группы, включающей ритуксимаб (см., например, US 7381560 и EP 2000149B1 на имя Anderson и др., см., например, фиг. 4 и 5), окрелизумаб (описанный в WO 2004/056312 и в WO 2006/084264 (например, варианты, представленные в таблицах 1 и 2, предпочтительно вариант v.16 или v.114, или v.511)) и афутузумаб (HuMab<CD20>; см. WO 2005/044859). Наиболее предпочтительным антителом к CD20 является ритуксимаб. Понятия "ритуксимаб", "окрелизумаб" и "афутузумаб" (HuMab<CD20>) все относятся к соответствующим антителам к CD20, которые удовлетворяют требованиям, необходимым для получения разрешения на продажу в качестве идентичного или биологически сходного продукта в стране или на территории, выбранной из группы стран, включающей США, страны Европы и Японию. Ритуксимаб имеет CDR-участки, описанные в US 7381560 и EP 2000149B1.

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

Гиподермальный (SC) интерстициальный матрикс состоит из сети волокнистых белков, погруженной в вязкоэластичный гель гликозаминогликанов. Гиалуронан (НА), несulfированный состоящий из повторяющихся звеньев линейный дисахарид, является основным гликозаминогликаном в SC-ткани. НА секретируется в интерстициальную ткань фибробластами в виде высокомолекулярного вязкого полимера с молекулярной массой порядка нескольких мегадальтонов, который затем локально расщепляется в лимфе и в печени под действием лизосомальных гиалуронидаз и экзогликозидаз. Примерно 50% гиалуронана, присутствующего в организме, продуцируется в SC-ткани, в которой он присутствует в количестве, составляющем примерно 0,8 мг/г веса ткани во влажном состоянии (Aukland K. и Reed R., выше). Считается, что у взрослого человека весом 70 кг количество НА составляет 15 г, из которых 30% ежедневно подвергается круговороту (синтезируется и расщепляется) (Laurent L.B. и др., "Catabolism of hya-

luronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver", *Exp. Physiol.*, 76, 1991, сс. 695-703). HA, являющийся основной составляющей гелеподобного компонента гиподермального матрикса, в значительной степени определяет его вязкость.

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

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

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

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

Взаимодействия гиалуронан-белок участвуют также в структуре внеклеточного матрикса или "основного вещества".

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

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

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

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

Гиалуронидазы млекопитающих можно дополнительно подразделять на две группы: ферменты, активные в нейтральной среде, и ферменты, активные в кислой среде. В человеческом геноме выявлено шесть гиалуронидазоподобных генов, а именно, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 и PH20/SPAM1. HYALP1 представляет собой псевдоген, а у HYAL3 не обнаружена ферментативная активность в отношении известных субстратов. HYAL4 представляет собой хондроитиназу и отличается невысоким уровнем активности в отношении гиалуронана. HYAL1 является прототипом активного в кислой среде фермента, а PH20 является прототипом активного в нейтральной среде фермента. Активные в кислой среде гиалуронидазы, такие как HYAL1 и HYAL2, обычно не обладают каталитической активностью при нейтральном значении pH (т.е. при pH 7). Например, HYAL1 обладает слабой каталитической активностью *in vitro* при значении pH, превышающем 4,5 (Frost I.G. и Stern R., "A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents", *Anal. Biochemistry*, 251, 1997, сс. 263-269). HYAL2 представляет собой активный в кислой среде фермент с очень низкой удельной активностью *in vitro*. Гиалуронидазоподобные ферменты можно охарактеризовать также как ферменты, которые, как правило, связаны с плазматической мембраной посредством гликозилфосфатидилинозольного

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

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

При инъекции НА в гиподерму его деполимеризация с помощью sHASEGP происходит в ограниченной области SC-ткани, а именно в месте инъекции.

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

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

Содержащие гиалуронидазу животного происхождения продукты уже применяли в клинических условиях в течение более чем 60 лет, прежде всего для повышения диспергирования и абсорбции других, вводимых совместно лекарственных средств и для гиподермоклиза (SC-инъекция/инфузия жидкости в большом объеме) (Frost G.I., "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", Expert Opinion on Drug Delivery, 4, 2007, сс. 427-440). Особенности механизма действия гиалуронидаз описаны подробно в следующих публикациях: Duran-Reynolds F., "A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action", CR Soc Biol Paris, 1938, сс. 69-81; Chain E., "A mucolytic enzyme in testes extracts", Nature, 1939, сс. 977-978; Weissmann B., "The transglycosylative action of testicular hyaluronidase", J. Biol. Chem., 216, 1955, сс. 783-794; Tammi R., Saamanen A.M., Maibach H.I., Tammi M., "Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture", J. Invest. Dermatol., 97, 1991, сс. 126-130;

Laurent U.B.G., Dahl L.B., Reed R.K., "Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver", *Exp. Physiol.*, 76, 1991, cc. 695-703; Laurent T.C. и Fraser J.R.E., "Degradation of Bioactive Substances: Physiology and Pathophysiology", под ред. Henriksen J.H., изд-во CRC Press, Boca Raton, FL; 1991, cc. 249-265; Harris E.N. и др., "Endocytic function, glycosaminoglycan specificity, and antibody sensitivity of the recombinant human 190-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE)", *J. Biol. Chem.*, 279, 2004, cc. 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, cc. 427-440. Содержащие гиалуронидазу продукты, разрешенные для применения в странах Европейского союза (EU), представляют собой Hylase® "Dessau" и Hyalase®. Содержащие гиалуронидазу животного происхождения продукты, разрешенные для применения в США, включают Vitrase™, Hydase™ и Amphadase™.

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

2 декабря 2005 г. фирма Halozyme Therapeutics Inc. получила разрешение FDA на применение инъекционной композиции рекомбинантной человеческой гиалуронидазы, rHuPH20 (HYLENEX™). От FDA получено разрешение на применение HYLENEX™ в дозе 150 ед. для SC-введения при следующих показаниях: в качестве адьюванта для повышения абсорбции и диспергирования других инъекционных лекарственных средств, для гиподермоклаза, в качестве вспомогательного средства для SC-урографии для улучшения резорбции рентгеноконтрастных агентов.

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

Растворимые гликопротеины с гиалуронидазной активностью (sHASEGP), способ их получения и их применение в фармацевтических композициях описаны в WO 2004/078140.

Фермент гиалуронидаза в композициях повышает степень введения антитела к CD20 в системный кровоток, например, повышая абсорбцию действующего вещества (т.е. действует в качестве усилителя проникновения). Фермент гиалуронидаза повышает также степень введения терапевтического антитела к CD20 в системный кровоток при подкожном пути применения в результате обратимого гидролиза гиалуронана, внеклеточного компонента интерстициальной SC-ткани. Гидролиз гиалуронана в гиподерме приводит к временному открытию каналов в интерстициальном пространстве SC-ткани и тем самым повышает степень введения терапевтического антитела к CD20 в системный кровоток. Кроме того, введение становится менее болезненным для человека и приводит к меньшему связанному с вводимым объемом опуханию SC-ткани.

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

Общей особенностью всех ферментов гиалуронидаз является их способность осуществлять деполимеризацию гиалуронана вне зависимости от различий в химической структуре, виде-источнике, в тка-

нях-источниках или в партиях лекарственного продукта, полученного из одних и тех же видов и тканей. Их отличительной особенностью является то, что их активность является одинаковой (за исключением эффективности) несмотря на различие в структурах.

Фермент гиалуронидаза, применяемый в композиции отличается тем, что не оказывает отрицательного воздействия на молекулярную целостность антитела к CD20 в стабильной фармацевтической композиции. Кроме того, фермент гиалуронидаза модифицирует только введение антитела к CD20 в системный кровоток, но не обладает никакими свойствами, которые могут обуславливать или принимать участие в терапевтических воздействиях абсорбированного системно антитела к CD20. Фермент гиалуронидаза не обладает системной биологической доступностью и не оказывает отрицательного воздействия на молекулярную целостность антитела к CD20 при хранении в рекомендованных условиях стабильной фармацевтической композиции. Поэтому ее можно рассматривать в качестве эксципиента в композиции антитела к CD20. Поскольку она не обладает никаким терапевтическим действием, она представляет собой вспомогательную составную часть фармацевтической формы в отличие от обладающего терапевтической активностью антитела к CD20.

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

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

гHuPH20 представляет собой первый и единственный рекомбинантный человеческий фермент гиалуронидазу, который в настоящее время доступен для терапевтического применения. Встречающийся в естественных условиях человеческий белок PH20 имеет липидный якорь, присоединенный к находящейся на карбоксильном конце аминокислоте, который "закоривает" ее в плазматической мембране. Фермент гHuPH20, разработанный на фирме Halozyme, представляет собой укороченный делеционный вариант, лишенный аминокислот на карбоксильном конце, ответственных за присоединение липида. Это позволяет получать растворимый обладающий активностью при нейтральном значении pH фермент, сходный с белком, который обнаружен в препаратах бычьих яиц. Белок гHuPH20 синтезируют с состоящим из 35 аминокислот сигнальным пептидом, который удаляется с N-конца в процессе секреции. Зрелый белок гHuPH20 содержит ортолог N-концевой аминокислотной последовательности, аутентичный с обнаруженным в некоторых препаратах бычьей гиалуронидазы.

PH20-гиалуронидазы, включая PH20 животного происхождения и рекомбинантную человеческую гHuPH20, катализируют деполимеризацию гиалуронана путем гидролиза β -1,4-связи между C₁-положением N-ацетилглюкозамина и C₄-положением глюкуроновой кислоты. Наименьшим продуктом расщепления является тетрасахарид (Weissmann B., "The transglycosylative action of testicular hyaluronidase", J. Biol. Chem., 216, 1955, сс. 783-794). Эта структура N-ацетилглюкозамин/глюкуроновая кислота не обнаружена в N-сцепленных гликанах рекомбинантных биологических продуктов и поэтому гHuPH20 не влияет на гликозилирование антител, входящих вместе с ней в препаративную форму, таких, например, как трастузумаб. Фермент гHuPH20 сам несет шесть N-сцепленных гликанов на молекулу, имеющую коровьи структуры, сходные с обнаруженными в моноклональных антителах. Установлено, что эти N-сцепленные структуры не изменяются со временем, подтверждая тем самым отсутствие ферментативной активности гHuPH20 в отношении этих N-сцепленных гликановых структур. Короткое время полужизни гHuPH20 и постоянный синтез гиалуронана обуславливают кратковременное и локальное действие фермента на ткани.

Фермент гиалуронидазу, который является эксципиентом в подкожной композиции, можно получать с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Такой путь гарантирует, что в любые моменты времени получают один и тот же белок (идентичная аминокислотная последовательность) и что таким обра-

зом можно избегать аллергической реакции, например, вызываемой загрязняющими белками, которые образуются при совместной очистке в процессе экстракции из ткани. Фермент гиалуронидаза, применяемый в композиции, приведенный в качестве примера в контексте настоящего описания, представляет собой человеческий фермент, а именно gHuPH20.

