

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3570884

DAL TITOLO:

“Formulazioni sottocutanee di anticorpo HER2”

DEPOSITATA IL:

*** **

DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

L'invenzione riguarda formulazioni di anticorpi HER2 a dose fissa per la somministrazione sottocutanea e il loro uso nel trattamento del cancro. In particolare, l'invenzione riguarda formulazioni di pertuzumab a dose fissa, formulazioni sottocutanee comprendenti pertuzumab e trastuzumab, e il loro uso nel trattamento del cancro.

Contesto dell'invenzione

Anticorpi HER2

I membri della famiglia HER dei recettori tirosin-chinasici sono importanti mediatori della crescita, differenziazione e sopravvivenza cellulare. La famiglia dei recettori comprende quattro membri distinti tra cui il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR, ErbB1 o HER1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4 o tyro2). I membri della famiglia dei recettori sono stati coinvolti in vari tipi di malignità umana.

Una versione umanizzata ricombinante dell'anticorpo murino anti-HER2 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab o HERCEPTIN[®], brevetto U.S. n. 5,821,337) è clinicamente attiva in pazienti con carcinomi mammari metastatici sovraespressanti HER2 che hanno ricevuto una precedente esauriente terapia anti-cancro (Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14:737-744(1996)).

Il Trastuzumab ha ricevuto l'autorizzazione alla commercializzazione dalla Food and Drug Administration il 25 settembre 1998 per il trattamento di pazienti con cancro al seno metastatico i cui tumori sovraesprimono la proteina HER2. Attualmente, trastuzumab è approvato per l'uso come agente singolo o in combinazione con chemioterapia o terapia ormonale nel contesto metastatico, e come agente singolo o in combinazione con la chemioterapia come trattamento adiuvante per pazienti con cancro al seno HER2-positivo in stadio iniziale. La terapia a base di trastuzumab è ora il trattamento raccomandato per pazienti con cancro al seno in stadio iniziale HER2-positivo che non hanno controindicazioni per il suo uso (informazioni sulla prescrizione di Herceptin[®]; Linee guida NCCN, versione 2.2011). trastuzumab più

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

docetaxel (o paclitaxel) è uno standard di cura registrato nel contesto del trattamento del cancro al seno metastatico di prima linea (MBC) (Slamon et al. N Engl J Med.2001; 344(11):783-792.; Marty et al. al. J Clin Oncol. 2005; 23(19):4265-4274).

I pazienti trattati con l'anticorpo HER2 trastuzumab vengono selezionati per la terapia in base all'espressione di HER2. Vedere, ad esempio, WO99/31140 (Paton *et al.*), US2003/0170234A1 (Hellmann, S.) e US2003/0147884 (Paton *et al.*); nonché WO01/89566, US2002/0064785 e US2003/0134344 (Mass *et al.*). Vedere, inoltre, il brevetto U.S. n. 6,573,043, il brevetto U.S. n. 6,905,830 e US2003/0152987, Cohen *et al.*, riguardanti l'immunoistochimica (IHC) e l'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) per rilevare la sovraespressione e amplificazione di HER2. Pertanto, la gestione ottimale del cancro al seno metastatico ora tiene conto non solo delle condizioni generali, dell'anamnesi e dello stato del recettore di un paziente, ma anche dello stato di HER2.

Il Pertuzumab (noto anche come anticorpo monoclonale umanizzato ricombinante 2C4 (rhuMAb 2C4); Genentech, Inc, South San Francisco) rappresenta il primo di una nuova classe di agenti noti come inibitori della dimerizzazione di HER (HDI) e agisce per inibire la capacità di HER2 di formare eterodimeri od omodimeri attivi con altri recettori HER (come EGFR/HER1, HER2, HER3 e HER4). Vedere, per esempio, Harari e Yarden *Oncogene* 19:6102-14 (2000); Yarden e Sliwkowski. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-37 (2001); Sliwkowski *Nat Struct Biol* 10:158-9 (2003); Cho *et al. Nature* 421:756-60 (2003); e Malik *et al. Pro Am Soc Cancer Res* 44:176-7 (2003).

È stato dimostrato che il blocco della formazione di eterodimeri HER2-HER3 da parte del Pertuzumab nelle cellule tumorali inibisce la segnalazione cellulare critica, portando a una ridotta proliferazione e sopravvivenza del tumore (Agus *et al. Cancer Cell* 2:127-37 (2002)).

Il Pertuzumab è stato sottoposto a test come agente singolo nella clinica con uno studio di fase Ia in pazienti con tumori avanzati e studi di fase II in pazienti con carcinoma ovarico e cancro al seno oltre a carcinoma polmonare e prostatico. In uno studio di Fase I, i pazienti con tumori solidi incurabili, localmente avanzati, recidivanti o metastatici che avevano progredito durante o dopo la terapia standard sono stati trattati con pertuzumab somministrato per via endovenosa ogni 3 settimane, pertuzumab era generalmente ben tollerato. La regressione del tumore è stata raggiunta in 3 dei 20 pazienti valutabili per la risposta. Due pazienti hanno confermato le risposte parziali. Una malattia stabile della durata di oltre 2,5 mesi è stata osservata in 6 pazienti su 21 (Agus *et al., Pro Am Soc Clin Oncol* 22:192 (2003)). A dosi di 2,0-15 mg/kg, la farmacocinetica del pertuzumab era lineare e la clearance media variava da 2,69 a 3,74 ml/die/kg e l'emivita media di eliminazione terminale variava da 15,3 a 27,6 giorni. Non sono stati rilevati anticorpi verso pertuzumab (Allison *et al., Pro Am Soc Clin Oncol* 22:197 (2003)).

US2006/0034842 descrive procedimenti per trattare il cancro esprimente ErbB con combinazioni di anticorpi anti-ErbB2. US2008/0102069 descrive l'uso del trastuzumab e del pertuzumab nel trattamento del carcinoma metastatico HER2-positivo, come il cancro al seno. Baselga et

al., *J Clin Oncol*, 2007 Annual Meeting Proceedings Parte I, col. 25, n. 18S (June 20 Supplement), 2007:1004 riferiscono il trattamento di pazienti con cancro preesistente HER2-positivo, che è progredito durante il trattamento con trastuzumab, con una combinazione di trastuzumab e pertuzumab. Portera et al., *J Clin Oncol*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Parte I. Vol. 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007:1028 hanno valutato l'efficacia e la sicurezza della terapia combinata di trastuzumab+pertuzumab in pazienti con cancro al seno HER2-positivo, che avevano subito malattia progressiva durante la terapia a base di Trastuzumab. Gli autori hanno concluso che era necessaria un'ulteriore valutazione dell'efficacia del trattamento combinato per definire il rischio e il beneficio complessivo di questo regime di trattamento.

Il Pertuzumab è stato valutato in studi di Fase II in associazione con trastuzumab in pazienti con cancro al seno metastatico HER2-positivo che hanno precedentemente ricevuto trastuzumab per la malattia metastatica. Uno studio, condotto dal National Cancer Institute (NCI), ha selezionato 11 pazienti con cancro al seno metastatico HER2-positivo precedentemente trattato. Due pazienti su 11 hanno mostrato una risposta parziale (PR) (Baselga et al., *J Clin Oncol* 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings; 25:18S (June 20 Supplement): 1004.

I risultati di uno studio neoadiuvante di Fase II che ha valutato l'effetto di un nuovo regime di combinazione di pertuzumab e trastuzumab più chemioterapia (docetaxel) in donne con cancro al seno HER2-positivo allo stadio iniziale, presentato al CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) 8-12 dicembre 2010, hanno dimostrato che i due anticorpi HER2 più il docetaxel somministrati nel contesto neoadiuvante prima dell'intervento miglioravano significativamente la percentuale di completa scomparsa del tumore (percentuale di risposta patologica completa, pCR, del 45,8 per cento) nel seno di più della metà rispetto al trastuzumab più docetaxel (pCR di 29, 0 per cento); $p=0,014$.

Lo studio clinico di fase II di valutazione clinica di pertuzumab e trastuzumab (CLEOPATRA) ha valutato l'efficacia e la sicurezza di pertuzumab più trastuzumab più docetaxel, rispetto a placebo più trastuzumab più docetaxel, come trattamento di prima linea per i pazienti con cancro al seno localmente recidivante, non reseccabile o metastatico HER2-positivo. La combinazione di pertuzumab più trastuzumab più docetaxel, rispetto a placebo più trastuzumab più docetaxel, quando utilizzata come trattamento di prima linea per il cancro al seno metastatico HER2-positivo, ha prolungato significativamente la sopravvivenza libera da progressione, senza alcun aumento degli effetti tossici cardiaci. (Baselga et al., *N Eng J Med* 2012 366:2, 109-119).

Lo studio clinico di fase II NeoSphere ha valutato l'efficacia e la sicurezza della somministrazione neoadiuvante di pertuzumab e trastuzumab in donne naive al trattamento (pazienti che non hanno ricevuto alcuna precedente terapia antitumorale) con cancro al seno operabile,

localmente avanzato e infiammatorio. I pazienti trattati con pertuzumab e trastuzumab più docetaxel hanno mostrato un tasso di risposta patologica completa significativamente migliorata rispetto a quelli trattati con trastuzumab più docetaxel, senza differenze sostanziali di tollerabilità (Gianni et al., *Lancet Oncol* 2012 13(1):25-32). I risultati del follow-up a 5 anni sono riportati da Gianni et al., *Lancet Oncol* 2016 17 (6):791-800).

Le pubblicazioni dei brevetti relativi agli anticorpi HER2 comprendono: brevetti US n. 5,677,171; 5,720,937; 5,720,954; 5,725,856; 5,770,195; 5,772,997; 6,165,464; 6,387,371; 6,399,063; 6,015,567; 6,333,169; 4,968,603; 5,821,337; 6,054,297; 6,407,213; 6,639,055; 6,719,971; 6,800,738; 5,648,237; 7,018,809; 6,267,958; 6,695,940; 6,821,515; 7,060,268; 7,682,609; 7,371,376; 6,127,526; 6,333,398; 6,797,814; 6,339,142; 6,417,335; 6,489,447; 7,074,404; 7,531,645; 7,846,441; 7,892,549; 6,573,043; 6,905,830; 7,129,840; 7,344,840; 7,468,252; 7,674,589; 6,949,245; 7,485,302; 7,498,030; 7,501,122; 7,537,931; 7,618,631; 7,862,817; 7,041,292; 6,627,196; 7,371,379; 6,632,979; 7,097,840; 7,575,748; 6,984,494; 7,279,287; 7,811,773; 7,993,834; 7,435,797; 7,850,966; 7,485,704; 7,807,799; 7,560,111; 7,879,325; 7,449,184; 7,700,299; e US 2010/0016556; US 2005/0244929; US 2001/0014326; US 2003/0202972; US 2006/0099201; US 2010/0158899; US 2011/0236383; US 2011/0033460; US 2005/0063972; US 2006/018739; US 2009/0220492; US 2003/0147884; US 2004/0037823; US 2005/0002928; US 2007/0292419; US 2008/0187533; US 2003/0152987; US 2005/0100944; US 2006/0183150; US2008/0050748; US 2010/0120053; US 2005/0244417; US 2007/0026001; US 2008/0160026; US 2008/0241146; US 2005/0208043; US 2005/0238640; US 2006/0034842; US 2006/0073143; US 2006/0193854; US 2006/0198843; US 2011/0129464; US 2007/0184055; US 2007/0269429; US 2008/0050373; US 2006/0083739; US 2009/0087432; US 2006/0210561; US 2002/0035736; US 2002/0001587; US 2008/0226659; US 2002/0090662; US 2006/0046270; US 2008/0108096; US 007/0166753; US 2008/0112958; US 2009/0239236; US 2004/008204; US 2009/0187007; US 2004/0106161; US 2011/0117096; US 2004/048525; US 2004/0258685; US 2009/0148401; US 2011/0117097; US 2006/0034840; US 2011/0064737; US 2005/0276812; US 2008/0171040; US 2009/0202536; US 2006/0013819; US 2006/0018899; US 2009/0285837; US 2011/0117097; US 2006/0088523; US 2010/0015157; US 2006/0121044; US 2008/0317753; US2006/0165702; US 2009/0081223; US 2006/0188509; US 2009/0155259; US 2011/0165157; US 2006/0204505; US 2006/0212956; US 2006/0275305; US 2007/0009976; US 2007/0020261; US 2007/0037228; US 2010/0112603; US 2006/0067930; US 2007/0224203; US 2008/0038271; US 2008/0050385; 2010/0285010; US 2008/0102069; US 2010/0008975; US 2011/0027190; US 2010/0298156; US 2009/0098135; US 2009/0148435; US 2009/0202546; US 2009/0226455; US 2009/0317387; e US 2011/0044977.

Enzimi ialuronidasi

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

Le ialuronidasi sono un gruppo di enzimi generalmente attivi in ambiente neutro o acido presenti in tutto il regno animale. Le ialuronidasi variano rispetto alla specificità di substrato e al meccanismo d'azione (WO2004/078140). Vi sono tre classi generali di ialuronidasi: 1. Ialuronidasi del tipo di mammifero (EC3.2.1.35), che sono endo- β -N-acetilesosaminidasi con tetrasaccaridi ed esasaccaridi come principali prodotti finali. Hanno attività sia idrolitiche che transglicosidasiche, e possono degradare lo ialuronano e i condroitin solfati (CS), generalmente C4-S e C6-S. 2. Le ialuronidasi batteriche (EC4.2.99.1) degradano lo ialuronano e, in varia misura, CS e DS. Sono endo- β -N-acetilesosaminidasi che operano mediante una reazione di beta eliminazione che produce principalmente prodotti finali disaccaridici. 3. Le ialuronidasi (EC3.2.1.36) da sanguisughe, altri parassiti e crostacei sono endo-beta-glucuronidasi che generano prodotti finali tetrasaccaridici ed esasaccaridici attraverso idrolisi del legame β 1-3.

Le ialuronidasi di mammifero possono essere ulteriormente suddivise in due gruppi: enzimi attivi in ambiente neutro e acido. Ci sono sei geni ialuronidasi-simili nel genoma umano, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 e PH20/SPAM1. HYALP1 è uno pseudogene, e non è stato mostrato che HYAL3 possieda attività enzimatica verso qualsiasi substrato noto. HYAL4 è una condroitinasi e mostra poca attività verso lo ialuronano. HYAL1 è l'enzima attivo in ambiente acido prototipico e PH20 è l'enzima attivo in ambiente neutro prototipico. Le ialuronidasi attive in ambiente acido, come HYAL1 e HYAL2, sono generalmente prive di attività catalitica a pH neutro (vale a dire pH 7). Per esempio, HYAL1 ha poca attività catalitica in vitro sopra a pH 4,5 [Frost I.G. e Stern, R., "A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents", *Anal. Biochemistry*, 1997; 251:263-269]. HYAL2 è un enzima attivo in ambiente acido con un'attività specifica molto bassa *in vitro*.

Gli enzimi ialuronidasi-simili possono anche essere caratterizzati da quelli che sono generalmente bloccati alla membrana plasmatica tramite un ancoraggio inositolo glicosilfosfatidile, come HYAL2 umano e PH20 umano [Danilkovitch-Miagkova et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100(8):4580-4585; Phelps et al., *Science* 1988; 240(4860):1780-1782], e quelli che sono generalmente solubili, come HYAL1 umano [Frost, I. G. et al., "Purification, cloning, and expression of human plasma yaluronidase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 236 (1):10-15]. Tuttavia, ci sono variazioni da specie a specie: PH20 bovina ad esempio è attaccata molto blandamente alla membrana plasmatica e non è ancorata tramite un ancoraggio sensibile alla fosfolipasi [Lalancette et al, *Biol Reprod.*, 2001; 65 (2):628-36]. Questa caratteristica unica della ialuronidasi bovina ha permesso l'uso dell'enzima ialuronidasi solubile da testicoli bovini come estratto per uso clinico (Wydase™, Hyalase™). Altre specie di PH20 sono enzimi ancorati ai lipidi che non sono generalmente solubili senza l'uso di detergenti o di lipasi. Per esempio, PH20 umana è ancorata alla membrana plasmatica tramite un ancoraggio a GPI (glicosilfosfatidilinositolo). Tentativi di preparare

costrutti di DNA di PH20 umano che non introdurrebbero un ancoraggio lipidico nel polipeptide hanno portato a un enzima cataliticamente inattivo o a un enzima insolubile [Arming et al., *Eur. J. Biochem.*, 1997; 247(3):810-4]. La ialuronidasi da sperma di macaco presenti in natura si trova sia in forma solubile che legata alla membrana. Mentre la forma legata alla membrana di 64 kDa possiede attività enzimatica a pH7,0, la forma di 54 kDa è attiva solo a pH4,0 [Cherr et al., *Dev. Biol.*, 1996; 10; 175(1): 142-53]. Così, forme solubili di PH20 sono spesso carenti di attività enzimatica in condizioni di neutralità.

W02006/091871 descrive che piccole quantità di glicoproteine ialuronidasi solubili (sHASEGP) possono essere introdotte in una formulazione al fine di facilitare la somministrazione del farmaco terapeutico nell'ipoderma. Con la rapida depolimerizzazione dell'HA nello spazio extracellulare la sHASEGP riduce la viscosità dell'interstizio, aumentando così la conduttanza idraulica e consentendo di somministrare volumi più grandi in modo sicuro e comodo nel tessuto SC. L'aumento della conduttanza idraulica indotto dalla sHASEGP attraverso la riduzione della viscosità interstiziale consente una maggiore dispersione, aumentando potenzialmente la biodisponibilità sistemica del farmaco terapeutico somministrato per via sottocutanea (SC).

Quando è iniettato nell'ipoderma, la depolimerizzazione dell'HA da parte della sHASEGP è localizzata verso il sito di iniezione nel tessuto SC. Evidenze sperimentali mostrano che la sHASEGP è inattivata localmente nello spazio interstiziale con un'emivita di 13 fino a 20 minuti nei topi, senza assorbimento sistemico rilevabile nel sangue dopo singola dose per via endovenosa nei topi CD-1. All'interno del compartimento vascolare la sHASEGP dimostra un'emivita di 2,3 e 5 minuti nei topi e nelle scimmie *Cynomolgus*, rispettivamente, con dosi fino a 0,5 mg/kg. La rapida clearance della sHASEGP, combinata con la continua sintesi del substrato HA nel tessuto SC, comporta un potenziamento della permeazione transitorio e localmente attivo per le altre molecole co-iniettate, i cui effetti sono completamente reversibili entro 24 fino a 48 ore post somministrazione [Bywaters G. L., et al., "Reconstitution of the dermal barrier to dye spread after Hyaluronidase injection", *Br. Med. J.*, 1951; 2 (4741): 1178-1183].

Oltre ai suoi effetti sulla dispersione dei fluidi a livello locale, la sHASEGP agisce anche come agente potenziante dell'assorbimento. Le macromolecole maggiori di 16 kilodalton (kDa) sono in gran parte escluse dall'assorbimento attraverso i capillari tramite diffusione e sono per lo più assorbite attraverso i linfonodi drenanti. Una macromolecola somministrata sottocute come ad esempio un anticorpo terapeutico (peso molecolare circa 150 kDa) deve quindi attraversare la matrice interstiziale prima di raggiungere i vasi linfatici drenanti per il successivo assorbimento nel compartimento vascolare. Aumentando la dispersione locale, la sHASEGP aumenta il tasso (K_a) di assorbimento di molte macromolecole. Questo porta a un aumento dei livelli ematici di picco (C_{max}) e potenzialmente a maggiore biodisponibilità rispetto alla

somministrazione SC in assenza di sHASEGP [Bookbinder L.H., et al., "A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics", *J. Control. Release* 2006; 114:230-241].

I prodotti ialuronidasi di origine animale sono utilizzati clinicamente da oltre 60 anni, principalmente per aumentare la dispersione e l'assorbimento di altri farmaci co-somministrati e per ipodermoclisi (iniezione/infusione SC di liquidi in grandi volumi) [Frost G. I., "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2007; 4:427-440]. I dettagli sul meccanismo d'azione delle ialuronidasi sono stati descritti in dettaglio nelle seguenti pubblicazioni: Duran-Reynolds F., "A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action", *CR Soc Biol Paris*, 1938; 69-81; Chain E., "A mucolytic enzyme in testes extracts", *Nature* 1939; 977-978; Weissmann B., "The transglycosylative action of testicular hyaluronidase", *J. Biol. Chem.*, 1955; 216: 783-94; 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.* 1991; 97:126-130; 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.* 1991; 76: 695-703; Laurent, T. C. and Fraser, J. R. E., "Degradation of Bioactive Substances: Physiology and Pathophysiology", Henriksen, J. H. (Ed) CRC Press, Boca Raton, Fla.; 1991. pp. 249-265; Harris, E. N., et al., "Endocytic function, glycosaminoglycan specificity, and antibody sensitivity of the recombinant human 190-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE)", *J. Biol. Chem.* 2004; 279:36201-36209; Frost, G. I., "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2007; 4: 427-440. I prodotti ialuronidasi approvati nei paesi della UE includono Hylase® "Dessau" e Hyalase®. I prodotti ialuronidasi di origine animale approvati negli Stati Uniti includono Vitrase™, Hydase™ e Amphadase™.

Formulazioni di anticorpi liofilizzati stabili comprendenti un lioprotettore, un tampone e un tensioattivo sono state descritte da Andya et al. (WO 97/04801 e brevetti US n. 6,267,958, 6,685,940, 6,821,151, 7,060,268). WO 2006/044908 fornisce formulazioni di anticorpi, inclusi anticorpi monoclonali formulati in tampone di istidina-acetato, da pH 5,5 a 6,5, preferibilmente da 5,8 a 6,2. Formulazioni di anticorpi anti-HER2 sono descritte nei brevetti U.S. n. 8,372,396; 9,017,671. Formulazioni di anticorpi anti-HER2 per via sottocutanea e i loro usi sono descritti nel brevetto U.S. n. 9,345,661. La somministrazione endovenosa a dose fissa di pertuzumab è descritta nei brevetti U.S. 7,449,184 e 8,404,234.

Sommario dell'invenzione

L'invenzione è come definita nelle rivendicazioni. In una forma di realizzazione specifica dell'invenzione, viene fornita una composizione farmaceutica liquida comprendente 600 mg di pertuzumab a una concentrazione di 60 mg/ml, 600 mg di trastuzumab a una concentrazione di 60 mg/ml, 2,000 U/ml di rHuPH20, 20 mM di His-HCl pH 5,5, 105 mM di trealosio, 100 mM di saccarosio, 0.04% di polisorbato 20, 10 mM di metionina, e acqua sterile per iniezione fino a un volume totale di 10 ml, che, per esempio, può essere contenuto in una fiala da 15 ml.

In un'altra forma di realizzazione specifica dell'invenzione, la composizione farmaceutica liquida comprende 1.200 mg di pertuzumab a una concentrazione di 80 mg/ml, 600 mg di trastuzumab a una concentrazione di 40 mg/ml, 2,000 U/ml di rHuPH20, 20 mM di His-HCl pH 5,5, 70 mM di trealosio, 133 mM di saccarosio, 0.04% di polisorbato 20, 10 mM di metionina e acqua sterile per iniezione fino a un volume totale di 15 ml, che può essere contenuto in una fiala da 20 ml.

In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione riguarda un articolo di fabbricazione comprendente una composizione farmaceutica liquida dell'invenzione.

In un aspetto, la divulgazione riguarda un articolo di fabbricazione comprendente una fiala monodose contenente una singola dose fissa di un anticorpo HER2 comprendente le sequenze amminoacidiche di catena leggera variabile e di catena pesante variabile di SEQ ID NO 7 e 8, rispettivamente, in cui la dose fissa è di circa 600 mg o di circa 1200 mg. Preferibilmente, in detto aspetto della divulgazione, l'anticorpo HER2 è pertuzumab.

In un aspetto della divulgazione, l'articolo di fabbricazione comprende due fiale monodose, in cui una prima fiala contiene una singola dose fissa di circa 1200 mg di pertuzumab e una seconda fiala contiene una singola dose fissa di circa 600 mg di pertuzumab.

In un secondo aspetto della divulgazione, l'articolo di fabbricazione comprende due fiale monodose, in cui la prima fiala contiene una singola dose fissa di circa 600 mg di pertuzumab e la seconda fiala contiene una singola dose fissa di circa 600 mg di trastuzumab.

In un terzo aspetto della divulgazione, l'articolo di fabbricazione comprende due fiale monodose, in cui la prima fiala contiene una singola dose fissa di circa 1200 mg di pertuzumab e una seconda fiala comprendente una singola dose fissa di 600 mg di trastuzumab.

In tutti gli aspetti della divulgazione, almeno una delle fiale monodose può contenere la(e) dose(i) fissa(e) in una formulazione liquida per somministrazione sottocutanea.

In tutti gli aspetti della divulgazione, la formulazione liquida per somministrazione sottocutanea comprende inoltre un enzima ialuronidasi, come la ialuronidasi umana ricombinante (rHuPH20). rHuPH20 può essere presente in una quantità sufficiente a provocare un aumento della dispersione del pertuzumab o del trastuzumab contenuto nella stessa formulazione liquida durante la somministrazione sottocutanea. rHuPH20

può essere presente nella formulazione liquida contenente trastuzumab, per esempio a una concentrazione compresa tra circa 150 U/ml e 16.000 U/ml, o a una concentrazione compresa tra circa 600 U/ml e circa 16.000 U/ml, o a una concentrazione compresa tra circa 1.000 U/ml e circa 2.000 U/ml, ad esempio a una concentrazione di circa 2.000 U/ml o a una concentrazione di almeno circa 600 U/ml.

rHuPH20 può essere presente nella formulazione liquida contenente pertuzumab a una concentrazione compresa tra circa 600 U/ml e circa 2.000 U/ml, come ad esempio a una concentrazione di circa 600 U/ml, o a una concentrazione di circa 667 U/ml, o a una concentrazione di circa 1.000 U/ml, o a una concentrazione di circa 2.000 U/ml.

In un altro aspetto della divulgazione, la fiala monodose presente nell'articolo di fabbricazione comprende inoltre una singola dose fissa di trastuzumab.

In un aspetto della divulgazione, la singola dose fissa di pertuzumab e la singola dose fissa di trastuzumab sono contenute in un'unica formulazione liquida per somministrazione sottocutanea, dove la formulazione liquida può, per esempio, contenere una singola dose fissa di circa 600 mg di pertuzumab e una singola dose fissa di circa 600 mg di trastuzumab, o una singola dose fissa di circa 1200 mg di pertuzumab e una singola dose fissa di circa 600 mg di trastuzumab.

La formulazione liquida comprendente la dose fissa di pertuzumab e la dose fissa di trastuzumab può inoltre comprendere un enzima ialuronidasi, come la ialuronidasi umana ricombinante (rHuPH20), che può essere presente in detta formulazione liquida in una quantità sufficiente a provocare un aumento della dispersione del pertuzumab e del trastuzumab contenuti nella stessa formulazione liquida durante la somministrazione sottocutanea, come ad esempio a una concentrazione di almeno circa 600 U/ml, o a una concentrazione compresa tra circa 600 U/ml e circa 2.000 U/ml, ad esempio a concentrazione di circa 1.000 U/ml.

In alcune forme di realizzazione, gli articoli di fabbricazione nel presente documento comprendono inoltre un foglietto illustrativo che istruisce l'utente a somministrare la(e) dose(i) fissa(e) per via sottocutanea a un paziente con cancro HER2-positivo, come recitato nelle rivendicazioni.

In una forma di realizzazione, il foglietto illustrativo istruisce l'utente a somministrare le dosi fisse di pertuzumab e trastuzumab per via sottocutanea a un paziente con cancro HER2-positivo, come recitato nelle rivendicazioni.

In un altro aspetto della divulgazione, il foglietto illustrativo istruisce l'utente a co-somministrare la dose fissa di pertuzumab e la dose fissa di trastuzumab per via sottocutanea come due iniezioni sottocutanee separate.

In un ulteriore aspetto della divulgazione, il foglietto illustrativo istruisce l'utente a somministrare il pertuzumab a dose fissa comiscelato con il trastuzumab a dose fissa, come una singola iniezione sottocutanea.

Il cancro può, per esempio, essere cancro al seno, cancro peritoneale, cancro alle tube di Falloppio, cancro ai polmoni, cancro del colon-retto, cancro delle vie biliari o cancro della vescica, come il cancro al seno in fase iniziale (EBC) o il cancro al seno metastatico (MBC).

In un altro aspetto, la divulgazione riguarda un articolo di fabbricazione comprendente una fiala da 10 ml o 20 ml contenente una singola dose fissa di un anticorpo HER2 comprendente le sequenze amminoacidiche leggere variabili e pesanti variabili nelle SEQ ID NO 7 e 8, rispettivamente, in cui la dose fissa è di circa 600 mg o di circa 1200 mg dell'anticorpo HER2, e un foglietto illustrativo che istruisce l'utente a somministrare la dose fissa per via sottocutanea a un paziente con cancro HER2-positivo.

Secondo l'invenzione, l'anticorpo HER2 o uno degli anticorpi HER2 è pertuzumab. In un altro aspetto della divulgazione, la dose fissa di pertuzumab è contenuta in una formulazione liquida per somministrazione sottocutanea, in cui la formulazione liquida può, per esempio, comprendere il pertuzumab a una concentrazione di circa 100-150 mg/ml, ad esempio a una concentrazione di circa 120 mg/ml.

In vari aspetti della divulgazione, la formulazione liquida presente nell'articolo di fabbricazione comprende inoltre ialuronidasi umana ricombinante (rHuPH20) in quantità sufficiente a provocare un aumento della dispersione del pertuzumab durante la somministrazione sottocutanea, come ad esempio a una concentrazione di circa 2.000 U/ml, o a una concentrazione di circa 1.000 U/ml.

L'articolo di fabbricazione può inoltre comprendere uno o più eccipienti scelti dal gruppo consistente di agenti tamponanti, stabilizzanti e tensioattivi.

In un aspetto, l'agente tamponante è idoneo per regolare il pH a circa 5,0 - 6,0, come ad esempio a pH 5,5 - 5,7, ad esempio 5,5. Un tampone esemplificativo è un tampone di istidina, come L-istidina acetato.

Lo stabilizzante può comprendere saccarosio e opzionalmente metionina e/o trealosio. Un tensioattivo preferito è il polisorbato 20.

In un ulteriore aspetto, la divulgazione riguarda una formulazione acquosa per somministrazione sottocutanea comprendente pertuzumab a una concentrazione di circa 120 mg/ml, rHuPH20 a una concentrazione di circa 1000-2000 U/ml, un tampone di L-istidina per regolare il pH a circa 5,5-5,7, saccarosio, metionina e polisorbato 20.

In un aspetto, il rHuPH20 è presente a una concentrazione di circa 1000 U/ml. In un altro aspetto, il rHuPH20 è presente a una concentrazione di circa 2000 U/ml. In un ulteriore aspetto, il pH della soluzione acquosa è pH è 5,7.

L'invenzione riguarda inoltre una composizione farmaceutica sottocutanea liquida comprendente una dose fissa di pertuzumab e una dose fissa di trastuzumab co-formulate in una soluzione acquosa comprendente inoltre rHuPH20, un agente tamponante idoneo per regolare il pH a circa 5,0 - 6,0, uno stabilizzatore e un tensioattivo, come recitato nelle rivendicazioni.

In un aspetto, l'agente citotossico è un tampone di istidina. In un altro aspetto, l'agente tamponante è L-istidina acetato. In un altro aspetto ancora, il pH è 5,5-5,7, ad esempio 5,5. In altri aspetti, la composizione farmaceutica liquida comprende saccarosio come stabilizzante, e può inoltre comprendere metionina e/o trealosio come stabilizzante.

In un aspetto specifico, la composizione farmaceutica liquida comprende 600 mg di pertuzumab a una concentrazione di 60 mg/ml, 600 mg di trastuzumab a una concentrazione di 60 mg/ml, 1.000 U/ml di rHuPH20, 20 mM di His-HCl pH 5,5, 105 mM di trealosio, 100 mM di saccarosio, 0,04% di polisorbato 20, 10 mM di metionina e acqua sterile per iniezione fino a un volume totale di 10 ml, che, ad esempio, può essere contenuto in una fiala da 15 ml.

In un altro aspetto specifico, la composizione farmaceutica liquida comprende 1.200 mg di pertuzumab a una concentrazione di 80 mg/ml, 600 mg di trastuzumab a una concentrazione di 40 mg/ml, 1.000 U/ml di rHuPH20, 20 mM di His-HCl pH 5,5, 70 mM di trealosio, 133 mM di saccarosio, 0,04% di polisorbato 20, 10 mM di metionina e acqua sterile per iniezione fino a un volume totale di 15 ml, che può essere contenuto in una fiala da 20 ml.

I suddetti articoli di fabbricazione possono inoltre comprendere un foglietto illustrativo con istruzioni per somministrare per via sottocutanea la composizione farmaceutica liquida ivi contenuta a un soggetto umano con cancro HER2-positivo, come, per esempio, cancro al seno, cancro peritoneale, cancro alle tube di Falloppio, cancro ai polmoni, cancro del colon-retto, cancro delle vie biliari e cancro della vescica, ad esempio cancro al seno in fase iniziale (EBC) o cancro al seno metastatico (MBC).

In un ulteriore aspetto, la divulgazione riguarda un procedimento per il trattamento del cancro che comprende la somministrazione per via sottocutanea a un soggetto umano con un cancro HER2-positivo di una o più dosi fisse di un anticorpo HER2 comprendente le sequenze amminoacidiche leggere variabili e pesanti variabili in SEQ ID NO 7 e 8, rispettivamente, in una quantità efficace per trattare il cancro, in cui la dose fissa è di circa 600 mg e/o di circa 1200 mg.

L'anticorpo HER2 è preferibilmente pertuzumab.

In una forma di realizzazione, l'invenzione riguarda pertuzumab per l'uso in un procedimento per il trattamento del cancro HER2-positivo, comprendente la somministrazione del pertuzumab per via sottocutanea a un soggetto umano a una dose di carico fissa di 1200 mg seguita da almeno una dose di mantenimento di 600 mg.

In una seconda forma di realizzazione, la somministrazione della dose di carico è seguita dalla somministrazione di dosi multiple di mantenimento.

In una terza forma di realizzazione, la prima dose di mantenimento di pertuzumab viene somministrata al soggetto umano circa due settimane o circa tre settimane dopo la somministrazione della dose di carico di pertuzumab.

In ulteriori forme di realizzazione, le dosi fisse di pertuzumab vengono somministrate al soggetto umano approssimativamente ogni 2 settimane o approssimativamente ogni 3 settimane.

Il cancro può essere un cancro HER2-positivo, come il cancro al seno, cancro peritoneale, cancro delle tube di Falloppio, cancro ai polmoni, cancro del colon-retto, cancro delle vie biliari e cancro della vescica, ad esempio cancro al seno in fase iniziale (EBC) o cancro al seno metastatico (MBC).

Opzionalmente, il procedimento può comprendere inoltre la somministrazione di un secondo agente terapeutico al paziente, come un diverso anticorpo HER2, ad esempio trastuzumab, o un agente chemioterapico.

In una forma di realizzazione, la dose fissa di pertuzumab viene somministrata per via sottocutanea in combinazione con trastuzumab somministrato per via sottocutanea.

In un'altra forma di realizzazione, il pertuzumab a dose fissa e il trastuzumab vengono co-somministrati per via sottocutanea come due iniezioni sottocutanee separate.

