



(51) МПК

*A61K 9/19* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61K 47/12* (2006.01)*A61K 47/36* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014124143/15, 16.06.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
16.06.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.06.2014

(43) Дата публикации заявки: 27.12.2015 Бюл. № 36

(45) Опубликовано: 10.07.2016 Бюл. № 19

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: ЕА 12801 В1, 30.12. В.В. Сова и др. Выделение и очистка белков. Методическое пособие по курсу "Химия и биохимия белков и ферментов". Владивосток. 2006. с. 10-11. RU 2426554, ДЖЕНЕНТЕК ИНК, 20.08.2011. US 6685940, James Andya et al., 03.02.2004.

Адрес для переписки:

127562, Москва, а/я 67, ООО "АСИРИС-М", для  
Е.В. Корниенко

(72) Автор(ы):

Федюнин Иван Александрович (RU),  
Жученко Максим Андреевич (RU),  
Рождественская Елизавета Юрьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью  
"Промоген-МАТ" (RU)

## (54) СТАБИЛЬНАЯ КОМПОЗИЦИЯ АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ С HER2 РЕЦЕПТОРАМИ, И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области фармацевтики и биотехнологии, а именно касается новой стабильной композиции антитела, специфически связывающегося с HER2 рецепторами, как в лиофилизированной форме, которая может быть восстановлена растворителем, так и в виде концентрированного

раствора, а также способа получения композиции. Изобретение может быть использовано для создания готовой лекарственной формы препарата, а также для приготовления раствора для инфузий, применяемых для лечения HER2-положительных опухолей. 2 н. и 7 з.п. ф-лы, 1 ил, 3 табл., 21 пр.

RU 2 589 691 С2

RU 2 589 691 С2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 9/19* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 47/12* (2006.01)  
*A61K 47/36* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2014124143/15, 16.06.2014

(24) Effective date for property rights:  
16.06.2014

Priority:

(22) Date of filing: 16.06.2014

(43) Application published: 27.12.2015 Bull. № 36

(45) Date of publication: 10.07.2016 Bull. № 19

Mail address:

127562, Moskva, a/ja 67, OOO "ASIRIS-M", dlja  
E.V. Kornienko

(72) Inventor(s):

**Fedyunin Ivan Aleksandrovich (RU),  
ZHuchenko Maksim Andreevich (RU),  
Rozhdestvenskaya Elizaveta YUrevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu  
"Promogen-MAT" (RU)**

(54) **STABLE COMPOSITION OF ANTIBODY SPECIFICALLY BOUND WITH HER2 RECEPTORS AND PREPARATION METHOD THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to pharmaceuticals and biotechnology, namely concerns new stable composition of antibody specifically bound with HER2 receptors in dried form, which can be recovered by solvent, and in form of concentrated solution, as well

as method for preparing composition.

EFFECT: invention can be used for creation of finished dosage form of preparation, as well as for preparing solution for infusions used for treating HER2-positive tumours.

9 cl, 1 dwg, 3 tbl, 21 ex

R U 2 5 8 9 6 9 1 C 2

R U 2 5 8 9 6 9 1 C 2

Данное изобретение относится к области фармацевтики и биотехнологии, а именно касается новой стабильной композиции антитела, специфически связывающегося с HER2 рецепторами, как в лиофилизированной форме, которая может быть восстановлена растворителем, так и в виде концентрированного раствора, а также способа получения

5 композиции.

Изобретение может быть использовано для создания готовой лекарственной формы препарата, а также для приготовления раствора для инфузий, применяемых для лечения HER2-положительных опухолей.

10 HER2 рецептор (также известен как HER2/neu и ErbB2) является одним из четырех членов семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR). Данные рецепторы экспрессируются на поверхности большинства нормальных и опухолевых эпителиальных клеток и участвуют в регулировании важнейших клеточных процессов, контролируя пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз клеток.

15 Гиперэкспрессия и/или амплификация гена HER2 клетками приводит к развитию ряда агрессивных видов рака, в частности рака молочной железы (РМЖ), рака желудка, рака яичников, рака матки, которые характеризуются низкой выживаемостью больных, а также малой эффективностью цитостатической терапии. Частота встречаемости HER2-позитивного РМЖ и рака желудка по разным оценкам варьируется в пределах 15-30% от общего числа больных РМЖ и раком желудка.