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

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

Применение gHuPH20 в содержащей антитело к CD20 композиции для SC-введения позволяет осуществлять введение более значительных объемов лекарственного продукта и потенциально приводит к повышению абсорбции вводимого подкожно антитела к CD20, предпочтительно ритуксимаба, в системный кровоток.

Осмотическое давление стабильной фармацевтической композиции, составляет 350 ± 50 мОсм/кг.

В стабильной фармацевтической композиции практически отсутствуют видимые (при оценке человеческим глазом) частицы. Частицы, невидимые невооруженным глазом (при оценке с затемнением света), должны удовлетворять следующим критериям: максимальное количество на флакон частиц размером ≥ 10 мкм - > 6000 максимальное количество на флакон частиц размером ≥ 25 мкм - > 600 . Такую композицию можно применять для приготовления лекарственного средства, пригодного для лечения у индивидуума заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к CD20, предпочтительно такого, например, как рак или незлокачественное заболевание, путем введения индивидууму композиции в количестве, эффективном для лечения указанного заболевания или нарушения. Предпочтительно антитело к CD20 следует вводить совместно, одновременно или последовательно, с химиотерапевтическим средством.

Способ лечения заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к CD20, (например, рака (предпочтительно) или незлокачественного заболевания), у индивидуума, заключается в том, что вводят композицию индивидууму в количестве, эффективном для лечения указанного заболевания или нарушения. При раке или незлокачественном заболевании, как правило, должны присутствовать экспрессирующие CD20 клетки, в результате чего антитело к CD20 в терапевтической фармацевтической предназначенной для SC-введения композиции должно обладать способностью связываться с пораженными клетками. Рак предпочтительно представляет собой рак, при котором происходит экспрессия CD20. Незлокачественное заболевание, которое можно лечить с помощью такой композиции предпочтительно представляет собой указанное выше аутоиммунное заболевание. Предпочтительно антитело к CD20 вводят совместно, одновременно или последовательно, с химиотерапевтическим средством.

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

Для получения предназначенной для подкожного введения композиции антитела к CD20 (предпочтительно ритуксимаба) требуются высокие концентрации антитела (примерно 120 мг/мл) на конечной стадии очистки процесса изготовления. Поэтому к общепринятому процессу получения антитела к CD20 (предпочтительно ритуксимаба) добавляют дополнительную стадию (стадию ультрафильтрации/диафильтрации). Высококонцентрированную стабильную фармацевтическую препаративную форму антитела к CD20 можно получать также в виде стабилизированной композиции белка, которую можно восстанавливать приемлемым разбавителем с получением восстановленной композиции с высокой кон-

центрацией антитела к CD20.

Антитело к CD20 в SC-композиции предпочтительно применяют для лечения рака, предпочтительно рака, при котором происходит экспрессия CD20.

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

Помимо указанных выше анализов практикующим специалистам в данной области известны различные анализы *in vivo*. Например, можно экспонировать клетки в организме пациента антителом, которое необязательно может содержать выявляемую метку, например радиоактивный изотоп, и связывание антитела с клетками пациента можно оценивать, например, наружным сканированием с измерением радиоактивности или путем анализа биопсии, полученной у пациента до обработки антителом.

Очевидно, что содержащую антитело к CD20 предназначенную для SC-введения композицию можно применять также для лечения различных незлокачественных заболеваний или нарушений, таких как аутоиммунные заболевания, упомянутые в настоящем описании; эндометриоз; склеродерма; ретенноз; полипы, такие как полипы ободочной кишки, носовые полипы или полипы желудочно-кишечного тракта; фиброаденома; респираторное заболевание; холецистит; нейрофиброматоз; поликистоз почек; воспалительные заболевания; кожные нарушения, включая псориаз и дерматит; сосудистое заболевание; состояния, включающие аномальную пролиферацию сосудистых эпителиальных клеток; язвы желудочно-кишечного тракта; болезнь Менетрие, секреторные аденомы или синдром потери белка; почечные нарушения; ангиогенные нарушения; глазное заболевание, такое как возрастная дегенерация желтого пятна, синдром предполагаемого глазного гистоплазмоза, неоваскуляризация сетчатки в результате пролиферативной диабетической ретинопатии, васкуляризация сетчатки, диабетическая ретинопатия или возрастная дегенерация желтого пятна; связанные с костной тканью патологии, такие как остеоартрит, рахит и остеопороз; повреждение после церебрального ишемического инсульта; заболевания, связанные с фиброзом или отеком, такие как цирроз печени, фиброз легкого, саркоидоз, тиреоидит, синдром системной гипервязкости, болезнь Рандю-Ослера-Вебера, хроническое облитерирующее заболевание легких или отек, связанный с ожогами, травмой, облучением, "ударом", гипоксией или ишемией; реакция гиперчувствительности кожи; диабетическая ретинопатия и диабетическая нефропатия; синдром Гийена-Барре; реакция "трансплантат-против-хозяина" или отторжение трансплантата; болезнь Педжетта; воспаление кости или сустава; фотостарение (например, вызванное УФ-облучением человеческой кожи); доброкачественная гипертрофия предстательной железы; определенные микробные инфекции, включая вызываемые микробными патогенами, выбранными из аденовирусов, хантавирусов, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia spp.* и *Bordetella pertussis*; тромбоз, связанный с агрегацией тромбоцитов; связанные с репродуктивной системой состояния, такие как эндометриоз, синдром гиперстимуляции яичников, преэклампсия, дисфункциональное маточное кровотечение или менометрорагия; синовит; атерома; острые и хронические нефропатии (включая пролиферативный гломерулонефрит и индуцируемое диабетом заболевание почек); экзема; образование гипертрофированных рубцов; эндотоксический шок и грибная инфекция; семейный аденоматозный полипоз; нейродегенеративные болезни (например, болезнь Альцгеймера, связанная со СПИДом деменция, болезнь Паркинсона, амиотрофический боковой склероз, пигментный ретинит, спинальная мышечная атрофия и дегенерация мозжечка); миелодиспластические синдромы; гипопластическая анемия; ишемическое повреждение; фиброз легкого, почки или печени; опосредуемая Т-клетками реакция гиперчувствительности; детский гипертрофический стеноз привратника; синдром задержки мочи; псориатический артрит и тиреоидит Хашимото. Предпочтительные для лечения незлокачественные состояния упомянуты в настоящем описании.

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

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

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

Предпочтительно входящее в композицию антитело вводят в виде "голового" антитела. Однако вводимое антитело можно конъюгировать с цитотоксическим агентом. Предпочтительно иммуноконъюгат и/или антиген, с которым оно связано, затем интернализуется клеткой, что приводит к повышенной терапевтической эффективности иммуноконъюгата в отношении уничтожения раковой клетки, с которой он связан. Предпочтительно цитотоксический агент оказывает направленное или интерферирующее воздействие на нуклеиновую кислоту в раковой клетке. Примерами таких цитотоксических агентов являются майтанзиноиды, калихеамицины, рибонуклеазы и ДНК-эндонуклеазы. Предпочтительными иммуноконъюгатами являются иммуноконъюгаты ритуксимаб-майтанзиноид, которые аналогично иммуноконъюгату трастузумаб-майтанзиноид (DM1) (T-DM1) описаны в WO 2003/037992, более предпочтительным иммуноконъюгатом является T-MCC-DM1.

При подкожном введении композицию можно вводить с помощью приемлемого устройства, такого как (но, не ограничиваясь только ими) шприц; устройство для инъекции (например, устройства INJECT-EASE™ и GENJECT™); инфузионный насос (такой, например, как Accu-Chek™); ручка-инжектор (например, GENPEN™); безыгольное устройство (например, MEDDECTOR™ и BIOJECTOR™); или с помощью системы введения на основе пластыря для подкожного применения.

Количество композиции указанного антитела к CD20, вводимой с целью предупреждения или лечения заболевания, и время введения должны зависеть от типа (вид, пол, возраст, вес и т.д.) и состояния пациента, подлежащего лечению, и серьезности заболевания или состояния, подлежащего лечению. Для правильного определения дозы важны также такие показатели, как течение заболевания, применяют ли антитело в превентивных или терапевтических целях, предшествующая терапия, история болезни пациента и его ответ на антитело. Окончательное решение о вводимой дозе принимает лечащий врач. Антитело можно вводить пациенту в однократной обработки или серий обработок. В зависимости от типа и серьезности заболевания доза антитела к CD20, составляющая примерно от 1 мкг/кг до 50 мг/кг (например, 0,1-20 мг/кг), представляет собой возможную начальную дозу, предназначенную для введения пациенту.

Предпочтительная доза указанного антитела к CD20 должна составлять от примерно 0,05 до примерно 30 мг/кг веса тела. Так, пациенту можно вводить одну или несколько доз, которые составляют примерно 0,5, 2,0, 4,0, 10 или 30 мг/кг (или любую их комбинацию). В зависимости от типа (вид, пол, возраст, вес и т.д.) и состояния пациента и от типа антитела к CD20 доза указанного первого антитела может отличаться от дозы второго антитела к CD20. Указанные дозы можно вводить ежедневно или периодически, например каждый 3-6 день или даже каждые 1-3 недели. Можно вводить также начальную более высокую ударную дозу с последующим введением одной или нескольких более низких доз. На основе клинических исследований (см. также примеры 3 и 4, в которых в качестве примера, который не ограничивает объем изобретения, описано применение ритуксимаба) в качестве предпочтительных выбрана дозы от 300 до 900 мг/м². Более предпочтительны дозы антитела к CD20 находятся в диапазоне от примерно 375 до примерно 800 мг/м². Предпочтительными конкретными дозами указанного антитела к CD20 являются дозы, составляющие примерно 375 мг/м², примерно 625 мг/м² и примерно 800 мг/м². Предпочтительными являются также фиксированные дозы указанного антитела к CD20.

В качестве фиксированных доз, которые применяют в случае В-клеточных лимфом, предпочтительно неходжкинской лимфомы, используют следующие дозы. Предпочтительно применяют от примерно 1200 до примерно 1800 мг указанного антитела к CD20 на дозу. Более предпочтительными являются дозы, выбранные из группы, включающей примерно 1300, примерно 1500, примерно 1600 и примерно 1700 мг указанного антитела к CD20 на дозу. Наиболее предпочтительно фиксированная доза, которую вводят пациентам, страдающим В-клеточными лимфомами, предпочтительно неходжкинской лимфомой, составляют примерно 1400 мг указанного антитела к CD20 (например, ритуксимаба) на дозу, которую можно вводить согласно различным схемам лечения, включая примерно каждые 2 месяца (в том числе примерно каждые 8 недель), примерно каждые 3 месяца (в том числе примерно каждые 12 недель), примерно 2 года (или более) и т.д. (см. также примеры 3 и 4, в которых в качестве примера, который не ограничивает объем изобретения, описано применение ритуксимаба).