In ancora un'altra forma di realizzazione, il pertuzumab a dose fissa viene comiscelato con trastuzumab a dose fissa e somministrato come una singola iniezione sottocutanea.

In un'ulteriore forma di realizzazione, il pertuzumab a dose fissa e il trastuzumab a dose fissa vengono somministrati come un'unica co-formulazione per somministrazione sottocutanea, come per esempio una qualsiasi delle co-formulazioni descritte sopra e in tutta la divulgazione.

L'agente chemioterapico, se somministrato, può essere, per esempio, un taxano e/o un'antraciclina, come paclitaxel, docetaxel, daunorubicina, doxorubicina e/o epirubicina.

Breve descrizione dei disegni

La Figura 1 fornisce uno schema della struttura proteica di HER2 e sequenze amminoacidiche per i domini I-IV (SEQ ID NO 1-4, rispettivamente) del suo dominio extracellulare.

Le Figure 2A e 2B raffigurano allineamenti delle sequenze amminoacidiche dei domini leggero variabile (V_L) (Figura 2A) e pesante variabile (V_H) (Figura 2B) dell'anticorpo monoclonale murino 2C4 (SEQ ID NO 5 e 6, rispettivamente); i domini V_L e V_H della variante 574/pertuzumab

(SEQ ID NO. 7 e 8, rispettivamente), e cornici consenso V_L e V_H umane (hum $\kappa 1$, sottogruppo I kappa leggero; humIII, sottogruppo III pesante) (SEQ ID NO 9 e 10, rispettivamente). Gli asterischi identificano differenze tra domini variabili di pertuzumab e l'anticorpo monoclonale murino 2C4 o tra domini variabili di pertuzumab e la cornice umana. Le regioni determinanti la complementarità (CDR) sono tra parentesi.

Le Figure 3A e 3B mostrano le sequenze amminoacidiche della catena leggera (Figura 3A, SEQ ID NO 11) e catena pesante (Figura 3B; SEQ ID N 12) di pertuzumab. Le CDR sono mostrate in grassetto. Le masse molecolari calcolate della catena leggera e della catena pesante sono 23.526,22 Da e 49,216.56 Da (cisteine in forma ridotta). La porzione di carboidrati è attaccata all'Asn 299 della catena pesante.

Le Figure 4A e 4B mostrano le sequenze amminoacidiche della catena leggera (Figura 4A; SEQ ID NO 13) e catena pesante (Figura 4B, SEQ ID NO 14) di trastuzumab, rispettivamente. I limiti dei domini variabile leggero e variabile pesante sono indicati dalle frecce.

Le Figure 5A e 5B illustrano una sequenza della variante della catena leggera del pertuzumab (Figura 5A, SEQ ID NO 15) e una sequenza della variante della catena pesante del pertuzumab (Figura 5B, SEQ ID NO 16), rispettivamente.

La Figura 6 mostra lo schema di studio dello studio di determinazione della dose per la somministrazione sottocutanea di pertuzumab da solo e in combinazione con trastuzumab.

Figura 7 Diagramma decisionale.

Figura 8 Panoramica dello studio.

La Figura 9 mostra concentrazioni normalizzate in base alla dose ($\mu\text{g/ml}$) di pertuzumab somministrato per via sottocutanea, con e senza trastuzumab, in funzione del tempo (giorni).

La Figura 10 mostra concentrazioni normalizzate in base alla dose ($\mu\text{g/ml}$) di pertuzumab in funzione del tempo (giorni) con diverse concentrazioni di rHuPH20.

La Figura 11 mostra le stime dei parametri utilizzando i modelli EV di pertuzumab e PK (popPK) della popolazione storica a confronto.

Figura 12 Dati demografici e distribuzione per età.

Figura 13 Panoramica sugli eventi avversi Parte 1.

Figura 14 Panoramica sugli eventi avversi Parte 1, n. di soggetti.

Figura 15 Eventi avversi più comuni (tutti i gradi) - incidenza complessiva $\geq 5\%$ nello studio, n. di soggetti

Figura 16 Tossicità correlata all'EGFR

Figura 17 Reazioni correlate all'iniezione e reazioni nel sito di iniezione

Figura 18 Valutazioni LVEF - ECHO

Figura 19 Composizioni delle sostanze farmacologiche sottocutanee (SC DS) pertuzumab, trastuzumab e rHuPH20 utilizzate nella preparazione delle co-formulazioni pertuzumab-trastuzumab a dose fissa.

La Figura 20 mostra la quantità (%) di specie ad alto peso molecolare (HMWS) in varie formulazioni sottocutanee di pertuzumab e trastuzumab, e co-formulazioni di pertuzumab/trastuzumab a 5°C e 25°C, rispettivamente.

Figura 21 Profilo concentrazione-tempo medio di pertuzumab sierico per coorte

Figura 22 Profilo tempo-concentrazione medio geometrico di pertuzumab sierico normalizzato in base alla dose, con e senza Herceptin concomitante

Figura 23 Profilo concentrazione-tempo medio geometrico di pertuzumab sierico con 667 U/ml o 2,000 U/ml di rHuPH20 (HMV)

Figura 24 Profilo concentrazione-tempo medio geometrico di trastuzumab sierico con 667 U/ml o 2,000 U/ml di rHuPH20 (HMV).

Figura 25 Profilo concentrazione-tempo medio geometrico di pertuzumab sierico dopo dosi di Perjeta 600 mg SC e Perjeta 420 mg EV.

Figura 26 Profilo tempo-concentrazione medio geometrico di pertuzumab sierico in pazienti con HMV o EBC.

Figura 27 Profilo concentrazione-tempo medio geometrico di pertuzumab sierico normalizzato in base alla dose, con 667 U/ml, 1.000 U/ml o 2,000 U/ml di rHuPH20.

Figura 28 Profilo concentrazione-tempo medio geometrico di trastuzumab sierico con 667 U/ml o 1.000 U/ml o 2,000 U/ml di rHuPH20.

Figura 29 Test di scalfittura e spolverizzazione sulla stabilità della sostanza farmaceutica pertuzumab: Dati SEC

Figura 30 Differenze di formulazione FDC - Torbidità

Figura 31 Differenze di formulazione FDC-SEC/HMWS

Descrizione dettagliata delle forme di realizzazione preferite

L'invenzione è come definita nelle rivendicazioni.

I. Definizioni

Il termine "formulazione farmaceutica" si riferisce a una preparazione che è in una forma tale da consentire che l'attività biologica del principio attivo sia efficace, e che non contiene componenti aggiuntivi che sono inaccettabilmente tossici per un soggetto al quale verrebbe somministrata la formulazione. Tali formulazioni sono sterili.

Una formulazione "sterile" è asettica o priva di tutti i microrganismi viventi e delle loro spore.

Una formulazione "stabile" è quella in cui la proteina al suo interno, dopo conservazione, mantiene essenzialmente la sua stabilità fisica e/o stabilità chimica e/o attività biologica. Preferibilmente, dopo conservazione, la formulazione mantiene essenzialmente la sua stabilità fisica e chimica, nonché la sua attività biologica. Il periodo di conservazione è generalmente scelto in base alla validità prevista della formulazione.

Varie tecniche analitiche per misurare la stabilità delle proteine sono disponibili nella tecnica e sono recensite in Peptide and Protein. Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) e Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993), per esempio. La stabilità può essere misurata a una temperatura selezionata per un periodo di tempo selezionato. Preferibilmente, la formulazione è stabile a circa 40°C. per almeno circa 2-4 settimane, e/o stabile a circa 5,0 e/o 15°C. per almeno 3 mesi e/o stabile a circa -20°C. per almeno 3 mesi o almeno 1 anno. Inoltre, la formulazione è preferibilmente stabile dopo congelamento (ad esempio, fino a -70°C) e scongelamento della formulazione, per esempio dopo 1, 2 o 3, cicli di congelamento e scongelamento. La stabilità può essere valutata qualitativamente e/o quantitativamente in una varietà di modi diversi, tra cui la valutazione della formazione di aggregato (per esempio con cromatografia ad esclusione dimensionale, misurando la torbidità, e/o mediante ispezione visiva); mediante valutazione dell'eterogeneità di carica usando la cromatografia a scambio cationico o l'elettroforesi zonale capillare; l'analisi di sequenze ammino-terminali o carbossi-terminali; l'analisi di spettrometria di massa; l'analisi SDS-PAGE per confrontare l'anticorpo ridotto e intatto; l'analisi di mappa peptidica (per esempio triptici o LYS-C); valutando l'attività biologica o la funzione di legame all'antigene dell'anticorpo; ecc. L'instabilità può comportare uno o più di: aggregazione, deamidazione (ad esempio deamidazione di Asn), ossidazione (ad esempio ossidazione di Met), isomerizzazione (ad esempio isomerizzazione di Asp), accorciamento (clipping)/idrolisi/frammentazione (ad esempio frammentazione della regione cerniera), formazione di succinimide, cisteina(e) non appaiata(e), estensione N-terminale, processamento C-terminale, differenze di glicosilazione ecc.

Un anticorpo che è "suscettibile di deamidazione" è uno comprendente uno o più residui che si è scoperto essere inclini alla deamidazione.

Un anticorpo che è "suscettibile di aggregazione" è uno di cui si è scoperto che si aggrega con una o più altre molecole anticorpali, in particolare dopo congelamento e/o agitazione.

Un anticorpo che è "suscettibile di frammentazione" è un anticorpo di cui si è scoperto che viene clivato in due o più frammenti, per esempio in corrispondenza di una sua regione cerniera.

Con "riduzione della deamidazione, dell'aggregazione o della frammentazione" si intende prevenire o ridurre la quantità di deamidazione,

aggregazione o frammentazione rispetto all'anticorpo monoclonale formulato a un pH diverso o in un tampone diverso.

Nel presente documento, "attività biologica" di un anticorpo monoclonale si riferisce alla capacità dell'anticorpo di legarsi all'antigene e provocare una risposta biologica misurabile che può essere misurata in vitro o in vivo. Nel caso di pertuzumab, in una forma di realizzazione, l'attività biologica si riferisce alla capacità dell'anticorpo formulato di inibire la proliferazione della linea cellulare di cancro al seno umano MDA-MB-175-VII.

Con "isotonico" si intende che la formulazione di interesse ha essenzialmente la stessa pressione osmotica del sangue umano. Le formulazioni isotoniche avranno generalmente una pressione osmotica da circa 250 a 350 mOsm. L'isotonicità può essere misurata utilizzando per esempio un osmometro del tipo a tensione di vapore o a punto di congelamento.

Come usato nel presente documento, "tampone" indica una soluzione tamponata che resiste alle variazioni di pH grazie all'azione dei suoi componenti coniugati acido-base. Il tampone di questa invenzione ha preferibilmente un pH nell'intervallo da circa 5,0 a circa 7,0, preferibilmente da circa 5,5 a circa 6,5, per esempio da 5,5 a 6,2, come, per esempio, 5,5 o 5,7. Esempi di tamponi che controlleranno il pH in questo intervallo includono acetato, succinato, succinato, gluconato, istidina, citrato, glicilglicina e altri tamponi di acidi organici. Il tampone preferito nel presente documento è un tampone di istidina.

Un "tampone di istidina" è un tampone comprendente ioni di istidina. Esempi di tamponi di istidina includono cloruro di istidina, acetato di istidina, fosfato di istidina, solfato di istidina. Il tampone di istidina preferito identificato negli esempi nel presente documento è risultato essere l'acetato di istidina. Nella forma di realizzazione preferita, il tampone di acetato di istidina viene preparato titolando L-istidina (solido, base libera) con acido acetico (liquido). Preferibilmente, il tampone di istidina o il tampone di istidina-acetato ha un pH compreso tra 5,5 e 6,5, o tra pH 5,7 e 6,2, ad esempio pH 5,7.

Un "saccaride" nel presente documento comprende la composizione generale $(CH_2O)_n$ e suoi derivati, inclusi monosaccaridi, disaccaridi, trisaccaridi, polisaccaridi, alcoli di zucchero, zuccheri riducenti, zuccheri non riducenti ecc. Esempi di saccaridi nel presente documento includono glucosio, saccarosio, trealosio, lattosio, fruttosio, maltosio, destrano, glicerina, destrano, eritritolo, glicerolo, arabitolo, xilitolo, sorbitolo, mannitolo, mellibiosio, meleztosio, raffiniosio, mannotriosio, stachiosio, maltosio, lattulosio, maltulosio, glucitolo, maltitolo, isomaltulosio ecc. Il saccaride preferito nel presente documento è un disaccaride non riducente, come il trealosio o il saccarosio.

Nel presente documento, un "tensioattivo" si riferisce a un agente di superficie, preferibilmente un tensioattivo non ionico. Nel presente documento, esempi di tensioattivi includono polisorbato (per esempio, polisorbato 20 e, polisorbato 80); polossamero (ad esempio

polossamero 188); Triton; sodio dodecil solfato (SDS); sodio lauril solfato; ottil glicoside di sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o stearil-solfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- o stearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaina; lauroammidopropil-, cocamidopropil-, linoleammidopropil-, miristammidopropil-, palmidopropil- o isostearammidopropil-betaina (ad esempio lauroammidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearammidopropil-dimetilammina; sodio metil cocoil- o disodio metil oleil-taurato; e la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, NJ); polietil glicole, polipropil glicole e copolimeri di etilene e propilenglicole (ad esempio, Pluronic, PF68 eccetera), ecc. Il tensioattivo preferito nel presente documento è il polisorbato 20.

Un "recettore HER" è una proteina tirosin-chinasi recettore appartenente alla famiglia dei recettori HER e comprende i recettori EGFR, HER2, HER3 e HER4. Il recettore HER comprenderà generalmente un dominio extracellulare, che può legare un ligando HER e/o dimerizzare con un'altra molecola dei recettori HER; un dominio transmembrana lipofilo; un dominio intracellulare tirosin chinasi conservato; e un dominio carbossi-terminale di segnalazione che ospita diversi residui di tirosina che possono essere fosforilati. Il recettore HER può essere un recettore HER di "sequenza nativa" o una sua "variante amminoacidica della sequenza". Preferibilmente il recettore HER è il recettore HER umano di sequenza nativa.

Le espressioni "ErbB2" e "HER2" sono utilizzate in modo intercambiabile nel presente documento e si riferiscono alla proteina HER2 umana descritta, per esempio, in Semba *et al.*, *PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985) e in Yamamoto *et al.* *Nature* 319:230-234 (1986) (numero di accesso Genebank X03363). Il termine "*erbB2*" si riferisce al gene che codifica per l'ErbB2 umano e "*neu*" si riferisce al gene che codifica per la proteina p185^{neu} di ratto. L'HER2 preferita è la sequenza nativa umana HER2.

Nel presente documento, "dominio extracellulare HER2" o "HER2 ECD" si riferisce a un dominio di HER2 che si trova all'esterno di una cellula, ancorato a una membrana cellulare, o in circolazione, compresi i suoi frammenti. La sequenza amminoacidica di HER2 è mostrata in Figura 1. In una forma di realizzazione, il dominio extracellulare di HER2 può comprendere quattro domini: "Dominio I" (residui di amminoacidi da circa 1-195; SEQ ID NO: 1), "Dominio II" (residui di amminoacidi da circa 196-319; SEQ ID NO: 2), "Dominio III" (residui di amminoacidi da circa 320-488; SEQ ID NO: 3) e "Dominio IV" (residui di amminoacidi da circa 489-630; SEQ ID NO: 4) (numerazione dei residui senza peptide segnale). Vedere Garrett *et al.* *Mol. Cell.* 11: 495-505 (2003), Cho *et al.* *Nature* 421: 756-760 (2003), Franklin *et al.* *Cancer Cell* 5:317-328 (2004) e Plowman *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993), nonché la Figura 1 nel presente documento.

"HER3" o "ErbB3" nel presente documento si riferiscono al recettore come descritto, per esempio, nei brevetti US n. 5,183,884 e 5,480,968 e in Kraus *et al.* *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989).

Un cancro "a basso HER3" è uno che esprime l'HER3 a un livello inferiore rispetto al livello mediano per l'espressione dell'HER3 nel tipo di cancro. In una forma di realizzazione, il cancro a basso HER3 è rappresentato dal carcinoma ovarico, peritoneale o delle tube di Falloppio. Il livello di DNA, della proteina, e/o dell'mRNA dell'HER3 nel cancro può essere valutato per determinare se il cancro sia un cancro a basso HER3. Vedere, ad esempio, il brevetto US N. 7,981,418 per ulteriori informazioni sul cancro a basso HER3. Opzionalmente, un saggio di espressione dell'mRNA dell'HER3 viene eseguito al fine di determinare che il cancro è un cancro a basso HER3. In una forma di realizzazione, viene valutato il livello di mRNA dell'HER3 nel cancro, ad esempio utilizzando la reazione a catena della polimerasi (PCR), come la PCR di trascrizione inversa quantitativa (qRT-PCR). Opzionalmente, il cancro esprime HER3 a un rapporto di concentrazione uguale o inferiore a circa 2,81 come valutato qRT-PCR, ad esempio utilizzando uno strumento COBAS z480®.

Un "dimero HER" nel presente documento è un dimero associato in modo non covalente comprendente almeno due recettori HER. Tali complessi possono formarsi quando una cellula che esprime due o più recettori HER è esposta a un ligando HER e può essere isolata mediante immunoprecipitazione e analizzata mediante SDS-PAGE come descritto per esempio in Sliwkowski *et al.*, J. Biol. Chem., 269 (20): 14661-14665 (1994). Altre proteine, come una subunità dei recettori delle citochine (ad esempio Gp130) possono essere associate al dimero. Preferibilmente, il dimero HER comprende HER2.

Un "eterodimero HER" nel presente documento è un eterodimero non associato in modo covalente comprendente almeno due diversi recettori HER, come eterodimeri EGFR-HER2, HER2-HER3 o HER2-HER4.

Un "anticorpo HER" è un anticorpo che si lega a un recettore HER. Opzionalmente, l'anticorpo HER interferisce ulteriormente con l'attivazione o funzione di HER. Preferibilmente, l'anticorpo HER si lega al recettore HER2. Gli anticorpi HER2 di interesse nel presente documento sono pertuzumab e trastuzumab.

"Attivazione di HER" si riferisce all'attivazione, o alla fosforilazione, di uno o più recettori HER. Generalmente l'attivazione di HER porta a trasduzione del segnale (ad esempio provocata da un dominio chinasi intracellulare di un recettore HER fosforilante residui di tirosina nel recettore HER o in un polipeptide del substrato). L'attivazione di HER può essere mediata dal legame del ligando HER a un dimero di HER comprendente il recettore HER di interesse. Il legame del ligando a un dimero HER può attivare un dominio chinasi di uno o più dei recettori HER nel dimero e quindi portare alla fosforilazione dei residui di tirosina in uno o più dei recettori HER e/o alla fosforilazione dei residui di tirosina in ulteriori polipeptidi del substrato, come Akt o MAPK chinasi intracellulari.

"Fosforilazione" si riferisce all'aggiunta di uno o più gruppi fosfato a una proteina, come un recettore HER, o a un suo substrato.

Un anticorpo che "inibisce la dimerizzazione dell'HER" è un anticorpo che inibisce o interferisce con la formazione di un dimero HER. Preferibilmente, tale anticorpo si lega all'HER2 nel suo sito di legame eterodimerico. L'anticorpo inibitore della dimerizzazione più preferito nel presente documento è pertuzumab o MAb 2C4. Altri esempi di anticorpi che inibiscono la dimerizzazione di HER comprendono anticorpi che si legano all'EGFR e ne inibiscono la dimerizzazione con uno o più altri recettori HER (per esempio l'anticorpo monoclonale EGFR806, MAb 806, che si lega all'EGFR attivato o "non legato"; vedere Johns *et al.*, J. Biol. Chem. 279 (29): 30375-30384 (2004)); anticorpi che si legano all'HER3 e inibiscono la sua dimerizzazione con uno o più altri recettori HER; e anticorpi che si legano all'HER4 e inibiscono la sua dimerizzazione con uno o più altri recettori HER.

Un "inibitore della dimerizzazione di HER2" è un agente che inibisce la formazione di un dimero o eterodimero comprendente HER2.

Un "sito di legame eterodimerico" sull'HER2 si riferisce a una regione nel dominio extracellulare di HER2 che contatta, o si interfaccia con una regione nel dominio extracellulare di EGFR, HER3 o HER4 dopo la formazione di un dimero con esso. La regione si trova nel dominio II di HER2 (SEQ ID n: 15). Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

Un anticorpo HER2 che "si lega a un sito di legame eterodimerico" di HER2, si lega ai residui nel dominio II (SEQ ID NO: 2) e opzionalmente si lega anche ai residui in altri domini del dominio extracellulare HER2, come i domini I e III, SEQ ID NO: 1 e 3), e può ostacolare stericamente, almeno in parte, la formazione di un eterodimero HER2-EGFR, HER2-HER3 o HER2-HER4. Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004) caratterizzano la struttura cristallina di HER2-pertuzumab depositata nella banca dati proteica RCSB (codice ID IS78), che illustra un anticorpo a titolo di esempio che si lega al sito di legame eterodimerico di HER2.

Un anticorpo che "si lega al dominio II" di HER2 si lega ai residui nel dominio II (SEQ ID NO: 2) e opzionalmente ai residui in altri uno o più domini di HER2, come i domini I e III (SEQ ID NO: 1 e 3, rispettivamente). Preferibilmente l'anticorpo che si lega al dominio II si lega alla giunzione tra i domini I, II e III di HER2.

Per gli scopi riportati nel presente documento, "pertuzumab" e "rhuMAb 2C4", che sono usati in modo intercambiabile, si riferiscono a un anticorpo comprendente le sequenze amminoacidiche della catena leggera variabile e pesante variabile rispettivamente in SEQ ID NO: 7 e 8.

Dove il pertuzumab è un anticorpo intatto, comprende preferibilmente un anticorpo IgG1; in una forma di realizzazione comprendente la sequenza amminoacidica di catena leggera in SEQ ID NO: 11 o 15 e la sequenza amminoacidica di catena pesante in SEQ ID NO: 12 o 16.

L'anticorpo è opzionalmente prodotto da cellule ovariche di criceto cinese (CHO) ricombinanti. I termini "pertuzumab" e "rhuMAb 2C4" nel presente documento riguardano versioni biosimilari del farmaco con il nome adottato dagli Stati Uniti (USAN) o il nome internazionale non

proprietario (INN): pertuzumab.

Per gli scopi indicati nel presente documento, "trastuzumab" e "rhuMAb4D5", che sono usati in modo intercambiabile, si riferiscono a un anticorpo comprendente le sequenze amminoacidiche della leggera variabile e della pesante variabile rispettivamente dall'interno di SEQ. ID N.: 13 e 14. Dove trastuzumab è un anticorpo intatto, comprende preferibilmente un anticorpo IgG1; in una forma di realizzazione comprendente la sequenza amminoacidica di catena leggera di SEQ ID NO: 13 e la sequenza amminoacidica di catena pesante di SEQ ID NO: 14. L'anticorpo è opzionalmente prodotto da cellule ovariche di criceto cinese (CHO). I termini "trastuzumab" e "rhuMAb4D5" nel presente documento riguardano versioni biosimilari del farmaco con il nome adottato dagli Stati Uniti (USAN) o il nome internazionale non proprietario (INN): trastuzumab.

Il termine "anticorpo" nel presente documento è usato nel senso più ampio e riguarda nello specifico anticorpi monoclonali, anticorpi policlonali, anticorpi multispecifici (ad esempio gli anticorpi bispecifici) e frammenti di anticorpi purché esibiscano l'attività biologica desiderata.

Forme "umanizzate" di anticorpi non umani (ad esempio, di roditore) sono anticorpi chimerici che contengono una sequenza minima derivata da un'immunoglobulina non umana. Per la maggior parte, gli anticorpi umanizzati sono immunoglobuline umane (anticorpo ricevente) in cui i residui derivanti da una regione ipervariabile del ricevente sono sostituiti con residui derivanti da una regione ipervariabile di una specie non umana (anticorpo donatore) come topo, ratto, coniglio o primate non umano avente la specificità, l'affinità e la capacità desiderate. In alcuni casi, i residui della regione cornice (FR) dell'immunoglobulina umana vengono sostituiti dai corrispondenti residui non umani. Inoltre, gli anticorpi umanizzati possono comprendere residui che non si trovano nell'anticorpo ricevente o nell'anticorpo donatore. Queste modifiche vengono realizzate per perfezionare ulteriormente la prestazione dell'anticorpo. In generale, l'anticorpo umanizzato comprenderà sostanzialmente tutti tra almeno uno, e tipicamente due, domini variabili, in cui tutte o sostanzialmente tutte le anse ipervariabili corrispondono a quelle di un'immunoglobulina non umana e tutte o sostanzialmente tutte le FR sono quelle di una sequenza di immunoglobulina umana. L'anticorpo umanizzato opzionalmente comprenderà anche almeno una parte di una regione costante dell'immunoglobulina (Fc), tipicamente quella di un'immunoglobulina umana. Per ulteriori dettagli, vedere Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Gli anticorpi umanizzati HER2 comprendono specificamente trastuzumab (HERCEPTIN®) come descritto nella Tabella 3 del brevetto U.S. 5,821,337 e come definito nel presente documento; e anticorpi umanizzati 2C4 come pertuzumab come descritto e definito nel presente documento.

Un "anticorpo intatto" nel presente documento è un anticorpo che comprende due regioni leganti l'antigene e una regione Fc. Preferibilmente, l'anticorpo intatto ha una regione Fc funzionale.

I "frammenti di anticorpo" comprendono una porzione di un anticorpo intatto, che comprende preferibilmente la sua regione di legame all'antigene. Esempi di frammenti di anticorpo comprendono frammenti Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; diabody; anticorpi lineari; molecole di anticorpi a catena singola; e anticorpi multispecifici formati da frammenti di anticorpo.

Gli "anticorpi nativi" sono solitamente glicoproteine eterotetrameriche di circa 150.000 dalton, costituite da due catene leggere (L) identiche e due catene pesanti (H) identiche. Ciascuna catena leggera è legata a una catena pesante da un legame disolfuro covalente, mentre il numero di legami disolfuro varia tra le catene pesanti di diversi isotipi di immunoglobulina. Ciascuna catena pesante e leggera ha anche ponti disolfuro intracatena regolarmente distanziati. Ciascuna catena pesante ha a una estremità un dominio variabile (V_h) seguito da una serie di domini costanti. Ogni catena leggera ha un dominio variabile a un'estremità (V_l) e un dominio costante all'altra estremità. Il dominio costante della catena leggera è allineato con il primo dominio costante della catena pesante e il dominio variabile della catena leggera è allineato con il dominio variabile della catena pesante. Si ritiene che residui amminoacidici specifici formino un'interfaccia tra i domini variabili di catena pesante e catena leggera.

Il termine "regione ipervariabile" quando utilizzato nel presente documento si riferisce ai residui amminoacidici di un anticorpo che sono responsabili del legame dell'antigene. La regione ipervariabile comprende generalmente residui amminoacidici da una "regione determinante la complementarità" o "CDR" (ad esempio, i residui 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) nel dominio variabile della catena leggera e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) nel dominio variabile della catena pesante; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/o quei residui da una "ansa ipervariabile" (ad esempio i residui 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) nel dominio variabile della catena leggera e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) nel dominio variabile della catena pesante; Chothia e Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). I residui della "regione cornice" o "FR" sono quei residui del dominio variabile diversi dai residui della regione ipervariabile come definiti nel presente documento.

Il termine "regione Fc" nel presente documento viene usato per definire una regione C-terminale di una catena pesante immunoglobulinica, incluse regioni Fc della sequenza nativa e regioni Fc varianti. Sebbene i confini della regione Fc di una catena pesante immunoglobulinica possano variare, la regione Fc della catena pesante IgG umana è di solito definita per allungarsi da un residuo amminoacidico in posizione Cys226, o da Pro230, fino al suo terminale carbossilico. La lisina C-terminale (residuo 447 secondo il sistema di numerazione EU) della

regione Fc può essere rimossa, per esempio, durante la produzione o la purificazione dell'anticorpo, oppure mediante ingegnerizzazione ricombinante dell'acido nucleico codificante per una catena pesante dell'anticorpo. Di conseguenza, una composizione di anticorpi intatti può comprendere popolazioni anticorpali con tutti i residui K447 rimossi, popolazioni anticorpali senza nessun residuo K447 rimosso e popolazioni anticorpali aventi una miscela di anticorpi con e senza il residuo K447.

Salvo diversa indicazione, nel presente documento la numerazione dei residui in una catena pesante di immunoglobuline è quella dell'indice EU come in Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edizione, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). L'"Indice EU come in Kabat" indica la numerazione dei residui dell'anticorpo EU IgG1 umano.

Una "regione Fc funzionale" possiede una "funzione effettrice" di una regione di Fc di sequenza nativa. "Funzioni effettrici" esemplificative comprendono legame C1q; CDC; legame del recettore Fc; ADCC; fagocitosi; sottoregolazione dei recettori della superficie cellulare (ad esempio recettore delle cellule B, BCR) ecc. Tali funzioni effettrici richiedono generalmente che la regione Fc sia combinata con un dominio legante (ad esempio un dominio variabile anticorpale) e che possa essere valutata utilizzando vari saggi, ad esempio come descritto nel presente documento.

Una "regione Fc della sequenza nativa" comprende una sequenza amminoacidica identica alla sequenza amminoacidica di una regione Fc trovata in natura. Le regioni Fc umane della sequenza nativa includono una regione Fc di IgG1 umana della sequenza nativa (allotipi non A e A), una regione Fc di IgG2 umana della sequenza nativa, una regione Fc di IgG3 umana della sequenza nativa e una regione Fc di IgG4 umana della sequenza nativa nonché loro varianti naturali.

Una "regione Fc variante" comprende una sequenza amminoacidica che differisce da quella di una regione Fc della sequenza nativa in virtù di almeno una modificazione amminoacidica, preferibilmente una o più sostituzioni amminoacidiche. Preferibilmente, la regione Fc variante presenta almeno una sostituzione amminoacidica rispetto a una regione Fc della sequenza nativa o alla regione Fc di un polipeptide parentale, ad esempio da circa una a circa dieci sostituzioni amminoacidiche e preferibilmente da circa una a circa cinque sostituzioni amminoacidiche in una regione Fc della sequenza nativa o nella regione Fc del polipeptide parentale. La regione Fc variante nel presente documento preferibilmente possiede almeno circa l'80% di omologia con una regione di Fc della sequenza nativa e/o con una regione Fc di un polipeptide parentale, e in maniera assolutamente preferita almeno circa il 90% di omologia con ciò, più preferibilmente almeno circa il 95% omologia con ciò.

In base alla sequenza amminoacidica del dominio costante delle loro catene pesanti, gli anticorpi intatti possono essere assegnati a diverse

"classi". Esistono cinque classi principali di anticorpi intatti: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e diversi di questi possono essere ulteriormente suddivisi in "sottoclassi" (isotipi), ad esempio, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. I domini costanti della catena pesante che corrispondono alle diverse classi di anticorpi sono chiamati rispettivamente, α , δ , ϵ , γ , e μ . Le strutture sottounitarie e le configurazioni tridimensionali delle diverse classi di immunoglobuline sono ben note.

Un "anticorpo nudo" è un anticorpo che non è coniugato a una molecola eterologa, come una frazione citotossica o radiomarcata.

Un anticorpo "maturato per affinità" è un anticorpo con una o più alterazioni in una o più sue regioni ipervariabili che hanno come risultato un miglioramento dell'affinità dell'anticorpo per l'antigene, rispetto a un anticorpo parentale che non possiede quella o quelle alterazioni.

Anticorpi maturati per affinità preferiti avranno affinità nanomolare o persino picomolare per l'antigene bersaglio. Gli anticorpi maturati per affinità vengono prodotti mediante procedure note nella tecnica. Marks *et al. BioTechnology* 10:779-783 (1992) descrive la maturazione per affinità mediante shuffling dei domini VH e VL. La mutagenesi casuale delle CDR e/o dei residui di cornice viene descritta da: Barbas *et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al. Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al. J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al., J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); e Hawkins *et al, J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Un anticorpo "deamidato" è uno nel quale uno più dei suoi residui di asparagina sono stati derivatizzati ad esempio a un acido aspartico, una succinimide o un acido iso-aspartico.

I termini "cancro" e "canceroso" si riferiscono a o descrivono la condizione fisiologica nei mammiferi che è tipicamente caratterizzata da crescita cellulare non regolata.

Un cancro "avanzato" è un cancro che si è diffuso al di fuori del sito o dell'organo di origine, sia per invasione locale ("localmente avanzato") sia per metastasi ("metastatico"). Di conseguenza, il termine cancro "avanzato" comprende sia la malattia localmente avanzata, sia quella metastatica.

Il cancro "metastatico" si riferisce a un cancro che si è diffuso da una parte del corpo (ad esempio il seno) a un'altra parte del corpo.

Un cancro "refrattario" è un cancro che progredisce anche se un agente antitumorale, come una chemioterapia o una terapia biologica, come l'immunoterapia, viene somministrato al paziente oncologico. Un esempio di cancro refrattario è un cancro refrattario al platino.

Un cancro "ricorrente" è un cancro che è ricresciuto, sia nel sito iniziale sia in un sito distante, dopo una risposta alla terapia iniziale, come la chirurgia.

Un cancro "localmente ricorrente" è un cancro che ritorna dopo il trattamento nello stesso posto di un cancro precedentemente trattato.

Un cancro "non resecabile" non può essere rimosso (resecato) dalla chirurgia.

"Cancro al seno allo stadio iniziale" si riferisce al cancro al seno che non si è diffuso oltre il seno o i linfonodi ascellari. Tale cancro viene generalmente trattato con terapia neoadiuvante o adiuvante.

"Terapia neoadiuvante" o "trattamento neoadiuvante" o "somministrazione neoadiuvante" si riferisce alla terapia sistemica somministrata prima dell'intervento chirurgico.

"Terapia adiuvante" o "trattamento adiuvante" o "somministrazione adiuvante" si riferisce alla terapia sistemica somministrata dopo l'intervento chirurgico.

Nel presente documento, un "paziente" o "soggetto" è un paziente umano. Il paziente può essere un "paziente oncologico", vale a dire una persona che soffre o è a rischio di soffrire di uno o più sintomi di cancro, in particolare di cancro al seno.

Una "popolazione di pazienti" si riferisce a un gruppo di pazienti oncologici. Tali popolazioni possono essere usate per dimostrare l'efficacia e/o sicurezza statisticamente significativa di un farmaco, come il pertuzumab e/o il trastuzumab.

Un paziente "recidivo" è un paziente che ha segni o sintomi di cancro dopo la remissione. Opzionalmente, il paziente ha avuto una recidiva dopo una terapia adiuvante o neoadiuvante.

Un cancro o campione biologico che "mostra espressione, amplificazione o attivazione dell'HER" è un cancro che, in un test diagnostico, esprime (o sovraesprime) un recettore HER, ha amplificato il gene HER e/o dimostra in altro modo attivazione o fosforilazione di un recettore HER.

Un cancro o un campione biologico che "mostra attivazione dell'HER" è un cancro che, in un test diagnostico, dimostra attivazione o fosforilazione di un recettore HER. Tale attivazione può essere determinata direttamente (ad esempio misurando la fosforilazione di HER tramite ELISA) o indirettamente (ad esempio mediante l'analisi dell'espressione genica o rilevando eterodimeri HER, come descritto nella presente).