20 В последние годы наблюдается значительный прогресс в лечении HER2-положительных видов рака, в частности РМЖ, за счет внедрения в клиническую практику препаратов целенаправленного действия, и в первую очередь моноклональных антител - трастузумаба (Герцептин™) и недавно одобренного для применения пертузумаба (Перьета™).

25 Трастузумаб является гуманизированным рекомбинантным моноклональным антителом к рецептору эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2). Механизмы действия трастузумаба до настоящего времени до конца не изучены. Антипролиферативные и цитотоксические свойства, судя по всему, являются результатом комбинации ингибирования сигнальных каскадов (митоген-активированного

30 протеинкиназного (МАРК) и фосфатидилинозитолтрифосфаткиназного (PI3K)) путем связывания с HER2, интернализации и деградирования HER2 рецепторов, индукции p27, приводящей к блокированию клеточного цикла благодаря снижению активности циклин-зависимой киназы 2 (CDK2), ингибирования репарации повреждений ДНК и антителозависимой клеточной цитотоксичности. Кроме того, трастузумаб делает

35 опухолевые клетки более чувствительными к традиционной химиотерапии.

В настоящее время трастузумаб используется для терапии опухолей с гиперэкспрессией HER2, а именно метастатического РМЖ, РМЖ на ранних стадиях, распространенной аденокарциномы желудка или пищеводно-желудочного перехода. По данным работ, опубликованных за последние 10-15 лет, эффективность комбинаций

40 трастузумаба и цитостатических агентов в лечении метастатического РМЖ достигает 50-75%. Комбинации трастузумаба с паклитакселом и доцетакселом одобрены в США и Европе в качестве стандарта первой линии терапии больных метастатическим РМЖ с гиперэкспрессией HER2. При добавлении трастузумаба к адъювантной химиотерапии у больных ранним HER2-позитивным раком риск рецидива и смерти снижается более

45 чем на 30%. При этом терапия трастузумабом характеризуется хорошей переносимостью.

Моноклональные антитела, как и другие белки, применяемые в клинической практике, со временем подвергаются деградации. Одной из задач, стоящих перед разработчиками лекарственных средств на основе моноклональных антител, является создание

композиций, обеспечивающих высокую стабильность, поддержание качества, сохранение активности и структуры активной субстанции (моноклонального антитела) при хранении. Препараты на основе моноклональных антител производятся в виде лиофилизатов или концентрированных растворов (концентратов). Как правило, в их состав дополнительно включены буфер с определенным рН, лиопротекторы, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества и другие компоненты. При этом для каждого моноклонального антитела индивидуально подбираются каждый из компонентов и их соотношение, обеспечивающие наибольшую стабильность активного компонента.

Деградация моноклональных антител может быть связана с химическим разрушением определенных аминокислотных остатков (окисление метионина, триптофана, гистидина, деамидирование аспарагина и глутамина, перегруппировка дисульфидных связей между цистеинами,  $\beta$ -элиминирование с перегруппировкой аспарагиновой кислоты, гидролиз аспарагиновой кислоты, кросс-сшивки между цистеинами, лизинами, глутаминовой кислотой) с нарушением третичной структуры белка или в связи с ковалентной или нековалентной агрегацией мономеров моноклональных антител в растворе.

В связи с важностью сохранения свойств препарата при хранении существует ряд патентов на стабильные композиции препаратов на основе моноклональных антител к HER2. В патенте РФ 2426554 описана стабильная фармацевтическая композиция, содержащая пертузумаб в гистидин-ацетатном буфере с рН 5,5-6,5. В патентах США 6685940 и 7682609, а также РФ 2229288 описаны лиофилизированные композиции антител, в том числе композиции антител против HER2 и IgE. В патенте США 7074404 описана композиция антитела против HER2, содержащая смесь антитела против HER2 и одного или нескольких его кислых вариантов, где количество кислого варианта(ов) составляет приблизительно менее чем 25%. Примером антитела против HER2 является трастузумаб.

В качестве ближайшего аналога может быть указан препарат Герцептин фирмы Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария, в виде лиофилизата для приготовления раствора для инфузий, который содержит:

Активное вещество: трастузумаб - 440 мг;

Вспомогательные вещества: L-гистидина гидрохлорид - 9,9 мг, L-гистидин - 6,4 мг,  $\alpha, \alpha$ -трегалозы дигидрат - 400,0 мг, полисорбат 20 - 1,8 мг.