В качестве фиксированных доз, которые вводят пациентам, страдающим лейкозом, предпочтительно хроническим лимфолейкозом (CLL), применяют следующие дозы. Предпочтительно применяют от примерно 1600 до примерно 2200 мг указанного антитела к CD20 на дозу. Более предпочтительными являются дозы, выбранные из группы, включающей примерно 1700, примерно 1800, примерно 1900 и примерно 2100 мг указанного антитела к CD20 на дозу. Фиксированная доза, которую вводят страдающих лейкозом, предпочтительно CLL, пациентам может составлять примерно 1870 мг указанного антитела к CD20 (например, ритуксимаба) на дозу.

В качестве фиксированных доз, которые вводят пациентам, страдающим аутоиммунным заболеванием, таким как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, волчаночный нефрит, диабет, ИТР и васкулит, применяют следующие дозы. Предпочтительно применяют от примерно 1200 до примерно 2200 мг

указанного антитела к CD20 на дозу, например, примерно 1500 мг указанного антитела к CD20 (например, ритуксимаба) на дозу.

Если применяют химиотерапевтическое средство, то его, как правило, вводят в известных дозах или необязательно в более низкой дозе, что может быть связано с совместным действием лекарственных средств или с отрицательными побочными действиями, связанными с применением химиотерапевтического средства. Для подготовки и разработки схем применения указанных химиотерапевтических средств можно использовать инструкции производителя или их может определять эмпирически практикующий специалист в данной области. Подготовка и схемы применения указанной химиотерапии описаны также в: *Chemotherapy Service*, под ред. М.С. Perry, изд-во Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992.

Стабильную фармацевтическую композицию, которая содержит обладающее фармацевтической активностью антитело к CD20, предпочтительно вводят с помощью подкожной инъекции, при этом предпочтительно введение повторяют несколько раз с интервалом 3 недели (q3w). Наиболее предпочтительно полный объем инъецируемой жидкости в большинстве случаев вводят в течение периода времени, составляющего от 1 до 10 мин, предпочтительно от 2 до 6 мин, наиболее предпочтительно 3 ± 1 мин. Наиболее предпочтительно вводят 2 мл/мин, т.е., например, примерно 240 мг/мин. Для многих пациентов, которым не вводят другие внутривенные (IV) химиотерапевтические средства, указанное подкожное применение приводит к повышению удобства для пациентов, поскольку его можно осуществлять путем самовведения в домашних условиях. Это повышает строгость соблюдения больным режима и схемы лечения и снижает/устраняет затраты, связанные с IV-введением (т.е. затраты на осуществление IV-введения, арендную плату койко-дней, перевоз пациента и т.д.). С подкожным введением весьма вероятно должны быть связаны снижение частоты и/или интенсивности связанных с инфузией реакций.

Лекарственное средство можно применять для предупреждения или снижения метастазов или дальнейшей диссеминации у указанного пациента, который страдает раком, при котором происходит экспрессия CD20. Лекарственное средство можно применять для удлинения продолжительности жизни указанного пациента, удлинения периода жизни без прогрессирующего развития заболевания у указанного пациента, удлинения продолжительности ответа, что приводит к статистически значимому и клинически заметному улучшению у подвергающегося лечению пациента согласно таким критериям, как продолжительность жизни, период жизни без прогрессирующего развития заболевания, уровень ответа или продолжительность ответа. Лекарственное средство можно применять для повышения уровня ответа у группы пациентов.

Одно или несколько дополнительных других ростигибирующих, цитотоксических, химиотерапевтических, антиангиогенных, противораковых средств или цитокин(ов) или соединений, которые повышают действие указанных агентов, можно применять в сочетании с антителом к CD20 для лечения рака, при котором происходит экспрессия CD20. Предпочтительно лечение с помощью антитела к CD20 осуществляют без указанных других цитотоксических, химиотерапевтических или противораковых средств или соединений, которые повышают действие указанных агентов.

Указанные средства представляют собой, например: алкилирующие средства или средства с алкилирующим действием, такие как циклофосфамид (CTX; например cytoxan®), хлорамбуцил (CHL; например, leukeran®), цисплатин (CisP; например, platinol®), бусульфан (например, myleran®), мелфалан, кармустин (BCNU), стрептозотозин, триэтиленмеламин (TEM), митомицин С и т.п.; антиметаболиты, такие как метотрексат (MTX), этопозид (VP16; например, verpesid®), 6-меркаптопурин (6MP), 6-тиогуанин (6TG), цитарабин (Ara-C), 5-фторурацил (5-FU), капецитабин (например, Xeloda®), дакарбазин (DTIC) и т.п.; антибиотики, такие как актиномицин D, доксорубин (DXR; например, adriamycin®), даунорубин (дауномицин), блеомицин, митрамицин и т.п.; алкалоиды, такие как алкалоиды барвинка, например винкристин (VCR), винбластин и т.п.; и другие противоопухолевые средства, такие как паклитаксел (например, taxol®) производные паклитаксела, цитостатические средства, глюкокортикоиды, такие как дексаметазон (DEX; например, decadron®) и кортикостероиды, такие как преднизон, ингибиторы нуклеозидных ингибиторы ферментов, такие как гидроксимочевина, истощающие аминокислоты ферменты, такие как аспарагиназа, леуковорин и другие производные фолиевой кислоты, и аналогичные различные противоопухолевые средства. В качестве дополнительных средств можно применять также следующие агенты: арнифостин (например, ethyol®), дактиномицин, мехлоретамин (азотный аналог горчичного газа), стрептозотозин, циклофосфамид, ломустин (CCNU), доксорубин липо (например, doxil®), гемцитабин (например, gemzar®), даунорубин липо (например, daunoxome®), прокарбазин, митомицин, доцетаксел (например, taxotere®), алдеслейкин, карбоплатин, оксалиплатин, кампотецин, СРТ 11 (иринотекан), 10-гидроксиг-7-этилкамптотецин (SN38), флосуридин, флударабин, ифосфамид, идарубин, месна, интерферон бета, интерферон альфа, митоксантрон, топотекан, леупролид, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, пликамицин, митотан, пэгаспаргаза, пентостатин, пипоброман, пликамицин, тамоксифен, тенипозид, тестолактон, тиогуанин, тиотепа, урациловый аналог горчичного газа, винорелбин, хлорамбуцил. Предпочтительно лечение антителом к CD20 осуществляют без указанных дополнительных средств.

Применение цитотоксических и противораковых средств, описанных выше, а также антипролифе-

ративных специфических в отношении мишени противораковых лекарственных средств типа ингибиторов протеинкиназ в химиотерапевтических схемах, как правило, хорошо известно в области противораковой терапии, и их применение предусматривает такие же принципы мониторинга толерантности и эффективности и контроля путей введения и доз, с некоторой корректировкой. Например, фактические дозы цитотоксических агентов могут варьироваться в зависимости от ответов культивируемых клеток пациента, определенных с помощью гистокультур. Как правило, доза должна быть понижена по сравнению с количеством, которое применяют в отсутствии других дополнительных средств.

Типичные дозы эффективных цитотоксических средств могут находиться в диапазонах, рекомендованных производителем, и если это установлено по ответам *in vitro* или ответам на созданных на животных моделях, их концентрацию или количество можно снижать примерно вплоть до 10 раз. Так, фактическая должна зависеть от решения лечащего врача, состояния пациента и эффективности терапевтического метода, основанного на оценке чувствительности *in vitro* первичных культур злокачественных клеток или образца ткани в гистокультуре, или ответов, обнаруженных на соответствующих созданных на животных моделях.

Эффективное количество ионизирующего излучения и/или радиофармацевтических средств можно применять в дополнение к лечению рака, при котором происходит экспрессия CD20, с использованием антитела к CD20. Источник излучения может быть внутренним или внешним относительно пациента, подлежащего лечению. Когда источник является внешним относительно пациента, то терапию называют наружной лучевой терапией (EBRT). Когда источник излучения является внутренним относительно пациента, то лечение обозначают как брахитерапия (BT). Радиоактивные атомы можно выбирать из группы, включающей (но, не ограничиваясь только ими) радий, цезий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, йод-123, йод-131 и индий-111. Можно также метить антитело соответствующими радиоактивными изотопами. Предпочтительно терапию с использованием антитела к CD20 применяют без ионизирующего излучения. Лучевая терапия является стандартным средством лечения для контроля нерезектабельных или неоперабельных опухолей и/или метастазов опухолей. Улучшенные результаты были получены, когда лучевую терапию объединяли с химиотерапией. Лучевая терапия основана на принципе, что высокая доза излучения, поставляемая к области-мишени, может приводить к гибели репродуктивных клеток как в опухоли, так и в здоровых тканях. Схему введения излучения, как правило, определяют в понятиях абсорбированной дозы излучения (Гр), времени и фракционирования, и ее должен тщательно подбирать онколог. Количество излучения, полученное пациентом, должно зависеть от различных обстоятельств, но двумя наиболее важными являются локализация опухоли относительно других имеющих решающее значение структур или органов в организме, и степень распространения опухоли. Типичный курс лечения пациента, подвергающегося лучевой терапии, представляет собой схему лечения в течение периода времени, составляющего от 1 до 6 недель, при этом общую дозу, составляющую от 10 до 80 Гр, вводят пациенту в виде однократной суточной фракционированной дозы, составляющей от 1,8 до 2,0 Гр, 5 дней в неделю. Имеет место синергизм, когда опухоли у больных людей подвергают комбинированной терапии. Другими словами, ингибирование роста опухолей с помощью агентов, входящих в комбинацию, которая содержит антитело к CD20 повышается при объединении с излучением, необязательно в сочетании с дополнительными химиотерапевтическими или противораковыми средствами. Параметры вспомогательной лучевой терапии описаны, например, в WO 99/60023.

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

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

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

Антитело, которое включают в состав композиции, предпочтительно является практически чистым и желателен практически гомогенным (т.е. не содержит белков-загрязнителей и т.д., при этом фермент гиалуронидаза в композиции не рассматривается как белок-загрязнитель моноклонального антитела к CD20).

Для лучшего понимания изобретения оно проиллюстрировано с помощью представленных ниже при-

меров. Однако их не следует рассматривать в качестве ограничивающих объем изобретения. Все процитированные литературные и патентные публикации включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Примеры

Предлагаемые в изобретении содержащие антитело к CD20 композиции, предназначенные для подкожного введения, создавали с учетом представленных ниже экспериментальных результатов с использованием общей методологии получения и аналитических методов и анализов, которые изложены далее.

Пример 1. Получение высококонцентрированных жидких композиций.