Una cellula cancerogena con "sovraespressione o amplificazione del recettore HER" è una cellula che ha livelli significativamente più alti di una proteina o di un gene del recettore HER rispetto a una cellula non cancerosa dello stesso tipo di tessuto. Tale sovraespressione può essere provocata dall'amplificazione o dalla maggiore trascrizione o traduzione del gene. La sovraespressione o amplificazione del recettore HER può essere determinata in un test diagnostico o prognostico valutando i livelli aumentati della proteina HER presente sulla superficie di una cellula (ad esempio tramite un test immunistochimico; IHC). In alternativa, o in aggiunta, si possono misurare i livelli di acido nucleico

codificante HER nella cellula, ad esempio tramite ibridazione *in situ* (ISH), tra cui l'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH, vedere WO98/45479 pubblicato a ottobre 1998) e l'ibridazione cromogenica *in situ* (CISH, vedere, ad esempio Tanner et al., *Am. J. Pathol.*): 157(5): 1467-1472 (2000); Bella et al., *J. Clin. Oncol.* 26: (Maggio 20 suppl; abstr 22147) (2008)), southern blotting, o tecniche di reazione a catena della polimerasi (PCR), come la PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR). Si può anche studiare la sovraespressione o l'amplificazione del recettore HER misurando un antigene disseminato (ad esempio il dominio extracellulare HER) in un fluido biologico come il siero (vedere, ad esempio, il brevetto U.S. N. 4,933,294 depositato il 12 giugno 1990; WO 91/05264 pubblicato il 18 aprile 1991; il brevetto U.S. 5,401,638 depositato il 28 marzo 1995; e Sias et al. *J. Immunol. Methods* 132:73-80 (1990)). A parte i saggi di cui sopra, vari saggi *in vivo* sono a disposizione del professionista esperto. Per esempio, si possono esporre cellule all'interno del corpo del paziente a un anticorpo che è opzionalmente marcato con un marcatore rilevabile, ad esempio uno radioattivo *in situ* per la radioattività o analizzando una biopsia prelevata da un paziente precedentemente esposto all'anticorpo.

Un cancro "HER2-positivo" comprende cellule cancerose che presentano livelli di HER2 superiori a quelli normali. Opzionalmente, il cancro HER2-positivo ha un punteggio immunostochimico (IHC) di 2+ o 3+ e/o è positivo a ibridazione *in situ* (ISH), ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) o ibridazione *in situ* cromogenica (CISH), ad esempio ha un rapporto di amplificazione ISH/FISH/CISH di $\geq 2,0$.

Un cancro "HER2-mutato" comprende cellule cancerose con una mutazione attivante HER2, comprese le mutazioni del dominio chinamico, che possono, per esempio, essere identificate mediante sequenziamento di nuova generazione (NGS) o reazione a catena della polimerasi in tempo reale (RT-PCR). Il cancro "HER2-mutato" include specificamente il cancro caratterizzato da inserzioni nell'esone 20 di HER2, delezioni attorno ai residui amminoacidici 755-759 di HER2, una qualsiasi delle mutazioni G309A, G309E, S310F, D769H, D769Y, V777E, P780-Y781insGSP, V842I, R896C (Bose et al., *Cancer Discov* 2013; 3:1-14), nonché mutazioni attivanti putative non sinonime identiche (o indel) precedentemente riportate nel database COSMIC trovate in due o più esemplari unici. Per ulteriori dettagli vedere, ad esempio Stephens et al., *Nature* 2004;431:525-6; Shigematsu et al., *Cancer Res* 2005; 65:1642-6; Buttitta et al., *Int J Cancer* 2006; 119:2586-91; Li et al., *Oncogene* 2008; 27:4702-11; Sequist et al., *J Clin Oncol* 2010; 28:3076-83; Arcila et al., *Clin Cancer Res* 2012; 18:4910-8; Greulich et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:14476-81; e Herter-Sprie et al., *Front Oncol* 2013;3:1-10.

Nel presente documento, un "agente antitumorale" si riferisce a un farmaco usato per trattare il cancro. Esempi non limitativi di agenti antitumorali nella presente includono agenti chemioterapici, inibitori di dimerizzazione di HER, anticorpi per HER, anticorpi diretti contro antigeni associati a tumore, composti anti-ormonali, citochine, farmaci mirati a EGFR, agenti anti-angiogenici, inibitori della tirosin-chinasi,

agenti e anticorpi inibitori della crescita, agenti citotossici, anticorpi che inducono l'apoptosi, inibitori di COX, inibitori della farnesil transferasi, anticorpi che legano la proteina oncofetale CA125, vaccini per HER2, inibitori di Raf o ras, doxorubicina liposomale, topotecan, taxano, inibitori doppi della tirosin-chinasi, TLK286, EMD-7200, pertuzumab, trastuzumab, erlotinib e bevacizumab.

Lo "epitopo 2C4" è la regione nel dominio extracellulare di HER2 al quale si lega l'anticorpo 2C4. Al fine di effettuare lo screening degli anticorpi che si legano all'epitopo 2C4, può essere eseguito un saggio di blocco incrociato di routine come quello descritto in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Preferibilmente l'anticorpo blocca il legante del 2C4 all'HER2 del 50% circa o più. In alternativa, è possibile eseguire la mappatura degli epitopi per valutare se l'anticorpo si lega essenzialmente all'epitopo 2C4 di HER2. L'epitopo 2C4 comprende residui del dominio II (SEQ ID NO: 2) nel dominio extracellulare di HER2. Il 2C4 e il pertuzumab si legano al dominio extracellulare di HER2 a livello della giunzione dei domini I, II e III (SEQ ID NO: 1, 2 e 3, rispettivamente). Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

Lo "epitopo 4D5" è la regione nel dominio extracellulare di HER2 a cui si legano l'anticorpo 4D5 (ATCC CRL10463) e il trastuzumab. Questo epitopo è vicino al dominio transmembrana di HER2 e all'interno del dominio IV di HER2 (SEQ ID NO: 4). Per effettuare lo screening di anticorpi che si legano essenzialmente all'epitopo 4D5, può essere eseguito un saggio di blocco incrociato di routine come quello descritto in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). In alternativa, è possibile eseguire la mappatura degli epitopi per valutare se l'anticorpo si leghe essenzialmente all'epitopo 4D5 di HER2 (ad esempio a uno o più residui nella regione dal residuo 529 circa al residuo 625 circa, comprensivo dell'HER2 ECD, la numerazione dei residui comprendente il peptide segnale). "Trattamento" si riferisce sia al trattamento terapeutico sia a misure profilattiche o preventive. Coloro che necessitano di un trattamento comprendono coloro che già presentano il cancro e coloro in cui il cancro deve essere prevenuto. Quindi il paziente da trattare nel presente documento può essere stato diagnosticato come avente il cancro o può essere predisposto o suscettibile al cancro.

Il termine "quantità efficace" si riferisce a una quantità di farmaco efficace per trattare il cancro nel paziente. La quantità efficace del farmaco può ridurre il numero di cellule tumorali; ridurre le dimensioni del tumore; inibire (vale a dire rallentare in qualche misura e preferibilmente fermare) l'infiltrazione delle cellule tumorali negli organi periferici; inibire (vale a dire rallentare in qualche misura e preferibilmente fermare) le metastasi tumorali; inibire, in qualche misura, la crescita tumorale; e/o alleviare in qualche misura uno o più dei sintomi associati al cancro. Nella misura in cui può prevenire la crescita e/o uccidere le cellule cancerose esistenti, il farmaco può essere citostatico e/o citotossico. La quantità efficace può estendere la sopravvivenza libera da progressione (ad esempio misurata dai criteri di valutazione della risposta per

tumori solidi, RECIST o cambiamenti CA-125), determinare una risposta obiettiva (comprendente una risposta parziale, PR o risposta completa, CR), aumentare il tempo di sopravvivenza complessivo e/o migliorare uno o più sintomi del cancro (ad esempio valutato dal FOSI). Il termine "agente citotossico" come usato nel presente documento si riferisce a una sostanza che inibisce o impedisce la funzione delle cellule e/o provoca la distruzione delle cellule. Il termine intende comprendere isotopi radioattivi (ad esempio At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isotopi radioattivi di Lu), agenti chemioterapici e tossine come le tossine a piccola molecola o le tossine enzimaticamente attive di origine batterica, fungina, vegetale o animale, comprendenti relativi frammenti e/o varianti.

Una "chemioterapia" è l'uso di un composto chimico utile nel trattamento del cancro. Esempi di agenti chemioterapici, usati in chemioterapia, comprendono agenti alchilanti come tiotepa e ciclofosfamide CYTOXAN®; alchil solfonati come busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridine come benzodopa, carboquone, meturedopa e uredopa; etilenimine e metilamelammine comprendenti altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamide, trietilentiofosforamide e trimetilolmelamina; TLK286 (TELCYTA™); acetogenine (in particolare bullatacina e bullatacinone); delta-9-tetraidrocannabinolo (dronabinolo, MARINOL®); beta-lapacone; lapacolo; colchicine; acido betulino; una camptotecina (comprendente l'analogo sintetico del topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, scoplectina e 9-amminocamptotecina); briostatina; callistatina; CC-1065 (compresi i suoi analoghi sintetici di adozelesina, carzelesina e bizelesina); podofillotossina; acido podofillinico; teniposide; criptoficine (in particolare criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (comprendente gli analoghi sintetici KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; spongistatina; mostarde azotate come clorambucile, clornafazina, colofosfamide, estramustina, ifosfamide, mecloretamina, mecloretamina cloridrato ossido, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamide, mostarda uracilica, nitrosuree come carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; bisfosfonati, come clodronato; antibiotici come gli antibiotici enedinici (ad esempio, calicheamicina, in particolare calicheamicina gammaII e calicheamicina omegaII (vedere, ad esempio, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33:183-186 (1994)) e antraciline come anamicina AD32, alcarubicina, daunorubicina, doxorubicina, dexrazoxano, DX-52-1, epirubicina, GPX-100, idarubicina, valrubicina, KRN5500, menogarile, dinemicina, comprendente dinemicina A, un'esperamicina, neocarzinostatina cromoforo e cromofori antibiotici di enedina correlati alla cromoproteina, aclacinomisine, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicine, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicine, dactinomicina, detorubicina, 6-diazo-5-ossol-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorubicina (comprendente morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, doxorubicina liposomiale e deossidoxorubicina), esorubicina, marcellomicina, mitomicine come mitomicina C, acido

micofenolico, nogalamicina, olivomicine, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, streptonigrina, streptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina e zorubicina; analoghi dell'acido folico come denopterina, pteropterina e trimetrexato; analoghi della purina come fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina e tioguanina; analoghi della pirimidina come ancitabina, azacidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideossiuridina, dossifluridina, enocitabina e floxuridina; androgeni come calusterone, dromostanone propionato, epitiostanolo, mepitiostanolo e testolattone; anti-surrenali come amminoglucocorticoidi, mitotano e trilostano; integratori di acido folico come acido folinico (leucovorina); aceglutone; agenti anti-folato anti-neoplastici come ALIMTA®, LY231514 pemetrexed, inibitori di diidrofolato reductasi come metotrexato, anti-metaboliti come 5-fluorouracile (5-FU) e i suoi profarmaci come Uft, S-1 e capecitabina e inibitori della timidilato sintasi e inibitori della glicinammide ribonucleotide formiltransferasi come raltitrexed (TOMUDEX^{RM}, TDX); inibitori della diidropirimidina deidrogenasi come eniluracile; aldofosfammide glicoside; acido aminolevulinico; amsacrina; bestrabucile; bisantrene; edatraxato; defofammina; demecolcina; diaziquone; elfornitina; elliptinium acetato; un eptilone; etoglucide; gallio nitrato; idrossiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoidi come maitansina e ansamitocine; mitoguanone; mitoxantrone; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet; pirarubicina; losoxantrone; 2-etilidrazide; procarbazine; complesso polisaccaridico PSK7 (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; spirogermanio; acido tenuazonico; triaziquone; 2,2',2"-triclorotrietilammina; tricoteceni (in particolare tossina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesine (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitolo; mitolattolo; pipobroman; gacitosina; arabinoside ("Ara-C"); ciclofosfammide; tiotepa; taxani; clorambucile; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; platino; analoghi del platino o analoghi a base di platino come cisplatino, oxaliplatino e carboplatino; vinblastina (VELBAN®); etoposide (VP-16), ifosfamide, mitoxantrone, vincristina (ONCOVIN®), alcaloide della vinca, vinorelbina (NAVELBINE®), novantrone, edatrexato, daunomicina, amminopterina, xeloda, ibandronato, inibitore della topoisomerasi RFS2000, difluorometilornitina (DMFO); retinoidi come acido retinoico, sali, acidi o derivati farmaceuticamente accettabili di uno dei suddetti, nonché combinazioni di due o più dei suddetti come CHOP, un'abbreviazione per una terapia combinata di ciclofosfammide, doxorubicina, vincristina, e prednisolone e FOLFOX, un'abbreviazione per un regime di trattamento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinato con 5-FU e leucovorina.

In questa definizione sono inoltre compresi agenti anti-ormonali che agiscono per regolare o inibire l'azione degli ormoni sui tumori come gli anti-estrogeni e i modulatori selettivi dei recettori estrogenici (SERM), tra cui, per esempio, tamoxifene (comprendente tamoxifene NOLVADEX®), raloxifene, droloxifene, 4-idrossitamoxifene, triossifene, keoxifene, LY117018, onapristone e FARESTON® toremifene; inibitori dell'aromatasi; e anti-androgeni come flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide e goserelina; così come troxacitabina (un

analogo della citosina del nucleoside 1,3-diossolano); oligonucleotidi antisenso, in particolare quelli che inibiscono l'espressione dei geni nelle vie di segnalazione coinvolte nella proliferazione di cellule aberranti, come per esempio PKC-alfa, Raf, H-Ras e recettore del fattore di crescita epidermico (EGF-R); vaccini come vaccini per la terapia genica, per esempio vaccino ALLOVECTIN®, vaccino LEUVECTIN® e vaccino VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inibitore della topoisomerasi 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; e sali, acidi o derivati farmaceuticamente accettabili di uno dei suddetti.

Un "taxano" è una chemioterapia che inibisce la mitosi e interferisce con i microtubuli. Esempi di taxani comprendono Paclitaxel (TAXOL®; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.); formulazione di nanoparticelle ingegnerizzate con albumina prive di cromoforo di paclitaxel o *nab*-paclitaxel (ABRAXANE™; American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois); e Docetaxel (TAXOTERE®; Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France).

Una "antraciclina" è un tipo di antibiotico che deriva dal fungo *Streptococcus peucetius*, gli esempi comprendono: daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, e qualsiasi altro agente chemioterapico a base di antraciline, compresi quelli elencati in precedenza.

"Chemioterapia basata su antraciline" si riferisce a un regime chemioterapico che consiste di o comprende una o più antraciline. Esempi includono, senza limitazione, 5-FU, epirubicina e ciclofosfamide (FEC); 5-FU, doxorubicina e ciclofosfamide (FAC); doxorubicina e ciclofosfamide (AC); epirubicina e ciclofosfamide (CE); doxorubicina a dose-densa e ciclofosfamide (ddAC), e simili.

Per gli scopi riportati nel presente documento, "chemioterapia a base di carboplatino" si riferisce a un regime chemioterapico che consiste di o comprende uno o più Carboplatini. Un esempio è TCH (Docetaxel/TAXOL®, carboplatino e trastuzumab/HERCEPTIN®).

Un "inibitore dell'aromatasi" inibisce l'enzima aromatasi, che regola la produzione di estrogeni nelle ghiandole surrenali. Esempi di inibitori dell'aromatasi comprendono: 4-(5)-imidazoli, aminoglutetimide, megestrolo acetato MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozolo, vorozolo RIVISOR®, letrozolo FEMARA® e anastrozolo ARIMIDEX®. In una forma di realizzazione, l'inibitore dell'aromatasi nel presente documento è letrozolo o anastrozolo.

Una "chemioterapia antimetabolita" è l'uso di un agente strutturalmente simile a un metabolita, ma che non può essere utilizzato dall'organismo in modo produttivo. Molte chemioterapie antimetabolita interferiscono con la produzione di acidi nucleici, RNA e DNA. Esempi di agenti chemioterapici antimetaboliti comprendono gemcitabina (GEMZAR®), 5-fluorouracil (5-FU), capecitabina (XELODA™), 6-mercaptopurina, metotrexato, 6-tioguanina, pemetrexed, raltitrexed, arabinosilcososina ARA-C citarabina (CYTOSAR-U®), dacarbazina (DTIC-DOME®), azocitosina, deossicitosina, piridimide, fludarabina (FLUDARA®), cladribina, 2-desossi-D-glucosio ecc.

Per cancro "resistente alla chemioterapia" si intende che il paziente affetto da cancro ha progredito durante il trattamento con un regime chemioterapico (vale a dire il paziente è "refrattario alla chemioterapia"), oppure il paziente ha progredito entro 12 mesi (ad esempio entro 6 mesi) dopo aver completato un regime chemioterapico.

Il termine "platino" è usato nel presente documento con riferimento alla chemioterapia a base di platino, tra cui, senza limitazione, cisplatino, carboplatino e oxaliplatino.

Il termine "fluoropirimidina" è usato nel presente documento con riferimento a una chemioterapia antimetabolita, tra cui, senza limitazione, capecitabina, floxuridina e fluorouracile (5-FU).

Una dose "fissa" o "piatta" di un agente terapeutico nel presente documento si riferisce a una dose che viene somministrata a un paziente umano indipendentemente dal peso (WT) o dalla superficie corporea (BSA) del paziente. La dose fissa o piatta non è quindi fornita come dose mg/kg o mg/m², ma piuttosto come quantità assoluta dell'agente terapeutico.

Una dose di "carico" in generale nel presente documento comprende una dose iniziale di un agente terapeutico somministrato a un paziente ed è seguita da una o più sue dosi di mantenimento. Generalmente viene somministrata una singola dose di carico, ma nel presente documento sono contemplate più dosi di carico. Di solito, la quantità di dose di carico somministrata supera la quantità dell'una o più dosi di mantenimento somministrata/e e/o l'una o più dosi di carico è/sono somministrata/e con maggiore frequenza rispetto all'una o più dosi di mantenimento, in modo da ottenere la concentrazione desiderata allo stato stazionario dell'agente terapeutico prima di quanto si possa ottenere con l'una o più dosi di mantenimento.

Una dose "di mantenimento" si riferisce nel presente documento a una o più dosi di un agente terapeutico somministrato al paziente per un periodo di trattamento. Di solito, le dosi di mantenimento vengono somministrate a intervalli di trattamento distanziati, come ad esempio circa ogni settimana, circa ogni 2 settimane, circa ogni 3 settimane, o circa ogni 4 settimane, preferibilmente ogni 3 settimane.

Una "fiala" è un contenitore idoneo a contenere una preparazione liquida o liofilizzata. In una forma di realizzazione, la fiala è una fiala monouso, ad esempio una fiala monouso da 10 ml o 20 ml con un tappo, come una fiala di vetro monouso da 10 ml con un tappo da 20 mm.

Un "foglietto illustrativo" è un foglietto che, per ordine della FDA (Food and Drug Administration) o di altre autorità normative, deve essere inserito all'interno della confezione di ogni farmaco soggetto a prescrizione. Il foglietto comprende generalmente il marchio del farmaco, il suo nome generico e il suo meccanismo d'azione; riporta indicazioni, controindicazioni, avvertenze, precauzioni, effetti negativi e forme di dosaggio; e comprende inoltre istruzioni per il dosaggio, il tempo e la via di somministrazione raccomandati.

L'espressione "dati sulla sicurezza" riguarda i dati ottenuti in uno studio clinico controllato che mostra la prevalenza e la gravità degli eventi avversi per guidare l'utente in merito alla sicurezza del farmaco, tra cui indicazioni su come monitorare e prevenire reazioni avverse al farmaco.

"Dati sull'efficacia" si riferisce ai dati ottenuti in studi clinici controllati i quali dimostrano che un farmaco tratta efficacemente una malattia, come il cancro.

Con "miscela stabile" riferita a una miscela di due o più farmaci, come pertuzumab e trastuzumab" indica che ciascuno dei farmaci nella miscela mantiene sostanzialmente la sua stabilità fisica e chimica nella miscela come valutato da uno o più saggi analitici. Saggi analitici esemplificativi a questo scopo comprendono: analisi del colore, dell'aspetto e della trasparenza (CAC), concentrazione e torbidità, analisi del particolato, cromatografia a esclusione dimensionale (SEC), cromatografia a scambio ionico (IEC), elettroforesi capillare di zona (CZE), focalizzazione isoelettrica capillare per immagini (iCIEF) e saggio della potenza. In una forma di realizzazione, la miscela ha mostrato di essere stabile fino a 24 ore a 5°C o 30°C.

La somministrazione "in combinazione" comprende la somministrazione combinata e la somministrazione separata, nel qual caso, la somministrazione di un agente terapeutico può avvenire prima, simultaneamente e/o dopo la somministrazione di un altro agente terapeutico. Pertanto, la somministrazione di pertuzumab e trastuzumab in combinazione (o la somministrazione di una combinazione di pertuzumab e trastuzumab) comprende la somministrazione combinata e la somministrazione separata in entrambi gli ordini.

Un farmaco che viene somministrato "in concomitanza" con uno o più altri farmaci viene somministrato durante lo stesso ciclo di trattamento, nello stesso giorno di trattamento di uno o più altri farmaci e, opzionalmente, contemporaneamente all'uno o più altri farmaci. Ad esempio, per le terapie tumorali somministrate ogni 3 settimane, i farmaci somministrati in concomitanza vengono somministrati ciascuno il giorno 1 di un ciclo di 3 settimane.

Il termine "co-somministrazione" viene utilizzato nel presente documento per riferirsi a una somministrazione separata, tra cui, per esempio, la somministrazione di pertuzumab e trastuzumab come due iniezioni sottocutanee (SC) separate.

Il termine "co-miscelato" viene utilizzato nel presente documento per riferirsi alla somministrazione simultanea come una singola iniezione, tra cui, per esempio, la somministrazione di pertuzumab e trastuzumab come una singola iniezione sottocutanea (SC), preparata dal professionista sanitario in loco, immediatamente prima della somministrazione sottocutanea miscelando formulazioni separate di pertuzumab e trastuzumab.

Il termine "co-formulazione" viene utilizzato nel presente documento per riferirsi a una singola formulazione farmaceutica pronta per l'uso

comprendente due o più principi attivi, tra cui, per esempio, una singola formulazione farmaceutica pronta per l'uso comprendente pertuzumab e trastuzumab formulati insieme per la somministrazione sottocutanea (SC).

II. Composizioni di anticorpi e chemioterapiche

(i) Anticorpi HER2

L'antigene HER2 da utilizzare per la produzione di anticorpi può essere, ad esempio, una forma solubile del dominio extracellulare di un recettore HER2 o di una sua porzione, contenente l'epitopo desiderato. In alternativa, cellule che esprimono HER2 sulla loro superficie cellulare (ad esempio, cellule NIH-3T3 trasformate per sovraesprimere l'HER2; o una linea cellulare di carcinoma come le cellule SK-BR-3, vedere Stancovski *et al.* *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991)) possono essere utilizzate per generare anticorpi. Altre forme del recettore HER2 utili per generare anticorpi risulteranno chiare agli esperti del settore.

Nella tecnica sono disponibili vari procedimenti per produrre anticorpi monoclonali. Per esempio, gli anticorpi monoclonali possono essere realizzati usando il procedimento dell'ibridoma descritto per la prima volta da Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), mediante procedimenti del DNA ricombinante (brevetto U.S. N. 4,816,567).

Gli anticorpi anti-HER2 usati secondo la presente invenzione, trastuzumab e pertuzumab, sono disponibili in commercio.

Il brevetto US N. 6,949,245 descrive la produzione di anticorpi HER2 umanizzati esemplificativi che legano l'HER2 e bloccano l'attivazione del ligando di un recettore HER.

Gli anticorpi umanizzati HER2 comprendono specificamente trastuzumab come descritto nella Tabella 3 del brevetto U.S. 5,821,337 e come definito nel presente documento; e anticorpi umanizzati 2C4 come pertuzumab come descritto e definito nel presente documento.

Gli anticorpi umanizzati del presente documento possono, per esempio, comprendere residui della regione ipervariabile non umani incorporati in un dominio variabile umano pesante e possono inoltre comprendere una sostituzione della regione cornice (FR) in una posizione scelta dal gruppo consistente di 69H, 71H e 73H utilizzando il sistema di numerazione del dominio variabile esposto in Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). In una forma di realizzazione, l'anticorpo umanizzato comprende sostituzioni FR in due o in tutte le posizioni 69H, 71H e 73H.

Un anticorpo umanizzato esemplificativo di interesse nel presente documento comprende residui determinanti la complementarità del dominio pesante variabile GFTFTDYTMX (SEQ ID NO: 17), dove X è preferibilmente D o S; DVNPNSSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO:18); e/o NLGPSFYFDY (SEQ ID NO:19), opzionalmente comprendente modificazioni di amminoacidi di quei residui CDR, ad

esempio dove le modificazioni essenzialmente mantengono o aumentano l'affinità dell'anticorpo. Per esempio, una variante di anticorpo per l'uso nei procedimenti della presente invenzione può avere da circa uno a circa sette o circa cinque sostituzioni di amminoacidi nelle sequenze CDR pesanti variabili di cui sopra. Tali varianti degli anticorpi possono essere preparate mediante maturazione per affinità, ad esempio, come descritto qui di seguito.

L'anticorpo umanizzato può comprendere residui determinanti la complementarità del dominio leggero variabile KASQDVSIGVA (SEQ ID NO: 20); SASYX¹X²X³, dove X¹ è preferibilmente R o L, X² è preferibilmente Y o E, e X³ è preferibilmente T o S (SEQ ID NO: 21); e/o QQYYIYPYT (SEQ ID NO: 22), ad esempio in aggiunta a quei residui CDR del dominio pesante variabile nel paragrafo precedente. Tali anticorpi umanizzati comprendono opzionalmente modificazioni di amminoacidi dei suddetti residui CDR, ad esempio dove le modificazioni essenzialmente mantengono o migliorano l'affinità dell'anticorpo. Per esempio, la variante dell'anticorpo di interesse può avere da circa uno a circa sette o circa cinque sostituzioni di amminoacidi nelle sequenze CDR della leggera variabile di cui sopra. Tali varianti degli anticorpi possono essere preparate mediante maturazione per affinità, ad esempio, come descritto qui di seguito.

La presente domanda contempla anche anticorpi maturati per affinità che legano l'HER2. L'anticorpo parentale può essere un anticorpo umano o un anticorpo umanizzato, ad esempio un anticorpo comprendente le sequenze variabili leggere e/o variabili pesanti delle SEQ ID NO 7 e 8, rispettivamente (vale a dire comprendente la VL e/o la VH del Pertuzumab). Una variante maturata per affinità di pertuzumab si lega preferibilmente al recettore HER2 con un'affinità superiore a quella del 2C4 o pertuzumab murino (ad esempio con affinità da circa due o quattro volte, a circa 100 volte o circa 1000 volte maggiore, ad esempio valutata usando un ELISA del dominio extracellulare di HER2 (ECD)). Residui CDR della variabile pesante esemplificativi per la sostituzione comprendono H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, o combinazioni di due o più (ad esempio due, tre, quattro, cinque, sei o sette di questi residui). Esempi di residui CDR della leggera variabile per l'alterazione comprendono L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 o combinazioni di due o più (ad esempio da due a tre, quattro, cinque o fino a circa dieci di questi residui).

L'umanizzazione dell'anticorpo 4D5 murino per generare sue varianti umanizzate, comprendenti trastuzumab, è descritta nei brevetti U.S. N. 5,821,337, 6,054,297, 6,407,213, 6,639,055, 6,719,971 e 6,800,738 e in Carter et al. PNAS (USA), 89:4285-4289 (1992). L'HuMAb4D5-8 (trastuzumab) legava l'antigene HER2 3 volte più strettamente dell'anticorpo 4D5 di topo e aveva una funzione immunitaria secondaria (ADCC) che consentiva un'attività citotossica diretta dell'anticorpo umanizzato in presenza di cellule effettrici umane. L'HuMAb4D5-8 comprendeva residui CDR della leggera variabile (V_L) incorporati in una cornice consenso del sottogruppo I di V_{Kε} residui CDR della pesante

variabile (V_h) incorporati in una cornice consenso del sottogruppo III di V_h . L'anticorpo comprendeva inoltre sostituzioni della regione cornice (FR) come posizioni: 71, 73, 78 e 93 della sostituzione V_H (numerazione di Kabat dei residui FR; e una sostituzione FR in posizione 66 della V_L (numerazione di Kabat dei residui FR). trastuzumab comprende la regione Fc γ 1 umana di allotipo non-A.

Sono contemplate varie forme dell'anticorpo umanizzato o degli anticorpi maturati per affinità. Per esempio, l'anticorpo umanizzato o l'anticorpo maturato per affinità può essere un frammento di anticorpo. In alternativa, l'anticorpo umanizzato o l'anticorpo maturato per affinità può essere un anticorpo intatto, come un anticorpo IgG1 intatto.

(ii) *Composizioni a base di Pertuzumab*

In una forma di realizzazione di una composizione di anticorpi HER2, la composizione comprende una miscela di un anticorpo pertuzumab della specie principale e una o più varianti dello stesso. Nella presente, la forma di realizzazione preferita di un anticorpo pertuzumab della specie principale è un anticorpo comprendente le sequenze amminoacidiche della leggera variabile e della pesante variabile nelle SEQ ID NO 7 e 8, e in modo massimamente preferibile comprendente una sequenza amminoacidica di catena leggera della SEQ ID NO 11 e un sequenza amminoacidica di catena pesante della SEQ ID NO 12 (comprendente varianti deamidate e/o ossidate di tali sequenze). In una forma di realizzazione, la composizione comprende una miscela dell'anticorpo pertuzumab della specie principale e una sua variante della sequenza amminoacidica comprendente un'estensione del leader amminoterminale. Preferibilmente, l'estensione del leader amminoterminale si trova su una catena leggera della variante dell'anticorpo (ad esempio su una o due catene leggere della variante dell'anticorpo). L'anticorpo HER2 della specie principale o la variante dell'anticorpo può essere un anticorpo a lunghezza intera o un frammento di anticorpo (ad esempio frammenti Fab di $F(ab=)2$), ma preferibilmente entrambi sono anticorpi a lunghezza intera. La variante dell'anticorpo nel presente documento può comprendere un'estensione del leader amminoterminale su una o più delle sue catene pesanti o leggere. Preferibilmente, l'estensione del leader amminoterminale è su una o due catene leggere dell'anticorpo. L'estensione del leader amminoterminale preferibilmente comprende o consiste di VHS-. La presenza dell'estensione del leader amminoterminale nella composizione può essere rilevata mediante varie tecniche analitiche tra cui, senza limitazione alcuna, analisi della sequenza N-terminale, saggio per eterogeneità di carica (ad esempio, cromatografia a scambio cationico o elettroforesi capillare di zona), spettrometria di massa ecc. La quantità della variante di anticorpo nella composizione varia generalmente da una quantità che costituisce il limite di rilevazione di qualsiasi saggio (preferibilmente un'analisi della sequenza N-terminale) usato per rilevare la variante a una quantità inferiore alla quantità dell'anticorpo della specie principale. Generalmente, circa il 20% o meno (ad esempio da circa l'1% a circa il 15%, ad esempio dal 5% a circa il 15%) delle molecole di anticorpo nella composizione comprende

un'estensione del leader amminotermiale. Tali quantità percentuali vengono preferibilmente determinate utilizzando l'analisi quantitativa della sequenza N-terminale o l'analisi a scambio cationico (utilizzando preferibilmente una colonna a scambio cationico debole ad alta risoluzione, come una colonna a scambio cationico PROXAC WCX-10™). A parte la variante di estensione del leader amminotermiale, sono contemplate ulteriori alterazioni della sequenza amminoacidica dell'anticorpo della specie principale e/o della variante, comprendenti, senza limitazione alcuna, un anticorpo comprendente un residuo di lisina C-terminale su una o entrambe le sue catene pesanti, un variante deamidata dell'anticorpo ecc.

Inoltre, l'anticorpo o variante principale della specie può inoltre comprendere variazioni di glicosilazione, esempi non limitativi delle quali comprendono un anticorpo comprendente una struttura di oligosaccaride G1 o G2 attaccata alla sua regione Fc, un anticorpo comprendente una porzione di carboidrato attaccata a una sua catena leggera (ad esempio una o due porzioni di carboidrato, come glucosio o galattosio, attaccate a una o due catene leggere dell'anticorpo, ad esempio attaccate a uno o più residui di lisina), anticorpo comprendente una o due catene pesanti non glicosilate, o un anticorpo comprendente un oligosaccaride sialato attaccato a una o due sue catene pesanti ecc.

La composizione può essere recuperata da una linea cellulare geneticamente modificata, ad esempio una linea cellulare di ovaio di criceto cinese (CHO) che esprime l'anticorpo HER2, o può essere preparata mediante sintesi peptidica.

Per ulteriori informazioni su composizioni di pertuzumab a titolo di esempio, vedere i brevetti US N. 7,560,111 e 7,879,325 nonché US 2009/0202546A1.

(iii) *Composizioni a base di trastuzumab*

La composizione di trastuzumab comprende generalmente una miscela di un anticorpo della specie principale (comprendente sequenze di catene leggere e pesanti delle SEQ ID NO: 13 e 14, rispettivamente) e sue forme varianti, in particolare varianti acide (comprendenti varianti deamidate). Preferibilmente, la quantità di tali varianti acide nella composizione è inferiore a circa il 25%, o inferiore a circa il 20%, o inferiore a circa il 15%. Vedere il brevetto U.S. n. 6,339,142. Vedere, inoltre, Harris et al., *J. Chromatography*, B752:233-245 (2001) riguardante forme di trastuzumab risolubili mediante cromatografia a scambio cationico, comprendenti il Picco A (Asn30 deamidato in Asp in entrambe le catene leggere); il Picco B (Asn55 deamidato in isoAsp in una catena pesante); il Picco 1 (Asn30 deamidato in Asp in una catena leggera); il Picco 2 (Asn30 deamidato in Asp in una catena leggera e Asp 102 isomerizzato in isoAsp in una catena pesante); il Picco 3 (forma principale del picco o anticorpo della specie principale); il Picco 4 (Asp102 isomerizzato in isoAsp in una catena pesante); e il Picco C (Aspinimide Asp 102 succinimide (Asu) in una catena pesante). Tali forme e composizioni varianti sono comprese nella presente invenzione.

(iv) *Formulazioni sottocutanee comprendenti un enzima ialuronidasi*

L'enzima ialuronidasi agisce principalmente come potenziatore della permeazione per aumentare la dispersione e l'assorbimento di altri farmaci co-somministrati. La ialuronidasi idrolizza transitoriamente lo ialuronano, componente della matrice SC, portando a una ridotta viscosità della matrice extracellulare dell'ipoderma e, pertanto, a un migliore rilascio dei farmaci somministrati per via sottocutanea nella circolazione sistemica.