Растворитель (бактериостатическая вода для инъекций 20 мл, содержащая 1,1% бензилового спирта в качестве антимикробного консерванта): бензиловый спирт - 229,9 мг, вода для инъекций - 20,9 мг.

(<http://grls.rosminzdrav.ru/InstrImgMZ.aspx?isNew=1&idReg=4989&page=8&isOld=1&t=57d20729-cc62-4528-b5e6-e866072c4daa>).

Задачей изобретения является разработка новой стабильной композиции антитела, специфически связывающегося с HER2 рецепторами.

Задача решается фармацевтической композицией, включающей трастузумаб в качестве активного вещества, фармацевтически приемлемый растворитель, лиопротектор, выбранный из группы: трегалоза, мальтоза, смесь сахарозы с маннитом или глицином, буфер, выбранный из L-гистидинового буфера или натрий-фосфатного буфера, и фармацевтически приемлемый растворитель при следующем содержании компонентов:

трастузумаб - 10-23 мг/мл  
 лиопротектор - 110-800 мМ  
 буфер рН 5-6,5 - 5-10 мМ

Может быть дополнительно введено поверхностно-активное вещество, такое как

полисорбаты, полимеры полиоксиэтилена-полиоксипропилена и т.п. в концентрации 0,01-0,03%, метионин, ЭДТА, глицин, аргинин, пролин, а также их смеси, для обеспечения дополнительной стабильности.

5 Композиция может быть в виде жидкости, ее лиофилизированной формы или в виде концентрированного раствора.

Растворитель предпочтительно представляет известный подходящий для антитела растворитель, такой как вода для инъекций или стерильный физиологический раствор. В растворитель, представляющий собой воду для инъекций, может быть дополнительно введен консервант.

10 Задача также решается способом получения, включающим разведение трастузумаба растворителем, диализ в буферный раствор, содержащий при необходимости поверхностно-активное вещество, добавление лиопротектора и при необходимости остальных дополнительных компонентов, перемешивание до полного растворения, стерилизующую фильтрацию, розлив во флаконы или ампулы. Перед укупоркой  
15 флаконов или запайкой ампул раствор может быть сконцентрирован или лиофилизирован.

Техническим результатом данного изобретения является создание стабильной композиции трастузумаба как в лиофилизированной форме, которая может быть  
20 восстановлена растворителем, так и в виде концентрированного раствора. При восстановлении растворителем перед применением стабильность сохраняется.

Изобретение может быть проиллюстрировано нижеприведенными примерами осуществления изобретения.

Приготовление готовых лекарственных форм для тестирования стабильности

Активную фармацевтическую субстанцию трастузумаб после разведения до  
25 необходимой концентрации белка переводили с использованием диализа в 5 мМ L-гистидиновый буфер (примеры 1-12, 14-21 в таблицах 2 и 3) или 10 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 6,0, (пример 13 в таблице 2) содержащие, при необходимости, полисорбат 20 0,02% (об./об.). Выравнивание концентрации дополнительных компонентов:  
30 полисорбата 20, трегалозы, L-метионина, ЭДТА, сахарозы, маннита, мальтозы, глицина, аргинина и пролина производили добавлением стерильных концентрированных растворов. После внесения всех рабочих растворов производили перемешивание до полного растворения компонентов. Стерилизация компонентов финальной смеси осуществлялась стерилизующей фильтрацией через мембранный фильтр с размером  
35 пор 0,22 мкм. Готовый стерильный раствор разливали по 0,5 мл во флаконы номинальным объемом 2 мл. В случае концентрированных растворов (примеры 14 в таблице 2 и 17-21 в таблице 3) сразу после розлива флаконы укупоривали резиновыми пробками, обжимали алюминиевыми колпачками и закладывали на хранение. В случае лиофилизатов (примеры 1-13 в таблице 2, примеры 15, 16 в таблице 3) до укупорки флаконов проводили лиофильное высушивание полученных растворов по  
40 нижеописанной методике. Составы всех тестируемых композиций приведены в таблицах 2 и 3.