Ритуксимаб получали с помощью методов, хорошо известных для получения рекомбинантных белков. Генетически сконструированную линию клеток яичника китайского хомячка (CHO), для создания которой использовали метод, описанный в EP-B-590058, размножали в культуре клеток из мастер-банка клеток. Из жидкой культуры клеток собирали моноклональное антитело ритуксимаб и очищали с помощью основанной на применении иммобилизованного белка А аффинной хроматографии, катионообменной хроматографии, фильтрации для удаления вирусных загрязнителей с осуществлением последующей анионообменной хроматографии и стадии ультрафильтрации/диафильтрации.

gHuPN20 получали с помощью методов, хорошо известных для получения рекомбинантных белков. Этот процесс начинали с оттаивания клеток из рабочего банка клеток (WCB) или мастер-банка клеток (MCB) и размножали в культуре клеток в сериях вращающихся колб с последующим размножением в биореакторе. Клеточную культуру объемом вплоть до 6 л применяли для создания непрерывного источника для поддержания клеток под давлением отбора метотрексатом. После достижения объема размножающейся культуры примерно 36 л культуру переносили в 400-литровый биореактор для получения конечной партии объемом примерно 300 л. Биореактор для получения продукта работал в режиме с периодической подпиткой в отсутствии давления отбора, и продолжительность фазы получения составляла примерно 2 недели. Белок gHuPN20 секретируется в культуральную жидкость. Можно применять также 1000-литровый биореактор для получения конечной партии объемом 500 л. После завершения стадии получения культуру осветляли фильтрацией и затем обрабатывали растворителем/детергентом для инактивации вирусов. Затем белок очищали путем осуществления 4 серий процессов хроматографии на колонках для удаления примесей, связанных с осуществлением процесса и связанных с продуктом. Осуществляли стадию фильтрации вирусов и затем полученную после фильтрации партию продукта концентрировали в конечном буфере: 10 мг/мл gHuPN20 в 20 мМ L-гистидин/HCl-буфере, pH 6,5, 130 мМ NaCl, 0,05% (мас./об.) полисорбата 80. Партию gHuPN20 хранили при температуре ниже -70°C.

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

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

Для приготовления жидких композиций ритуксимаба осуществляли обмен буфера на буфер для диафильтрации, содержащий требуемую буферную композицию, и при необходимости осуществляли концентрирование путем диафильтрации до получения концентрации антитела примерно 200 мг/мл. После завершения процедуры диафильтрации к раствору антитела добавляли эксципиенты (например, трегалозу, gHuPN20, поверхностно-активное вещество) в виде маточных растворов. И, наконец, концентрацию белка доводили буфером до достижения конечной концентрации ритуксимаба, составляющей примерно 120 мг/мл.

Все композиции стерилизовали фильтрацией через 0,22 мкм-фильтры с низкой способностью связывать белки и фильтровали в асептических условиях в стерильные 6-миллилитровые стеклянные пузырьки, снабженные покрытыми ETFE (сополимер этилена и тетрафторэтилена) резиновыми пробками и зажимными алюминиевыми крышками. Объем заполнения составлял примерно 3,0 мл. Эти композиции хранили в различных климатических условиях (5, 25 и 40°C) в течение различных интервалов времени и подвергали стрессу путем встряхивания (1 неделя с частотой встряхивания 200 об/мин при 5 и 25°C) и стрессу методом замораживания-оттаивания. Образцы анализировали до и после воздействия указанных вариантов стресса с помощью следующих аналитических методов:

- 1) УФ-спектрофотометрия;
- 2) гель-фильтрация (SEC);
- 3) ионообменная хроматография (IEC);
- 4) определение мутности раствора;
- 5) определение видимых частиц; и
- 6) определение активности gHuPN20.

УФ-спектроскопию, применяемую для определения содержания белков, осуществляли с использованием УФ-спектрофотометра Perkin Elmer λ35 при диапазоне длин волн от 240 до 400 нм. Образцы "чистого" белка разводили до концентрации примерно 0,5 мг/мл с помощью соответствующего данной композиции буфера. Концентрацию белка рассчитывали согласно уравнению 1.

Уравнение 1

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

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

Для обнаружения растворимых высокомолекулярных субстанций (агрегаты) и низкомолекулярных продуктов гидролиза (LMW) в композициях применяли гель-фильтрацию (SEC). Метод осуществляли с помощью устройства для ЖХВР, снабженного УФ-детектором (определение при длине волны 280 нм) и колонкой TosoHaas TSK G3000SWXL (7,8×300 мм). Продукты, представляющие собой интактные мономеры, агрегаты и продукты гидролиза, разделяли с применением изократического профиля элюции, используя 0,2 М вторичный кислый фосфорнокислый натрий, 0,25 М хлорид калия, pH 7,0, при скорости потока 0,5 мл/мин.

Ионообменную хроматографию (IEC) осуществляли для обнаружения продуктов химического расщепления, изменяющих чистый заряд ритуксимаба в композициях. Для этой цели ритуксимаб расщепляли папаином. Для осуществления метода использовали приемлемое устройство для ЖХВР, снабженное УФ-детектором (обнаружение при длине волны 280 нм), аналитическую катионообменную колонку типа Polymer Labs PL-SCX 1000A. В качестве подвижных фаз А и Б использовали соответственно 10 mM MES, pH 6,0 и 10 mM MES, 0,2 М хлорид натрия, pH 6,0 со скоростью потока 1 мл/мин.

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

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

Анализ *in vitro* фермента гиалуронидазы gHuPH20 использовали в качестве анализа активности. Этот анализ основан на образовании нерастворимого осадка при связывании гиалуронана (гиалуронат натрия) с катионным осадителем. Активность фермента определяли путем инкубации gHuPH20 с применяемым в качестве субстрата гиалуронаном и последующего осаждения нерасщепленного гиалуронана с помощью подкисленного сывороточного альбумина (лошадиная сыворотка). Мутность оценивали при длине волны 640 нм и снижение мутности в результате активности фермента в отношении субстрата гиалуронана использовали в качестве меры ферментативной активности. Процедуру осуществляли с использованием стандартной кривой, созданной на основе оценки разведений стандартного референс-образца gHuPH20, и активность образца определяли на основе этой кривой.

Результаты оценки стабильности композиций А-К представлены ниже в таблицах.

Составы и результаты определения стабильности содержащих в качестве лекарственного продукта ритуксимаб жидких композиций, предлагаемых в настоящем изобретении.

Композиция А представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл ритуксимаба, 20 mM L-гистидин, 210 mM дигидрат трегалозы, 10 mM метионин, 0,06% полисорбата 80, 2000 ед./мл gHuPH20, pH 5,5.

Температура хранения/условия стресса	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация –ЖХВР			Ионообменная хроматография – ЖХВР		Мутность (FTU)	Видимые частицы	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Начало	114	2,2	97,8	0,1	24	65	4,2	Свободна от частиц	1970
Встряхивание при 5°C	1 неделя	114	2,4	97,5	0,1	n.d.	n.d.	4,2	Свободна от частиц	1760
Встряхивание при 25°C	1 неделя	115	2,3	97,6	0,1	n.d.	n.d.	4,4	Свободна от частиц	1676
Замораживание/оттаивание	(5 циклов)	114	2,4	97,5	0,1	n.d.	n.d.	4,4	Свободна от частиц	2123
5°C	4 недели	114	2,2	97,8	0,1	25	65	4,7	Свободна от частиц	1979
	13 недель	114	2,1	97,8	0,1	26	62	4,6	Свободна от частиц	2219
	26 недель	114	2,1	97,8	0,2	25	63	4,4	Свободна от частиц	2412
25°C	4 недели	114	2,0	97,9	0,1	25	64	4,7	Свободна от частиц	1975

	13 недель	n.d.	1,9	97,8	0,3	24	61	4,8	Свободна от частиц	2215
	26 недель	n.d.	1,9	97,6	0,5	22	60	4,3	Свободна от частиц	2409
40°C	4 недели	114	2,1	97,3	0,6	19	61	5,5	Свободна от частиц	n.d.
	13 недель	n.d.	3,2	91,4	5,4	13	55	8,1	Свободна от частиц	n.d.

n.d. - не определяли.

Композиция Б представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл ритуксимаба, 20 мМ L-гистидин, 210 мМ дигидрат трегалозы, 10 мМ метионин, 0,06% полисорбата 80, 2000 ед./мл гHuRN20, pH 6,1.

Температура хранения/условия стресса	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация – ЖХВР			Ионообменная хроматография – ЖХВР		Мутность (FTU)	Видимые частицы	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Начало	117	2,3	97,7	0,1	25	63	7,1	Свободна от частиц	2463
Встряхивание при 5°C	1 неделя	116	2,2	97,7	0,1	n.d.	n.d.	7,2	Свободна от частиц	2288
Встряхивание при 25°C	1 неделя	118	2,1	97,8	0,1	n.d.	n.d.	6,9	Свободна от частиц	2613
Замораживание/Оттаивание	(5 циклов)	116	2,3	97,7	0,1	n.d.	n.d.	6,6	Практически свободна от частиц	2259
5°C	4 недели	117	2,2	97,8	0,1	25	62	6,3	Свободна от частиц	2485
	13 недель	114	2,3	97,6	0,1	25	62	6,3	Свободна от частиц	2237
	26 недель	119	2,2	97,7	0,1	25	61	6,8	Свободна от частиц	2344
25°C	4 недели	n.d.	2,0	97,9	0,1	25	62	6,6	Свободна от частиц	2179
	13 недель	n.d.	2,1	97,7	0,2	24	61	6,3	Свободна от частиц	2083
	26 недель	n.d.	2,1	96,2	1,8	23	60	6,9	Свободна от частиц	2397
40°C	4 недели	n.d.	2,2	96,1	1,7	21	59	8,6	Свободна от частиц	n.d.
	13 недель	n.d.	3,3	92,2	4,5	14	53	21,0	Свободна от частиц	n.d.

n.d. не определяли.

Композиция В представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл ритуксимаба, 20 мМ L-гистидин, 210 мМ дигидрат трегалозы, 10 мМ метионин, 0,06% полисорбата 80, 12000 ед./мл гHuRN20, pH 5,5.

Температура хранения/условия стресса	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация – ЖХВР			Ионообменная хроматография – ЖХВР		Мутность (FTU)	Видимые частицы	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Начало	126	1,7	98,3	0,0	27	58	4,4	Свободна от частиц	11963
Встряхивание при 5°C	1 неделя	127	1,6	98,3	0,0	n.d.	n.d.	4,0	Свободна от частиц	12083
Встряхивание при 25°C	1 неделя	127	1,6	98,4	0,1	n.d.	n.d.	4,5	Свободна от частиц	11150
Замораживание/Оттаивание	(5 циклов)	126	1,6	98,4	0,0	n.d.	n.d.	4,2	Практически свободна от частиц	11869
5°C	7 недель	124	1,5	98,5	0,0	26	62	5,0	Свободна от частиц	12206
	19 недель	120	1,5	98,5	0,1	26	62	4,1	Свободна от частиц	11945
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Свободна от частиц	n.d.
25°C	7 недель	n.d.	1,5	97,8	0,7	25	63	5,8	Свободна от частиц	12259
	19 недель	n.d.	1,5	97,3	1,2	24	61	4,8	Свободна от частиц	13137
	26 недель	n.d.	1,8	96,6	1,6	24	60	4,4	Свободна от частиц	12948
40°C	7 недель	n.d.	2,5	94,6	2,9	18	60	10,2	Свободна от частиц	n.d.
	19 недель	n.d.	3,7	89,8	6,5	12	55	20,0	Свободна от частиц	n.d.

n.d. - не определяли.