Le glicoproteine ialuronidasi solubili (sHASEGP), un processo per la preparazione delle stesse e il loro uso in composizioni farmaceutiche sono stati descritti in WO2004/078140. L'uso di glicoproteine ialuronidasi solubili in combinazione con una varietà di anticorpi esemplificativi, come ad esempio trastuzumab, è stato menzionato in WO 2006/091871.

L'enzima ialuronidasi nelle formulazioni della presente invenzione potenzia il rilascio dell'anticorpo o anticorpi anti-HER2 (ad esempio pertuzumab e/o trastuzumab) nella circolazione sistemica, ad esempio aumentando l'assorbimento del principio attivo (agisce come potenziatore della permeazione). L'enzima ialuronidasi aumenta anche il rilascio dell'anticorpo o anticorpi terapeutici HER2 (ad esempio pertuzumab e/o trastuzumab) nella circolazione sistemica tramite la via di applicazione sottocutanea mediante l'idrolizzazione reversibile dello ialuronano, un componente extracellulare del tessuto interstiziale SC. L'idrolisi dello ialuronano nell'ipoderma apre temporaneamente i canali nello spazio interstiziale del tessuto SC e quindi migliora il rilascio dell'anticorpo terapeutico anti-HER2 nella circolazione sistemica. Inoltre, la somministrazione mostra una riduzione del dolore nell'essere umano e meno gonfiore volume-derivato del tessuto SC.

La ialuronidasi, quando è somministrata localmente, ha tutto il suo effetto a livello locale. In altre parole la ialuronidasi è inattivata e metabolizzata a livello locale in pochi minuti e non è stata rilevata per avere effetti sistemici o a lungo termine. La rapida inattivazione della ialuronidasi in pochi minuti quando entra nel flusso sanguigno preclude una capacità realistica di eseguire studi di biodistribuzione comparabili tra diversi prodotti ialuronidasi. Questa proprietà riduce al minimo anche qualsiasi potenziale problema di sicurezza sistemica perché il prodotto ialuronidasi non può agire in siti distanti.

La caratteristica unificante di tutti gli enzimi ialuronidasi è la loro capacità di depolimerizzare lo ialuronano, indipendentemente dalle differenze nella struttura chimica, nell'origine delle specie, nell'origine del tessuto o nei lotti di prodotto farmaceutico provenienti da una stessa specie e uno stesso tessuto. Essi sono inusuali per il fatto che la loro attività è la stessa (tranne per la potenza), pur avendo strutture differenti.

L'eccipiente enzima ialuronidasi secondo la formulazione della presente invenzione è caratterizzato dall'assenza di effetti avversi sull'integrità

molecolare dell'anticorpo o anticorpi HER2 nelle formulazioni farmaceutiche stabili descritte nel presente documento. Inoltre, l'enzima ialuronidasi modifica unicamente il rilascio dell'anticorpo HER2 o degli anticorpi HER2 nella circolazione sistemica ma non possiede alcuna proprietà che potrebbe fornire o contribuire agli effetti terapeutici dell'anticorpo o anticorpi HER2 assorbiti a livello sistemico. L'enzima ialuronidasi non è biodisponibile a livello sistemico e non influenza negativamente l'integrità molecolare dell'anticorpo o anticorpi HER2 alle condizioni di conservazione raccomandate della formulazione farmaceutica stabile secondo l'invenzione.

Un certo numero di enzimi ialuronidasi idonei secondo la presente invenzione è noto dalla tecnica antecedente. L'enzima preferito è un enzima ialuronidasi umano, in modo massimamente preferibile l'enzima ialuronidasi umano ricombinante noto come rHuPH20. rHuPH20 è un membro della famiglia delle β -1,4 glicosil idrolasi attive in ambiente neutro e acido che depolimerizzano lo ialuronano mediante idrolisi del legame β -1,4 tra la posizione C₁ della N-acetil glucosamina e la posizione C₄ dell'acido glucuronico. Lo ialuronano è un polisaccaride che si trova nella sostanza fondamentale intracellulare del tessuto connettivo, come il tessuto interstiziale sottocutaneo, e di alcuni tessuti specializzati, come il cordone ombelicale e l'umor vitreo. L'idrolisi dello ialuronano diminuisce temporaneamente la viscosità del tessuto interstiziale e favorisce la dispersione dei fluidi iniettati o di trasudati o essudati localizzati, facilitando così il loro assorbimento. Gli effetti della ialuronidasi sono locali e reversibili con completa ricostituzione dello ialuronano tessutale che si verifica entro 24 fino a 48 ore (Frost, G. I., "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", Expert Opinion in Drug Delivery, 2007; 4:427-440). L'aumento della permeabilità del tessuto connettivo attraverso l'idrolisi dello ialuronano correla con l'efficacia della ialuronidasi per la loro capacità di aumentare la dispersione e l'assorbimento delle molecole co-somministrate.

Il genoma umano contiene diversi geni ialuronidasi. Solo il prodotto del gene PH20 possiede efficace attività di ialuronidasi in condizioni extracellulari fisiologiche e agisce come agente di diffusione, mentre le ialuronidasi attive in ambiente acido non hanno questa proprietà.

rHuPH20 è il primo e unico enzima ialuronidasi ricombinante umano attualmente disponibile per uso terapeutico. La proteina PH20 umana presente in natura ha un ancoraggio lipidico attaccato all'amminoacido carbossi-terminale che la ancora alla membrana plasmatica. L'enzima rHuPH20 sviluppato da Halozyme è una variante di delezione troncata priva di tali amminoacidi nell'estremità carbossi-terminale responsabile per l'attacco lipidico. Ciò dà luogo a un enzima attivo a pH neutro, solubile, simile alla proteina trovata nelle preparazioni da testicoli bovini. La proteina rHuPH20 viene sintetizzata con un peptide segnale di 35 amminoacidi che è rimosso dall'estremità N-terminale durante il processo di secrezione. La proteina rHuPH20 matura contiene una sequenza amminoacidica N-terminale autentica ortologa a quella trovata in alcune preparazioni di ialuronidasi bovina.

Le ialuronidasi PH20, tra cui la PH20 di derivazione animale e rHuPH20 ricombinante umana, depolimerizzano lo ialuronano per idrolisi del legame β -1,4 tra la posizione C₁ della N-acetil glucosamina e la posizione C₄ dell'acido glucuronico. Il tetrasaccaride è il prodotto di digestione più piccolo (Weissmann, B., "The transglycosylative action of testicular hyaluronidase", J. Biol. Chem., 1955; 216: 783-94). Questa struttura di N-acetil glucosamina/acido glucuronico non si trova nei glicani uniti con legame N glicosidico (N-linked) dei prodotti biologici ricombinanti e quindi rHuPH20 non influirà sulla glicosilazione degli anticorpi con cui è formulata, come ad esempio pertuzumab o trastuzumab. L'enzima rHuPH20 possiede di per sé sei glicani N-linked per molecola con strutture core simili a quella trovata negli anticorpi monoclonali. Come anticipato, queste strutture N-linked non cambiano nel tempo, confermando la mancanza di attività enzimatica di rHuPH20 su queste strutture di glicani N-linked. La breve emivita di rHuPH20 e la sintesi costante di ialuronano portano a un'azione breve e locale dell'enzima sui tessuti.

L'enzima ialuronidasi presente nella formulazione sottocutanea secondo la presente invenzione può essere preparato utilizzando la tecnologia del DNA ricombinante. In questo modo si garantisce che sia ottenuta sempre la stessa proteina (identica sequenza amminoacidica) e che sia evitata una reazione allergica causata da proteine contaminanti co-purificate durante l'estrazione da un tessuto. L'enzima ialuronidasi utilizzato nella formulazione come esemplificato nel presente documento è un enzima umano, vale a dire rHuPH20.

La sequenza amminoacidica di rHuPH20 (HYLENEX™) è ben nota ed è disponibile al numero di registro CAS 75971-58-7. Il peso molecolare approssimativo è di 61 kDa.

Sebbene la sicurezza e l'efficacia dei prodotti ialuronidasi siano state stabilite, vi sono solo due anticorpi monoclonali (Herceptin® e MabThera®) che sono stati approvati per il rilascio sottocutaneo, utilizzando formulazioni contenenti ialuronidasi. Non è nota alcuna formulazione sottocutanea contenente ialuronidasi comprendente due anticorpi nella stessa formulazione (co-formulazione di due anticorpi).

La concentrazione dell'enzima ialuronidasi dipende dall'enzima ialuronidasi effettivamente utilizzato nella preparazione della formulazione secondo l'invenzione. Una quantità efficace dell'enzima ialuronidasi può essere prontamente determinata dall'esperto nella tecnica sulla base della divulgazione più avanti.

L'enzima ialuronidasi deve essere fornito in quantità sufficiente da provocare un aumento della dispersione e dell'assorbimento dell'anticorpo o anticorpi anti-HER2 co-somministrati, come pertuzumab e/o trastuzumab. La quantità minima dell'enzima ialuronidasi è almeno di circa 150 U/ml. Più in particolare, la quantità efficace dell'enzima ialuronidasi è da circa 150 U/ml a circa 16.000 U/ml, o da circa 600 U/ml a circa 16.000 ml, o da circa 1.000 a 16.000 U/ml, dove quest'ultimo corrisponde a da circa 0,01 mg a 0,16 mg di proteine sulla base di un'attività

specifica presunta di 100.000 U/mg. In alternativa, la concentrazione dell'enzima ialuronidasi è da circa 1.500 a 12.000 U/ml, o più in particolare di circa 2.000 U/ml o di circa 12.000 U/ml. Le quantità specificate corrispondono alla quantità di enzima ialuronidasi aggiunta inizialmente alla formulazione. Le concentrazioni dell'enzima ialuronidasi misurate nella formulazione finale possono variare entro un certo intervallo. Il rapporto (p/p) tra l'enzima ialuronidasi e l'anticorpo o anticorpi anti-HER2 è generalmente compreso nell'intervallo tra 1:1.000 e 1:8.000, o compreso nell'intervallo tra 1:4.000 e 1:5.000 o circa 1:6.000.

L'enzima ialuronidasi può essere derivato da animali, campioni umani o preparato in base alla tecnologia del DNA ricombinante, come descritto più avanti.

In alcune forme di realizzazione, le formulazioni sottocutanee di anticorpo HER2 nel presente documento comprendono ialuronidasi umana ricombinante (rHuPH20) a una concentrazione da circa 600 U/ml a circa 16.000 U/ml, o da circa 1.000 U/ml, a circa 16.000 U/ml, o da circa 1.000 a circa 2.000 U/ml, o a una concentrazione di circa 600 U/ml, o di circa 667 U/ml, o di circa 1.000 U/ml, o di circa 2.000 U/ml, preferibilmente di circa 1.000 U/ml.

In alcune forme di realizzazione le formulazioni di pertuzumab altamente concentrate e stabili della presente invenzione comprendono una dose fissa di 600 mg o 1200 mg di pertuzumab e ialuronidasi umana ricombinante (rHuPH20) a una concentrazione di 1.000 U/ml.

Come indicato sopra la glicoproteina ialuronidasi solubile può essere considerata come un ulteriore eccipiente nella formulazione di anti-HER2. La glicoproteina ialuronidasi solubile può essere aggiunta alla formulazione anti-HER2 al momento della preparazione della formulazione anti-HER2 o può essere aggiunta poco prima dell'iniezione. In alternativa, la glicoproteina ialuronidasi solubile può essere fornita come iniezione separata. In quest'ultimo caso la glicoproteina ialuronidasi solubile può essere fornita in una fiala separata sia in forma liofilizzata, che deve essere ricostituita con opportuni diluenti prima che avvenga l'iniezione sottocutanea, o può essere fornita come formulazione liquida dal produttore. La formulazione anti-HER2 e la glicoproteina ialuronidasi solubile possono essere procurate come entità separate o possono essere fornite anche in forma di kit che comprendono sia componenti dell'iniezione che istruzioni idonee per la loro somministrazione sottocutanea. Possono inoltre essere fornite istruzioni idonee per la ricostituzione e/o la somministrazione di una o di entrambe le formulazioni.

Oltre all'enzima ialuronidasi, come l'rHuPH20, le formulazioni sottocutanee della presente invenzione comprendono uno o più eccipienti aggiuntivi, come uno o più agenti tamponanti, uno o più stabilizzanti e/o uno o più tensioattivi.

Il tampone utilizzato nelle formulazioni secondo la presente invenzione ha un pH nell'intervallo da circa 5,0 a circa 7,0, o da circa 5,0 a circa

6,0, o da circa 5,3 a circa 5,8, o da circa 5,5 a circa 5,7.

Per le formulazioni sottocutanee (SC) di pertuzumab, è stato trovato come il più idoneo il pH di circa 5,7. Un pH preferito di una formulazione sottocutanea (SC) di trastuzumab è di circa 5,5.

Esempi di agenti tamponanti che controlleranno il pH in questo intervallo includono acetato, succinato, gluconato, istidina, citrato, glicilglicina e altri tamponi di acidi organici. Il tampone più idoneo secondo la presente invenzione è un tampone di istidina, come, per esempio, istidina cloruro, istidina acetato, istidina fosfato, istidina solfato, preferibilmente un tampone di istidina cloruro. Un tampone di istidina cloruro può essere preparato titolando L-istidina (base libera, solida) con acido cloridrico diluito. In particolare, il tampone di istidina o il tampone di istidina cloruro è un tampone di L-istidina a pH di $5,5 \pm 0,6$, più particolarmente a un pH da circa 5,3 a circa 5,8, e in modo massimamente particolare ha un pH di 5,5 o 5,7.

Lo stabilizzatore può, per esempio, essere un saccaride o una combinazione di saccaridi, inclusi monosaccaridi, disaccaridi, trisaccaridi, polisaccaridi, alcoli di zucchero, zuccheri riducenti, zuccheri non riducenti ecc. Esempi di saccaridi nel presente documento includono glucosio, saccarosio, trealosio, lattosio, fruttosio, maltosio, destrano, glicerina, destrano, eritritolo, glicerolo, arabitolo, xilitolo, sorbitolo, mannitolo, mellibiosio, melezitiosio, raffiniosio, mannotriosio, stachiosio, maltosio, lattulosio, maltulosio, glucitolo, maltitolo, lattitolo e isomaltulosio. Un saccaride particolarmente idoneo per l'uso nelle formulazioni SC di trastuzumab è il trealosio, e un saccaride particolarmente idoneo per l'uso nelle formulazioni SC di pertuzumab è il saccarosio.

Il tensioattivo preferibilmente è un tensioattivo non ionico. Nel presente documento, esempi di tensioattivi includono polisorbato; polossamero (ad esempio polossamero 188); Triton; sodio dodecil solfato (SDS); sodio lauril solfato; ottil glicoside di sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o stearyl-solfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- o stearyl-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaina; lauroammidopropil-, cocammidopropil-, linoleammidopropil-, miristammidopropil-, palmidopropil- o isostearammidopropil-betaina (ad esempio lauroammidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearammidopropil-dimetilammina; sodio metil cocoil- o disodio metil oleil-taurato; e la serie MONAQU AT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); polietil glicole, polipropil glicole e copolimeri di etilene e propilenglicole (ad esempio, Pluronic, PF68 ecc.); ecc. Polisorbato 20 (PS20) e Polisorbato 80 (PS80), rispettivamente, sono particolarmente idonei per l'uso nelle formulazioni descritte nel presente documento.

III. Selezione dei pazienti per la terapia

Il rilevamento dell'espressione o dell'amplificazione di HER2 può essere usato per selezionare i pazienti per il trattamento secondo la presente

invenzione. Sono disponibili svariati saggi commerciali approvati dalla FDA per identificare pazienti affetti da cancro HER2-positivo, esprimente HER2, sovraesprimente HER2 o HER2-amplificato. Questi procedimenti comprendono HERCEPTEST® (Dako) e PATHWAY® HER2 (saggi immunostochimici (IHC)) e PathVysion® e HER2 FISH pharmDx™ (saggi FISH). Gli utilizzatori devono consultare i foglietti illustrativi dei kit di saggio specifici per informazioni sulla validità e le performance di ciascun saggio.

Per esempio, la sovraespressione di HER2 può essere analizzata tramite IHC, ad esempio utilizzando HERCEPTEST® (Dako). Sezioni di tessuto incluse in paraffina ottenute da una biopsia tumorale possono essere sottoposte al saggio IHC e possono essere accordati loro i criteri di intensità della colorazione della proteina HER2 come segue:

Punteggio 0 non si osserva colorazione o si osserva colorazione della membrana in meno del 10 % delle cellule tumorali.

Punteggio 1+ viene rilevata una colorazione debole/appena percettibile della membrana in più del 10 % delle cellule tumorali. Solo parte della membrana delle cellule è colorata.

Punteggio 2+ si osserva una colorazione completa della membrana da debole a moderata in più del 10 % delle cellule tumorali.

Punteggio 3+ si osserva una colorazione completa della membrana da moderata a forte in più del 10 % delle cellule tumorali.

Quei tumori con punteggio 0 o 1+ per la valutazione della sovraespressione di HER2 possono essere caratterizzati come HER2 negativi, mentre quei tumori con punteggio 2+ o 3+ possono essere caratterizzati come HER2 positivi.

I tumori che sovraesprimono l'HER2 possono essere valutati con punteggi immunostochimici corrispondenti al numero di copie di molecole di HER2 espresse per cellula e possono essere determinati biochimicamente:

0 = 0-10.000 copie/cellula,

1+ = almeno circa 200.000 copie/cellula,

2+ = almeno circa 500.000 copie/cellula,

3+ = almeno circa 2.000.000 di copie/cellula.

La sovraespressione di HER2 al livello 3+, che porta all'attivazione ligando-indipendente della tirosin chinasi (Hudziak et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84:7159-7163 (1987)), si verifica in circa il 30% dei carcinomi mammari e in questi pazienti la sopravvivenza libera da recidiva e la sopravvivenza complessiva sono diminuite (Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989); Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987)).

La presenza di sovraespressione della proteina HER2 e l'amplificazione del gene sono altamente correlate, quindi, in alternativa, o in aggiunta,

l'uso di saggi di ibridazione *in situ* (ISH), ad esempio l'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) per rilevare l'amplificazione genica, può essere impiegato anche per la selezione di pazienti appropriati per il trattamento secondo la presente invenzione. Saggi FISH come l'INFORM™ (venduto da Ventana, Arizona) o il PathVysion® (Vysis, Illinois) possono essere eseguiti su tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina per determinare l'estensione (eventuale) dell'amplificazione di HER2 nel tumore.

In modo più comune in assoluto, lo stato di HER2-positivo è confermato utilizzando tessuto tumorale archiviato incluso in paraffina, usando uno qualsiasi dei procedimenti precedenti.

Preferibilmente, per il trattamento secondo la presente invenzione vengono selezionati pazienti HER2-positivi con un punteggio IHC 2+ o 3+ o che sono FISH- o ISH-positivi. I pazienti con punteggio IHC 3+ e positività a FISH/ISH sono particolarmente idonei per il trattamento secondo la presente invenzione.

Sono state identificate anche mutazioni di HER2 associate alla risposta alla terapia diretta a HER2. Tali mutazioni includono, senza limitazione, inserzioni nell'esone 20 di HER2, delezioni attorno ai residui amminoacidici 755-759 di HER2, una qualsiasi delle mutazioni G309A, G309E, S310F, D769H, D769Y, V777L, P780-Y781insGSP, V842I, R896C (Bose et al., Cancer Discov 2013; 3:1-14), nonché mutazioni attivanti putative non sinonime identiche (o indel) precedentemente riportate nel database COSMIC trovate in due o più campioni unici.

Vedere anche il brevetto U.S. N. 7,981,418 per saggi alternativi per lo screening dei pazienti per la terapia con pertuzumab, e gli Esempi.

IV. Formulazioni farmaceutiche

Formulazioni farmaceutiche degli anticorpi HER2 usate secondo la presente invenzione sono preparate per la conservazione miscelando un anticorpo avente il grado di purezza desiderato con veicoli, eccipienti o stabilizzanti opzionali farmaceuticamente accettabili (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16a edizione, Osol, A. Ed. (1980)), generalmente sotto forma di formulazioni liofilizzate o soluzioni acquose. Sono anche contemplati cristalli di anticorpi (vedere la domanda di brevetto US 2002/0136719). Veicoli, eccipienti o stabilizzanti accettabili non sono tossici per i riceventi ai dosaggi e concentrazioni impiegati, e includono, tamponi come fosfato, citrato e altri acidi organici; antiossidanti tra cui acido ascorbico e metionina; conservanti (come cloruro di ottadecildimetilbenzilammonio; cloruro di esametonio; cloruro di benzalconio; cloruro di benzetonio; fenolo, alcool butilico o benzilico; alchil parabeni come per esempio metil o propil parabene; catecolo; resorcinolo; cicloesano; 3-pentanol; e m-cresolo); polipeptidi a basso peso molecolare (meno di circa 10 residui); proteine; come per esempio albumina sierica, gelatina o immunoglobuline; polimeri idrofili come per esempio polivinilpirrolidone; aminoacidi come per esempio

glicina, glutammina, asparagina, istidina, arginina o lisina; monosaccaridi, disaccaridi e altri carboidrati tra cui glucosio, mannosio o destreine; agenti chelanti come per esempio EDTA; zuccheri come per esempio saccarosio, mannitolo, trealosio o sorbitolo; controioni formanti sali come per esempio sodio; complessi metallici (per esempio, complessi Zn-proteina); e/o tensioattivi non ionici come TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicole (PEG). Formulazioni di anticorpi liofilizzati sono descritte in WO 97/04801.

Formulazioni di anticorpi liofilizzati sono descritte nei brevetti U.S. N. 6,267,958, 6,685,940 e 6,821,515. La formulazione preferita di HERCEPTIN® (trastuzumab) è una polvere liofilizzata sterile, di colore da bianco a giallo chiaro senza conservanti per somministrazione endovenosa (EV), comprendente 440 mg di trastuzumab, 400 mg di α,α -trealosio disidratato, 9,9 mg di L-istidina-HCl, 6,4 mg di L-istidina, e 1,8 mg di polisorbato 20, USP. La ricostituzione di 20 ml di acqua batteriostatica per iniezione (BWF), contenente l'1,1% di alcool benzilico come conservante, produce una soluzione multidose contenente 21 mg/ml di trastuzumab, con un pH di circa 6,0. Per ulteriori dettagli, consultare le informazioni sulla prescrizione di trastuzumab.

La formulazione preferita di pertuzumab per uso terapeutico comprende pertuzumab 30 mg/ml in acetato di istidina 20 mM, saccarosio 120 mM, polisorbato 20 allo 0,02%, a pH 6,0. Una formulazione alternativa di pertuzumab comprende 25 mg/ml di pertuzumab, 10 mM di tampone di istidina-HCl, 240 mM di saccarosio, polisorbato 20 0,02%, pH 6,0.

La formulazione del placebo utilizzato negli studi clinici descritti negli Esempi è equivalente al pertuzumab, senza l'agente attivo.

La formulazione nel presente documento può anche contenere più di un composto attivo secondo necessità per la particolare indicazione da trattare, preferibilmente quelli con attività complementari che non si influenzano negativamente a vicenda. Vari farmaci che possono essere combinati con l'inibitore di dimerizzazione HER sono descritti nella sezione Procedimento qui di seguito. Convenientemente, tali molecole sono presenti in combinazione in quantità che sono efficaci per lo scopo previsto.

Le formulazioni da usare per la somministrazione *in vivo* devono essere sterili. Questo si ottiene facilmente mediante filtrazione con membrane di filtrazione sterile.

Formulazioni specifiche esemplificative idonee per l'uso nei procedimenti della presente divulgazione sono le seguenti:

Pertuzumab EV: pertuzumab 420 mg/14 ml di concentrato per infusione endovenosa è un liquido sterile, da limpido a leggermente opalescente, da incolore a marrone chiaro fornito in fiale di vetro monouso da 20 ml con tappi da 20 mm. Ogni fiala monouso contiene 420 mg di pertuzumab a una concentrazione di 30 mg/ml in acetato di L-istidina 20 mM (pH6.0), saccarosio 120 mM e polisorbato 20 0,02%.

Pertuzumab SC con rHuPH20: pertuzumab 600 mg/5 ml con soluzione di rHuPH20 per iniezione sottocutanea è un liquido sterile, senza

conservanti, da incolore a leggermente brunastro, fornito in fiale monouso da 10 ml con tappi da 20 mm. Le fiale sono riempite per consentire il rilascio e il trasferimento di 5,0 ml del farmaco in studio riempito con circa 5,4 ml di prodotto farmaceutico). Ciascuna fiala si compone di una formulazione contenente 120 mg/ml di RO4368451 in tampone di L-istidina acetato contenente gli eccipienti saccarosio, polisorbato 20, metionina e rHuPH20 (2000 U/ml) a pH 5,7.

Una formulazione specifica di pertuzumab SC con rHuPH20 contiene i seguenti componenti:

120 mg/ml di pertuzumab

240 mM di saccarosio

Polisorbato 20 0,02 %

10 mM di metionina

2000 U/ml di rhuPH20

20 mM di istidina/acetato

pH 5,7

Pertuzumab SC senza rHuPH20: pertuzumab 500 mg/5 ml di soluzione per iniezione sottocutanea è un liquido sterile, senza conservanti, da incolore a leggermente brunastro, fornito in fiale di vetro monouso da 10 ml con tappi da 20 mm. Le fiale vengono riempite per consentire il rilascio e il trasferimento di 5,0 ml di farmaco in studio. Ciascuna fiala si compone di una formulazione contenente 120 mg/ml di pertuzumab in tampone di L-istidina acetato contenente gli eccipienti saccarosio, polisorbato 20 e metionina a pH 5,7.

Trastuzumab SC: trastuzumab per somministrazione sottocutanea contiene tipicamente i seguenti componenti: ialuronidasi umana ricombinante (rHuPH20); L-istidina; L-istidina cloridrato monoidrato; α,α -trealosio disidratato; L-metionina; Polisorbato 20; acqua per iniezione, trastuzumab 600 mg/5 ml. La soluzione di trastuzumab per iniezione sottocutanea è un liquido sterile, senza conservanti, da incolore a leggermente brunastro, fornito in fiale di vetro monouso da 6 ml con tappi da 20 mm, Ogni fiala si compone di una formulazione contenente 120 mg/ml di trastuzumab in tampone di L-Istidina-HCl contenente gli eccipienti trealosio, polisorbato 20, metionina e rHuPH20 (2000 U/ml) a pH 5,5.

Una formulazione specifica di trastuzumab SC contiene i seguenti componenti:

120 mg/ml di trastuzumab

210 mM di trealosio

0.04% di polisorbato 20

10 mM di metionina

2000 U/ml di rHuPH20

20 mM di istidina-HCl

pH 5,5

Una specifica forma di dosaggio di carico della combinazione a dose fissa (FDC) di pertuzumab-trastuzumab SC ha la seguente composizione: trastuzumab 600 mg e pertuzumab 1.200 mg in 15 ml di soluzione per iniezione sottocutanea è un liquido sterile, senza conservanti, da incolore a leggermente brunastro fornito in fiale di vetro monouso da 20 ml con tappi da 20 mm, Ogni fiala si compone di una formulazione contenente 40 mg/ml di trastuzumab e 80 mg/ml di pertuzumab in tampone L-Istidina-HCl contenente gli eccipienti trealosio, saccarosio, polisorbato 20, metionina e rHuPH20 (1.000 U/ml) a pH 5,5.

Una specifica forma di dosaggio di mantenimento della combinazione a dose fissa (FDC) di pertuzumab-trastuzumab SC ha la seguente composizione: trastuzumab 600 mg e pertuzumab 600 mg in 10 ml di soluzione per iniezione sottocutanea è un liquido sterile, senza conservanti, da incolore a leggermente brunastro fornito in fiale di vetro monodose da 15 ml con tappi da 20 mm, Ogni fiala si compone di una formulazione contenente 60 mg/ml di trastuzumab e 60 mg/ml di pertuzumab in tampone di L-Istidina-HCl contenente gli eccipienti trealosio, saccarosio, polisorbato 20, metionina e rHuPH20 (1.000 U/ml) a pH 5,5.

V. Procedimenti di trattamento

Per la somministrazione endovenosa, pertuzumab e trastuzumab sono somministrati secondo informazioni prescrittive applicabili.

Pertuzumab viene generalmente somministrato ogni tre settimane mediante infusione endovenosa, iniziando con una prima infusione di 840 mg somministrata nell'arco di 60 minuti, seguita da una seconda e da eventuali successive infusioni endovenose di 420 mg somministrate nell'arco di 30-60 minuti. Ulteriori dettagli su schemi di somministrazione idonei sono forniti nelle Informazioni prescrittive di trastuzumab.

Trastuzumab viene generalmente somministrato ogni tre settimane mediante infusione endovenosa iniziando con una prima dose di carico di 8 mg/kg nell'arco di 90 minuti, seguita da una seconda e da eventuali successive dosi di mantenimento di 6 mg/kg somministrate nell'arco di 30-60 minuti. Ulteriori dettagli su schemi di somministrazione idonei sono forniti nelle Informazioni prescrittive di trastuzumab.

Pertuzumab e trastuzumab possono essere somministrati durante la stessa visita, in entrambi gli ordini.

Secondo la presente invenzione, pertuzumab o pertuzumab+trastuzumab vengono somministrati per via sottocutanea.

Pertuzumab SC viene tipicamente somministrato ogni tre settimane come iniezione sottocutanea, iniziando con una dose di carico fissa di circa 1200 mg, seguita da una seconda e da eventuali dosi di mantenimento fisse successive di circa 600 mg come qui sopra descritto e come descritto negli Esempi. Il sito di iniezione deve essere alternato tra la coscia sinistra e quella destra. Le nuove iniezioni devono essere somministrate ad almeno 2,5 cm dal vecchio sito su cute sana e non in aree dove la cute è arrossata, tumefatta, sensibile o indurita.

Trastuzumab SC viene tipicamente somministrato come iniezioni sottocutanee a una dose di 600 mg in 2-5 minuti ogni tre settimane. Il sito di iniezione deve essere alternato tra la coscia sinistra e quella destra. Le nuove iniezioni devono essere somministrate ad almeno 2,5 cm dal vecchio sito su cute sana e non in aree dove la cute è arrossata.

Le co-formulazioni di pertuzumab/trastuzumab SC vengono somministrate in modo simile.

Per la somministrazione sottocutanea in co-miscela di pertuzumab e trastuzumab, è necessario comporre la miscela finale in siringhe utilizzando un connettore per siringa. L'iniezione sottocutanea viene infine somministrata utilizzando una siringa di plastica monouso e un ago in acciaio inossidabile.

VI. Articoli di fabbricazione

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, viene fornito un articolo di fabbricazione comprendente una composizione farmaceutica liquida dell'invenzione. L'articolo di fabbricazione preferibilmente comprende inoltre un foglietto illustrativo. Il foglietto illustrativo può fornire istruzioni per somministrare per via sottocutanea la composizione farmaceutica liquida in essa contenuta a un paziente con cancro esprime HER2, ad esempio HER2-positivo, HER2-amplificato o HER2-mutato.

In determinate forme di realizzazione, il cancro è cancro al seno, cancro ovarico, cancro peritoneale, cancro alle tube di Falloppio, cancro ai polmoni, cancro alla prostata, cancro coloretale, cancro biliare e cancro alla vescica. In altre forme di realizzazione, il cancro è cancro al seno, cancro peritoneale, cancro alle tube di Falloppio, cancro ai polmoni, cancro del colon-retto, cancro delle vie biliari e cancro alla vescica.

In una forma di realizzazione particolare, il cancro è cancro al seno, come il cancro al seno in fase iniziale o il cancro al seno metastatico.

In una forma di realizzazione, l'articolo di fabbricazione è una fiala di vetro monouso dotata di un tappo, che contiene la formulazione da somministrare.

Un'altra forma di un articolo di fabbricazione è una siringa, contenente la formulazione da somministrare, che può essere attaccata a un ago ipodermico in acciaio inossidabile per la somministrazione sottocutanea.

In un aspetto della divulgazione, l'articolo di fabbricazione comprende due fiale, in cui una prima fiala contiene una dose fissa di circa 1200

mg di pertuzumab e una seconda fiala contiene una dose fissa di circa 600 mg di pertuzumab.

In un altro aspetto della divulgazione, l'articolo di fabbricazione comprende due fiale, in cui una prima fiala contiene una dose fissa di circa 600 mg di pertuzumab e una seconda fiala contiene una dose fissa di circa 600 mg di trastuzumab.

In un altro aspetto della divulgazione, l'articolo di fabbricazione comprende una fiala monodose contenente circa 600 mg di pertuzumab.

IV. Deposito di materiali biologici

Le seguenti linee cellulari di ibridoma sono state depositate presso l'American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA20110-2209, USA (ATCC):

Designazione degli anticorpi	Numero ATCC	Data di deposito
4D5	ATCC CRL10463	24 maggio 1990
2C4	ATCC HB-12697	8 aprile 1999

Tabella 1

TABELLA DELLE SEQUENZE

Descrizione	SEQ ID NO	Figura
Dominio I HER2	1	1
Dominio II HER2	2	1
Dominio III HER2	3	1
Dominio IV HER2	4	1
2C4 leggera variabile	5	2A
2C4 pesante variabile	6	2B
574/pertuzumab leggera variabile	7	2A
574/pertuzumab pesante variabile	8	2B
cornice consenso V _L umana	9	2A
cornice consenso V _H umana	10	2B
catena leggera pertuzumab	11	3A

catena pesante pertuzumab	12	3B
catena leggera trastuzumab	13	4A
catena pesante trastuzumab	14	4B
Variante catena leggera pertuzumab	15	5A
Variante catena pesante pertuzumab	16	5B
GFTFTDYTMX	17	
DVNPNSGGSIYNQRFKG	18	
NLGPSFYFDY	19	
KASQDVSIGVA	20	
SASYX ¹ X ² X ³	21	
QYYIYPYT	22	

Ulteriori dettagli dell'invenzione sono illustrati dai seguenti Esempi non limitativi.