Лиофильное высушивание

Лиофильное высушивание производили на лиофильной сушке Martin Christ ВЕТА 1-8KS (таблица 1). Флаконы помещали на заранее охлажденную полку лиофильной сушки,  
45 температура замораживания находилась в диапазоне  $-30 \div -40^{\circ}\text{C}$ . Флаконы с готовой лекарственной формой претерпевали замораживание продолжительностью 2 часа, после чего сушка переключалась на режим сублимации (первичной сушки). Сублимация проводилась под давлением 0,09 мТорр при температуре полки  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 28

часов. По истечении времени сублимации сушку переключали на стадию десорбции (вторичной сушки). Переход на десорбцию производился ступенчато, в течение 1 часа, так, чтобы каждые 15 минут температура полки повышалась на 10°C. По завершении перехода на десорбцию флаконы досушивали в течение двух часов при температуре 20°C и давлении 0,09 мТорр. По окончании сушки флаконы с препаратом укупоривали резиновыми пробками и обжимали алюминиевыми колпачками.

Для каждого примера использовали по крайней мере два флакона, один из которых по окончании сушки был использован для определения остаточной влажности методом кулонометрического титрования по стандартной методике (метод Карла Фишера).

Требуемое значение влажности составляло менее 2%.

#### Изучение стабильности

С целью ускоренного изучения стабильности флаконы с готовой лекарственной формой инкубировали при температуре +50°C в течение 40 дней или же при температурах +37°C и +50°C в течение более длительного времени (до 92 дней). Температура

ускоренного хранения и его продолжительность были подобраны предварительно и было установлено, что изменения происходят в достаточной степени для изучения стабильности препарата при хранении. По истечении срока ускоренного хранения, а также в промежуточных точках отбирали флаконы на анализы. Для оценки стабильности белка при хранении использовали показатель качества «чистота», определяемый

методом гель-фильтрационной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГФ-ВЭЖХ), и «активность», используя метод определения активности трастузумаба на BT-474 клетках. В качестве состава сравнения использовали состав, идентичный составу коммерчески доступного препарата Герцептин (Ф. Хоффманн-ля Рош Лтд.), содержащий 21 мг/мл трастузумаб, 50 мМ трегалозы, 5 мМ гистидиновый буфер, полисорбат 20 0,01% (об./об.).

#### ГФ-ВЭЖХ

Перед анализом уравнивали колонку подвижной фазой (10 мМ ТРИС, 0,15 М NaCl, 0,15 мМ ЭДТА, рН 7,0) при скорости потока 0,5 мл/мин. Вводили по 20 мкл раствора образцов в колонку для гель-фильтрации, используя скорость потока 0,5 мл/мин. Проводили разделение в изократическом режиме. Элюирующиеся с колонки пики определяли в УФ-спектре при 214 нм. Чистоту испытуемого образца рассчитывали в процентах относительно содержания пика мономера иммуноглобулина.

#### Определение активности

В лунки 96-луночного планшета вносили суспензию клеток BT-474 по (100 мкл/лунка, 7500 клеток/лунка) в среде RPMI 1640 с глутамином, гентамицином и 10% эмбриональной бычьей сыворотки. В краевые лунки вносили по 200 мкл среды без клеток. Инкубировали планшет при температуре 37°C и 5% углекислого газа в течение 1-3 часов. В лунки с клетками добавляли по 100 мкл разведения стандартного образца (пример 1 в таблице 2) и исследуемого образца (примеры 2-14) в различных разведениях (0,0001-10 мкг/мл, три лунки на каждое разведение), перемешивали содержимое планшетов в течение 5 минут на орбитальном шейкере, инкубировали в течение 145 часов при температуре 37°C и 5% углекислого газа. По окончании инкубации количество живых клеток оценивали с использованием красителя WST-1 (Roche). WST-1 добавляли по 20 мкл во все лунки 96-луночного планшета. Перемешивали в течение 5 мин и инкубировали от 2 до 4 часов при температуре 37°C и 5% углекислого газа. Считывали показания в относительных единицах флуоресценции при длине волны возбуждения 450 нм. ЕС50 рассчитывали, используя 4-параметровую логистическую программу.