Композиция Г представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл ритуксимаба, 20 мМ уксусную кислоту, 210 мМ дигидрат трегалозы, 10 мМ метионин, 0,06% полисорбата 20, 12000 ед./мл гHuРН20, рН 5,5.

Температура хранения/условия стресса	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация – ЖХВР			Ионообменная хроматография – ЖХВР		Мутность (FTU)	Видимые частицы	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Начало	127	1,6	98,4	0,0	26	62	4,9	Свободна от частиц	12619
Встряхивание при 5°C	1 неделя	125	1,5	98,4	0,0	n.d.	n.d.	4,3	Свободна от частиц	12507
Встряхивание при 25°C	1 неделя	123	1,5	98,4	0,1	n.d.	n.d.	4,3	Свободна от частиц	12923
Замораживание/Оттаивание	(5 циклов)	124	1,5	98,4	0,0	n.d.	n.d.	4,4	Практически свободна от частиц	12394
5°C	7 недель	125	1,5	98,4	0,0	26	63	5,0	Практически свободна от частиц	10030
	19 недель	123	1,5	98,5	0,1	26	62	4,7	Свободна от частиц	15324
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Свободна от частиц	n.d.
25°C	7 недель	n.d.	1,6	97,7	0,7	25	62	4,9	Свободна от частиц	13099
	19 недель	n.d.	1,6	97,2	1,2	24	61	5,1	Свободна от частиц	13031
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Свободна от частиц	n.d.
40°C	7 недель	n.d.	2,6	94,8	2,6	17	60	28,7	Свободна от частиц	n.d.
	19 недель	n.d.	3,6	90,5	6,0	9	56	51,9	Свободна от частиц	n.d.

n.d. - не определяли.

Композиция Д представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл ритуксимаба, 20 мМ L-гистидин, 210 мМ дигидрат трегалозы, 10 мМ метионин, 0,06% полисорбата 20, 12000 ед./мл гHuРН20, рН 5,5.

Температура хранения/условия стресса	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация – ЖХВР			Ионообменная хроматография – ЖХВР		Мутность (FTU)	Видимые частицы	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Начало	126	1,5	98,5	0,0	26	62	4,6	Практически свободна от частиц	12231
Встряхивание при 5°C	1 неделя	128	1,5	98,5	0,0	n.d.	n.d.	4,4	Практически свободна от частиц	12524
Встряхивание при 25°C	1 неделя	127	1,5	98,5	0,1	n.d.	n.d.	4,2	Свободна от частиц	11438
Замораживание/Оттаивание	(5 циклов)	127	1,5	98,5	0,0	n.d.	n.d.	4,3	Свободна от частиц	14440
5°C	7 недель	125	1,5	98,5	0,0	26	62	4,7	Свободна от частиц	12824
	19 недель	125	1,5	98,5	0,1	26	62	4,5	Свободна от частиц	13891
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Свободна от частиц	n.d.
25°C	7 недель	n.d.	1,5	97,8	0,7	25	62	4,3	Свободна от частиц	13540
	19 недель	n.d.	1,5	97,4	1,1	24	61	4,6	Свободна от частиц	11243
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Свободна от частиц	n.d.
40°C	7 недель	n.d.	2,5	94,6	2,9	18	60	10,6	Свободна от частиц	n.d.
	19 недель	n.d.	3,9	89,6	6,5	12	55	22,7	Свободна от частиц	n.d.

n.d. - не определяли.

Композиция Е представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл ритуксимаба, 20 мМ L-гистидин, 120 мМ хлорид натрия, 10 мМ метионин, 0,02% полисорбата 80, 12000 ед./мл гHuРН20, рН 5,5.

Температура хранения/условия стресса	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация – ЖХВР			Ионообменная хроматография – ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fab NS укорочения a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Начало	124	1,6	98,3	0,0	3	26	62	28,7	Свободна от частиц	12034
Встряхивание при 5°C	1 неделя	127	1,6	98,4	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	31,0	Свободна от частиц	12083
Встряхивание при 25°C	1 неделя	125	2,4	97,5	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	31,1	Свободна от частиц	11150
Замораживание/Оттаивание	(5 циклов)	125	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	30,4	Свободна от частиц	11869
5°C	7 недель	122	1,6	98,4	0,0	3	25	63	31,4	Свободна от частиц	10368
	19 недель	118	1,5	98,4	0,1	3	26	62	31,8	Свободна от частиц	11654
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Свободна от частиц	n.d.
25°C	7 недель	n.d.	1,7	97,6	0,7	3	25	63	31,1	Свободна от частиц	13853
	19 недель	n.d.	1,7	97,1	1,2	3	24	61	31,6	Свободна от частиц	12556
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Свободна от частиц	n.d.
40°C	7 недель	n.d.	2,9	94,1	3,1	5	19	59	87,0	Свободна от частиц	n.d.
	19 недель	n.d.	4,3	88,8	6,9	6	13	55	211,0	Свободна от частиц	n.d.

n.d. - не определяли.

Композиция Ж представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл ритуксимаба, 20 мМ лимонная кислота, 120 мМ хлорид натрия, 10 мМ метионин, 0,02% полисорбата 80, 12000 ед./мл гHuPH20, pH 6,5.

Температура хранения/условия стресса	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация – ЖХВР			Ионообменная хроматография – ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fab NS укорочения a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Начало	126	1,8	98,1	0,0	4	26	62	40,3	Свободна от частиц	10808
Встряхивание при 5°C	1 неделя	122	1,8	98,2	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	35,6	Свободна от частиц	9324
Встряхивание при 25°C	1 неделя	125	2,3	97,7	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	35,7	Свободна от частиц	n.a.
Замораживание/Оттаивание	(5 циклов)	126	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	34,5	Свободна от частиц	11270
5°C	7 недель	124	1,8	98,2	0,0	3	24	63	38,5	Практически свободна от частиц	12854
	19 недель	118	1,7	98,2	0,1	3	26	62	37,6	Свободна от частиц	11202
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		Свободна от частиц	n.d.
25°C	7 недель	n.d.	1,9	97,4	0,7	2	24	63	40,2	Практически свободна от частиц	11645
	19 недель	n.d.	2,1	96,9	1,1	3	24	60	36,9	Свободна от частиц	14233
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		Свободна от частиц	n.d.
40°C	7 недель	n.d.	3,1	94,3	2,6	5	19	58	101,0	Практически свободна от частиц	n.d.
	19 недель	n.d.	4,8	89,4	5,8	7	12	52	385,0	Свободна от частиц	n.d.

n.d. - не определяли.

Композиция 3 представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл ритуксимаба, 20 мМ лимонная кислота, 210 мМ дигидрат трегалозы, 10 мМ метионин, 0,06% полисорбата 80, 12000 ед./мл гHuPH20, pH 6,5.

Температура хранения/условия стресса	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация – ЖХВР			Ионообменная хроматография – ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fab NS укорочения a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Начало	127	2,0	98,0	0,0	3	26	62	33,4	Свободна от частиц	11951
Встряхивание при 5°C	1 неделя	128	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	30,3	Свободна от частиц	10936
Встряхивание при 25°C	1 неделя	127	1,9	98,0	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	29,7	Свободна от частиц	12595
Замораживание/Оттаивание	(5 циклов)	127	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	32,0	Свободна от частиц	11442
5°C	7 недель	124	1,8	98,2	0,0	3	24	63	33,8	Свободна от частиц	11723
	19 недель	122	1,7	98,2	0,1	3	26	62	30,8	Свободна от частиц	12180
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Свободна от частиц	n.d.
25°C	7 недель	n.d.	2,0	97,3	0,7	3	25	62	30,8	Свободна от частиц	12328
	19 недель	n.d.	2,1	96,9	1,1	4	24	60	31,4	Свободна от частиц	12017
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Свободна от частиц	n.d.
40°C	7 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5	20	58	84,8	Свободна от частиц	n.d.
	19 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7	11	50	295,0	Свободна от частиц	n.d.

n.d. - не определяли.

Композиция И представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 120 мг/мл ритуксимаба, 20 мМ L-гистидин, 120 мМ хлорид натрия, 10 мМ метионин, 0,04% полисорбата 80, 12000 ед./мл gHuPH20, pH 6,0.

Температура хранения/условия стресса	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация – ЖХВР			Ионообменная хроматография – ЖХВР			Мутность (FTU)	Видимые частицы	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Fab NS укорочения a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Начало	123	1,7	98,3	0,0	3	25	62	34,0	Свободна от частиц	11022
Встряхивание при 5°C	1 неделя	125	1,6	98,3	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	33,3	Свободна от частиц	12231
Встряхивание при 25°C	1 неделя	124	1,7	98,3	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	32,1	Свободна от частиц	8371
Замораживание/Оттаивание	(5 циклов)	123	1,8	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	32,9	Свободна от частиц	12058
5°C	7 недель	122	1,6	98,4	0,0	3	25	62	33,5	Свободна от частиц	11108
	19 недель	119	1,6	98,4	0,1	3	26	62	34,4	Свободна от частиц	11548
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Свободна от частиц	n.d.
25°C	7 недель	n.d.	1,7	97,7	0,6	3	25	62	34,8	Свободна от частиц	12679
	19 недель	n.d.	1,8	97,2	1,1	4	24	60	34,6	Свободна от частиц	13252
	26 недель	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Свободна от частиц	n.d.
40°C	7 недель	n.d.	2,5	94,9	2,6	5	20	58	88,1	Свободна от частиц	n.d.
	19 недель	n.d.	3,7	90,4	5,9	7	14	53	292,0	Свободна от частиц	n.d.

n.d. - не определяли.

Композиция К представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 5 мг/мл GA101 (huMAb<CD20>), 20 мМ L-гистидин, 240 мМ дигидрат трегалозы, 0,02% полоксамер 188, 2000 ед./мл gHuPH20, pH 6,0.