Tabella 2 -ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI E DEFINIZIONI DEI TERMINI

Abbreviazione	Definizione
ALP	fosfatasi alcalina
ALT	alanina aminotransferasi
ARDS	sindrome da distress respiratorio acuto
ARR	reazione correlata alla somministrazione
AST	aspartato aminotransferasi
ATA	anti-anticorpo terapeutico
AUC	area sotto la curva concentrazione sierica-tempo
AUC _{0-21giorni}	area sotto la curva concentrazione sierica-tempo AUC dall'inizio del trattamento dello studio al giorno 21
AUC _{0-inf}	area sotto la curva concentrazione-tempo dall'inizio del trattamento dello studio da 0 a infinito
BMI	indice di massa corporea

Abbreviazione	Definizione
BP	pressione sanguigna
CHF	insufficienza cardiaca congestizia
CL/F	clearance apparente media
C _{max}	concentrazione sierica massima
C _{trough}	concentrazione pre-dose
CTCAE	Criteri terminologici comuni per gli eventi avversi
EBC	cancro al seno in fase iniziale
CE	Comitato etico
ECG	elettrocardiogramma
ECO	ecocardiografia
eCRF	Modulo elettronico di segnalazione del caso
EDC	acquisizione elettronica dei dati
EGFR	recettore del fattore di crescita dell'epidermide
FDC	combinazione a dose fissa
FEC	fluorouracile, epirubicina e ciclofosfamide
GLP	Buona pratica di laboratorio
HBcAb	anticorpo core dell'epatite B totale
HBsAg	antigene di superficie dell'epatite B
HCG	gonadotropina corionica umana
HCV	virus dell'epatite C
HER2	recettore del fattore di crescita dell'epidermide 2
HIV	virus dell'immunodeficienza umana
HMV	volontario maschio sano
HR	frequenza cardiaca

Abbreviazione	Definizione
IB	Brochure dello sperimentatore
ICH	Conferenza internazionale sull'armonizzazione
Ig	immunoglobulina
IMP	prodotto medicinale sperimentale
IND	Domanda per nuovo farmaco sperimentale
INN	Nome non proprietario internazionale
IRB	Comitato istituzionale di revisione
IRR	reazione correlata all'infusione
EV	endovenoso
IUD	dispositivo intrauterino
LPLV	ultimo paziente, ultima visita
LVEF	frazione di eiezione ventricolare sinistra
mAb	anticorpo monoclonale
MBC	cancro al seno metastatico
MedDRA	Dizionario medico per le attività di regolamentazione
MUGA	acquisizione multi-gate (scansione)
NCI	National Cancer Institute
NYHA	New York Heart Association
ORR	tasso di risposta complessivo
PK	farmacocinetica
popPK	farmacocinetica di popolazione
Q3W	ogni 3 settimane
QTc	Intervallo QT corretto per la frequenza
QTcF	Intervallo QT corretto utilizzando la formula di Fridericia

Abbreviazione	Definizione
RBC	globulo rosso
rHuPH20	ialuronidasi umana ricombinante
SC	sottocutaneo
DS	deviazione standard
SI	Sistema internazionale di unità di misura
SID	dispositivo di iniezione monouso
SIR	siringa
TBD	da determinare
t_{max}	tempo di concentrazione sierica massima
$t_{1/2}$	emivita di eliminazione
TK	tossicocinetica
ULN	limite superiore del normale
GB	globulo bianco

ESEMPIO 1

Studio di fase I di determinazione della dose sottocutanea di pertuzumab in associazione con trastuzumab

Questo è uno studio clinico di fase I, in aperto, multicentrico, in due parti, per la determinazione della dose sottocutanea di pertuzumab in combinazione con trastuzumab, in volontari maschi sani e pazienti di sesso femminile con cancro al seno in fase iniziale.

Lo studio ha progettato la sicurezza e la farmacocinetica di pertuzumab SC per il trattamento Q3W mediante applicazione di un approccio basato sulla PK per confrontare una formulazione SC con la formulazione EV approvata. In questo studio di determinazione della dose, si intende identificare la dose SC che è paragonabile a IV per quanto riguarda le concentrazioni sieriche, le concentrazioni C_{trough} sieriche SC Q3W di pertuzumab sono sconosciute.

Nello studio verranno valutati diversi tipi di iniezioni di pertuzumab SC:

- Somministrazione separata di pertuzumab SC con o senza trastuzumab SC come iniezioni separate (co-somministrazione)
- Somministrazione simultanea di pertuzumab SC e trastuzumab SC come iniezione singola (co-miscelata)

Marco Giovanni Mari
 USBM-CP-090

- Somministrazione di pertuzumab e trastuzumab SC come iniezione singola (co-miscelata)

Inizialmente, nella Parte 1, volontari maschi sani (HMV) riceveranno una singola dose di pertuzumab EV o SC (con o senza trastuzumab SC) per selezionare una o più dosi SC di pertuzumab che ci si aspetta si traducano in concentrazioni sieriche paragonabili a pertuzumab EV, sia quando somministrati in co-somministrazione o con iniezione co-miscelata. La(e) dose(i) di pertuzumab SC verranno quindi confermate in pazienti con EBC.

Sulla base dei dati di PK nella Parte 1 (coorti di volontari sani), il modello popPK di pertuzumab verrà utilizzato per identificare la(e) dose(i) desiderata per la Parte 2. (Vedere, Garg et al., *Cancer Chemother Pharmacol* (2014) 74:819-829.)

Dopo la selezione della dose desiderata e sulla base di informazioni sulla fattibilità di una FDC, pazienti con cancro al seno in fase iniziale (EBC) che hanno completato il loro trattamento standard saranno arruolati nella Parte 2 per ricevere pertuzumab SC alla(e) dose(i) identificata(e) nella Parte 1. Questa dose identificata di pertuzumab sarà co-somministrata con trastuzumab SC, co-miscelata con trastuzumab SC o co-formulata con trastuzumab SC in una combinazione a dose fissa (FDC). La Parte 2 includerà la conferma della dose di pertuzumab SC e un confronto della PK da co-miscelati e FDC.

In questo studio in cui verranno somministrati due anticorpi monoclonali (mAb) a un volume fino a circa 15 ml, verrà valutata anche la concentrazione di rHuPH20. In precedenza, 2000 U/ml del potenziatore dell'assorbimento sono stati utilizzati con trastuzumab SC e Rituximab SC, tuttavia, questi sono singoli anticorpi e a volumi inferiori alla combinazione pertuzumab/trastuzumab studiata qui.

Al fine di determinare se una quantità inferiore di rHuPH20 porterebbe a un assorbimento mAb idoneo, lo studio è stato progettato per testare una concentrazione enzimatica di 2000 U/ml quando vengono somministrati entrambi gli anticorpi (volume di 15 ml) e una concentrazione enzimatica di 667 U/ml (utilizzando pertuzumab che non contiene rHuPH20) quando vengono somministrati entrambi gli anticorpi (volume di 15 ml). Se i parametri di PK sono approssimativamente equivalenti, la quantità ridotta di rHuPH20 può essere potenzialmente utilizzata nello sviluppo del prodotto FDC co-formulato.

OBIETTIVI ED ENDPOINT

OBIETTIVI PRIMARI

Parte 1 (determinazione della dose)

Gli obiettivi primari per la Parte 1 di questo studio sono i seguenti:

- Selezionare la dose di carico e di mantenimento sottocutanea (SC) di pertuzumab che si traduce in un'esposizione paragonabile a

Marco Giovanni Mari
USBM-CP-090

pertuzumab per via endovenosa (EV) quando pertuzumab SC viene somministrato come iniezioni di un singolo agente (per un successivo uso in co-somministrazione con trastuzumab SC).

- Selezionare la dose di carico e di mantenimento SC di pertuzumab che si traduce in un'esposizione paragonabile a pertuzumab EV quando pertuzumab SC viene somministrato in miscela con trastuzumab SC come iniezione singola (co-miscelato).
- Valutare se sia necessaria rHuPH20 aggiuntiva quando pertuzumab SC e trastuzumab SC vengono miscelati contemporaneamente.

Parte 2 (conferma della dose)

Gli obiettivi primari per la Parte 2 di questo studio sono i seguenti:

- Confermare la dose di mantenimento di pertuzumab SC quando somministrato come iniezione di un singolo agente come parte della co-somministrazione con trastuzumab SC oppure
- Confermare la dose di mantenimento di pertuzumab SC quando somministrato miscelato con trastuzumab SC in una singola iniezione (co-miscelato) o co-formulato con trastuzumab SC in una singola iniezione pronta per l'uso (combinazione a dose fissa (FDC)).

OBIETTIVI SECONDARI

Gli obiettivi secondari di questo studio sono i seguenti:

- Valutare la sicurezza e la tollerabilità di pertuzumab SC somministrato da solo o in combinazione con trastuzumab SC (co-miscelato o FDC) in volontari maschi sani (HMV) e pazienti di sesso femminile con cancro al seno in fase iniziale (EBC) che hanno completato la terapia standard per il cancro al seno, sulla base dei seguenti endpoint:
 - Incidenza, natura e gravità degli eventi avversi classificati secondo i National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI CTCAE) v4.03;
 - Cambiamenti nei parametri dei segni vitali, della frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) e dell'elettrocardiogramma (ECG);
 - Cambiamenti nei risultati di laboratorio clinici;
 - Incidenza della risposta anti-anticorpo terapeutico (ATA).

DISEGNO DELLO STUDIO

DESCRIZIONE DELLO STUDIO

Panoramica del disegno dello studio

Questo è uno studio multicentrico, in due parti, in aperto su pertuzumab SC.

La Parte 1 dello studio è la determinazione della dose, in cui la dose di carico e di mantenimento di pertuzumab SC sarà determinata in soggetti HMV. Saranno valutati due tipi di iniezioni di pertuzumab SC: pertuzumab somministrato come iniezione di agente singolo (per un successivo uso in co-somministrazione con l'iniezione di singolo agente trastuzumab SC) e pertuzumab SC co-miscelato con trastuzumab SC in una singola iniezione.

La Parte 2 dello studio confermerà la(e) dose(i) di pertuzumab SC in pazienti con EBC che hanno completato la terapia standard per il cancro al seno. La dose di pertuzumab SC nella Parte 2 sarà co-somministrata con trastuzumab SC, co-miscelata con trastuzumab SC, o co-formulata con trastuzumab SC come FDC. La Parte 2 includerà la conferma della dose di pertuzumab SC nonché un confronto tra la PK da co-miscelati e FDC prima di uno studio di fase III.

Vedere la Figura 6 per lo schema dello studio. Sarà monitorata la sicurezza e saranno prelevati campioni di sangue per la valutazione PK secondo il programma delle valutazioni.

Parte 1 (determinazione della dose)

Gli HMV sono stati arruolati nelle coorti da 1 a 8 (6 soggetti per coorte). Ogni soggetto ha ricevuto una singola iniezione. Le coorti 2-4 hanno valutato differenti dosi di pertuzumab SC. Le coorti da 5 a 8 hanno valutato dosi di pertuzumab+trastuzumab co-miscelate. Le dosi valutate all'interno di ciascuna coorte sono le seguenti:

- Coorte 1: 420 mg di pertuzumab EV (controllo)
- Coorte 2: 400 mg di pertuzumab SC
- Coorte 3: 600 mg di pertuzumab SC
- Coorte 4: 1200 mg di pertuzumab SC
- Coorte 5: 600 mg di trastuzumab SC (controllo)
- Coorte 6: 400 mg di pertuzumab SC più 600 mg di trastuzumab SC (co-miscelati)
- Coorte 7: 1200 mg di pertuzumab SC più 600 mg di trastuzumab SC (co-miscelati)
- Coorte 8: 1200 mg di pertuzumab SC (senza rHuPH20) più 600 mg di trastuzumab SC (co-miscelati)

Le diverse dosi di pertuzumab sono state somministrate regolando il volume di dosaggio. La concentrazione di pertuzumab e trastuzumab era di 120 mg/ml e rHuPH20 era 2.000 U/ml nelle soluzioni di dosaggio SC.

Le coorti 6 e 7 hanno ricevuto pertuzumab SC e trastuzumab SC entrambi contenenti rHuPH20 in una concentrazione di 2.000 U/ml, mentre gli HMV nella coorte 8 hanno ricevuto pertuzumab SC non contenente rHuPH20, co-miscelato con trastuzumab SC contenente rHuPH20 in una concentrazione di 2.000 U/ml, perciò la concentrazione complessiva di rHuPH20 ricevuta dalla coorte 8 era di circa 667 U/ml. La coorte 8 è stata pianificata per valutare l'impatto di una concentrazione inferiore di rHuPH20 sulla PK di pertuzumab e trastuzumab quando somministrati in un'iniezione co-miscelata.

Periodo di tempo da osservare

Per garantire la sicurezza durante lo studio, il primo volontario sano nella coorte 2 è stato attentamente monitorato per sicurezza e tollerabilità dopo il trattamento con pertuzumab SC e fino alla fine del giorno 3. Il monitoraggio di 3 giorni è stato completato prima di espandere la coorte 2 e prima di iniziare la somministrazione nella coorte 3 o 4.

Se la dose di pertuzumab SC è stata ritenuta sicura e tollerata nel primo volontario sano nella coorte 2, i successivi volontari sani sono stati trattati in parallelo nelle coorti 2, 3 e 4 senza l'aggiunta del periodo di tempo da osservare di 3 giorni.

Allo stesso modo, 3 volontari sani nella coorte 6 sono stati trattati con pertuzumab e trastuzumab SC e strettamente monitorati per la sicurezza e la tollerabilità per 3 giorni post-dose, prima di espandere la coorte 6 e prima di iniziare la somministrazione nella coorte 7 o 8.

Se la dose di pertuzumab e trastuzumab SC è stata ritenuta sicura e tollerata nei primi 3 volontari sani della coorte 6, i successivi volontari sani saranno trattati in parallelo nella coorte 6 senza l'aggiunta del periodo di tempo da osservare di 3 giorni.

Le coorti 7 e 8 sono state aperte contemporaneamente. Tre HMV sono stati trattati con pertuzumab e trastuzumab SC e attentamente monitorati per sicurezza e tollerabilità per 3 giorni post-dose, prima di espandere le rispettive coorti.

Se la dose di pertuzumab e trastuzumab SC è stata ritenuta sicura e tollerata nei primi 3 volontari sani nelle coorti 7 e 8, i successivi volontari sani saranno trattati in parallelo in quelle coorti senza l'aggiunta del periodo di tempo da osservare di 3 giorni.

I volontari sani nelle coorti 1 e 5 possono essere ricevere somministrazioni in parallelo e possono essere arruolati prima del primo volontario sano nella coorte 2.

Selezione della dose per la Parte 2

La selezione delle dosi di pertuzumab SC nella Parte 1 (coorti 2, 3 e 4) si basa sul modello di farmacocinetica di popolazione (popPK) di pertuzumab EV con i valori dei parametri di PK di trastuzumab SC incorporati. Una volta che la quantità sufficiente di dati nella Parte 1 consente la stima di parametri di PK fissi (vale a dire, C_{trough} , AUC_{0-inf}, concentrazione sierica massima [C_{max}], tempo di concentrazione

sierica massima [T_{max}]), verrà scelta la(e) dose(i) (di mantenimento) di pertuzumab SC per la Parte 2. Questa dose SC sarà calcolata per fornire un'esposizione a pertuzumab simile a quella di pertuzumab EV a 420 mg. Allo stesso modo, sulla base di parametri di PK, verrà calcolata una dose (di carico) SC di pertuzumab per fornire un'esposizione a pertuzumab simile a quella di pertuzumab EV a 840 mg. Il modello popPK di pertuzumab EV verrà aggiornato con i parametri di pertuzumab SC utilizzando i dati della Parte 1 e sarà utilizzato per identificare correttamente le dosi di carico e di mantenimento SC.

La dose di trastuzumab SC da 600 mg è stata determinata nello studio di fase Ib BP22023 di determinazione della dose e confermata nello studio di fase III HannaH.

È possibile aprire ulteriori coorti per la determinazione della dose se le dosi delle coorti pianificate si traducono in un'esposizione a pertuzumab diversa dalla concentrazione desiderata o se la variabilità nella farmacocinetica è troppo alta per determinare una dose per la Parte 2 dello studio.

Utilizzando i dati della Parte 1, una dose di pertuzumab SC è stata calcolata per fornire un'esposizione a pertuzumab simile a quella di pertuzumab EV a 420 mg (dose di mantenimento) e 840 mg (dosi di carico). La concentrazione selezionata di rHuPH20 per la somministrazione co-miscelata di pertuzumab e trastuzumab nella coorte B si basa sulla comparabilità della sicurezza e dell'esposizione a pertuzumab nelle coorti 7 e 8.

Parte 2 (conferma della dose)

Sono state arruolate nella Parte 2 donne con EBC che hanno completato la terapia standard (neo) adiuvante contro il cancro al seno.

Se la fattibilità di un prodotto FDC è confermata, solo le coorti B e C (non la coorte A; co-somministrazione) possono essere arruolate nella Parte 2. Ciò consentirebbe la conferma della dose della Parte 1 e mostrerebbe la comparabilità tra un'iniezione co-miscelata e un prodotto FDC. Se esiste un'interazione farmacocinetica tra pertuzumab e trastuzumab quando co-miscelati o se lo sviluppo della FDC non è fattibile, solo la coorte A può essere arruolata nella Parte 2, il che consentirebbe la conferma della dose della Parte 1. Questo disegno di studio consentirà la selezione di una dose di pertuzumab SC e un'opzione di formulazione per lo studio di fase III, arruolando al contempo il minor numero possibile di pazienti. Lo schema generale per la Parte 2 sarà quindi solo per la coorte A o per la coorte B e per la coorte C (vedere 185H Figura 2). Ogni coorte arruolerà 20 pazienti e ogni paziente riceverà una dose di pertuzumab e trastuzumab.

Ogni coorte ha arruolato 20 pazienti e ogni paziente ha ricevuto una dose di pertuzumab e trastuzumab.

- Coorte A: pertuzumab SC (dose determinata nella Parte 1) con 600 mg di trastuzumab SC; ciascun agente somministrato

Marco Giovanni Mari
USBM-CP-090

separatamente (co-somministrazione)

oppure

- Coorte B: pertuzumab SC (dose determinata nella Parte 1) con 600 mg di trastuzumab SC; entrambi gli agenti somministrati in un'unica iniezione (co-miscelati)

e

- Coorte C: pertuzumab SC (dose determinata nella Parte 1) con 600 mg di trastuzumab SC; entrambi gli agenti formulati insieme e somministrati in un'unica iniezione (FDC)

La dose massima pianificata di pertuzumab SC somministrata nella Parte 1 e nella Parte 2 non supererà i 1200 mg.

Nota: le dosi di pertuzumab e trastuzumab verranno modificate regolando il volume di dosaggio. La concentrazione di pertuzumab e trastuzumab è di 120 mg/ml e di rHuPH20 (quando presente) è di 2000 U/ml nelle soluzioni di dosaggio SC.

Il diagramma decisionale è mostrato in Figura 7.

Se vi era un'interazione farmacocinetica tra pertuzumab e trastuzumab somministrati in un'iniezione co-miscelata, o se lo sviluppo della FDC non era fattibile, solo la coorte A (co-somministrazione) doveva essere arruolata nella Parte 2. Questo disegno di studio ha consentito la selezione di una dose di pertuzumab SC e un'opzione di formulazione per l'ulteriore valutazione nello studio di fase III arruolando al contempo il minor numero possibile di pazienti. Lo schema generale per la Parte 2 era perciò solo la coorte A o la coorte B e la coorte C.

Criteri per continuare o interrompere la somministrazione

I dati di sicurezza, di tollerabilità e di PK saranno valutati continuamente e prima di espandere le coorti o (se necessario) di aggiungere coorti.

Le dosi iniziali saranno 420 mg di pertuzumab EV e 400, 600 e 1200 mg SC.

Per consentire decisioni informate riguardo alla somministrazione a volontari sani nelle coorti SC, i dati rilevanti di sicurezza e di tollerabilità di alcuni soggetti saranno riesaminati dopo 3 giorni prima della somministrazione al soggetto successivo nella coorte o prima di aprire altre coorti.

La decisione di continuare la somministrazione sarà presa congiuntamente dallo sperimentatore e dal medical monitor di Roche e da qualsiasi altra persona che lo sperimentatore o il medical monitor ritenga necessaria per essere d'aiuto in questa decisione.

La dose non sarà ulteriormente somministrata in nessun altro volontario sano o EBC se la tollerabilità o sicurezza in un precedente volontario sano o EBC non è accettabile come giudicato dallo sperimentatore e dal medical monitor. Il dosaggio non deve essere ulteriormente

somministrato in nessun altro volontario sano o EBC se si verifica uno qualsiasi degli eventi elencati di seguito, a meno che non sia ovvio che l'evento non è correlato alla somministrazione del trattamento:

- Severo evento avverso correlato al farmaco
- Reazioni di ipersensibilità secondo gli NCI CTCAE (gradi da 3 a 5)
- Un calo della LVEF di >10% punti o fino a <50% (per HMV)
- Un calo della LVEF di >10% punti e <50% (per EBC)
- Una valutazione ripetuta deve essere eseguita entro 3 settimane dal primo calo documentato e il caso deve essere riesaminato da un cardiologo. Insufficienza cardiaca congestizia di classe II (CHF) o superiore secondo la New York Heart Association (NYHA) deve essere confermata da un cardiologo.

Dovrebbe essere messo in chiaro che queste sono solo linee guida e lo sperimentatore insieme al medical monitor può fare un'eccezione. Tuttavia, quando viene fatta un'eccezione di questo tipo, i motivi di ciò dovrebbero essere chiaramente documentati sul Modulo elettronico di segnalazione del caso (eCRF).

FINE E DURATA DELLO STUDIO

La fine di questo studio è definita come la data in cui si verifica l'ultimo paziente, ultima visita (LPLV). Si prevede che la LPLV si verifichi 7 mesi dopo l'arruolamento dell'ultimo paziente. Ci si aspetta che la durata totale dello studio, dallo screening del primo paziente alla fine dello studio, sia di circa 16-24 mesi. Vi sarà un massimo di 34 settimane per i volontari sani/pazienti dallo screening al follow-up (fino a 4 settimane per il periodo di screening e 30 settimane per la conduzione dello studio e il follow-up).

Per ogni partecipante allo studio (HMV e pazienti con EBC), il periodo di screening è stato fino a 4 settimane e il follow-up è stato eseguito circa 7 mesi dopo la somministrazione del farmaco in studio.

MATERIALI E PROCEDIMENTI

POPOLAZIONE DELLO STUDIO

Parte 1 Criteri di inclusione

Gli HMV devono soddisfare i seguenti criteri per l'ingresso nello studio:

- Modulo di consenso informato firmato
- Soggetti maschi sani, di età compresa tra 18 e 45 anni

- In grado di rispettare il protocollo di studio, a giudizio dello sperimentatore
- LVEF $\geq 55\%$ misurata mediante ecocardiografia (ECHO) o scansione multi-gated (MUGA)
- Un indice di massa corporea (BMI) compreso tra 18 e 32 kg/m² inclusi
- Consenso a rimanere in astinenza (astenersi dal rapporto eterosessuale) o utilizzare misure contraccettive e consenso ad astenersi dal donare sperma, come definito di seguito:
 - Con le partner di sesso femminile potenzialmente fertili, gli uomini devono rimanere in astinenza o usare un preservativo più un metodo contraccettivo aggiuntivo che insieme si traducono in un tasso di fallimento $< 1\%$ all'anno durante il periodo di trattamento e per almeno 7 mesi dopo la somministrazione di pertuzumab e/o trastuzumab. L'affidabilità dell'astinenza sessuale deve essere valutata in relazione alla durata della sperimentazione clinica e allo stile di vita preferito e abituale del paziente. L'astinenza periodica (ad esempio metodi basati su calendario, ovulazione, sintotermici o postovulatori) e il coito interrotto non sono metodi contraccettivi accettabili.
 - Gli uomini devono astenersi dal donare lo sperma durante questo stesso periodo.
 - Con le partner di sesso femminile in gravidanza, gli uomini devono rimanere astinenti o usare il preservativo durante il periodo di trattamento e per almeno 7 mesi dopo la somministrazione di pertuzumab e/o trastuzumab per evitare di esporre l'embrione.
- Nessuna controindicazione dalla storia medica e chirurgica dettagliata e dall'esame obiettivo
- Cute normale intatta senza tatuaggi potenzialmente oscuranti, pigmentazione o lesioni nell'area per l'iniezione prevista nelle cosce.

Parte 1 Criteri di esclusione

- Gli HMV che soddisfano uno qualsiasi dei seguenti criteri saranno esclusi dall'ingresso nello studio:
- Test delle urine per droghe d'abuso positivo secondo lo standard locale
- Risultato positivo al test per virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV) o dell'immunodeficienza umana (HIV) 1 o 2
- Storia di esposizione a HBV, HCV o HIV
- Infezione da epatite virale attiva (epatite B o C) o infezione da HIV
- Pressione sanguigna sistolica (PA) ≥ 140 mmHg o < 90 mmHg, o pressione diastolica > 0 mmHg o < 50 mmHg
- Uso di farmaci o rimedi erboristici proibiti nei 10 giorni precedenti o 5 volte l'emivita di eliminazione (a seconda di quale sia più lunga) prima della somministrazione del farmaco dello studio
- Anomalie clinicamente significative nei risultati dei test di laboratorio (inclusi i pannelli epatici e renali, l'emocromo completo, il

pannello chimico e l'analisi delle urine)

- Anomalie ECG clinicamente rilevanti allo screening o all'ECG basale, inclusi ma non limitati a quanto segue:
- Intervallo QTc (QTcB > 450 msec)
- Notevole tachicardia a riposo (HR > 100 bpm)
- Differenza tra il più alto e il più basso di qualsiasi QTc basale in uno specifico punto temporale > 30 msec
- Misurazione imprecisa dell'intervallo QT (ad esempio, onde T piatte, aritmie ecc.)
- Evidenza di fibrillazione atriale, flutter atriale, blocco di branca destra o sinistra, sindrome di Wolf-Parkinson-White o pacemaker

cardiaco

- Qualsiasi altra anomalia significativa
- Storia di eventuali condizioni cardiache o LVEF < 55 %
- Partecipazione a uno studio sperimentale su un farmaco o dispositivo nei 90 giorni precedenti lo screening
- Donazione di sangue > 500 ml nei 3 mesi precedenti lo screening
- Allergia nota alla ialuronidasi, al veleno d'api o di vespe, o qualsiasi altro componente nella formulazione di rHuPH20 (Hylenex®

ricombinante [iniezione di ialuronidasi in soggetto umano])

- Ipersensibilità nota a uno qualsiasi dei trattamenti dello studio o agli eccipienti di anticorpi umani o umanizzati ricombinanti
- Storia di ipersensibilità o di reazioni allergiche significative, spontanee o a seguito di una eventuale precedente somministrazione di

farmaci

- Evidente storia familiare clinicamente rilevante di ipersensibilità, allergia o malattie cardiache severe
- Edema o patologia degli arti inferiori (ad esempio, cellulite, disturbo linfatico o precedente intervento chirurgico, sindrome dolorosa preesistente, precedente dissezione dei linfonodi ecc.) che potrebbe interferire con qualsiasi valutazione del risultato specificato dal protocollo

- Qualsiasi anamnesi clinicamente rilevante di malattia sistemica (ad esempio, neoplasia maligna, diabete mellito, malattia gastrointestinale, renale, epatica, cardiovascolare, reumatologica o polmonare)

- Storia di cancro al seno, trattamento per cancro al seno o trattamento con antracicline o altri farmaci cardiotossici
- Malattia o condizione attuale che potrebbe interferire con, o per la quale il trattamento potrebbe interferire con, la conduzione dello studio, o che, a parere dello sperimentatore, rappresenterebbe un rischio inaccettabile per il soggetto in questo studio

- Attuale trattamento giornaliero cronico (continuo per > 3 mesi) con corticosteroidi (dose ≥ 10 mg/die di metilprednisolone), esclusi i corticosteroidi per via inalatoria
- Ricezione di antibiotici EV per l'infezione negli ultimi 7 giorni prima dell'arruolamento nello studio.
- Criteri di ingresso nello studio: Parte 2 (pazienti di sesso femminile con cancro al seno in fase iniziale)

Parte 2 Criteri di inclusione

- Le pazienti devono soddisfare i seguenti criteri per l'ingresso nello studio:
- Modulo di consenso informato firmato
- Pazienti di sesso femminile, età ≥ 18 anni
- In grado di rispettare il protocollo di studio, a giudizio dello sperimentatore
- Stato delle prestazioni pari a 0, Eastern Cooperative Oncology Group
- Attuale adenocarcinoma della mammella non metastatico che soddisfa i seguenti criteri:
 - a) Trattate con procedura chirurgica adeguata
 - b) Trattamento antitumorale (neo)adiuvante standard completato (chemioterapia/biologico) >7 mesi prima della somministrazione del farmaco dello studio
 - c) Trattate con radioterapia se applicabile
- LVEF al basale ≥ 55 % misurata mediante ecocardiografia o MUGA
- Test di gravidanza negativo in donne potenzialmente fertili che sono in premenopausa o a meno di 12 mesi di amenorrea postmenopausa, e che non hanno subito una sterilizzazione chirurgica.
- Per le donne potenzialmente fertili: consenso a rimanere astinenti (astenersi da rapporti eterosessuali) o utilizzare metodi contraccettivi non ormonali che si traducono in un tasso di fallimento <1% all'anno durante il periodo di trattamento e per almeno 7 mesi dopo la somministrazione di pertuzumab e trastuzumab

Una donna è considerata potenzialmente fertile se è postmenarca, non ha raggiunto uno stato postmenopausale (≥ 12 mesi consecutivi di amenorrea senza alcuna causa identificata diversa dalla menopausa) e non è stata sottoposta a sterilizzazione chirurgica (rimozione delle ovaie e/o dell'utero).

Esempi di metodi contraccettivi con un tasso di fallimento <1% all'anno includono la legatura bilaterale delle tube, la sterilizzazione maschile

e i dispositivi intrauterini in rame (IUD).

- L'affidabilità dell'astinenza sessuale deve essere valutata in relazione alla durata della sperimentazione clinica e allo stile di vita preferito e abituale del paziente. L'astinenza periodica (ad esempio metodi basati su calendario, ovulazione, sintotermici o postovulatori) e il coito interrotto non sono metodi accettabili.

Parte 2 Criteri di esclusione

- Le pazienti che soddisfano uno qualsiasi dei seguenti criteri saranno escluse dall'ingresso nello studio:
- Altre neoplasie maligne concomitanti che richiedono una terapia di qualsiasi modalità che possa interferire con le indagini farmacocinetiche o provocare tossicità inattesa
- Dose cumulativa massima di doxorubicina > 360 mg/m² o dose cumulativa massima di epirubicina > 720 mg/m² o eventuali precedenti antracicline non correlate al cancro al seno attuale
- Grave malattia concomitante incontrollata che potrebbe controindicare l'uso di uno qualsiasi dei farmaci sperimentali utilizzati in questo studio o che metterebbe la paziente ad alto rischio di complicanze correlate al trattamento.
- Anamnesi di altre neoplasie maligne nei 5 anni precedenti lo screening, ad eccezione del carcinoma in situ della cervice adeguatamente trattato, del carcinoma cutaneo non melanoma o del carcinoma uterino in stadio I
- Pazienti che attualmente partecipano ad altri studi su agenti sperimentali salvo autorizzazione da parte dello sperimentatore e dello sponsor
- Gravi malattie cardiache o condizioni mediche
- Qualsiasi condizione precedente o concomitante che suggerisca suscettibilità all'ipersensibilità o a reazioni allergiche. Le pazienti con allergie lievi o stagionali possono essere incluse dopo la discussione tra lo sperimentatore e lo sponsor.
- Severe reazioni correlate all'infusione (IRR) verificatesi durante una qualsiasi precedente terapia con pertuzumab o trastuzumab
- Nota allergia alla ialuronidasi, al veleno d'api o di vespe, o a qualsiasi altro componente nella formulazione di Hylenex®
- Uno qualsiasi dei seguenti test di laboratorio anormali il Giorno -1 prima del trattamento con trastuzumab: Bilirubina totale sierica >1,25 x limite superiore della norma (ULN; ad eccezione della sindrome di Gilbert)
Alanina aminotransferasi (ALT) o aspartato aminotransferasi (AST) >1,25 x ULN;
Albumina <25 g/L

Fosfatasi alcalina (ALP) >2,5 x ULN

Creatinina sierica >1,5 x ULN

Conta totale dei globuli bianchi (WBC) <2500 cellule/mm³

Conta assoluta dei neutrofilici <1500 cellule/mm³

Piastrine <100.000 cellule/mm³

- Donne in gravidanza o in allattamento, o donne che intendono rimanere incinte durante lo studio
- Donne potenzialmente fertili o di meno di 1 anno dopo la menopausa (a meno che non siano chirurgicamente sterili) che non sono in grado o non vogliono utilizzare misure contraccettive adeguate durante il trattamento dello studio e per 7 mesi dopo la somministrazione del farmaco dello studio
- Tossicità residua risultante da una precedente terapia (ad esempio, ematologica, cardiovascolare o neurologica di grado ≥ 2). L'alopecia è consentita.
- Ipertensione non controllata (BP sistolica > 150 mmHg e/o BP diastolica > 100 mmHg)
- Malattia cardiovascolare clinicamente significativa (vale a dire attiva), inclusi ma non limitati a accidente cerebrovascolare/ictus o infarto miocardico nei 6 mesi precedenti il primo trattamento dello studio; angina instabile; CHF di NYHA di grado II o superiore; aritmia cardiaca grave che richiede farmaci; o altro problema cardiovascolare che è non controllato o che è attualmente controllato con farmaci
- Risultato positivo al test HBV, HCV o HIV 1 o 2
- Storia di esposizione a HBV, HCV o HIV
- Infezione da epatite virale attiva (epatite B o C) o infezione da HIV
- Assunzione di antibiotici EV per l'infezione nei 7 giorni precedenti l'arruolamento nello studio
- Attuale trattamento giornaliero cronico (continuo per > 3 mesi) con corticosteroidi (dose equivalente o superiore a 10 mg/die di metilprednisolone), esclusi gli steroidi per via inalatoria
- Ipersensibilità nota a uno qualsiasi dei trattamenti dello studio o a eccipienti di anticorpi umani o umanizzati ricombinanti.

PROCEDIMENTO DI ASSEGNAZIONE DEL TRATTAMENTO

Volontari sani e pazienti saranno identificati per il potenziale reclutamento utilizzando registri di arruolamento pre-screening, annunci pubblicitari su giornali/radio approvati dal Comitato di revisione istituzionale (IRB)/Comitato etico (CE) e mailing list prima di acconsentire

Marco Giovanni Mari
USBM-SPF090

a partecipare allo studio.

Parte 1 (volontari sani)

Inizialmente verranno reclutati circa 48 volontari sani per la Parte 1. I numeri dei pazienti verranno assegnati in sequenza nell'ordine in cui sono state arruolate. Se necessario, possono essere aperte ulteriori coorti per la determinazione della dose.

Parte 2 (pazienti con EBC)

Saranno reclutate circa 40 pazienti con EBC per la Parte 2. I numeri delle pazienti verranno assegnati in sequenza nell'ordine in cui sono state arruolate.

TRATTAMENTO DELLO STUDIO

I prodotti medicinali sperimentali (IMP) per questo studio sono pertuzumab e trastuzumab.

Formulazione, confezionamento e manipolazione

La confezione del farmaco dello studio sarà supervisionata dal reparto forniture per studi clinici di Roche e recherà un'etichetta con l'identificazione richiesta dalla legge locale, il numero di protocollo e l'identificazione e il dosaggio del farmaco. La confezione e l'etichettatura del farmaco dello studio saranno conformi agli standard Roche e alle normative locali. All'arrivo degli IMP presso il sito, il personale del sito deve controllarli per eventuali danni e verificare la corretta identità, quantità, integrità dei sigilli e le condizioni di temperatura, e segnalare al monitor eventuali deviazioni o reclami sul prodotto al momento della scoperta. La persona qualificata responsabile della dispensazione del farmaco dello studio preparerà la dose corretta secondo il programma. Questa persona scriverà la data di dispensazione, la data di somministrazione e il numero e le iniziali del paziente, a seconda dei casi, sull'etichetta della fiala del farmaco dello studio e/o sul Registro di contabilità del farmaco. Questa persona registrerà anche il lotto del farmaco dello studio o il numero di lotto ricevuto da ciascun paziente durante lo studio.

Pertuzumab

Sono state utilizzate tre formulazioni di pertuzumab:

La Formulazione I di pertuzumab è un concentrato sterile, da incolore a leggermente brunoastro per soluzione per infusione fornito come formulazione EV monouso contenente 30 mg/ml di pertuzumab in tampone di L-Istidina acetato contenente gli eccipienti saccarosio e polisorbato 20. Ogni fiala da 20 ml contiene 420 mg di pertuzumab (14,0 ml/fiala).