#### Результаты

Для изучения влияния различных компонентов на стабильность моноклонального антитела трастузумаб в готовой лекарственной форме были приготовлены композиции различного состава и проведен сравнительный анализ стабильности при ускоренном хранении (Таблица 2). Один препарат антитела с чистотой 99,9% (определено методом ГФ-ВЭЖХ) был использован для приготовления композиций, указанных в таблице 2. После лиофилизации и окончания ускоренной программы хранения образцы тестировали по критическим показателям.

В качестве критического показателя использовали чистоту, оцененную как процентное содержание мономера антитела. Данный показатель широко используется для оценки стабильности антитела, так как изменение различных свойств белковой молекулы, как правило, приводит к изменению в показателе чистоты. При этом даже незначительное понижение чистоты позволяет судить о стабильности антитела. В качестве дополнительного показателя стабильности использовали активность трастузумаба на модели клеток BT474. Значения данного показателя позволяют напрямую судить о биологической активности антитела. Таким образом, полученные данные позволяют в полной мере провести сравнительную оценку стабильности различных композиций лиофилизата (Таблица 2).

Из приведенных в таблице результатов видно, что как чистота, так и биологическая активность значительно изменились по истечении срока ускоренного хранения. Так, при начальной чистоте 99,9% для состава сравнения (пример 1 в таблице 2) после инкубации в 40 дней при 50°C значение упало до менее чем 95%, что ниже допустимого значения чистоты при выходном контроле для большинства препаратов моноклональных антител. Значение биологической активности также значительно варьирует, но в большинстве случаев оно выше для композиций, имеющих более высокую степень чистоты, по сравнению с составом сравнения по окончании ускоренного хранения.

Из полученных результатов видно, что 11 композиций (примеры 2-13, таблица 2) показали стабильность большую или равную таковой состава сравнения по чистоте. 9 составов показали большую стабильность по активности (примеры 2, 3, 5-12, таблица 2) антитела. Тем не менее, два примера 4 и 13, показавшие значительно большую стабильность по чистоте, имеют значение активности чуть меньшее, но сопоставимое с составом сравнения, и поэтому отклонения от состава сравнения могут рассматриваться как перспективные.

Таким образом, изменяя концентрацию или состав компонентов относительно состава сравнения (пример 1 в таблице 2), возможно увеличение стабильности антитела. Повышенное содержание трегалозы (примеры 2-5 в таблице 2) позитивно сказывается на стабильности при хранении. Появление дополнительных компонентов в составе композиций также может положительно влиять на стабильности моноклонального антитела. Так, L-метионин в концентрации 5 мМ оказывает стабилизирующее действие (сравнение примеров 4 и 6 в таблице 2). Добавление же 5 мМ L-метионина вместе с 0,03% этилендиаминтетрауксусной кислоты или ее динатриевой соли также позволяет добиться большей стабильности при хранении по сравнению с составом сравнения (сравнение примеров 4 и 7 в таблице 2), хотя только с L-метионином позитивный эффект был несколько больше (сравнение примеров 6 и 7 в таблице 2). Добавление других аминокислот, а именно аргинина и пролина, в концентрациях 25 мМ имело не совсем однозначный эффект на стабильность антитела (сравнение составов 4 и 11). С одной стороны, чистота оказалась несколько ниже (99,0% против 99,4%), но антитело обладало большей активностью по истечении ускоренного хранения в случае, когда в составе

композиции присутствовали данные аминокислоты.

Замена лиопротектора относительно состава сравнения (трегалоза, 50 мМ) на сахарозу с маннитом в концентрациях по 40 мг/мл (пример 8), на мальтозу в концентрации 50 мг/мл (пример 9) или же на сахарозу с глицином в концентрациях по 30 мг/мл (пример 10) также позволила значительно увеличить стабильность как по показателю чистоты, так и по конечной активности трастузумаба.

Композиция с повышенным содержанием моноклонального антитела трастузумаб показала большую стабильность относительно состава сравнения (сравнение примеров 12 и 1 в таблице 2), однако, нельзя однозначно заключить о влиянии повышенной концентрации трастузумаба при хранении, так как в композиции также было увеличено содержание трегалозы.

Замена гистидинового буфера на Na-фосфатный не вызвало значительного падения стабильности лиофилизированной композиции (сравнение примеров 13 и 1 в таблице 2). Таким образом, натрий-фосфатный буфер может также рассматриваться для получения стабильной композиции трастузумаба.