Температура хранения/условия стресса	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация – ЖХВР			Ионообменная хроматография – ЖХВР		Мутность (FTU)	Видимые частицы	Активность фермента (ед./мл)
			НМВ (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Кислотная область (%)	Основной пик (%)			
-	Начало	25,1	0,6	98,5	0,9	18,5	68,6	6,0	Свободна от частиц	1833
-20°C	26 недель	26,2	0,6	98,6	0,8	18,7	68,3	5,8	Свободна от частиц	2078
5°C	26 недель	25,7	0,7	98,4	0,9	19,1	67,9	5,6	Свободна от частиц	1380
25°C	26 недель	25,9	0,9	97,3	1,9	26,7	60,8	6,0	Свободна от частиц	978
40°C	26 недель	26,1	3,0	86,8	9,7	40,9	19,5	7,2	Практически свободна от частиц	< предела обнаружения

n.d. - не определяли.

Пример 2. Получение жидких композиций, содержащих гуманизированную версию 2H7 антитела к CD20.

Для получения жидких композиций, содержащих рекомбинантную гуманизированную версию 2H7 антитела к CD20 (2H7.v16, описана в WO 2006/084264) осуществляли обмен буфера на буфер для диалитической фильтрации, содержащий требуемую буферную композицию, и при необходимости осуществляли концентрирование до получения концентрации антитела примерно 60 и 120 мг/мл. После достижения требуемой концентрации к раствору антитела добавляли эксципиенты (например, трегалозу, gHuPH20, полисорбат 20) в виде маточных растворов. И, наконец, концентрацию белка доводили буфером для конечной композиции до достижения концентрации гуманизированного 2H7, составляющей примерно 30, 50 и 100 мг/мл.

Все композиции стерилизовали фильтрацией через 0,22 мкм-фильтры с низкой способностью связывать белки и фильтровали в асептических условиях в стерильные 3-миллилитровые стеклянные пузырьки, снабженные пробками из бутиловой резины, ламинированные фторсодержащей смолой, и зажимными алюминиевыми крышками. Объем заполнения составлял примерно 1,2 мл. Эти композиции хранили в различных климатических условиях (5, 25 и 40°C) в течение различных интервалов времени. Образцы анализировали в каждый момент времени, когда оценивали стабильность, с помощью следующих аналитических методов:

- 1) УФ-спектрофотометрия;
- 2) гель-фильтрация (SEC);
- 3) ионообменная хроматография (IEC);
- 4) анализ комплементзависимой цитотоксичности (CDC) для определения активности гуманизированного 2H7;
- 5) турбидиметрический анализ активности gHuPH20.

(1) Концентрацию белка определяли с помощью ультрафиолетовой абсорбционной спектроскопии с использованием спектрофотометра типа Agilent 8453 при диапазоне длин волн от 240 до 400 нм. Образцы гравиметрически развели до концентрации примерно 0,5 мг/мл с помощью соответствующего буфера для композиции. Концентрацию белка рассчитывали на основе уравнения 1:

Концентрация белка = $((A_{\max} - A_{320}) \times DF) / (\epsilon (\text{см}^2/\text{мг}) \times d (\text{см}))$ (уравнение 1), где DF обозначает фактор разведения, d обозначает длины пути кюветы и ϵ обозначает коэффициент экстинкции, который составляет 1,75 ($\text{см}^2/\text{мг}^{-1}$) для 2H7 при $A_{\max}$. Абсорбцию УФ-света при $A_{\max}$ (как правило, 278-280 нм) корректировали на рассеяние света при 320 нм и умножали на фактор разведения, который определяли на основе взвешенных масс и плотностей "чистого" образца и буфера для разведения. Числитель делили на произведение длины пути кюветы d на коэффициент экстинкции ϵ .

(2) Гель-фильтрацию (SEC) применяли для обнаружения растворимых высокомолекулярных субстанций (агрегаты) и низкомолекулярных продуктов гидролиза (фрагменты) в композициях. SEC осуществляли с помощью устройства для ЖХВР фирма Agilent Technologies, Inc., 1100 серии, снабженного УФ-детектором (определение при длине волны 280 нм) и колонкой TSK G3000SWXL (7,8×300 мм). Продукты, представляющие собой интактные мономеры, агрегаты и продукты гидролиза, разделяли с применением изократического профиля элюции, используя 0,2М фосфат калия и 0,25М хлорид калия, pH 6,2, при скорости потока 0,3 мл/мин.

(3) Ионообменную хроматографию (IEC) осуществляли для обнаружения продуктов химического расщепления, изменяющих чистый заряд антитела к CD20 в композициях. Для этой цели антитело к CD20 инкубировали в присутствии карбоксипептидазы В для катализа гидролиза основных аминокислот. Для осуществления ионообменной хроматографии использовали устройство для ЖХВР фирма Agilent Technologies, Inc., 1100 серии, снабженное УФ-детектором (определение при длине волны 280 нм) и колонкой Dionex ProPac WCX-10 (4×250мм). Кислые и основные варианты разделяли с помощью линейного градиента 25 мМ фосфата калия, pH 6,9 (подвижная фаза А) и 120 мМ хлорид калия, растворенный в 25 мМ фосфате калия (подвижная фаза В), при скорости потока 0,5 мл/мин.

(4) Анализ комплементзависимой цитотоксичности (CDC) осуществляли для определения *in vitro* активности антитела к CD20. Анализ уровня комплементзависимой цитотоксичности (CDC) применяли для оценки способности антитела вызывать лизис человеческих В-лимфобластоидных клеток (WIL2-S) в присутствии человеческого комплемента. Анализ осуществляли в 96-луночных титрационных микропланшетах для культуры ткани. В этом анализе взятые в различных концентрациях применяемое в качестве эталона антитело к CD20, контроль или образец(ы), разведенные в разбавителе, применяемом для анализа, инкубировали с клетками WIL2-S (50000 клеток/лунку) в присутствии фиксированного количества человеческого комплемента. Планшет инкубировали при 37°C/5% CO₂ во влажной камере в течение 1-2 ч. В конце периода инкубации в каждую лунку добавляли по 50 мкл редокс-красителя ALAMAR-BLUE™ и планшет инкубировали в течение 15-26 ч. ALAMARBLUE™ представляет собой редокс-краситель, для которого характерна флуоресценция при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны испускания 590 нм при его восстановлении в живых клетках. Таким образом, изменения цвета и флуоресценции пропорциональны количеству жизнеспособных клеток. Результаты выражали в виде относительных единиц флуоресценции (RFU) в зависимости от концентрации антител к CD20 и параллельно применяли программу для оценки активности образцов антител к CD20 относительно эталонного образца.

(5) Турбидиметрический метод анализа применяли для определения активности гиалуронидазы и концентрации фермента. Этот метод основан на образовании нерастворимого осадка, который образуется при связывании гиалуроновой кислоты с подкисленным сывороточным альбумином. В целом, метод состоял в следующем: серийные разведения гиалуронидазы gHuPH20 (фирма Halozyme, Inc.), которые применяли в качестве референс-стандарта с содержанием от 2,5 до 0,25 ед./мл, приготавливали в разбавителе для фермента (70 mM NaCl, 25 mM PIPES, pH 5,5, 0,66 мг/мл гидролизата желатина, 0,1% человеческого сывороточного альбумина). Тест-образцы разводили до конечной концентрации 1,5 ед./мл разбавителем для фермента. По 30 мкл разведений стандарта и образца переносили в черный 96-луночный планшет с прозрачным дном (фирма Nunc). Затем планшет покрывали и предварительно нагревали в течение 5 мин при 37°C. Затем реакцию инициировали, добавляя по 30 мкл предварительно нагретого раствора гиалуроновой кислоты с концентрацией 0,25 мг/мл, который применяли в качестве субстрата (70 mM NaCl, 25 mM PIPES, pH 5,5, 0,25 мг/мл высушенного гиалуроната натрия, фирма Lifecore Biomedical).

Планшет встряхивали в течение непродолжительного периода времени и инкубировали в течение 10 мин при 37°C. После осуществления указанной стадии инкубации реакцию прекращали, добавляя 240 мкл рабочего раствора сыворотки (2,5% лошадиной сыворотки, 500 mM ацетат калия, pH 4,25). После выдерживания в течение 30 мин при комнатной температуре оценивали мутность реакционной смеси при длине волны 640 нм с помощью ридера для микропланшетов. Снижение мутности, связанное с активностью фермента при использовании в качестве субстрата гиалуроновой кислоты, использовали в качестве меры гиалуронидазной активности. Активность образца оценивали относительно калибровочной кривой, для построения которой применяли разведения gHuPH20, используемый в качестве рабочего референс-стандарта.

Результаты, полученные при использовании содержащих различные гуманизированные версии антитела 2H7 композиций, представлены ниже в таблицах.

Композиция Л представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 30 мг/мл гуманизированного 2H75, 30 mM ацетат натрия, 8% дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 20, 0 ед./мл gHuPH20, pH 5,3.

Температура хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация –ЖХВР			Ионообменная хроматография –ЖХВР		Уровень CDC (% удельной активности)	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Кислотный вариант (%)	Основной пик (%)		
-	Начало	32	0,9	98,9	0,2	27,1	67,5	103	ND
5°C	12 недель	ND	0,8	98,1	1,1	27,8	65,9	110	ND
	24 недели	ND	0,8	98,1	1,1	25,6	68,1	89	ND
	36 недель	ND	0,9	98,6	0,5	27,0	68,3	97	ND
	48 недель	ND	1,0	97,4	1,6	25,9	68,3	96	ND
	72 недели	ND	0,9	97,9	1,2	25,2	68,2	109	ND
	96 недель	ND	0,9	97,8	1,3	28,1	66,1	96	ND
25°C	4 недели	ND	0,7	98,0	1,2	29,5	64,7	ND	ND
	8 недель	ND	0,8	97,7	1,5	32,5	61,9	ND	ND
	12 недель	ND	0,8	97,4	1,8	35,0	59,1	83	ND
	24 недели	ND	1,0	96,8	2,2	40,9	52,1	ND	ND
40°C	2 недели	ND	0,7	97,8	1,6	36,0	57,7	ND	ND
	4 недели	ND	0,8	96,6	2,5	45,1	47,4	ND	ND
	8 недель	ND	1,0	94,9	4,1	60,3	33,3	ND	ND

*ND - не определяли.

Композиция М представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 30 мг/мл гуманизированного 2H75, 30 mM ацетат натрия, 8% дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 20, 1500 ед./мл gHuPH20, pH 5,3.