La Formulazione 2 di pertuzumab è una soluzione per iniezione sterile, da incolore a leggermente brunoastro fornita come formulazione SC

monouso contenente 120 mg/ml di pertuzumab in tampone di L-istidina acetato contenente gli eccipienti saccarosio, polisorbato 20, metionina e rHuPh20 (2000 U/ml). Ogni fiala da 10 ml contiene 600 mg di pertuzumab (5,0 ml/fiala).

La Formulazione di pertuzumab 3 è una soluzione per iniezione sterile, da incolore a leggermente brunastra fornita come formulazione SC monouso contenente 120 mg/ml di pertuzumab in tampone di L-Istidina acetato contenente gli eccipienti saccarosio, polisorbato 20 e metionina. Ogni fiala da 10 ml contiene 600 mg di pertuzumab (5,0 ml/fiala).

Nessun conservante viene utilizzato con pertuzumab poiché le fiale sono esclusivamente monouso. Le condizioni di conservazione consigliate per il prodotto farmaceutico sono comprese tra 2°C e 8°C, al riparo dalla luce. Il prodotto farmaceutico non deve essere congelato.

Trastuzumab

La formulazione di trastuzumab è una soluzione per iniezione concentrata sterile, da incolore a leggermente brunastra, contenente 120 mg/ml di trastuzumab in tampone di L-Istidina/Istidina-HCl contenente gli eccipienti trealosio, polisorbato 20, metionina e rHuPh20 (2000 U/ml). Ogni fiala da 5 ml contiene 600 mg di RO0452317 (5,0 ml/fiala).

Nessun conservante viene utilizzato con trastuzumab poiché le fiale sono esclusivamente monouso. Le condizioni di conservazione consigliate per il prodotto farmaceutico sono comprese tra 2°C e 8°C, al riparo dalla luce. Il prodotto farmaceutico non deve essere congelato.

Dosaggio, somministrazione e compliance

Pertuzumab e trastuzumab SC

La persona qualificata responsabile della dispensazione del farmaco dello studio preparerà la dose corretta. Questa persona scriverà la data di dispensazione e il numero e le iniziali del soggetto sull'etichetta della fiala del farmaco dello studio e sul Registro di contabilità del farmaco. Questa persona registrerà anche il lotto del farmaco dello studio o il numero di lotto ricevuto da ciascun soggetto durante lo studio.

Gli HMV riceveranno una singola dose di pertuzumab EV, pertuzumab SC, trastuzumab SC o pertuzumab SC e trastuzumab SC miscelati insieme (co-miscelati). I pazienti riceveranno una singola dose di pertuzumab e trastuzumab come due iniezioni di agente singolo (co-somministrazione) oppure un'unica iniezione di pertuzumab e trastuzumab miscelati insieme (co-miscelati) oppure pertuzumab co-formulato con trastuzumab come un'unica iniezione FDC.

A volontari e pazienti sani può anche essere somministrato un pre-farmaco (ad esempio, acetaminofene [paracetamolo] e/o prometazina), prima della somministrazione di pertuzumab e/o trastuzumab SC, a discrezione dello sperimentatore per ridurre il rischio di reazioni correlate all'infusione o all'iniezione.

Ogni eventuale sovradosaggio o somministrazione errata del farmaco in studio deve essere annotato sull'eCRF della Somministrazione del farmaco dello studio. Gli eventi avversi associati a un sovradosaggio o a una somministrazione errata del farmaco dello studio devono essere registrati nell'eCRF degli Eventi avversi.

Somministrato (pertuzumab EV)

Ai volontari sani che ricevevano pertuzumab EV (coorte 1 - controllo) è stata somministrata una dose di 420 mg.

La dose di pertuzumab è stata somministrata in 60 (\pm 10) minuti, e i volontari sani sono stati osservati per altri 60 minuti. L'infusione deve essere rallentata o interrotta se il paziente manifesta sintomi correlati all'infusione.

Dosi somministrate (pertuzumab SC e trastuzumab SC)

Ai volontari sani e ai pazienti che ricevevano pertuzumab SC (coorti 2-8, A e B) sono state somministrate dosi comprese tra 400 e 1200 mg.

Ai volontari sani e ai pazienti che ricevevano trastuzumab SC (coorti 5-8, A e B) è stata somministrata una dose di 600 mg (vedere la Tabella 3).

Tabella 3-Dosi e coorti

Coorte	Agente	Dose (mg)	Volume di iniezione (ml)
HMV			
1	pertuzumab EV	420	
2	pertuzumab SC	400	3,3
3	pertuzumab SC	600	5
4	pertuzumab SC	1.200	10
5	trastuzumab SC	600	5
6	pertuzumab SC + trastuzumab SC (co-miscelati)	400 + 600	8,3
7	pertuzumab SC + trastuzumab SC (co-miscelati)	1200 + 600	15
8	pertuzumab SC ^a + trastuzumab SC (co-miscelati)	1200 + 600	15

Marco Giovanni Mari

 USBM-SPF090

9 ^b	pertuzumab EV/SC +/- trastuzumab SC	X +/- 600	X
Pazienti			
A	pertuzumab SC + trastuzumab SC (co-somm)	TBD + 600	TBD
B	pertuzumab SC + trastuzumab SC (co-miscelati)	TBD + 600	TBD
C	<i>pertuzumab SC + trastuzumab SC</i> (FDC)	<i>TBD + 600</i>	<i>TBD</i>

FDC = combinazione a dose fissa; HMV = volontario maschio sano; EV = endovenoso; rHuPH20 = ialuronidasi umana ricombinante; SC = sottocutaneo; TBD = da determinare.

^a Concentrazione di rHuPH20 = solo 667 U/ml

^b Se è necessaria una coorte aggiuntiva

Le iniezioni SC sono state somministrate nella regione anteriore della coscia. I pazienti nella coorte A riceveranno le due iniezioni di co-somministrazione nelle cosce opposte, con la seconda iniezione somministrata immediatamente dopo la prima.

La quantità appropriata di soluzione deve essere prelevata dalle fiale. Fare riferimento al manuale di farmacia per le istruzioni.

L'ago per iniezione di calibro 27 viene inserito utilizzando una tecnica sterile nel tessuto SC della coscia. L'ago deve essere completamente inserito, facendo attenzione che la punta dell'ago sia più in profondità del derma ma non così in profondità come il muscolo sottostante.

L'obiettivo dell'angolo di posizionamento e della profondità dell'ago è ottenere un posizionamento uniforme nel tessuto SC di ogni paziente.

Il farmaco dello studio non deve essere iniettato all'interno di nei, cicatrici o contusioni. Pizzicare la cute e inserire l'ago prima di rilasciare la pelle e poter applicare pressione sulla siringa.

L'iniezione deve essere eseguita manualmente a una velocità di flusso non superiore a 2 ml/min, pertanto la somministrazione dovrebbe richiedere circa 2-8 minuti a seconda della dose somministrata. Se c'è una richiesta da parte del soggetto di interrompere l'iniezione, si dovrebbe inizialmente allentare la pressione sulla siringa per alleviare il dolore. Se il dolore non viene alleviato, l'iniezione deve essere interrotta e si deve chiedere al soggetto quando si senta a suo agio per riprendere l'iniezione.

Tempistica in relazione a pasti, attività fisiche e procedure

I pasti erano simili per composizione e tempo di somministrazione in tutte le coorti. Il consumo di cibi e bevande contenenti caffeina (ad esempio tè, caffè, cioccolato e bevande analcoliche) o alcolici non sarà consentito dal giorno -1 al giorno 2. L'uso del tabacco non è consentito durante la parte in clinica dello studio.

Saranno consentite attività deambulatorie leggere, mantenendo il livello di attività il più simile possibile per tutti i giorni nell'unità di ricerca clinica.

TERAPIA CONCOMITANTE, ALIMENTI PROIBITI E RESTRIZIONI AGGIUNTIVE

La terapia concomitante comprende qualsiasi farmaco (ad esempio, farmaci da prescrizione, farmaci da banco, vaccini, rimedi erboristici od omeopatici, integratori alimentari) utilizzati da un volontario sano/paziente entro 30 giorni dallo screening dello studio. Tutti questi farmaci devono essere segnalati allo sperimentatore e registrati nell'eCRF per i Farmaci concomitanti.

Terapia consentita

Per i volontari sani, non sarà consentita alcuna terapia concomitante, ad eccezione dei farmaci per il trattamento di eventi avversi, a meno che il motivo dell'eccezione non sia discusso tra lo sperimentatore e il medical monitor e chiaramente documentato.

Per le pazienti con EBC, durante lo studio sono consentiti i seguenti trattamenti:

Devono essere utilizzati procedimenti contraccettivi accettabili quando la paziente o il partner maschile non è sterilizzato chirurgicamente o non soddisfa la definizione di post menopausa dello studio (≥ 12 mesi di amenorrea)

H₁ e H₂ antagonisti (ad esempio difenidramina, cimetidina)

Farmaci cardiovascolari: inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), bloccanti il recettore dell'angiotensina, β -bloccanti, calcio-antagonisti e diuretici (per il trattamento dell'ipertensione arteriosa con l'obiettivo di ridurre la pressione sanguigna a $<140/90$ mmHg), β -bloccanti, calcio antagonisti e digossina (per il controllo della frequenza cardiaca), e inibitori dell'aggregazione dei trombociti

Analgesici/antinfiammatori (ad esempio paracetamolo/acetaminofene, meperidina, oppioidi)

Uso a breve termine di corticosteroidi per trattare o prevenire reazioni allergiche o di infusione

Antiemetici (antagonisti della serotonina profilattici approvati, benzodiazepine, antagonisti della dopamina ecc.)

Farmaci per il trattamento della diarrea (ad esempio loperamide)

Antagonisti dei recettori degli estrogeni (ad esempio, tamoxifene), inibitori dell'aromatasi (ad esempio, anastrozolo, exemestano) e agonisti

dell'ormone di rilascio dell'ormone gonadotropina (ad esempio, busserelina, triptorelina) dopo intervento chirurgico, come da prassi e linee guida locali

Soppressione dell'ovulazione (analogo dell'ormone di rilascio dell'ormone luteinizzante [LHRH])

Bifosfonati (da utilizzare in conformità con l'indicazione approvata in etichetta e/o le linee guida per il trattamento riconosciute a livello nazionale)

A discrezione dello sperimentatore, ai volontari sani e ai pazienti può essere somministrato anche un pre-farmaco (ad esempio, acetaminofene [paracetamolo] e/o prometazina) prima della somministrazione di pertuzumab e/o trastuzumab SC per ridurre il rischio di IRR o reazioni correlate all'iniezione.

Terapia vietata

L'uso delle seguenti terapie è vietato durante lo studio e per almeno 10 giorni prima dell'inizio del trattamento dello studio:

- Terapie antitumorali diverse da quelle somministrate in questo studio o elencate nelle terapie consentite sopra, tra cui chemioterapia citotossica, radioterapia, immunoterapia e terapia biologica antitumorale
- Qualsiasi terapia mirata, diversa da quelle utilizzate in questo studio
- Qualsiasi agente sperimentale, ad eccezione di quelli utilizzati per questo studio
- Rimedi erboristici: L'assunzione di rimedi erboristici prima dell'ingresso nello studio e continuazione durante lo studio non è ammessa e deve essere riportata sull'eCRF appropriato.
- Qualsiasi metodo di contraccezione ormonale attivo per via sistemica, orale, iniettato, o impiantato, ad eccezione degli IUD rivestiti di progesterone che erano stati precedentemente impiantati
- Terapia sostitutiva con estrogeni (terapia ormonale sostitutiva)
- Non sono consentiti medicinali soggetti a prescrizione, farmaci da banco o rimedi erboristici per almeno 10 giorni prima della dose del farmaco dello studio, fino alla fine dello studio, a meno che ciò non sia stato autorizzato dal medico dello studio.

Cibo proibito

Il consumo di cibi e bevande contenenti caffeina (ad esempio tè, caffè, cioccolato e bevande analcoliche) o alcolici non sarà consentito dal giorno -1 al giorno 2.

Restrizioni aggiuntive

I pasti saranno simili per composizione e tempo di somministrazione in tutte le coorti. L'uso del tabacco non è consentito durante la parte in clinica dello studio. Saranno consentite attività deambulatorie leggere, mantenendo il livello di attività il più simile possibile per tutti i giorni nell'unità di ricerca clinica.

VALUTAZIONI DELLO STUDIO

Parte 1 (volontari maschi sani)

I volontari sani si presenteranno all'unità il giorno -1 per le valutazioni pre-dose e rimarranno durante la notte (per 3 notti) presso l'unità. I volontari sani possono essere dimessi la mattina del giorno 2 a discrezione dello sperimentatore e tornare in clinica il giorno 3.

Il giorno 1, ai volontari sani verrà somministrato pertuzumab mediante infusione EV o iniezione SC di pertuzumab, trastuzumab SC, o pertuzumab e trastuzumab SC (co-miscelati) nella regione anteriore della coscia. I siti di iniezione verranno fotografati digitalmente dopo un'iniezione sottocutanea se si osserva una reazione avversa severa nel sito di iniezione.

Le valutazioni di sicurezza e di farmacocinetica saranno eseguite a intervalli regolari durante lo studio secondo il programma delle valutazioni.

I volontari sani rimarranno nell'unità fino al completamento della valutazione farmacocinetica di 48 ore. Torneranno per valutazioni di PK e di sicurezza in specifici giorni successivi.

Verrà eseguita una visita di follow-up 7 mesi dopo la somministrazione del farmaco dello studio. I volontari sani saranno dimessi dallo studio da un medico responsabile al termine della visita di follow-up.

Parte 2 (pazienti di sesso femminile con EBC)

Le pazienti si presenteranno all'unità il giorno -1 per le valutazioni pre-dose. Le pazienti torneranno all'unità il giorno 1 e riceveranno pertuzumab e trastuzumab come iniezione SC nella regione anteriore della coscia. Le pazienti della coorte A riceveranno le 2 iniezioni nelle cosce opposte, con la seconda iniezione somministrata immediatamente dopo la prima. I siti di iniezione verranno fotografati digitalmente dopo un'iniezione SC se si osserva una reazione avversa severa nel sito di iniezione.

Le valutazioni di sicurezza e di PK verranno eseguite a intervalli regolari durante lo studio secondo il programma delle valutazioni. Le pazienti rimarranno nell'unità fino a 12 ore post-dose. Torneranno per valutazioni farmacocinetiche e di sicurezza in specifici giorni successivi.

Verrà eseguita una visita di follow-up 7 mesi dopo la somministrazione del farmaco dello studio. Le pazienti saranno dimesse dallo studio da un medico responsabile al termine della visita di follow-up.

Visita di follow-up

Per gli HMV o le pazienti con EBC con eventi avversi cardiaci in corso (indipendentemente dalla causa) o eventi avversi correlati al trattamento dello studio, eventi avversi gravi o eventi di particolare interesse il giorno 85 o eventi avversi, eventi avversi gravi o eventi di particolare interesse che si verificano tra il giorno 85 e la visita di follow-up, verranno eseguite tutte le valutazioni alla visita di follow-up e verranno prelevati campioni PK/ATA.

Per gli HMV senza eventi avversi cardiaci (indipendentemente dalla causa) o eventi avversi correlati al trattamento dello studio, eventi avversi gravi o eventi avversi di particolare interesse in corso il giorno 85 e nessuno che si è verificato tra il giorno 85 e la visita di follow-up, è richiesto solo il follow-up della gravidanza delle partner femminili. Questa visita può essere eseguita tramite telefonata.

Per le pazienti con EBC senza eventi avversi cardiaci (indipendentemente dalla causa) o eventi avversi correlati al trattamento dello studio, eventi avversi gravi ed eventi avversi di particolare interesse in corso il giorno 85 e nessuno verificatosi tra il giorno 85 e la visita di follow-up, in questa visita è richiesto solo il test di gravidanza (per le pazienti potenzialmente fertili).

Per le pazienti con EBC in postmenopausa (≥ 12 mesi di amenorrea) senza eventi avversi cardiaci (indipendentemente dalla causa) o eventi avversi correlati al trattamento dello studio, eventi avversi gravi ed eventi avversi di particolare interesse in corso il giorno 85 e nessuno verificatosi tra il giorno 85 e la visita di follow-up, la visita di follow-up può essere eseguita tramite telefonata.

PARAMETRI DI SICUREZZA ED EVENTI AVVERSI

Le valutazioni di sicurezza consisteranno nel monitoraggio e nella registrazione di eventi avversi, inclusi eventi avversi gravi ed eventi avversi di particolare interesse, l'esecuzione di valutazioni di laboratorio sulla sicurezza specificate dal protocollo, la misurazione dei segni vitali specificati dal protocollo e la conduzione di altri test specificati dal protocollo che sono ritenuti critici per la valutazione della sicurezza dello studio.

Eventi avversi

Secondo le Linee guida per la buona pratica clinica, un evento avverso è un qualsiasi accadimento medico impreveduto in un soggetto sottoposto a indagine clinica a cui è stato somministrato un prodotto farmaceutico, indipendentemente dall'attribuzione causale. Un evento avverso può quindi essere uno qualsiasi dei seguenti:

- Qualsiasi segno sfavorevole e non intenzionale (incluso un risultato di laboratorio anomalo), sintomi o malattia temporaneamente associato all'uso di un prodotto medicinale, considerato correlato o meno al prodotto medicinale.
- Qualsiasi nuova malattia o esacerbazione di una malattia esistente (un peggioramento del carattere, della frequenza o della gravità di

una condizione nota).

- Ricorrenza di una condizione medica intermittente (ad esempio, mal di testa) non presente al basale.
- Qualsiasi deterioramento di un valore di laboratorio o di un altro test clinico (ad esempio, ECG, raggi X) che è associato a sintomi o porta a un cambiamento del trattamento dello studio o del trattamento concomitante o alla sospensione del farmaco dello studio.
- Eventi avversi correlati a un intervento richiesto dal protocollo, inclusi quelli che si verificano prima dell'assegnazione del trattamento dello studio (ad esempio, procedure invasive di screening, come le biopsie).

Eventi avversi gravi (segnalabili immediatamente allo sponsor)

Un evento avverso grave è un qualsiasi evento avverso che soddisfa uno qualunque dei seguenti criteri:

- È fatale (vale a dire che l'evento avverso effettivamente causa il decesso o vi porta)
- Può essere fatale (vale a dire, l'evento avverso, secondo lo sperimentatore, pone il paziente a rischio di decesso immediato). Ciò non include alcun evento avverso che se si fosse verificato in una forma più severa o se fosse stato autorizzato a continuare potrebbe aver causato il decesso.
- Richiede o prolunga il ricovero ospedaliero.
- Risulta in una disabilità/incapacità persistente o significativa (vale a dire, l'evento avverso si traduce in una sostanziale interruzione della capacità del paziente di condurre le normali funzioni connesse alla vita).
- È un'anomalia/un difetto congenito in un neonato/bambino molto piccolo nato da una madre esposta al farmaco dello studio.
- È un evento medico significativo a giudizio dello sperimentatore (ad esempio, può esporre a rischi il paziente o può richiedere un intervento medico/chirurgico per prevenire uno degli esiti sopra elencati).

I termini "severo" e "grave" non sono sinonimi. La severità si riferisce all'intensità di un evento avverso (ad esempio, classificato come lieve, moderato o severo, o secondo NCI CTCAE v4.03; l'evento stesso può avere un significato medico relativamente minore (come un forte mal di testa senza ulteriori riscontri).

Tabella 4

Scala di classificazione della severità degli eventi avversi per eventi non specificatamente elencati in NCI CTCAE

Grado	Severità
1	Lieve; asintomatico o sintomi lievi; solo osservazioni cliniche o diagnostiche; o intervento non indicato

2	Moderato; intervento minimo, locale o non invasivo indicato; o limitante le attività strumentali della vita quotidiana adeguate all'età ^a
3	Severo o medicamente significativo, ma non immediatamente pericoloso per la vita; indicato il ricovero o il prolungamento del ricovero; disabilitante; o limitante le attività di cura di sé nella vita quotidiana ^{b,c}
4	Conseguenze pericolose per la vita o indicato un intervento urgente ^d
5	Decesso correlato a un evento avverso ^d

NCI CTCAE = Criteri comuni di terminologia per gli eventi avversi del National Cancer Institute.

Nota: sulla base della versione più recente di NCI CTCAE (v4.03), disponibile all'indirizzo:

http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm

^a Le attività strumentali della vita quotidiana si riferiscono alla preparazione dei pasti, all'acquisto di alimenti o di indumenti, all'uso del telefono, alla gestione del denaro ecc.

^b Esempi di attività di cura di sé nella vita quotidiana includono fare il bagno, vestirsi e svestirsi, nutrirsi, usare il bagno e assumere farmaci, eseguiti da pazienti che non sono costretti a letto.

^c Se un evento è valutato come "evento medico significativo", deve essere segnalato come evento avverso grave, secondo la definizione di evento avverso grave.

^d Gli eventi di grado 4 e 5 devono essere segnalati come eventi avversi gravi, secondo la definizione di evento avverso grave.

Eventi avversi di particolare interesse (segnalabili immediatamente allo sponsor)

Gli eventi avversi di particolare interesse devono essere segnalati dallo sperimentatore allo sponsor immediatamente (vale a dire, non più di 24 ore dopo aver appreso dell'evento). Gli eventi avversi di particolare interesse per questo studio includono quanto segue:

- Casi di potenziale danno epatico indotto da farmaci che includono livelli elevati di ALT o AST in combinazione con bilirubina elevata o ittero clinico, come definito dalla legge di Hy.

- Sospetta trasmissione di un agente infettivo da parte del farmaco dello studio, come definito: Qualsiasi organismo, virus o particella infettiva (ad esempio, la proteina prionica che trasmette l'encefalopatia spongiforme trasmissibile), patogeno o non patogeno, è considerato un agente infettivo. La trasmissione di un agente infettivo può essere sospettata da sintomi clinici o risultati di laboratorio che indicano un'infezione in un paziente esposto a un medicinale. Questo termine si applica solo quando si sospetta una contaminazione del farmaco dello studio.
- Un declino asintomatico della LVEF che richiede un trattamento. Nota: in generale, i declini asintomatici della LVEF non dovrebbero essere segnalati come eventi avversi poiché i dati della LVEF sono raccolti separatamente nell'eCRF. Le eccezioni a questa regola sono le seguenti:
 - Un declino asintomatico della LVEF fino a un valore di 10 punti percentuali al di sotto del basale o inferiore e <50% deve essere segnalato come evento avverso.
 - Un declino asintomatico della LVEF che richiede un trattamento o che porta alla sospensione del trattamento dello studio deve essere segnalato in modo accelerato *utilizzando l'eCRF* per gli Eventi avversi e classificando l'evento come un evento non grave di particolare interesse immediatamente segnalabile.

Eventi avversi selezionati

Insufficienza cardiaca

La LVSD sintomatica (indicata come insufficienza cardiaca) deve essere segnalata come un evento avverso grave. Se la diagnosi è insufficienza cardiaca, deve essere segnalata come tale e non come segni e sintomi individuali di insufficienza cardiaca. Nell'eCRF devono essere registrati i segni e i sintomi. Un consulto cardiaco è raccomandato per i pazienti che sviluppano LVSD sintomatica (insufficienza cardiaca). L'insufficienza cardiaca deve essere classificata secondo NCI CTCAE v4.03 (grado 2, 3, 4 o 5), nonché secondo la classificazione NYHA (classe II, III e IV). La disfunzione sistolica ventricolare sinistra non deve essere utilizzata per descrivere la disfunzione sintomatica, come da NCI CTCAE v4.03.

L'insufficienza cardiaca verificatasi durante lo studio e fino a 5 anni dopo l'ultimo paziente arruolato deve essere segnalata indipendentemente dalla relazione causale e seguita fino a quando non si verifica una delle seguenti condizioni: risoluzione o miglioramento fino allo stato basale, non può essere previsto nessun ulteriore miglioramento, o il decesso.

Declino asintomatico della frazione di eiezione ventricolare sinistra

Marco Giovanni Mari
 USBM-SPF090

I declini asintomatici della LVEF non devono essere segnalati come eventi avversi perché i dati della LVEF vengono raccolti separatamente nell'eCRF. Le eccezioni a questa regola sono le seguenti:

- Una riduzione asintomatica della LVEF di ≥ 10 punti percentuali dal basale a una LVEF $<50\%$ deve essere segnalata come evento avverso con il termine della frazione di eiezione diminuita, come da NCI CTCAE v4.03. Inoltre, un commento nel campo dei commenti sugli eventi avversi dovrebbe confermare che l'evento era asintomatico.
- Deve anche essere segnalato un declino asintomatico della LVEF che richiede un trattamento o che porta alla sospensione di pertuzumab e trastuzumab. Questo evento avverso dovrebbe anche essere registrato come evento non grave di particolare interesse nel modulo degli eventi avversi gravi, e un commento dovrebbe essere aggiunto al campo dei commenti sugli eventi avversi, a conferma che l'evento era asintomatico.

La Tabella 5 mostra la Classificazione della New York Heart Association e i Criteri comuni di terminologia per gli eventi avversi relativi alla disfunzione sistolica ventricolare sinistra secondo il National Cancer Institute, versione 4.03.

Tabella 5

Classe I	Pazienti con cardiopatia ma senza conseguenti limitazioni dell'attività fisica. L'attività fisica ordinaria non causa eccessiva stanchezza, palpitazioni, dispnea o dolore anginoso.
Classe II	Pazienti con cardiopatia che comporta lievi limitazioni dell'attività fisica. Stanno bene a riposo. L'attività fisica ordinaria provoca affaticamento, palpitazioni, dispnea o dolore anginoso.
Classe III	Pazienti con cardiopatia che comporta marcate limitazioni dell'attività fisica. Stanno bene a riposo. Un'attività fisica inferiore all'ordinario provoca affaticamento, palpitazioni, dispnea o dolore anginoso.
Classe IV	Pazienti con cardiopatia che comporta incapacità di svolgere qualsiasi attività fisica senza disagio. I sintomi dell'insufficienza cardiaca o della sindrome dell'angina possono essere presenti anche a riposo. Se viene intrapresa un'attività fisica qualsiasi, il disagio aumenta.

Weatherall DJ, Ledingham JGG, curatori. Oxford Textbook of Medicine. Terza edizione. New York: Oxford University Press, 1996.

La Tabella 6 riassume le convenzioni di segnalazione per LVSD e insufficienza cardiaca:

Tabella 6**Convenzioni di segnalazione per disfunzione sistolica ventricolare sinistra/insufficienza cardiaca**

Osservazione	Modalità di segnalazione	Termine da segnalare	Classificazione
Declino asintomatico della LVEF di <10% punti dal basale o fino a una LVEF di $\geq 50\%$	Nessuna segnalazione aggiuntiva richiesta; risultati LVEF da segnalare nell'eCRF.	NA	NA
Declino asintomatico della LVEF di $\geq 10\%$ punti dal basale a una LVEF <50%	AE ^a (eCRF modulo elettronico eventi avversi)	Frazione di eiezione diminuita ^a	NCI CTCAE per "frazione di eiezione diminuita"
Declino asintomatico della LVEF che richiede un trattamento o che porta alla sospensione di pertuzumab e/o di trastuzumab	AE (eCRF modulo elettronico eventi avversi) e segnalazione come AESI non grave (<i>segnalato</i> in un modulo SAE)	Frazione di eiezione diminuita ^a	NCI CTCAE per "frazione di eiezione diminuita"
Insufficienza cardiaca/CHF (LVSD sintomatica) ^b	AE (eCRF modulo elettronico eventi avversi) e SAE (modulo SAE)	"Insufficienza cardiaca"	NCI CTCAE per "insufficienza cardiaca" e classe NYHA

AE = evento avverso; AESI = evento avverso di particolare interesse; CHF = insufficienza cardiaca congestizia;

eCRF = modulo elettronico di segnalazione del caso; LVEF = frazione di eiezione ventricolare sinistra; LVSD = disfunzione sistolica ventricolare sinistra; NA = non applicabile; NCI CTCAE = Criteri comuni di terminologia per gli eventi avversi del National Cancer Institute;

NYHA = New York Heart Association; SAE = evento avverso grave.

Nota: qualsiasi evento di LVSD sintomatica deve essere segnalato come insufficienza cardiaca.

^a Segnalare lo stato come asintomatico e fornire il valore di LVEF nel campo dei commenti come appropriato.

^b Qualsiasi evento di LVSD sintomatica deve essere segnalato come "insufficienza cardiaca".

La scala di classificazione della severità degli eventi avversi per l'NCI CTCAE (v4.03) verrà utilizzata per valutare la severità degli eventi avversi. Vedere la Tabella 4 sopra per valutare la severità degli eventi avversi che non sono specificatamente elencati nell'NCI CTCAE.

Valutazione della casualità degli eventi avversi

Gli sperimentatori dovrebbero utilizzare la propria conoscenza del paziente, le circostanze intorno all'evento e una valutazione di qualsiasi potenziale causa alternativa per determinare se un evento avverso sia considerato correlato al farmaco di studio, indicando "sì" o "no" di conseguenza. La seguente guida dovrebbe essere presa in considerazione:

- Relazione temporale tra l'insorgenza dell'evento e l'inizio del farmaco dello studio
- Decorso dell'evento, considerando in particolare gli effetti della riduzione della dose, della sospensione del farmaco dello studio o della reintroduzione del farmaco in studio (se applicabile)
- Nota associazione dell'evento con il farmaco dello studio o con trattamenti simili
- Nota associazione dell'evento con la malattia in studio
- Presenza di fattori di rischio nel paziente o uso di farmaci concomitanti noti per aumentare il verificarsi dell'evento
- Presenza di fattori non correlati al trattamento noti per essere associati al verificarsi dell'evento

Per i pazienti che ricevono una terapia combinata, la causalità sarà valutata individualmente per ciascuna terapia richiesta dal protocollo.

Reazioni correlate all'infusione, reazioni dell'iniezione e reazioni locali nel sito di iniezione

Gli eventi avversi che si verificano durante o entro 24 ore dalla somministrazione del farmaco dello studio e sono giudicati correlati all'infusione o all'iniezione del farmaco dello studio devono essere registrati come diagnosi (ad esempio, "reazione correlata all'infusione", "reazione dell'iniezione", "reazione nel sito di iniezione") nell'eCRF per gli Eventi avversi. Se possibile, evitare termini ambigui come "reazione sistemica".

I segni e i sintomi associati devono essere registrati nell'apposito eCRF per le Reazioni correlate all'infusione, eCRF per le Reazioni di iniezione o eCRF per le Reazioni nel sito di iniezione. Se un paziente manifesta una reazione sia locale che sistemica alla stessa dose del farmaco dello studio, ciascuna reazione deve essere registrata separatamente nell'eCRF per gli Eventi avversi registrando separatamente anche i segni e i sintomi nell'apposito eCRF, eCRF per le Reazioni di iniezione o eCRF per le Reazioni nel sito di iniezione.

Eventi avversi che sono secondari ad altri eventi

In generale, gli eventi avversi che sono secondari ad altri eventi (ad esempio, eventi a cascata o sequele cliniche) devono essere identificati in base alla loro causa primaria, ad eccezione degli eventi secondari severi o gravi. Un evento avverso secondario medicamente significativo che è separato nel tempo dall'evento iniziale deve essere registrato come evento indipendente nell'eCRF per gli Eventi avversi. Per esempio:

- Se il vomito provoca una lieve disidratazione senza alcun trattamento aggiuntivo in un adulto sano, solo il vomito deve essere riportato nell'eCRF
- Se il vomito provoca disidratazione severa, entrambi gli eventi devono essere riportati separatamente nell'eCRF
- Se una emorragia gastrointestinale severa porta a insufficienza renale, entrambi gli eventi devono essere riportati separatamente nell'eCRF
- Se le vertigini portano a una caduta e conseguente frattura, tutti e tre gli eventi devono essere riportati separatamente nell'eCRF.
- Se la neutropenia è accompagnata da un'infezione, entrambi gli eventi devono essere riportati separatamente nell'eCRF.

Tutti gli eventi avversi devono essere registrati separatamente nell'eCRF degli eventi avversi se non è chiaro se gli eventi siano associati.

Persistente di eventi avversi ricorrenti

Un evento avverso persistente è quello che si estende continuamente, senza risoluzione, tra i punti temporali di valutazione del paziente. Tali eventi devono essere registrati una sola volta nell'eCRF per gli Eventi avversi. La severità iniziale (intensità o grado) dell'evento verrà registrata nel momento in cui l'evento viene segnalato per la prima volta. Se un evento avverso persistente diventa più severo, anche la severità più estrema deve essere registrata nell'eCRF per gli Eventi avversi. Se l'evento diventa grave, deve essere segnalato allo sponsor immediatamente (vale a dire, non più di 24 ore dopo aver appreso che l'evento è diventato serio).

L'eCRF per gli Eventi avversi deve essere aggiornato modificando l'evento da "non grave" a "grave", indicando la data in cui l'evento è diventato grave, e completando tutti i campi di dati relativi agli eventi avversi gravi.

Un evento avverso ricorrente è un evento che si risolve tra punti temporali di valutazione del paziente e successivamente si ripresenta. Ogni ricorrenza di un evento avverso deve essere registrata come evento separato nell'eCRF per gli Eventi avversi.

Valori di laboratorio anomali

Non tutte le anomalie di laboratorio si qualificano come un evento avverso. Il risultato di un test di laboratorio deve essere segnalato come evento avverso se soddisfa uno dei seguenti criteri:

- È accompagnato da sintomi clinici

- Si traduce in un cambiamento nel trattamento dello studio (ad esempio, modifica del dosaggio, interruzione del trattamento, o sospensione del trattamento)
- Si traduce in un intervento medico (ad esempio, integrazione di potassio per l'ipopotassiemia) o in un cambiamento della terapia concomitante
- È clinicamente significativo a giudizio dello sperimentatore. Nota: per gli studi di oncologia, alcuni valori anomali potrebbero non essere considerati eventi avversi.

È responsabilità dello sperimentatore rivedere tutti i risultati di laboratorio. Per decidere se un'anomalia isolata di laboratorio debba essere classificata come evento avverso, si deve esercitare il giudizio medico e scientifico.

Se un'anomalia di laboratorio clinicamente significativa è un segno di una malattia o di una sindrome (ad esempio, ALP e bilirubina 5 x ULN associate a colestasi), solo la diagnosi (vale a dire, la colestasi) deve essere registrata nell'eCRF per gli Eventi avversi.

Se un'anomalia di laboratorio clinicamente significativa non è un segno di una malattia o di una sindrome, l'anomalia stessa deve essere registrata nell'eCRF per gli Eventi avversi, insieme a un descrittore che indica se il risultato del test sia al di sopra o al di sotto dell'intervallo di normalità (ad esempio, "potassio elevato", in contrapposizione a "potassio anormale"). Se l'anomalia di laboratorio può essere caratterizzata mediante un termine clinico preciso secondo le definizioni standard, il termine clinico deve essere registrato come evento avverso. Per esempio, un livello di potassio sierico elevato di 7,0 mEq/L dovrebbe essere registrato come "iperkaliemia".

Le osservazioni della stessa anomalia di laboratorio clinicamente significativa da una visita all'altra devono essere registrate una sola volta nell'eCRF per gli Eventi avversi.