Отсутствие стадии лиофилизации позволило бы упростить технологический процесс и является более удобным при лечении пациентов, так как отсутствует стадия растворения лиофильно высушенной таблетки. В связи с этим параллельно к лиофилизированным композициям был исследован препарат концентрированного раствора антитела того же состава, что и препарат сравнения (примеры 14 и 1 в таблице 2). По истечении ускоренного хранения концентрированный раствор показал меньшую чистоту и активность антитела (примеры 1, 14, таблица 2).

Тем не менее, ввиду очевидных технологических и практических преимуществ использования концентрированных растворов было проведено более детальное тестирование стабильности при хранении концентрированных растворов с разного состава. Для этого композиции различных составов хранили при двух температурах: 37°C и 50°C в течение более длительного срока и проводили измерение чистоты в различные промежутки времени (таблица 3, рисунок 1).

При хранении как при 37°C, так и при 50°C результаты являются сопоставимыми, хотя в случае повышенной температуры являются более показательными ввиду большего падения чистоты при хранении. В качестве состава сравнения была использована композиция, соответствующая составу препарата Герцептин. Для контроля также была протестирована лиофилизированная композиция с повышенным содержанием трегалозы, которая еще раз продемонстрировала большую стабильность по сравнению с составом сравнения (пример 4 в таблице 2, а также пример 16 в таблице 3). Из пяти протестированных композиций концентрированных растворов четыре (примеры 18-21, таблица 3), хотя и показали стабильность несколько ниже лиофилизированного состава сравнения (пример 15 в таблице 3), могут рассматриваться как потенциально перспективные ввиду удобства в производстве и врачебной практике. Одна композиция концентрированного раствора (пример 17, таблица 3) показала большую стабильность по сравнению с лиофильно высушенным составом сравнения. По сравнению с последним в данной композиции концентрированного раствора значительно больше содержание трегалозы, которое, наиболее вероятно, и вносит значительный стабилизирующий эффект.

Полученные формы могут подвергаться многочисленным процессам замораживания - размораживания.

Таким образом, по сравнению с композицией коммерчески доступного и используемого в практике препарата с основным действующим веществом трастузумаб



в данном патенте описаны составы более стабильных лиофилизатов, а также более стабильный концентрированный раствор. На данный момент существует ряд препаратов на основе разнообразных моноклональных антител и большое количество находится в разработке. В связи с этим данные составы представляют большой интерес, так как могут быть рассмотрены для создания стабилизированных композиций препаратов на основе других моноклональных антител.

Таблица 1. Режим лиофильного высушивания

Стадия сушки	Температура, (°C)	Время, час	Давление, мТорр
Замораживание	-30 ÷ -40	2	н.у.
Сублимация	- 20	28	70-110
Ступенчатый переход на десорбцию	От -20 до +20	1	70-110
Десорбция	+20	2	70-110

Таблица 2. Составы тестируемых композиций и результаты ускоренного хранения.

Композиция	Компоненты	Содержание*	Чистота, %, ГФ- ВЭЖХ	EC <sub>50</sub> (относитель но стандарта)
Пример 1 (стандарт сравнения)	Трастузумаб	21 мг/мл	94,8	1,0
	Трегалоза	50 мМ		
	L-гистидин/L- гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ		
	Твин 20	0,01%		
Пример 2	Трастузумаб	21 мг/мл	98,6	1,543
	Трегалоза	110 мМ		
	L-гистидин/L- гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ		
	Твин 20	0,02%		
Пример 3	Трастузумаб	21 мг/мл	99,1	1,792
	Трегалоза	220 мМ		
	L-гистидин/L- гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ		
	Твин 20	0,02%		
Пример 4	Трастузумаб	21 мг/мл	99,4	1,064
	Трегалоза	320 мМ		
	L-гистидин/L- гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ		
	Твин 20	0,02%		
Пример 5	Трастузумаб	21 мг/мл	99,4	0,950
	Трегалоза	800 мМ		
	L-гистидин/L- гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ		
	Твин 20	0,02%		