Температура хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация –ЖХВР			Ионообменная хроматография –ЖХВР		Уровень CDC (% удельной активности)	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Кислотный вариант (%)	Основной пик (%)		
-	Начало	32	0,9	98,9	0,2	27,1	67,4	114	1309
5°C	12 недель	ND	0,8	97,9	1,3	27,6	65,7	110	1520
	24 недели	ND	0,8	98,1	1,2	26,1	67,1	82	1112
	36 недель	ND	0,9	97,3	1,8	27,0	67,9	98	1166
	48 недель	ND	0,9	97,3	1,8	26,2	67,9	100	1620
	72 недели	ND	0,9	97,9	1,3	26,0	68,2	97	ND
	96 недель	ND	0,9	97,8	1,3	28,1	66,0	96	ND
25°C	4 недели	ND	0,7	98,0	1,3	29,5	64,7	ND	1147
	8 недель	ND	0,8	97,8	1,4	32,1	61,9	ND	847
	12 недель	ND	0,8	97,3	1,9	35,1	59,3	89	892
	24 недели	ND	1,0	96,8	2,2	41,3	51,9	ND	777
40°C	2 недели	ND	0,8	97,6	1,6	35,3	57,4	ND	ND
	4 недели	ND	0,8	96,7	2,4	45,2	46,9	ND	ND
	8 недель	ND	1,0	95,0	4,0	59,8	34,3	ND	ND

*ND - не определяли.

Композиция Н представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 30 мг/мл гуманизированного 2Н75, 30 мМ ацетат натрия, 8% дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 20, 12000 ед./мл гHuРН20, pH 5,3.

Температура хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация –ЖХВР			Ионообменная хроматография –ЖХВР		Уровень CDC (% удельной активности)	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Кислотный вариант (%)	Основной пик (%)		
-	Начало	33	0,9	98,9	0,2	27,2	67,4	103	10584
5°C	12 недель	ND	0,8	97,7	1,6	26,5	66,8	111	8864
	24 недели	ND	0,8	97,8	1,4	25,8	68,1	85	14319
	36 недель	ND	0,8	97,5	1,7	27,1	68,0	96	11408
	48 недель	ND	0,9	96,7	2,4	26,2	67,9	95	13817
	72 недели	ND	0,9	97,6	1,6	26,4	68,0	98	ND
	96 недель	ND	0,9	97,4	1,6	28,3	65,8	108	ND
25°C	4 недели	ND	0,8	97,7	1,5	29,6	64,7	ND	13464
	8 недель	ND	0,8	97,4	1,7	32,1	61,9	ND	10975
	12 недель	ND	0,9	97,0	2,1	35,4	58,7	92	10394
	24 недели	ND	1,0	96,5	2,5	41,0	51,8	ND	819
40°C	2 недели	ND	1,1	97,3	1,6	35,7	57,2	ND	ND
	4 недели	ND	0,8	96,6	2,5	45,5	47,5	ND	ND
	8 недель	ND	1,0	94,9	4,1	59,9	33,3	ND	ND

*ND - не определяли.

Композиция О представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 50 мг/мл гуманизированного 2Н75, 30 мМ ацетат натрия, 8% дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 20, 0 ед./мл гHuРН20, pH 5,3.

Температура хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация –ЖХВР			Ионообменная хроматография –ЖХВР		Уровень CDC (% удельной активности)	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Кислотный вариант (%)	Основной пик (%)		
-	Начало	50	0,9	98,9	0,2	27,0	67,6	107	ND
5°C	12 недель	ND	0,9	98,1	1,0	26,9	66,6	86	ND
	24 недели	ND	0,9	97,9	1,1	25,8	67,7	88	ND
	36 недель	ND	1,0	97,9	1,1	27,1	68,5	92	ND
	48 недель	ND	1,0	97,8	1,2	26,2	67,8	95	ND
	72 недели	ND	1,0	97,8	1,2	26,5	67,9	101	ND
	96 недель	ND	1,1	97,6	1,3	28,4	65,8	98	ND
25°C	4 недели	ND	0,9	97,9	1,2	29,5	64,9	ND	ND
	8 недель	ND	0,9	97,6	1,5	32,1	61,8	ND	ND
	12 недель	ND	1,0	97,4	1,6	35,3	58,9	86	ND
	24 недели	ND	0,9	97,9	1,1	40,0	52,8	ND	ND
40°C	2 недели	ND	0,9	97,5	1,6	35,3	56,9	ND	ND
	4 недели	ND	1,1	96,2	2,7	45,2	47,8	ND	ND
	8 недель	ND	1,4	94,1	4,4	59,7	32,9	ND	ND

*ND - не определяли.

Композиция П представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 50 мг/мл гуманизированного 2Н75, 30 мМ ацетат натрия, 8% дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 20, 1500 ед./мл гHuРН20, pH 5,3.

Температура хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация –ЖХВР			Ионообменная хроматография –ЖХВР		Уровень CDC (% удельной активности)	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Кислотный вариант (%)	Основной пик (%)		
-	Начало	51	0,9	98,9	0,2	27,1	67,4	116	1537
5°C	12 недель	ND	0,9	97,8	1,3	25,8	67,4	109	1454
	24 недели	ND	0,9	97,9	1,2	26,0	67,7	84	1372
	36 недель	ND	1,0	97,5	1,5	27,7	67,3	93	1432
	48 недель	ND	1,1	97,0	2,0	26,0	68,4	102	1356
	72 недели	ND	1,1	97,6	1,4	26,5	68,0	97	ND
	96 недель	ND	1,2	97,6	1,3	28,2	65,9	104	ND
25°C	4 недели	ND	0,9	97,9	1,3	29,7	64,6	ND	1269
	8 недель	ND	0,9	97,4	1,6	32,1	62,0	ND	966
	12 недель	ND	1,0	97,5	1,5	35,2	58,9	89	1002
	24 недели	ND	1,3	96,5	2,2	40,5	52,2	ND	ND
40°C	2 недели	ND	0,9	97,5	1,6	35,9	56,1	ND	ND
	4 недели	ND	1,1	96,3	2,6	46,5	45,7	ND	ND
	8 недель	ND	1,4	94,6	4,0	60,5	31,9	ND	ND

*ND - не определяли.

Композиция Р представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 50 мг/мл гуманизированного 2Н75, 30 мМ ацетат натрия, 8% дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 20, 12000 ед./мл гHuРН20, рН 5,3.

Температура хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация –ЖХВР			Ионообменная хроматография –ЖХВР		Уровень CDC (% удельной активности)	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Кислотный вариант (%)	Основной пик (%)		
-	Начало	52	0,9	98,9	0,2	27,2	67,4	110	9932
5°C	12 недель	ND	0,9	97,7	1,4	26,8	67,6	102	9668
	24 недели	ND	0,9	97,7	1,4	25,7	68,2	ND	11292
	36 недель	ND	1,0	97,5	1,5	27,5	67,0	96	15469
	48 недель	ND	1,1	97,4	1,6	26,1	68,2	100	10832
	72 недели	ND	1,0	97,7	1,3	26,3	68,0	106	ND
	96 недель	ND	1,2	97,4	1,5	29,3	64,8	100	ND
25°C	4 недели	ND	0,9	97,6	1,5	29,7	64,6	ND	11765
	8 недель	ND	1,0	97,6	1,4	32,3	61,9	ND	11594
	12 недель	ND	1,1	97,1	1,8	35,4	58,8	86	10119
	24 недели	ND	1,2	96,1	2,4	41,1	51,8	ND	8960
40°C	2 недели	ND	1,1	97,3	1,6	35,9	55,5	ND	ND
	4 недели	ND	1,1	96,4	2,5	44,9	46,5	ND	ND
	8 недель	ND	1,4	94,5	4,1	60,4	33,2	ND	ND

*ND - не определяли.

Композиция С представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 100 мг/мл гуманизированного 2Н75, 30 мМ ацетат натрия, 8% дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 20, 0 ед./мл гHuРН20, рН 5,3.

Температура хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация –ЖХВР			Ионообменная хроматография –ЖХВР		Уровень CDC (% удельной активности)	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Кислотный вариант (%)	Основной пик (%)		
-	Начало	102	1,0	98,8	0,2	27,2	67,5	101	ND
5°C	12 недель	ND	1,2	97,7	1,1	26,7	68,0	106	ND
	24 недели	ND	1,3	97,6	1,2	25,8	67,5	84	ND
	36 недель	ND	1,3	97,2	1,5	27,4	67,4	95	ND
	48 недель	ND	1,3	97,2	1,6	26,2	68,3	89	ND
	72 недели	ND	1,4	97,4	1,2	26,4	68,3	106	ND
	96 недель	ND	1,5	97,2	1,2	28,1	66,4	96	ND
25°C	4 недели	ND	1,2	97,5	1,2	31,0	63,7	ND	ND
	8 недель	ND	1,5	97,2	1,4	32,4	61,9	ND	ND
	12 недель	ND	1,6	96,7	1,7	35,4	58,9	90	ND
	24 недели	ND	1,9	96,0	2,1	40,6	52,1	ND	ND
40°C	2 недели	ND	1,4	97,1	1,6	35,4	57,7	ND	ND
	4 недели	ND	1,8	95,5	2,7	45,6	47,3	ND	ND
	8 недель	ND	2,3	93,5	4,3	60,3	32,9	ND	ND

*ND - не определяли.

Композиция Т представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 100 мг/мл гуманизированного 2Н75, 30 мМ ацетат натрия, 8% дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 20, 1500 ед./мл гHuРН20, рН 5,3.

Температура хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация –ЖХВР			Ионообменная хроматография –ЖХВР		Уровень CDC (% удельной активности)	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Кислотный вариант (%)	Основной пик (%)		
-	Начало	101	1,0	98,8	0,2	27,3	67,5	98	1389
5°C	12 недель	ND	1,2	97,7	1,2	25,3	67,7	104	1655
	24 недели	ND	1,3	97,6	1,2	26,0	67,6	82	1381
	36 недель	ND	1,3	96,6	2,2	26,7	68,7	95	1644
	48 недель	ND	1,3	96,5	2,2	26,2	68,2	94	1381
	72 недели	ND	1,4	97,5	1,2	26,7	68,1	106	ND
	96 недель	ND	1,5	97,2	1,3	28,1	66,2	95	ND
25°C	4 недели	ND	1,2	97,5	1,2	29,2	64,2	ND	1376
	8 недель	ND	1,4	97,3	1,3	32,5	60,4	ND	1018
	12 недель	ND	1,6	96,9	1,5	35,3	58,9	91	942
	24 недели	ND	1,9	96,0	2,2	40,7	53,8	ND	616
40°C	2 недели	ND	1,3	97,1	1,5	35,8	55,8	ND	ND
	4 недели	ND	1,8	95,6	2,7	45,8	47,6	ND	ND
	8 недель	ND	2,3	93,6	4,0	59,3	32,4	ND	ND

*ND - не определяли.

Композиция У представляет собой жидкую композицию, имеющую следующий состав: 100 мг/мл гуманизированного 2H75, 30 мМ ацетат натрия, 8% дигидрата трегалозы, 0,02% полисорбата 20, 12000 ед./мл гHuPH20, pH 5,3.