5	Пример 6	Трастузумаб	21 мг/мл	99,4	3,172
		Трегалоза	320 мМ		
		L-гистидин/L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ		
		Твин 20	0,02%		
		L-метионин	5мМ		
10	Пример 7	Трастузумаб	21 мг/мл	99,4	2,725
		Трегалоза	320 мМ		
		L-гистидин/L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ		
		Твин 20	0,02%		
		L-метионин	5мМ		
		ЭДТА	0.03%		
20	Пример 8	Трастузумаб	21 мг/мл	98,7	3,746
		Сахароза	40 мг/мл		
		Маннит	40 мг/мл		
		L-гистидин/L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ		
		Твин 20	0,02%		
30	Пример 9	Трастузумаб	21 мг/мл	99,1	1,924
		Мальтоза	50 мг/мл		
		L-гистидин/L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ		
		Твин 20	0,02%		
35	Пример 10	Трастузумаб	21 мг/мл	99,1	3,595
		Сахароза	30 мг/мл		
		Глицин	30 мг/мл		
		L-гистидин/L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ		
		Твин 20	0,02%		
40					

45

5	Пример 11	Трастузумаб	21 мг/мл	99,0	2,052
		Трегалоза	320мМ		
		L-гистидин/L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ		
		Твин 20	0,02%		
		Аргинин	25 мМ		
		Пролин	25 мМ		
10	Пример 12	Трастузумаб	23,75 мг/мл	99,4	1,789
		Трегалоза	640 мМ		
		L-гистидин/L-гистидингидрохлорид моногидрат	10 мМ		
		Твин 20	0,02%		
15	Пример 13	Трастузумаб	21 мг/мл	94,8	0,936
		Трегалоза	50 мМ		
		Na фосфатный буфер, pH 6.0	10 мМ		
		Твин 20	0,01%		
20	Пример 14 (концентрированный раствор)	Трастузумаб	21 мг/мл	90,5	0,103
		Трегалоза	50 мМ		
		L-гистидин/L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ		
		Твин 20	0,02%		

\* В случае лиофилизированных композиций указанные концентрации соответствуют таковым после восстановления водой (0,5 мл).

Таблица 3. Составы тестируемых композиций и результаты ускоренного хранения.

Композиция	Состав	Содержание*	Результаты ускоренного хранения		
			Дни	Чистота (ГФ-ВЭЖХ) при хранении на 37 °С	Чистота (ГФ-ВЭЖХ) при хранении на 50 °С
Пример 15 (лиофилизат)	Трастузумаб	21 мг/мл	0	99,38	
	Трегалоза	50 мМ	24	98,59	96,79
	L-гистидин + L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ	36	97,87	95,89
	Твин 20	0,02 %	84	97,58	94,77
Пример 16 (лиофилизат)	Трастузумаб	10 мг/мл	0	99,79	
	Трегалоза	320 мМ	24		99,48
	L-гистидин + L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ	42	99,6	99,38
	Твин 20	0,02%	79	100,0	99,38
92			99,45	99,22	
Пример 17 (концентрат)	Трастузумаб	10 мг/мл	0	99,79	
	Трегалоза	320 мМ	24		99,49
	L-гистидин + L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ	42	99,49	99,61
	Твин 20	0,02%	79	100,0	100,0
92			99,33	99,37	
Пример 18 (концентрат)	Трастузумаб	10 мг/мл	0	99,83	
	Маннитол	320 мМ	21	98,67	97,59
	Магния сульфат	10 мМ	39	98,90	97,57
	L-гистидин + L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ	63	98,38	94,32
	Твин 20	0,02%	76	97,71	91,35
89			97,58	91,44	

5	Пример 19 (концентрат)	Трастузумаб	10 мг/мл	0	99,86	
		Маннитол	320мМ	21	98,88	97,56
		Магния сульфат	10мМ	39	98,93	97,59
		ЭДТА	0,3 мг/мл	63	98,43	95,0
		L-гистидин + L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ	76	97,69	93,61
		Твин 20	0,02%	89	97,43	92,86
10	Пример 20 (концентрат)	Трастузумаб		0	99,93	
		Маннитол	320мМ	21	98,89	97,38
		Мочевина	0,5 мг/мл	39	99,11	97,46
		L-гистидин + L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ	63	98,36	91,33
		Твин 20	0,02%	76	97,8	88,42
				89	97,55	87,71
15	Пример 21 (концентрат)	Трастузумаб		0	99,93	
		Маннитол	320мМ	21	99,17	97,94
		Глицерин	5% (о/о)	39	98,65	97,01
		L-гистидин + L-гистидингидрохлорид моногидрат	5 мМ	63	98,68	95,08
		Твин 20	0,02%	76	97,84	93,3
				89	97,59	89,0

\* В случае лиофилизированных композиций указанные концентрации соответствуют таковым после восстановления водой (0,5 мл).

30

#### Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция, включающая трастузумаб в качестве активного вещества, фармацевтически приемлемый растворитель, лиопротектор, и буфер, отличающаяся тем, что лиопротектор выбран из группы: трегалоза, мальтоза, смесь сахарозы с маннитом или глицином, буфер выбран из L-гистидинового буфера или натрий-фосфатного буфера, при следующем содержании компонентов:

трастузумаб	10-23 мг/мл
лиопротектор	110-800 мМ
буфер pH 5-6,5	5-10 мМ

40 2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что дополнительно включает стабилизаторы, выбранные из группы: полисорбат, метионин, ЭДТА, глицин, аргинин, пролин, а также их смеси.

3. Композиция по п. 2, отличающаяся тем, что она включает 5 мМ L-метионина вместе с 0,03% этилендиаминтетрауксусной кислоты или ее динатриевой соли.

45 4. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что она может быть в виде лиофилизированной формы или в виде концентрированного раствора.

5. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что растворитель выбран из воды для инъекций или стерильного физиологического раствора.

6. Способ получения композиции по п. 1, характеризующийся тем, что разводят трастузумаб фармацевтически приемлемым растворителем и переводят его в буферный раствор, далее добавляют лиопротектор, перемешивают до полного растворения, проводят стерилизующую фильтрацию и разливают полученный раствор во флаконы или ампулы.

7. Способ получения композиции по п. 6, включающий стадию концентрирования или лиофилизации после розлива раствора.

8. Способ по п. 6, в котором стадию лиофилизации проводят путем замораживания при температура в диапазоне  $-30\div-40^{\circ}\text{C}$  в течение 2 часов, сублимации под давлением  $0,09\text{ мТорр}$  при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 28 часов с последующим переходом на десорбцию ступенчато, в течение 1 часа, так, чтобы каждые 15 минут температура повышалась на  $10^{\circ}\text{C}$ , и досушки в течение двух часов при температуре  $20^{\circ}\text{C}$  и давлении  $0,09\text{ мТорр}$ .

9. Способ по п. 6, в котором до стерилизующей фильтрации дополнительно вводят стабилизаторы, выбранные из группы: полисорбат, метионин, ЭДТА, глицин, аргинин, пролин, а также их смеси.

20

25

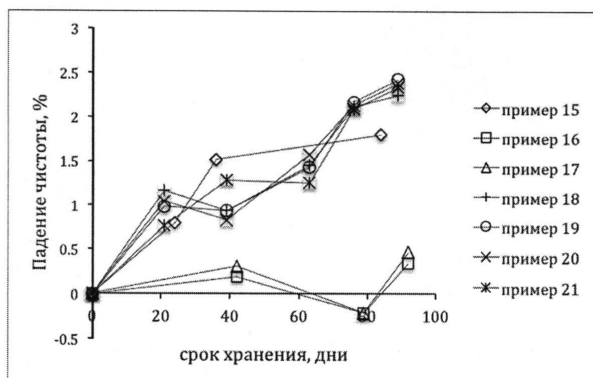
30

35

40

45

А



Б

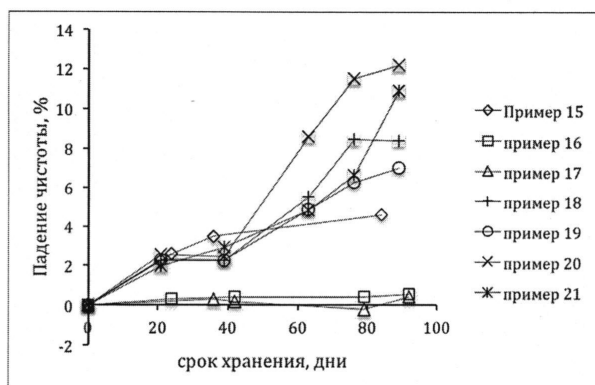


Рисунок 1. Результаты ускоренного хранения при температуре (А) 37 °С и (Б) 50 °С. Падение чистоты рассчитано относительно значения чистоты после розлива (в случае концентрированных растворов) или лиофильного высушивания (в случае лиофилизатов).