Температура хранения	Продолжительность хранения	Концентрация белка (мг/мл)	Гель-фильтрация –ЖХВР			Ионообменная хроматография –ЖХВР		Уровень CDC (% удельной активности)	Активность фермента (ед./мл)
			HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Кислотный вариант (%)	Основной пик (%)		
-	Начало	101	1,0	98,8	0,2	27,4	67,4	99	11692
5°C	12 недель	ND	1,1	97,6	1,2	25,8	68,1	97	10599
	24 недели	ND	1,2	97,6	1,2	26,1	67,2	80	11946
	36 недель	ND	1,2	97,1	1,7	26,1	69,3	95	14894
	48 недель	ND	1,3	97,0	1,8	25,7	68,4	89	11820
	72 недели	ND	1,4	97,4	1,3	26,4	68,3	102	ND
	96 недель	ND	1,5	97,1	1,4	28,1	66,2	97	ND
25°C	4 недели	ND	1,3	97,4	1,3	29,8	64,6	ND	11897
	8 недель	ND	1,4	97,1	1,4	32,5	61,6	ND	11117
	12 недель	ND	1,5	96,6	1,8	35,5	58,7	89	10763
	24 недели	ND	1,9	95,9	2,3	41,1	51,1	ND	7783
40°C	2 недели	ND	1,4	97,0	1,6	35,6	55,9	ND	ND
	4 недели	ND	1,8	95,6	2,6	46,0	48,0	ND	ND
	8 недель	ND	2,2	93,8	4,0	61,4	32,0	ND	ND

*ND - не определяли.

Пример 3. Лечение пациентов с помощью композиции.

Схемы лечения, включающие применение ритуксимаба, стали стандартными для ухода за пациентами, страдающими различными типами CD20-позитивных В-клеточных злокачественных заболеваний. Обычно ритуксимаб вводят путем внутривенной (IV) инфузии в течение нескольких часов. Эти долгосрочные инфузии и побочные действия, связанные с инфузией, рассматриваются некоторыми пациентами как некомфортабельные условия современного терапевтического лечения. Кроме того, требуемая процедура внутривенной обработки рассматривается как инвазивная и может быть болезненной, прежде всего для пациентов, страдающих злокачественными заболеваниями, которых подвергают повторяющимся циклам лечения. Подкожное (SC) введение может представлять собой существенно более простое лечение, время введения сокращается до менее чем 10 мин, и это улучшает ощущения пациента. Рекомбинантная человеческая гиалуронидаза (гHuPH20) создана и разрешена для улучшения диспергирования и абсорбции вводимых совместно лекарственных средств. Ее объединяли с ритуксимабом для достижения более безопасного и комфортабельного введения объема, превышающего 10 мл, с помощью SC-инъекции. Целью указанного исследования являлся выбор дозы применяемой для SC-введения содержащей ритуксимаб композиции, включающей гHuPH20, которую получали согласно методу, описанному в примере 1 (композиция А), в сравнении с IV-введением ритуксимаба и оценка ее безопасности и переносимости мужчинами и женщинами, страдающими фолликулярной лимфомой (FL), в процессе поддерживающей терапии.

В этом примере представлены данные, полученные на стадии 1 рандомизированного открытого многоцентрового адаптивного исследования Ib фазы. 124 пациента произвольно распределяли по четырем группам для оценки поддерживающей терапии с помощью ритуксимаба: 16 пациентов включали в контрольную группу, которую обрабатывали посредством IV-инъекций, 34 пациента включали в группу, которую обрабатывали SC дозой 1 (375 мг/м²), 34 пациента включали в группу, которую обрабатывали SC дозой 2 (625 мг/м²), и 40 пациентов обрабатывали SC дозой 3 (800 мг/м²). Перед рандомизацией пригодных для включения в опыт пациентов обрабатывали по меньшей мере один раз IV-дозой ритуксимаба, составляющей 375 мг/м², в поддерживающем режиме. Для пациентов, произвольно включенных в одну из групп с SC-обработкой, одну IV-дозу заменяли на SC-дозу. Пациентам вводили ритуксимаб либо каждые 2 месяца (q2m), либо каждые 3 месяца (q3m) согласно местной практике. Данные о безопасности

получали в целом для 119 пациентов. Ритуксимаб при его SC-введении, как правило, хорошо переносился. Не обнаружено никаких выраженных клинических симптомов или связанных с обработкой серьезных нежелательных явлений. В целом 95 нежелательных явлений (НЯ) обнаружено у 46 пациентов (39%). Наиболее частым зарегистрированным НЯ являлась "ассоциированная с введением реакция" (AAR, включающая покраснение, эритему и слабый дискомфорт). Эти AAR оказались обратимыми, в основном слабыми по интенсивности и только в 1 случае потребовалось лечение (метоклопрамид для лечения тошноты). В целом, профиль НЯ не существенно отличался от профиля, характерного для пациентов, которым ритуксимаб вводили IV (после AAR, наиболее частыми случаями являлись желудочно-кишечные нарушения и слабые инфекции). Описано 4 серьезных побочных действия (СПД) у 4 различных пациентов, все не зависели от исследуемой лекарственной обработки. Не выявлено НЯ, приводящих к смерти, отказу или прекращения лечения.

Общий объем, вводимый посредством SC-инъекции каждому пациенту, варьировался от 4,4 до 15,0 мл. Средняя продолжительность инъекции составляла 2 мл/мин. Максимальные концентрации ритуксимаба в сыворотке в обрабатываемых посредством SC-инъекции группах, обнаружены между днем 2 и днем 8 (48 ч и 168 ч). Фармакокинетические параметры оказались линейными касательно дозы для всех вводимых SC-путем доз (375, 625 и 800 мг/м²). Концентрации ритуксимаба в день 28 (C₂₈) и уровень экспозиции сыворотки (AUC₀₋₅₇) у пациентов, которым вводили SC ритуксимаб в дозе 625 мг/м², оказались сопоставимыми с показателями, обнаруженными у пациентов, которых обрабатывали стандартной для IV-введения дозой ритуксимаба, составляющей 375 мг/м² SC.

Таким образом, подкожное применение ритуксимаба обеспечивает быстрое введение, является комфортабельным и безопасным, при этом достигается экспозиция сыворотки, сопоставимая с обнаруженной в случае применения разрешенных внутривенных композиций, для страдающих FL-пациентов при поддерживающей терапии. Ощущения пациентов оказались благоприятными. Эти результаты подтверждают необходимость дополнительного изучения предназначенных для подкожного введения содержащих ритуксимаб композиций, и фиксированная доза ритуксимаба для SC-введения, составляющая 1400 мг, была выбрана для формального определения C_{trough} с помощью исследования "не меньшей эффективности" на стадии 2.

Пример 4. Лечение с помощью применяемого в виде SC-инъекции ритуксимаба в сравнении с применяемым в виде IV-инъекции ритуксимабом пациентов, страдающих фолликулярной неходжкинской лимфомой.

Пациентов, страдающих фолликулярной (низкой степени злокачественности) лимфомой, которых ранее не подвергали лечению, обрабатывали в режиме поддерживающей терапии либо: (а) содержащей ритуксимаб предназначенной для SC-введения композиций (которую приготавливали согласно методу, описанному в примере 1, композиция А) в сочетании с СНОР или CVP, либо (б) содержащей ритуксимаб предназначенной для IV-введения композиций в сочетании с СНОР или CVP.

Пациентов произвольно разделяли на группы, в которых осуществляли обработку с использованием 375 мг/м² ритуксимаба в виде внутривенной инфузии или 1400 мг ритуксимаба, который вводили подкожно. Кроме того, пациентов подвергали стандартной химиотерапии (CVP или СНОР). Пациентов, у которых обнаружен полный или частичный ответ после 8 циклов лечения, можно подвергать поддерживающей терапии в течение максимум 12 дополнительных циклов. Циклы поддерживающей терапии следует повторять каждые 8 недель. Предполагаемая продолжительность обработки составляет 96 недель.

Предполагается, что лечение с использованием 1400 мг антитела к CD20 ритуксимаба в виде SC-введения в качестве поддерживающей терапии каждые 8 недель в течение вплоть до 12 циклов, окажется безопасным и эффективным при лечении фолликулярной лимфомы, необязательно в сочетании с химиотерапией (включая СНОР или CVP).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция обладающего фармацевтической активностью антитела к CD20, содержащая:

- а) антитело к CD20, где антитело выбрано из группы, включающей ритуксимаб, окрелизумаб и человеческое МАт к CD20 (HuMab<CD20>) в концентрации от 50 до 120 мг/мл или от 100 до 150 мг/мл;
- б) гистиридиновый буфер, обеспечивающий значение pH 5,5±2,0, в концентрации от 1 до 50 мМ;
- в) стабилизатор, представляющий собой дигидрат α,α-трегалозы в концентрации от 15 до 250 мМ и/или метионин в концентрации от 5 до 25 мМ;
- г) неионогенное поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, включающей полисорбат 20 и полисорбат 80, в концентрации от 0,02 до 0,06% (мас./об.); и фермент гиалуронидазу в концентрации от 1000 до 16000 ед./мл.

2. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к CD20 по п.1, в которой концентрация антитела к CD20 составляет от 100 до 150 мг/мл, предпочтительно 120±20 мг/мл.

3. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к CD20 по одному из пп.1-2, в которой антитело к CD20 представляет собой ритуксимаб.

4. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к CD20 по одному из пп.1-2, в которой антитело к CD20 представляет собой окрелизумаб.
5. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к CD20 по одному из пп.1-4, которая является стабильной при замораживании и оттаивании.
6. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к CD20 по одному из пп.1-5, которая предназначена для подкожного или внутримышечного введения.
7. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к CD20 по одному из пп.1-6 в жидкой форме.
8. Высококонцентрированная стабильная фармацевтическая композиция антитела к CD20 по одному из пп.1-6 в лиофилизированной форме.
9. Применение композиции по одному из пп.1-8 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к CD20.
10. Применение по п.9, при котором заболевание или нарушение представляет собой опухоль.
11. Применение по п.9, в котором лекарственное средство предназначено для использования совместно с химиотерапией, одновременно или последовательно с ней.
12. Способ лечения заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью антитела к CD20, у индивидуума, заключающийся в том, что индивидууму вводят композицию по одному из пп.1-8 в количестве, эффективном для лечения указанного заболевания или нарушения.
13. Способ по п.12, в котором заболевание или нарушение представляет собой опухоль.
14. Способ по п.12, в котором высококонцентрированную стабильную фармацевтическую композицию применяют совместно с химиотерапевтическим средством, одновременно или последовательно с ним.
15. Способ по любому из пп.12-14, при котором индивидууму вводят композицию в количестве соответствующем фиксированной дозе антитела к CD20 от 1200 до 2200 мг.
16. Способ по любому из пп.12-14, при котором индивидууму вводят композицию в количестве соответствующем фиксированной дозе антитела к CD20 от 1200 до 1800 мг.
17. Способ по любому из пп.12-14, при котором индивидууму вводят композицию в количестве соответствующем фиксированной дозе антитела к CD20 от 1600 до 2200 мг.