Valori anomali dei segni vitali

Non tutte le anomalie dei segni vitali si qualificano come un evento avverso. Il risultato di un segno vitale deve essere segnalato come evento avverso se soddisfa uno dei seguenti criteri:

- È accompagnato da sintomi clinici
- Si traduce in un cambiamento nel trattamento dello studio (ad esempio, modifica del dosaggio, interruzione del trattamento, o sospensione del trattamento)
- Si traduce in un intervento medico o in un cambiamento della terapia concomitante
- È clinicamente significativo a giudizio dello sperimentatore

È responsabilità dello sperimentatore rivedere tutti i risultati dei segni vitali. Per decidere se un'anomalia isolata dei segni vitali debba essere classificata come evento avverso, si deve esercitare il giudizio medico e scientifico.

Se un'anomalia dei segni vitali clinicamente significativa è un segno di una malattia o di una sindrome (ad esempio, pressione arteriosa elevata), solo la diagnosi (ad esempio l'ipertensione) deve essere registrata nell'eCRF per gli Eventi avversi.

Le osservazioni della stessa anomalia dei segni vitali clinicamente significativa da una visita all'altra devono essere registrate solo una volta nell'eCRF per gli eventi avversi.

RISULTATI DEGLI STUDI DI PK E SELEZIONE DELLA DOSE

Parte 1 Analisi PK SC e selezione della dose

La selezione delle dosi di pertuzumab SC nella Parte 1 (coorti 2, 3 e 4) si è basata sul modello popPK di pertuzumab EV con i valori dei parametri PK di trastuzumab SC incorporati. Per una migliore accuratezza, nelle analisi di selezione della dose SC è stato anche fatto affidamento sulla popPK EV dalle stime storiche dei parametri del modello. Dopo la stima dei parametri di PK fissi (cioè, C_{trough} , $AUC_0 - inf$, concentrazione sierica massima [C_{max}], tempo di concentrazione sierica massima [T_{max}]), la(e) dose(i) di pertuzumab SC (di mantenimento) è stata selezionata per la Parte 2. Questa dose SC è stata calcolata per fornire un'esposizione a pertuzumab simile a quella di pertuzumab EV a 420 mg. Allo stesso modo, sulla base dei parametri di PK, è stata calcolata una dose (di carico) di pertuzumab SC per fornire un'esposizione a pertuzumab simile a quella di pertuzumab EV alla dose di 840 mg. Il modello popPK di pertuzumab EV è stato aggiornato con i parametri di pertuzumab SC utilizzando i dati della Parte 1 ed è stato utilizzato per identificare correttamente le dosi SC di carico e di mantenimento.

La Figura 8 mostra la panoramica dello studio, inclusi i dosaggi degli anticorpi, i volumi delle iniezioni, e le concentrazioni e le quantità di rHuPH20 (Halozyme) per le coorti 1-8.

La Figura 9 mostra concentrazioni normalizzate in base alla dose ($\mu\text{g/ml}$) di pertuzumab somministrato per via sottocutanea, con e senza trastuzumab, in funzione del tempo (giorni). I dati mostrano che non vi è interazione farmacocinetica tra pertuzumab SC e trastuzumab SC quando co-somministrati. Non sono state osservate differenze tra la PK di trastuzumab SC somministrato in monoterapia o con pertuzumab SC.

La Figura 10 mostra le concentrazioni normalizzate in base alla dose ($\mu\text{g/ml}$) di pertuzumab in funzione del tempo (giorni). Non ci sono state differenze significative nella PK di pertuzumab o nella PK di trastuzumab (non mostrata) quando somministrati con 2.000 U/ml o 667 U/ml

di rHuPH20.

La Figura 11 mostra le stime dei parametri utilizzando i modelli EV di pertuzumab e di PK della popolazione storica (popPK) confrontandoli a diverse concentrazioni di pertuzumab somministrato EV o SC, con e senza trastuzumab.

Caratterizzazione della farmacocinetica di Pertuzumab - Parte 1

I profili di concentrazione-tempo medi di pertuzumab per le coorti 1-4 e 6-8 sono mostrati in Figura 24. Le concentrazioni di pertuzumab dopo una dose di 420 mg somministrata per via endovenosa hanno seguito un profilo bifasico con una distinta fase di distribuzione ed eliminazione. Il pertuzumab somministrato per via sottocutanea ha determinato un tempo per raggiungere la concentrazione massima (T_{max}) tra 4-7 giorni e aumenti dell'esposizione correlati alla dose. È stata osservata variabilità all'interno di alcune delle coorti da 1200 mg SC, probabilmente a causa di una piccola dimensione del campione.

Le concentrazioni medie geometriche di pertuzumab normalizzate in base alla dose quando somministrato con e senza trastuzumab sono state confrontate per valutare il potenziale impatto di trastuzumab sulla PK di pertuzumab. Come mostrato in Figura 22, non c'è stato alcun impatto apparente di trastuzumab sulla PK di pertuzumab quando i due anticorpi sono stati somministrati SC co-miscelati. Ciò è coerente con i dati PK di studi precedenti in cui i due anticorpi sono stati somministrati in sequenza.

Le concentrazioni medie geometriche di pertuzumab quando somministrato con 667 U/ml o 2,000 U/ml di rHuPH20 sono state confrontate per valutare il potenziale impatto dell'enzima di potenziamento dell'assorbimento rHuPH20 sulla PK di pertuzumab. Non c'era alcun impatto apparente dell'abbassamento della concentrazione di rHuPH20 da 2.000 U/ml a 667 U/ml sulla PK di pertuzumab o trastuzumab, come mostrato nelle Figure 20 e 21, rispettivamente.

La caratterizzazione della PK di pertuzumab ha indicato che trastuzumab (risultante dalla somministrazione simultanea di trastuzumab SC) non ha alcun impatto apparente su pertuzumab. La PK di pertuzumab è apparsa principalmente inalterata abbassando la concentrazione di rHuPH20 da 2.000 U/ml a 667 U/ml, tuttavia, poiché solo un piccolo numero di soggetti era esposto a ciascuna concentrazione ($n = 6$ per coorte), era difficile escludere possibili differenze in particolare nella fase terminale e nella C_{trough} . Queste osservazioni hanno supportato ulteriori analisi per determinare la dose di pertuzumab SC che era non inferiore a pertuzumab EV, 420 mg.

Sviluppo del modello PK della popolazione per selezionare la dose di Pertuzumab SC

Una dose di carico di pertuzumab SC di 1200 è stata selezionata in base alla proporzionalità alla dose di pertuzumab e alla farmacocinetica lineare suggerita dal modello popPK sviluppato. Le simulazioni basate su modelli hanno confermato esposizioni comparabili tra pertuzumab

1200 SC e 840 mg EV. Le esposizioni a pertuzumab osservate dalle coorti da 1200 mg SC della Parte 1 hanno ulteriormente confermato la selezione della dose di carico rispetto alle esposizioni EV osservate negli studi storici.

Caratterizzazione della farmacocinetica di Pertuzumab - Parte 2

Data l'assenza di interazioni farmacocinetiche (PK) apparenti farmaco-farmaco (DDI) tra pertuzumab e trastuzumab quando co-miscelati nella Parte 1, e lo sviluppo tecnico della co-formulazione a dose fissa (FDC) era fattibile, la coorte A (co-somministrazione di 600 mg di pertuzumab con 600 mg di trastuzumab) non è stata arruolata nella Parte 2. La coorte B ha esaminato un'iniezione co-miscelata di pertuzumab SC e trastuzumab SC con 1.000 U/ml di rHuPH20 per confermare la dose di pertuzumab selezionata nella Parte 1 dello studio. Il materiale co-miscelato nella coorte B funge da surrogato per la FDC (descritta nell'Esempio 2), che sarà testata nella coorte C.

Sono state condotte analisi PK non compartimentali e di popolazione dei dati PK nella Parte 2:

per confermare la mancanza di interazione farmaco-farmaco farmacocinetica (DDI) tra pertuzumab e trastuzumab quando entrambi sono stati somministrati SC co-miscelati,

per studiare l'impatto di 1.000 U/ml di rHuPH20 sulla PK di pertuzumab e trastuzumab, e

per confermare che la dose di mantenimento di pertuzumab SC di 600 mg non era inferiore rispetto a pertuzumab EV 420 mg (somministrato agli HMV) in termini di C_{trough} allo stato stazionario in 20 pazienti con EBC.

Le concentrazioni medie geometriche di pertuzumab a seguito di una dose co-miscelata di pertuzumab SC 500 mg, trastuzumab SC 600 mg e rHuPH20 1.000 U/ml a 20 pazienti con EBC nella coorte B della Parte 2 sono state confrontate con le concentrazioni medie geometriche di pertuzumab a seguito di una dose di pertuzumab EV 420 mg a 6 HMV nella coorte 1 della Parte 1. Come mostrato in Figura 22, le esposizioni a pertuzumab (C_{trough} e AUC) sono simili tra 600 mg SC (pazienti con EBC) e 420 mg EV (HMV).

Le concentrazioni medie geometriche di pertuzumab normalizzate in base alla dose a seguito di una dose co-miscelata di pertuzumab SC 600 mg, trastuzumab SC 600 mg e rHuPH20 1.000 U/ml a 20 pazienti con EBC nella coorte B della Parte 2 sono state anche confrontate con le concentrazioni medie geometriche di pertuzumab a seguito di una dose di pertuzumab SC 600 mg e rHuPH20 da 2.000 U/ml a 6 HMV nella coorte 3 della Parte 1. Come mostrato in Figura 23, i profili PK di pertuzumab sono molto simili tra i pazienti con EBC (coorte B Parte 2) e gli HMV a seguito una dose di pertuzumab SC 600 mg (coorte 3 Parte 1).

Confrontando le concentrazioni medie geometriche normalizzate in base alla dose di pertuzumab e trastuzumab quando somministrati con 667 U/ml, 1.000 U/ml o 2.000 U/ml di rHuPH20 si può valutare il potenziale impatto dell'enzima di potenziamento dell'assorbimento

rHuPH20 sulla PK di pertuzumab e trastuzumab. Come mostrato in Figura 24, non vi è stato alcun impatto apparente dell'abbassamento della concentrazione di rHuPH20 da 2.000 U/ml a 1.000 U/ml o 667 U/ml sulla PK di pertuzumab. Il confronto dei dati farmacocinetici di pertuzumab tra pazienti con EBC e gli HNV conferma ulteriormente la mancanza di interazione tra pertuzumab e trastuzumab quando pertuzumab e trastuzumab sono somministrati co-miscelati per via sottocutanea.

Come mostrato in Figura 25, non c'erano differenze apparenti nella PK di trastuzumab quando somministrato con 667 U/ml, 2.000 U/ml o 2,000 U/ml di rHuPH20. La caratterizzazione della PK di pertuzumab nella coorte B della Parte 2 ha confermato i risultati nella Parte 1 dello studio. La coorte B della Parte 2 ha indicato che trastuzumab (risultante dalla somministrazione simultanea di trastuzumab SC) non ha avuto alcun impatto apparente sulla PK di pertuzumab, e le PK di pertuzumab e di trastuzumab sono simili a concentrazioni di rHuPH20 da 2.000 U/ml a 1.000 U/ml.

I dati di PK osservati, le simulazioni del modello che utilizzano il modello popPK aggiornato con dati di PK aggiuntivi raccolti nella coorte B della Parte 2 e le probabilità risultanti nella coorte B Parte 2 erano quasi identiche ai dati ottenuti nella Parte 1. Questi dati sono stati ulteriormente supportati dopo che un secondo modello popPK è stato costruito utilizzando dati SC delle Parti 1 e 2 dell'attuale studio di fase I e dati EV del modello popPK storico di pertuzumab EV (Garg et al., Cancer Chemother Pharmacol.2014; 74:819-829). L'aggiunta di un robusto set di dati di pertuzumab EV nei pazienti accoppiato con i dati SC negli HNV ha confermato le stime e le simulazioni dei parametri di PK, confermando la validità della selezione di una dose di carico e di mantenimento di pertuzumab SC di 1200 mg e 600 mg, rispettivamente.

Farmacocinetica di rHuPH20

Le concentrazioni plasmatiche di rHuPH20 sono state misurate alla pre-dose e a 0,5 e 24 ore dopo la dose per i pazienti nelle coorti 2-8 della Parte 1 e nella coorte B della Parte 2. Per misurare le concentrazioni plasmatiche di rHuPH20 è stato utilizzato un test immunologico a sandwich convalidato utilizzando una lettura di elettroluminescenza (ECL). La concentrazione minima quantificabile era 0,061444 ng/ml.

Le concentrazioni plasmatiche di rHuPH20 erano inferiori al limite di quantificazione per tutti i punti temporali di campionamento, indicando l'assenza di esposizione sistemica quantificabile all'enzima alle dosi di rHuPH20 utilizzate in questo studio.

Conclusioni

La PK del pertuzumab somministrato per via sottocutanea è stata coerente con la PK del trastuzumab somministrato per via sottocutanea. Le quantità/concentrazioni più basse e più elevate testate di rHuPH20 non hanno mostrato alcun impatto sulla PK del pertuzumab somministrato

per via sottocutanea. Pertanto, entrambe le concentrazioni di rHuPH20 testate (667 U/ml e 1.000 U/ml) sono idonee per l'uso nei procedimenti descritti nel presente documento.

Simili PK di pertuzumab e trastuzumab sono state osservate quando si utilizzavano 2.000, 1.000 o 667 U/ml di rHuPH20. I profili di sicurezza erano comparabili nelle coorti con co-miscelazione che ricevevano 1.000, 1.000, oppure 667-U/ml di rHuPH20. Tuttavia, poiché sono state valutate differenti concentrazioni di rHuPH20 in due gruppi di popolazioni (pazienti HMV ed EBC) ciascuno con un piccolo numero di soggetti, un potenziale impatto di una concentrazione inferiore (ad esempio, 1.000 U/ml) sulla PK e/o sulla sicurezza di pertuzumab in queste diverse popolazioni di soggetti non può essere escluso, e la concentrazione raccomandata di rHuPH20 nell'FDC (2.000 U/ml) è stata determinata con la totalità delle altre esperienze cliniche disponibili.

RISULTATI DI SICUREZZA

Parte 1 Dati di sicurezza

I dati demografici e la distribuzione per età della popolazione dello studio sono mostrati in Figura 12.

La Figura 13 mostra una panoramica degli eventi avversi nella Parte 1 dello studio. Il numero totale di eventi avversi è stato di 145, e la % degli eventi avversi di grado 1, grado 2 e \geq grado 3 per le varie coorti è elencata tra parentesi. L'evento avverso di grado 3 di diarrea osservato al giorno 32 era una malattia concomitante non correlata, una possibile infezione virale valutata come infezione concomitante del tratto respiratorio superiore (URTI). Non si sono verificati eventi avversi gravi (SAE), eventi avversi di particolare interesse (AESI), o eventi avversi (AE) che hanno portato alla sospensione, o eventi avversi che hanno portato al decesso. Al momento della valutazione erano in corso alcuni eventi avversi, pertanto non è possibile fornire un grado estremo finale.

La Figura 14 mostra una panoramica di un riepilogo degli eventi avversi nella Parte 1 dello studio, elencando il numero di soggetti per ciascuna coorte ed evento avverso.

La Figura. 15 è una tabulazione degli eventi avversi più comuni (tutti i gradi) con un'incidenza complessiva \geq 5% nel numero di soggetti dello studio per le coorti 18.

La Figura 16 mostra le tossicità correlate all'EGF, vale a dire diarrea, mucosite ed eruzione cutanea associate all'EGFR.

La Figura 17 riassume le reazioni correlate all'iniezione e le reazioni nel sito di iniezione, incluse le reazioni sistemiche e locali, per le coorti da 1 a 8. C'è stata una reazione nel sito di iniezione nella coorte 7 (1200 mg di pertuzumab (P) SC + 600 mg di trastuzumab (H) SC con rHuPH20. I sintomi erano disagio, dolore, tensione e intorpidimento nel sito di iniezione. Le Reazioni correlate all'iniezione sistemica

includevano febbre, brividi, nausea, rigidità, stordimento, sensibilità cutanea, fotofobia, fluttuazioni di temperatura e mal di testa.

La Figura 18 mostra i risultati delle valutazioni LVEF - Echo nelle coorti 1-8. Nella coorte 3 (600 mg di pertuzumab (P) SC), un volontario maschio sano (HMV) ha un calo di > 10% dal 67% al basale al 56% al giorno 22. La frazione di eiezione (EF) di follow-up al giorno 85 era del 60%. Il cardiologo non ha confermato alcuna evidenza di cardiotossicità. Si ritiene che il calo sia dovuto alla variabilità del procedimento di imaging.

Eventi avversi comuni

Nella Parte 1 (coorti 1-8), è stato segnalato un totale di 148 AE in 44 volontari maschi sani (HMV) su 48 (il 91,7%). La maggior parte degli AE è stata segnalata come di bassa intensità (grado 1 o 2). Il SOC più comune era infezioni e infestazioni, con 22 HMV (il 45,8%) che hanno avvertito un totale di 33 AE in questa categoria, di cui la maggior parte degli eventi è stata considerata non correlata al farmaco dello studio dallo sperimentatore. Gli AE più comunemente osservati (mediante PT) in coorti differenti sono stati: infezione del tratto respiratorio superiore (13 HMV [27,1%]), mal di testa (9 HMV [18,8%]), eruzione da farmaci (9 HMV [18,8%]) e diarrea (9 HMV [18,8%]). Tra questi AE comuni, gli AE correlati al farmaco dello studio (valutati dallo sperimentatore) sono stati riportati rispettivamente in 4 (8,3%), 8 (18,8%), e 7 (14,6%) HMV. Tutti gli AE nella Parte 1 si sono risolti entro la fine della Parte 1.

Nella coorte 1 (di controllo), in cui gli HMV hanno ricevuto una singola iniezione EV di 420 mg di pertuzumab, gli AE comunemente osservati (dal paziente) includevano: diarrea (3 HMV su 6 [il 50%]), infezione del tratto respiratorio superiore (2 HMV [il 33,3%]), e cheilite angolare (2 HMV [il 33,3%]).

Nelle coorti 2-4, in cui gli HMV hanno ricevuto una singola iniezione SC di pertuzumab rispettivamente a 400 mg, 600 mg e 1200 mg, gli AE più comunemente osservati (dal paziente) sono stati infezione del tratto respiratorio, eruzione cutanea e diarrea, ciascuno manifestatosi in 4 HMV su 18 (il 22,2%).

Nella coorte 5 (di controllo), in cui gli HMV hanno ricevuto una singola iniezione SC di 600 mg di trastuzumab, gli AE più comunemente osservati (dal paziente) sono stati il dolore alle estremità (alle natiche e alla parte superiore delle cosce, non in corrispondenza del sito di iniezione) (2HMV su 6 [il 33,3%]). Tutti gli altri AE sono stati riportati solo in 1 HMV.

Nelle coorti 6-8, in cui gli HMV hanno ricevuto un'iniezione SC di 600 mg di trastuzumab co-miscelato con pertuzumab a 400 mg, 1200 mg (con 2000 U/ml di rHuPH20) e 1200 mg (con 667 U/ml di rHuPH20), rispettivamente, l'incidenza degli AE è stata simile a quella degli HMV che hanno ricevuto solo pertuzumab (coorti 2-4). Gli AE più comunemente osservati sono stati l'infezione del tratto respiratorio superiore e

l'eruzione da farmaci, ciascuno dei quali si è verificato in 7 HMV su 18 (il 38,9%). Altri AE comuni riportati in almeno il 20% degli HMV sono stati cheilite angolare (4 HMV [22,2%]) e mal di testa (4 HMV [22,2%]).

L'incidenza degli AE complessivi era simile tra gli HMV che hanno ricevuto una concentrazione di 2,000 U/ml di rHuPH20 (coorte 7) e quelli che hanno ricevuto una concentrazione di 667 U/ml di rHuPH20 (Coorte 8) come parte di un'iniezione di pertuzumab e trastuzumab co-miscelati.

Per quanto riguarda gli obiettivi di sicurezza aggiuntivi, si annoverano:

- Nessuna variazione complessiva significativa della pressione sanguigna (BP), della frequenza cardiaca (HR) o degli intervalli tra i battiti (RR)
- Quattro soggetti hanno avuto un aumento della temperatura post-dose il giorno 1 associato a reazione correlata all'iniezione
- Non sono state segnalate alterazioni dell'ECG clinicamente significative

Per quanto riguarda le alterazioni di laboratorio ci sono stati:

- Nessuna anomalia di laboratorio da AE significativa
- Un soggetto ha avuto un aumento dell'urato di grado 4 (giorno 22), che è stato confermato dal sito come Non clinicamente significativo e probabilmente correlato all'esercizio fisico, il risultato era normale al giorno 85.
- Quattro soggetti hanno avuto un aumento di urato di grado 3, che sono stati tutti confermati dal sito come Non clinicamente significativo e di grado 1.

Parte 2 Dati di sicurezza

Nella Parte 2, tutte le 20 [1005] pazienti di sesso femminile con EBC hanno ricevuto un'iniezione SC co-miscelata di 600 mg di pertuzumab e 600 mg di trastuzumab (con 1.000 U/ml di rHuPH20). Tutti i pazienti hanno manifestato almeno un AE, con un totale di 102 AE segnalati al momento del cut-off dello studio clinico. La maggior parte degli AE è stata segnalata come avente bassa intensità (grado 1 o 2).

I SOC in cui si sono verificati gli AE più comuni (riportati in $\geq 50\%$ dei pazienti) includevano quanto segue:

Disturbi del sistema nervoso (14 pazienti [70%])

Disturbi gastrointestinali (10 [50%]), AE correlati al farmaco dello studio (10 [50%])

Disturbi muscoloscheletrici e del tessuto connettivo (10 [50%])

Gli AE più comunemente osservati (dal paziente) riportati in almeno il 20% dei pazienti sono stati: mal di testa (13 pazienti [65%]), mialgia

(7 pazienti [35%]), diarrea (6 pazienti [30%]), reazione nel sito di iniezione (6 pazienti [30%]) e nausea (4 pazienti [20%]). Tra questi AE comuni, AE correlati al farmaco dello studio (valutati dallo sperimentatore) sono stati segnalati in 9 (45%), 6 (30%), 4 (20%), 6 (30%) e 1 (5%) paziente, rispettivamente.

Sia la coorte B (pazienti con EBC) della Parte 2 sia le coorti 6-8 (H MV) della Parte 1 hanno ricevuto un'iniezione co-miscelata di pertuzumab e trastuzumab, e il tipo di AE che sono stati segnalati (dal paziente) con pertuzumab SC e trastuzumab SC nelle pazienti con EBC è coerente con rischi noti associati alla terapia combinata. Reazioni nel sito di iniezione, tutte di grado 1 o 2, si sono verificate con frequenza maggiore nelle pazienti con EBC rispetto agli H MV (6 [30%] vs 1 [5,6%]).

Conclusioni

Nella Parte 1, tutti gli eventi avversi (EA) nelle coorti con dose sottocutanea erano di grado 1 o grado 2.

Non si sono verificati eventi avversi gravi (SAE), eventi avversi di particolare interesse (AESI) o AE > G3 che hanno portato alla sospensione, o eventi fatali.

Non sono stati osservati eventi cardiaci significativi.

C'era un numero più alto di AE nella maggior parte delle coorti P SC e P+H SC rispetto alla coorte di controllo (P EV, H SC), tuttavia, non è stato osservato alcun profilo coerente con l'aumento della dose o l'aggiunta di trastuzumab (H).

Gli AE più comuni (verificatisi in > 5% dei soggetti) sono stati infezioni del tratto respiratorio superiore, diarrea, mal di testa ed eruzione da farmaci. Non c'era differenza tra le coorti 7 e 8 (con una concentrazione di rHuPH20 inferiore).

Sono state osservate quattro reazioni correlate all'iniezione (1 in H SC) e una reazione nel sito di iniezione (coorte 7). Tutte le reazioni erano di grado 1/2 e comparabili al profilo di trastuzumab (H SC) somministrato per via sottocutanea.

In conclusione, il profilo di sicurezza del pertuzumab (P) somministrato per via sottocutanea e i risultati in generale erano coerenti con il profilo di sicurezza noto del pertuzumab somministrato per via endovenosa e del trastuzumab somministrato per via sottocutanea. Di conseguenza, era sicuro continuare lo studio e passare alla Parte 2.

Pertuzumab SC, somministrato come dose di carico di 1200 mg e dose di mantenimento di 600 mg, fornisce C_{trough} e AUC simili rispettivamente a pertuzumab EV 840 mg e 420 mg, come determinato negli H MV. La dose di 600 mg di pertuzumab SC in pazienti con EBC fornisce C_{trough} e AUC simili alle coorti con 420 mg EV e 600 mg SC in H MV nella Parte 1 e la proporzionalità alla dose attraverso linearità della PK conferma una dose di carico di pertuzumab 1200 SC. Pertanto, le dosi di pertuzumab SC (1200 mg di carico, 600 mg di

mantenimento) sono confermate nelle pazienti con EBC.

In generale, il profilo di sicurezza di pertuzumab SC è coerente con il profilo di sicurezza noto di pertuzumab EV ed è ben tollerato quando somministrato in combinazione con trastuzumab SC. Non sono stati identificati nuovi segnali di sicurezza. La maggior parte degli HMV nella Parte 1 e tutte le pazienti con EBC nella coorte B della Parte 2 hanno manifestato almeno un AE. Vi sono stati 2 AE di grado 3 nella Parte 1 e 1 AE di grado 3 nella Parte 2 durante lo studio. Il resto degli AE era di bassa intensità (grado 1 o 2). Non vi sono stati SAE, decessi o AE che hanno portato a ritiri durante lo studio. A seguito di un'iniezione SC co-miscelata di pertuzumab e trastuzumab, le pazienti di sesso femminile con EBC hanno manifestato una maggiore incidenza di reazioni nel sito di iniezione rispetto agli HMV.

In considerazione dei risultati di PK e di sicurezza nel presente studio (Parti 1 e 2), i risultati di sicurezza, di tollerabilità e di PK di questo studio di fase I avvalorano la continuazione dello studio e l'arruolamento della coorte C per ricevere pertuzumab + trastuzumab a dose fissa in co-formulazione (FDC).

ESEMPIO 2

Co-formulazioni sottocutanee stabili a dose fissa (SC FDC) di Pertuzumab e Trastuzumab

Co-formulazioni stabili a dose fissa (FDC) di pertuzumab e trastuzumab sono state sviluppate per la somministrazione sottocutanea (SC).

Gli studi di co-formulazione hanno utilizzato le composizioni di sostanza farmacologica (DS) di pertuzumab e trastuzumab SC e la composizione di rHuPH20 mostrata in Figura 19.

La quantità (%) di specie ad alto peso molecolare (HMWS) in varie formulazioni sottocutanee di pertuzumab e trastuzumab, e le co-formulazioni di pertuzumab/trastuzumab contenenti trealosio e/o saccarosio come stabilizzante a 5°C e 25°C sono mostrate in Figura 23.

Le seguenti formulazioni di carico e di mantenimento SC FDS sono state trovate essere stabili e idonee per la somministrazione sottocutanea di una singola co-formulazione di pertuzumab e trastuzumab a pazienti umani:

Dose di carico

Pertuzumab

Dose: 1.200 mg

Concentrazione: 80 mg/ml

Trastuzumab

Dose: 600 mg

Concentrazione: 40 mg/ml

rHuPH20

Concentrazione: 1.000 U/ml o 2.000 U/ml

pH: 5,5

20 mM di L-istidina/HCl

Trealosio: 70 mM

Saccarosio: 133 mM

Polisorbato 20 (PS20): 0,04%; 0,4 mg/ml

10 mM di metionina

Volume di riempimento nominale 15 ml

Fiala: 20 ml/20 mm

Dose di mantenimento:

Pertuzumab

Dose: 600 mg

Concentrazione: 60 mg/ml

Trastuzumab

Dose: 600 mg

Concentrazione: 60 mg/ml

rHuPH20

Concentrazione: 1.000 U/ml o 2.000 U/ml

pH: 5,5

20 mM di L-istidina/HCl

Trealosio: 105 mM

Saccarosio: 100 mM

Polisorbato PS20:0,04 %; 0,4 mg/ml

10 mM di metionina

Volume nominale di riempimento: 10 ml

Fiala: 15 ml/20 mm

Stabilità della sostanza farmacologica di pertuzumab

Test di scalfittura e spolverizzazione

L'aggregazione proteica può verificarsi a causa della cristallizzazione dell'eccipiente (zucchero) in stato congelato in condizioni di conservazione della sostanza farmacologica. Nel test di scalfittura e spolverizzazione, le fiale di sostanza farmacologica vengono congelate e un po' di zucchero (trealosio o saccarosio) viene aggiunto alla parte superiore della formulazione congelata, quindi graffiato con una spatola metallica per accelerare qualsiasi potenziale cristallizzazione dello zucchero nella formulazione mentre è congelata. A punti temporali predeterminati le formulazioni vengono scongelate e analizzate mediante cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC).

I dati SEC mostrati in Figura 29 dimostrano che il saccarosio è un eccipiente superiore per la sostanza farmacologica pertuzumab conservata a -20°C.

È stato testato l'effetto delle differenze di formulazione nelle seguenti combinazioni a dose fissa (FDC) di pertuzumab-trastuzumab sulla torbidità e quantità di specie ad alto peso molecolare (HMWS).

Codice	F1	F2	F3	F4
Combinazione a dose fissa	Dose di mantenimento	Dose di mantenimento	Dose di carico	Dose di carico
Tampone (20 mM)	His-HCl pH 5,5	His-HCl pH 5,5	His-HCl pH 5,5	His-HCl pH 5,5
Trastuzumab (mg/ml)	60	60	40	40
Pertuzumab (mg/ml)	60	60	80	80
rHuPH20 (EU/ml)	2000	2000	2000	2000
PS20 (%)	0,04	0,04	0,04	0,04
Met (mM)	10	10	10	10
Saccarosio (mM)	100	-	133	-
Trealosio (mM)	105	-	70	-
NaCl (mM)	-	130	-	130

I dati mostrati in Figura 30 dimostrano che NaCl come eccipiente si traduce in un'elevata torbidità nella combinazione a dose fissa (FDC) di pertuzumab-trastuzumab SC. Allo stesso modo, i dati mostrati in Figura 31 dimostrano che NaCl come eccipiente si traduce in quantità maggiori di specie ad alto peso molecolare (HMW). Di conseguenza, il saccarosio e il trealosio sono eccipienti superiori per la FDC.

ELENCO DELLE SEQUENZE

<110> GENENTECH, INC.

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

<120> FORMULAZIONI SOTTOCUTANEE DI ANTICORPO HER2

<130> P34027-WO

<140>

<141>

<150> 62/447,359

<151> 17/01/2017

<160> 22

<170> PatentIn versione 3.5

<210> 1

<211> 195

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln
20 25 30

Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser
35 40 45

Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile
50 55 60

Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val
65 70 75 80

Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp
85 90 95

Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro
100 105 110

Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys
115 120 125

Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr
130 135 140

Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr
145 150 155 160

Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met
165 170 175

Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser
180 185 190

Leu Thr Arg
195

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr
1 5 10 15

Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His
20 25 30

Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu
35 40 45

Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser
50 55 60

Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr
65 70 75 80

Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu
85 90 95

Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln
100 105 110

Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val
115 120

<210> 3

<211> 169

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr
1 5 10 15

Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser

Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr
1 5 10 15

Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu
20 25 30

Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg
35 40 45

His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val
50 55 60

Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr
65 70 75 80

Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro
85 90 95

Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala
100 105 110

Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp
115 120 125

Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
130 135 140

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Arg Ile Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: polipeptide sintetico"

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: polipeptide sintetico"

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: polipeptide sintetico"

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Marco Giovanni Mari
USBM-CP-090

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: polipeptide sintetico"

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: polipeptide sintetico"

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 12

<211> 448

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: polipeptide sintetico"

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: polipeptide sintetico"

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 14

<211> 449

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: polipeptide sintetico"

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 15

<211> 217

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: polipeptide sintetico"

<400> 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
 20 25 30
 Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile
 85 90 95
 Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 115 120 125
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 145 150 155 160
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 180 185 190
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 195 200 205
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 16

<211> 449

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: polipeptide sintetico"

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: peptide sintetico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /sostituire="Ser"

<220>

<221> MISC_FEATURE

<400> 20

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: peptide sintetico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /sostituire="Leu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /sostituire = "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /sostituire="Ser"

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(7)

<223> /nota="Il residuo fornito nella sequenza non ha preferenza rispetto a quello nelle annotazioni per detta posizione"

<400> 21

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: peptide sintetico"

<400> 22

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
1 5

RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica liquida comprendente 600 mg di pertuzumab a una concentrazione di 60 mg/ml, 600 mg di trastuzumab a una concentrazione di 60 mg/ml, 2,000 U/ml di rHuPH20, 20 mM di His-HCl pH 5,5, 105 mM di trealosio, 100 mM di saccarosio, 0.04% di polisorbato 20, 10 mM di metionina e acqua sterile per iniezione fino a un volume totale di 10 ml.
2. Composizione farmaceutica liquida secondo la rivendicazione 1 contenuta in una fiala da 15 ml.
3. Composizione farmaceutica liquida comprendente 1.200 mg di pertuzumab a una concentrazione di 80 mg/ml, 600 mg di trastuzumab a una concentrazione di 40 mg/ml, 2,000 U/ml di rHuPH20, 20 mM di His-HCl pH 5,5, 70 mM di trealosio, 133 mM di saccarosio, 0.04% di polisorbato 20, 10 mM di metionina e acqua sterile per iniezione fino a un volume totale di 15 ml.
4. Composizione farmaceutica liquida secondo la rivendicazione 3 contenuta in una fiala da 20 ml.
5. Articolo di fabbricazione comprendente una composizione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4.
6. Articolo di fabbricazione secondo la rivendicazione 5, comprendente inoltre un foglietto illustrativo con istruzioni per somministrare per via sottocutanea la composizione farmaceutica liquida ivi contenuta a un soggetto umano con cancro HER2-positivo.
7. Articolo di fabbricazione secondo la rivendicazione 6, in cui il cancro HER2-positivo è scelto dal gruppo consistente di cancro al seno, cancro peritoneale, cancro delle tube di Falloppio, cancro ai polmoni, cancro del colon-retto, cancro delle vie biliari e cancro della vescica.
8. Articolo di fabbricazione secondo la rivendicazione 7, in cui il cancro al seno è cancro al seno in fase iniziale (EBC) o cancro al seno metastatico (MBC).
9. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo, comprendente somministrare il pertuzumab per via sottocutanea a un soggetto umano a una dose di carico fissa di 1200 mg seguita da almeno una dose di mantenimento di 600 mg.
10. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo secondo la rivendicazione 9, in cui la somministrazione della dose di carico è seguita dalla somministrazione di dosi multiple di mantenimento.
11. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 o 10 in cui la prima dose di mantenimento di pertuzumab viene somministrata a detto soggetto umano circa due settimane o circa tre settimane dopo la somministrazione della dose di carico di pertuzumab.
12. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 11, in cui le

dosi fisse di pertuzumab vengono somministrate a detto soggetto umano approssimativamente ogni 2 settimane o approssimativamente ogni 3 settimane.

13. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 12, in cui il cancro è scelto dal gruppo consistente di cancro al seno, cancro peritoneale, cancro delle tube di Falloppio, cancro ai polmoni, cancro del colon-retto, cancro delle vie biliari e cancro alla vescica.

14. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo secondo la rivendicazione 13, in cui il cancro è cancro al seno in fase iniziale (EBC) o cancro al seno metastatico (MBC).

15. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9-14, comprendente somministrare un secondo agente terapeutico al paziente.

16. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9-15, in cui il pertuzumab a dose fissa viene somministrato per via sottocutanea in combinazione con trastuzumab somministrato per via sottocutanea.

17. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo secondo la rivendicazione 16, in cui il pertuzumab a dose fissa e il trastuzumab sono co-somministrati per via sottocutanea come due iniezioni sottocutanee separate o in cui il pertuzumab a dose fissa di è co-miscelato con trastuzumab a dose fissa, e somministrato come una singola iniezione sottocutanea.

18. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo secondo la rivendicazione 16 in cui pertuzumab a dose fissa e trastuzumab a dose fissa sono somministrati come una singola co-formulazione per somministrazione sottocutanea.

19. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 16 a 18, in cui la co-formulazione è una composizione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4.

20. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo secondo la rivendicazione 15, in cui il secondo agente terapeutico è un agente chemioterapico, opzionalmente in cui l'agente chemioterapico è scelto dal gruppo consistente di taxani e antracicline.

21. Pertuzumab per l'uso in un metodo per trattare cancro HER2-positivo secondo la rivendicazione 20, in cui il taxano è paclitaxel o docetaxel e in cui l'antraciclina comprende daunorubicina, doxorubicina o epirubicina.

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090



FIG. 1

Variabile leggera

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC [KASQDVSIGVA] WYQQRP			*
	** * * * * *	*		
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [KASQDVSIGVA] WYQQKP			
		*	** * * *	
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQISNYLA] WYQQKP			
	50	60	0	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT] GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA			
	** * * * *	* *	*	* *
574	GKAPKLLIY [SASYRYT] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP			
	* * * * *			
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP			
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QQYIYPYT] FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 5)			
	* *	* *		
574	EDFATYYC [QQYIYPYT] FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 7)			
	* * * *			
hum κI	EDFATYYC [QQYNSLPWT] FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 9)			

FIG. 2A

Variabile pesante

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS [GFTFTDYTMD] WVKQS			*
	** * * * *	*		*
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFTDYTMD] WVRQA			
			** * *	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS] WVRQA			
	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG] KASLTVDRSSRIVYM			
	* * *		** * *	** * *
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG] RFTLSVDRSKNTLYL			
	* * * * *	* * *		
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG] RFTISRDNKNTLYL			
	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 6)			
	** * *		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 8)			
		* * * * *		
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY] WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 10)			

FIG. 2B

Sequenza di amminoacidi per catena leggera di Pertuzumab

1 10 20 30 40 50 60
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQOKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
70 80 90 100 110 120
RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
130 140 150 160 170 180
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
190 200 210
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11)

FIG. 3A

Sequenza di amminoacidi per catena pesante di Pertuzumab

1 10 20 30 40 50 60
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
70 80 90 100 110 120
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLLVTVSSA
130 140 150 160 170 180
STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPEVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
190 200 210 220 230 240
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGP
250 260 270 280 290 300
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
310 320 330 340 350 360
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
370 380 390 400 410 420
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
430 440 448
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 12)

FIG. 3B

Catena leggera Trastuzumab

1 15 30 45
|DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVTAVAWYQQKPKPK 45
46 60 75 90
LLIYSAFLLYSGVPSRFSRSGTDFLTISSSLQPEDFATYYCQQ 90
91 105 120 135
HYTTPTFGGQTKVEIKR|TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL 135
136 150 165 180
LNNFYPRFAKVKWKNVDAALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLT 180
181 195 210 214
LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 13)

FIG. 4A

Catena pesante Trastuzumab

```

1  EVQLVESGGGLVQPFGSLLRSLSCAASGFNIKDTYIHWVRRQAPGKGL 45
15  30
46  EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED 90
60  75
91  TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSS 135
120  165
136  KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 180
150  195
181  GLYSSLSSVTVPSSSLGTTQTYICNVNHHKPSNFKVDKKVEPKSCDK 225
210  255
226  THTCPAPPELLGGPSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS 270
285  300
271  HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD 315
330  345
316  WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 360
375  390
361  MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDG 405
420  435
406  SFFLYSKLTVDKSRWQQGQGVNVPSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 449

```

(SEQ ID NO: 14)

FIG. 4B

Catena leggera variante Pertuzumab

1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K 45
46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y 90
91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T R V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V 135
136 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S 180
181 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T R K S F N R G E C 217 (SEQ ID NO: 15)

FIG. 5A

Catena pesante variante Pertuzumab

1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L 45
30
46 E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D 90
75
91 T A V Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K 135
120
136 S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G 180
165
181 L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T 225
210
226 H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H 270
255
271 E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W 315
300
316 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K F I S K A K G Q P R R E P Q V Y T L P P S R E E M 360
345
361 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S 405
390
406 F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K 449
435

(SEQ ID NO: 16)

FIG. 5B

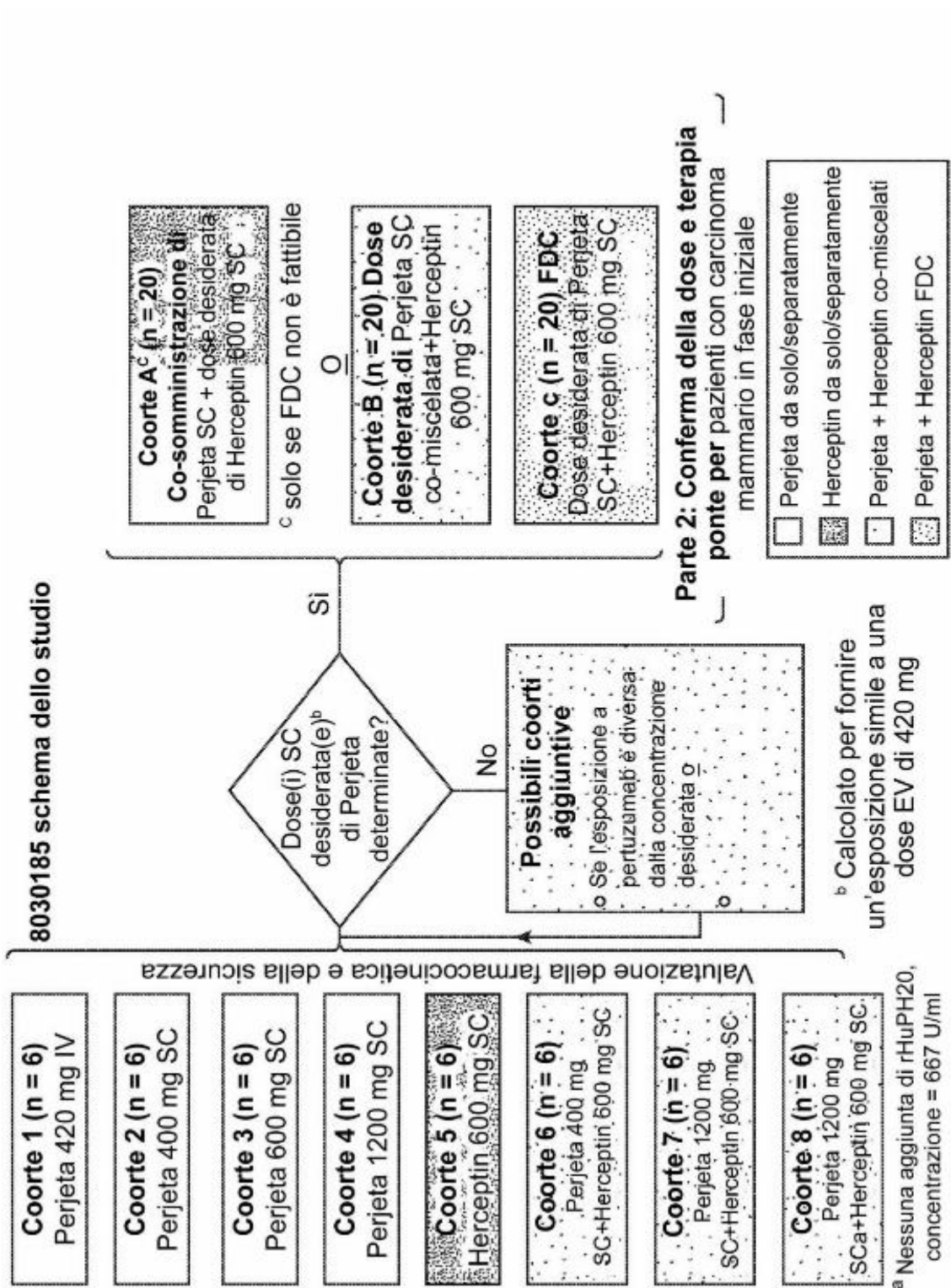
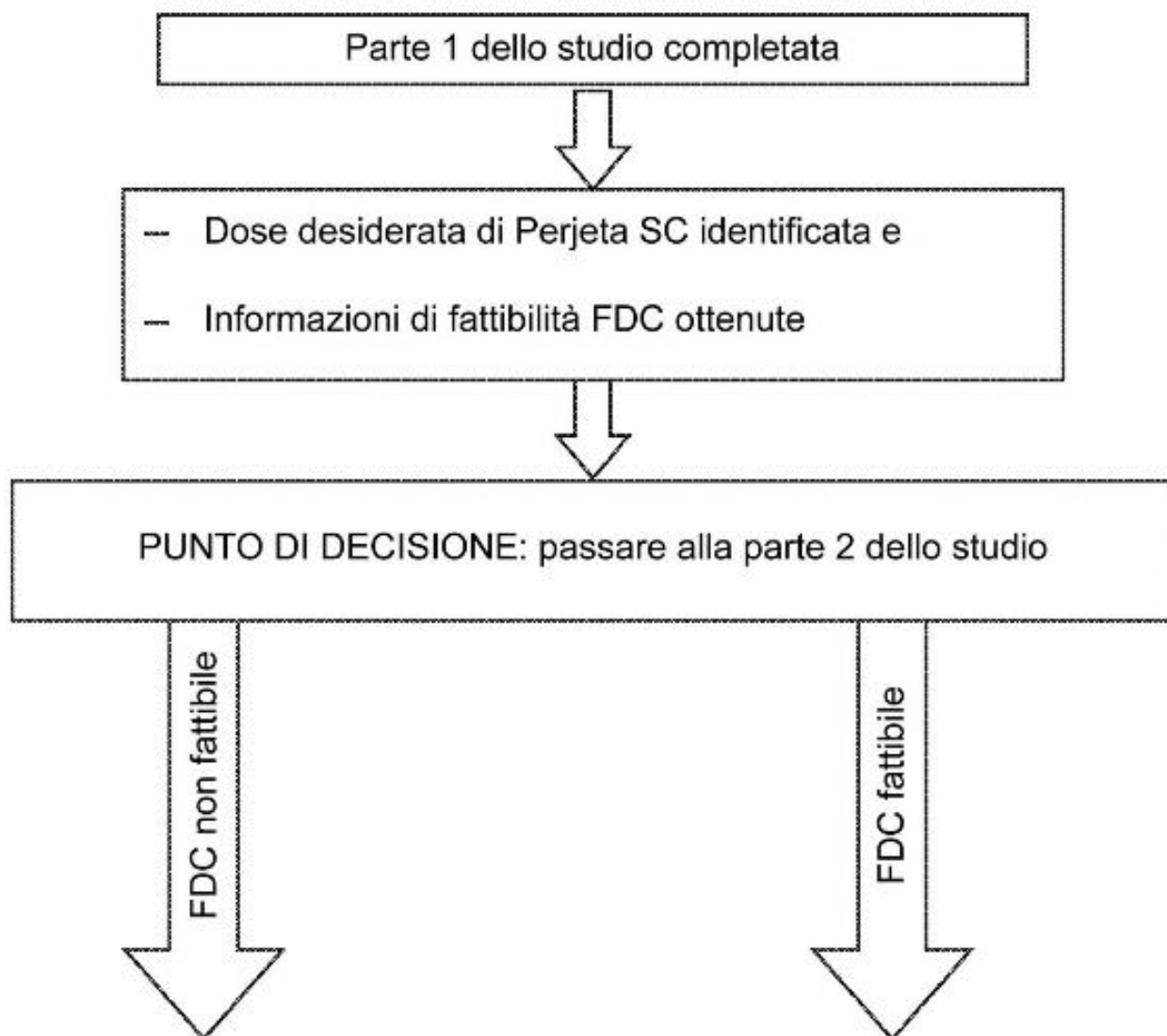


FIG. 6

Diagramma decisionale



FDC = combinazione a dose fissa; SC □ sottocutaneo.

FIG. 7

8030185 Panoramica dello studio

Coorte	Popolazione	N	Agente	Dose (mg) singola iniezione	Volume di iniezione (ml)	Concentrazione e di Halozyme (U/ml)#	Quantità di Halozyme (unità)
Determinazione della dose							
1 (controllo)	HMV	6	Pev	420		NA	NA
2	HMV	6	Psc	400	3,3	2.000 U/ml	6.600 U
3	HMV	6	Psc	600	5	2.000 U/ml	10.000 U
4	HMV	6	Caricamento P _{sc}	1200	10	2.000 U/ml	20.000 U
5 (controllo)	HMV	6	Hsc	600	5	2.000 U/ml	10.000 U
6	HMV	6	Psc+Hsc (co-misc)	400 + 600	8,3	2.000 U/ml	16.600 U
7	HMV	6	Psc+Hsc (co-misc)	1200 + 600	15	2.000 U/ml	30.000 U
8 (solo Halozyme di Herceptin)	HMV	6	Psc+Hsc (co-misc)	1200 + 600	15	667 U/ml	10.000 U
Conferma della dose							
9*	EBC	20	Psc+Hsc (co-misc)	TBD + 600			
10^	EBC	20	Psc + Hsc (FDC)	TBD + 600			

Parte 1

Parte 2

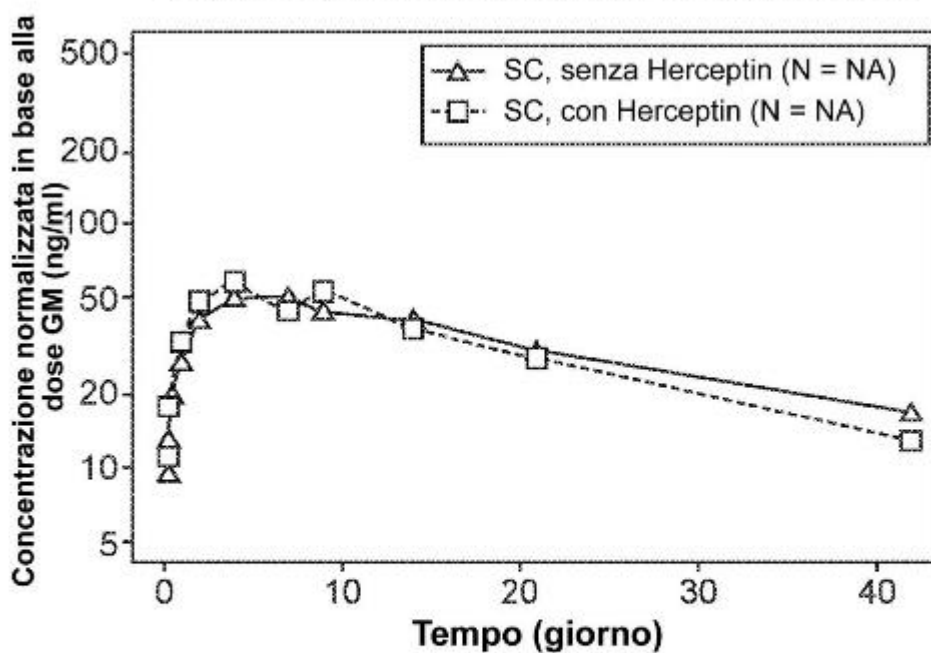
#MabThera e Herceptin SC utilizzano 2.000 U/ml

* Arruolamento previsto per gennaio 2017

^ Arruolamento previsto per ottobre 2017

FIG. 8

**Nessuna interazione PK tra Perjeta+Herceptin SC
quando somministrati contemporaneamente**

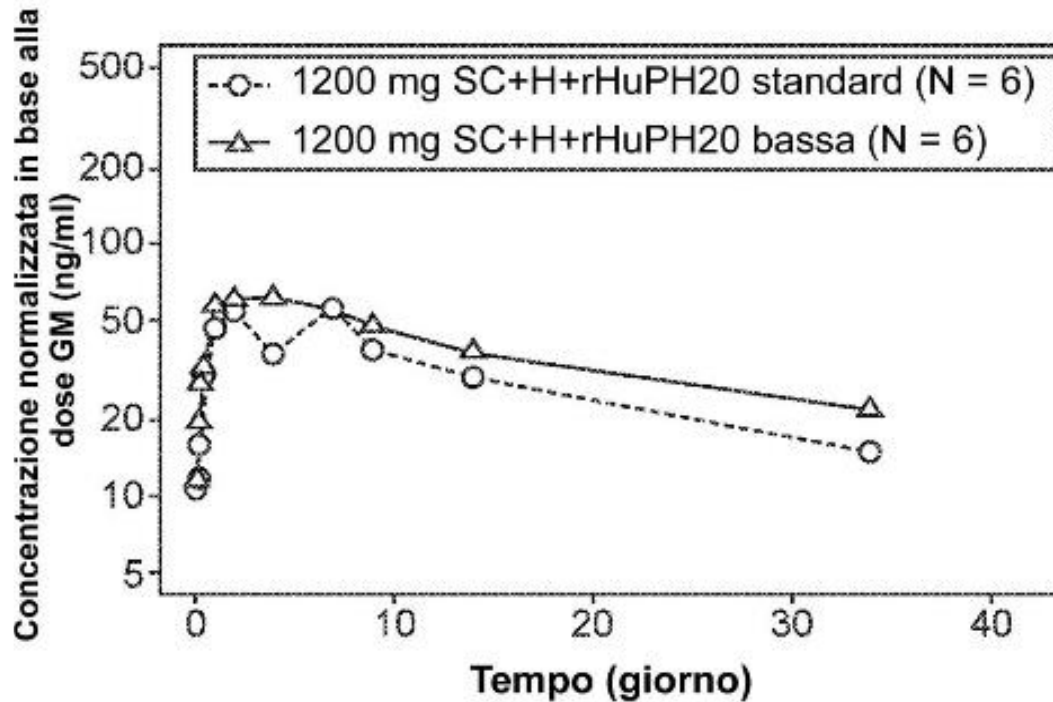


Nessuna interazione PK tra Perjeta SC e Herceptin SC.
Nessuna differenza nella PK di Herceptin in monoterapia,
con Perjeta SC o con differenti concentrazioni di rHuPH20.

FIG. 9

Nessun impatto di una concentrazione/quantità inferiore di rHuPH20 sulla PK di Perjeta

Concentrazioni di pertuzumab con rHuPH20 standard (2.000 U/ml) e bassa (667 U/ml)



Nessuna differenza significativa nella PK di Perjeta o PK di Herceptin (non mostrata) quando somministrato con rHuPH20 standard (2.000 U/ml) o bassa (667 U/ml).

FIG. 10

**Stime dei parametri - Dati storici EV e BO30185 SC
rispetto ai dati BO30185 EV e BO30185 SC**

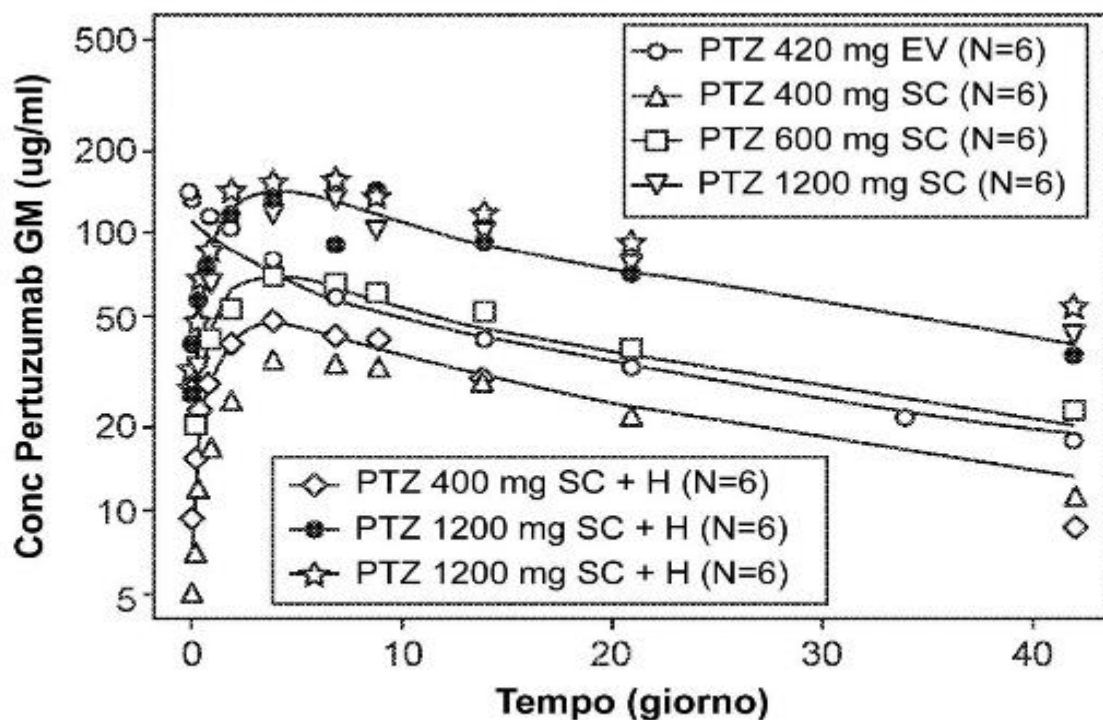
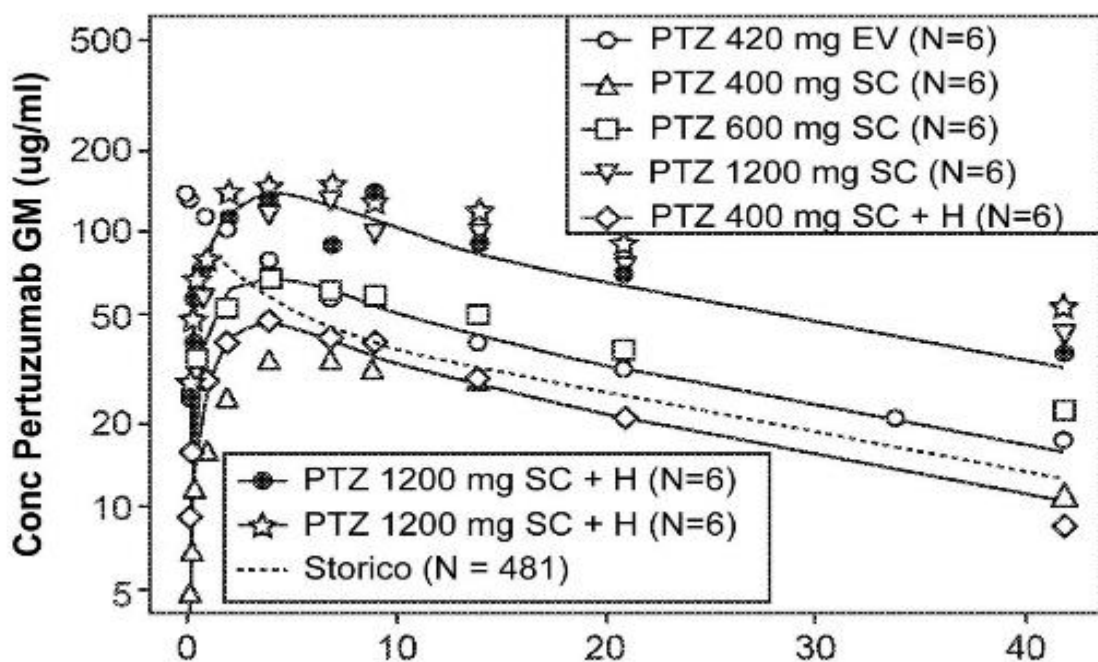
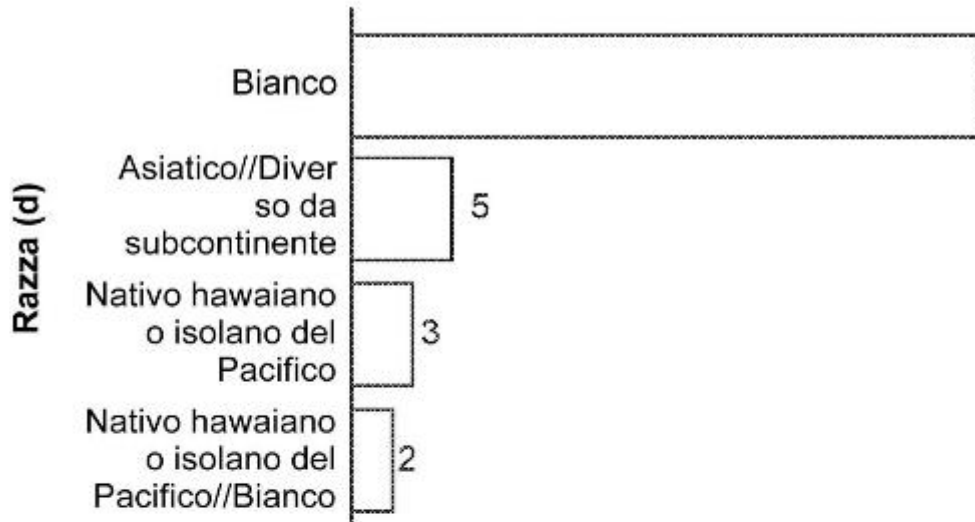


FIG. 11

Dati demografici

Razza



Distribuzione per età

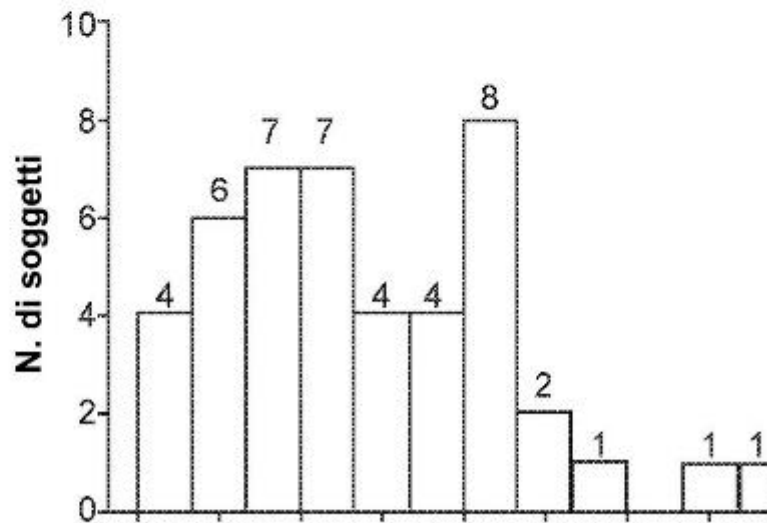


FIG. 12

Panoramica degli Eventi avversi nella Parte 1

Grado estremo	Coorte 1 (P EV 420 mg) N = 6	Coorte 5 (H 600 mg) N = 6	Coorte 2 (P 400 mg) N = 6	Coorte 3 (P 600 mg) N = 6	Coorte 4 (P 1200 mg) N = 6	Coorte 6 (P 400 mg+ H 600 mg) N = 6	Coorte 7 (P 1200 mg+ H 600 mg) N = 6	Coorte 8 (P 1200 mg+ H 600 mg) N = 6
AE totali n = 145 (%)	15 (10)	10 (7)	10 (7)	22 (15)	24 (17)	33 (23)	18 (13)	13 (9)
Grado 1	9 (6)	9 (6)	6 (4)	19 (13)	17 (12)	21 (15)	9 (6)	8 (6)
Grado 2	2 (1)	1 (1)	4 (3)	1 (1)	2 (1)	6 (4)	4 (3)	2 (1)
Grado >=3	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

- Un AE di grado 3 di diarrea, insorgenza il giorno 32: malattia non correlata e concomitante.
 - Possibile infezione virale come URTI concomitante
- Nessun SAE, AESI, AE che porta alla sospensione, AE che porta al decesso
- Alcuni AE in corso quindi nessun grado finale estremo

*Nessuna aggiunta di rHuPH20

FIG. 13

Panoramica degli Eventi avversi nella Parte 1 N. di soggetti

N. di soggetti con AE	Coorte 1 (P EV 420 mg) N = 6	Coorte 5 (H 600 mg) N = 6	Coorte 2 (P400 mg) N = 6	Coorte 3 (P 600 mg) N = 6	Coorte 4 (P 1200 mg) N = 6	Coorte 6 (P 400 mg+ H 600 mg) N = 6	Coorte 7 (P 1200 mg+ H 600 mg) N = 6	Coorte 8 (P 1200 mg** H 600 mg) N = 6
Qualsiasi AE, n (%)	5 (83)	5 (83)	5 (83)	6 (100)	5 (83)	6 (100)	6 (100)	6 (100)
Grado 1	4 (67)	5 (83)	4 (67)	6 (100)	5 (83)	6 (100)	6 (100)	5 (83)
Grado 2	2 (33)	1 (17)	3 (50)	1 (17)	2 (33)	5 (83)	2 (33)	2 (33)
Grado >= 3	1 (17)	0	0	0	0	0	0	0

*Nessuna aggiunta di rHuPH20

FIG. 14

Eventi avversi più comuni (tutti i gradi) - incidenza complessiva ≥ 5% nel numero di soggetti dello studio

Termine preferito per gli eventi avversi	Coorte 1 (P EV 420 mg) N = 6	Coorte 5 (H 600 mg) N = 6	Coorte 2 (P 400 mg) N = 6	Coorte 3 (P 600 mg) N = 6	Coorte 4 (P 1200 mg) N = 6	Coorte 6 (P 400 mg +H 600 mg) N = 6	Coorte 7 (P 1200 mg +H 600 mg) N = 6	Coorte 8 (P 1200 mg* +H 600 mg) N = 6
INFEZIONE DEL TRATTO RESPIRATORIO SUPERIORE	2 (33)	0	0	2 (33)	2 (33)	3 (50)	2 (33)	2 (33)
DIARREA	3 (50)	0	1 (17)	2 (33)	1 (17)	1 (17)	1 (17)	0
MAL DI TESTA	1 (17)	1 (17)	0	1 (17)	2 (33)	0	4 (67)	0
ERUZIONE DA FARMACI	1 (17)	0	0	0	1 (17)	2 (33)	3 (50)	2 (33)
CHEILITE ANGOLARE	2 (33)	0	0	1 (17)	0	3 (50)	0	1 (17)
DOLORE NELL'ESTREMITÀ	0	2 (33)	0	1 (17)	2 (33)	1 (17)	0	0
EPISTASSI	1 (17)	0	0	0	1 (17)	3 (50)	0	0
ERUZIONE CUTANEA	0	1 (17)	1 (17)	2 (33)	1 (17)	0	0	0
DOLORE ADDOMINALE	0	0	2 (33)	0	0	1 (17)	1 (17)	0
CUTE SECCA	0	0	0	1 (17)	1 (17)	2 (33)	0	0
REAZIONE CORRELATA ALL'INIEZIONE	0	1 (17)	0	0	0	2 (33)	0	1 (17)
CONGESTIONE NASALE	0	1 (17)	1 (17)	1 (17)	0	0	0	1 (17)
DOLORE OROFARINGEO	1 (17)	0	0	0	2 (33)	0	0	1 (17)
ECZEMA	0	1 (17)	0	0	1 (17)	1 (17)	0	0
FOLLICOLITE	0	0	0	1 (17)	1 (17)	0	0	0

FIG. 15

Tossicità correlata all'EGFR

Termine paniere AEGT/N. di soggetti (%)	Coorte 1 (P EV 420 mg) N = 6	Coorte 5 (H 600 mg) N = 6	Coorte 2 (P 400 mg) N = 6	Coorte 3 (P 600 mg) N = 6	Coorte 4 (P 1200 mg) N = 6	Coorte 6 (P 400 mg+ H 600 mg) N = 6	Coorte 7 (P 1200 mg+ H 600 mg) N = 6	Coorte 8 (P 1200 mg*+ H 600 mg) N = 6
Diarrea	3 (50)	0	1 (17)	2 (33)	2 (33)	2 (33)	1 (17)	0
Mucosite	2 (33)	0	2 (33)	1 (17)	0	4 (67)	0	1 (17)
Eruzione cutanea EGFR	1 (17)	2 (33)	1 (17)	3 (50)	3 (50)	3 (50)	4 (67)	2 (33)

Diarrea [PT: Diarrea (9), Movimenti intestinali frequenti (2)]
Intervallo di insorgenza: Giorno 2-36 con la maggior parte nei primi 10 giorni dopo il farmaco

Mucosite [PT: Cheilite angolare (7), Ulcerazione della bocca (2), Ulcera aftosa (2) e Gastroenterite (1)]
Intervallo di insorgenza: Giorno 8-38, la maggioranza si verifica tra 13 e 29

Eruzione cutanea associata a EGFR [PT: Eruzione da farmaci (9), Eruzione cutanea (5), Eczema (3),
Follicolite (2), Acne (1) e Dermatite Acneforme (1)]

Intervallo di insorgenza: Giorno 4-54, nessun profilo

*Nessuna aggiunta di rHuPH20

FIG. 16

Reazioni correlate all'iniezione e Reazioni nel sito di iniezione

Numero di soggetti (%)	Coorte 1 (P IV 420 mg) N = 6	Coorte 2 (P 400 mg) N = 6	Coorte 3 (P 600 mg) N = 6	Coorte 4 (P 1200 mg) N = 6	Coorte 6 (P 400 mg+ H 600 mg) N = 6	Coorte 7 (P 1200 mg+ H 600 mg) N = 6	Coorte 8 (P 1200 mg*+ H 600 mg) N = 6
Reazione correlata all'infusione (sistemica)	0						
Reazione correlata all'iniezione (sistemica)	1 (17)	0	0	0	2 (33)	0	1 (17)
Reazione nel sito di iniezione (locale)						1 (17)	0

Reazione nel sito di iniezione (locale): qualsiasi cambiamento morfologico o fisiologico in corrispondenza o in prossimità del sito di iniezione

- 1 Reazione nel sito di iniezione nella coorte 7
- 1200 mg P SC + 600 mg H SC con rHuPH20
- I sintomi erano disagio, dolore, tensione e intorpidimento nel sito di iniezione

Reazioni correlate all'iniezione (sistemiche)

- I sintomi includevano febbre, brividi, nausea, rigidità, stordimento, sensibilità cutanea, fotofobia, fluttuazioni di temperatura, mal di testa

*Nessuna aggiunta di rHuPH20

FIG. 17

Valutazioni LVEF-ECHO

Numero di soggetti (%)	Coorte 1 (P IV) N = 6	Coorte 5 (H SC) N = 6	Coorte 2, 3, 4 (P SC) N = 18	Coorte 6, 7, 8 (P+H SC) N = 18
Misurazione LVEF (%) - Basale	6 (100)	6 (100)	18 (100)	18 (100)
Valore assoluto <50% e diminuzione rispetto al basale>	0	0	0	0
Valore assoluto <50% o diminuzione rispetto al basale> 10% punti	0	0	1*	0

* Coorte 3 (600 mg P SC):

- o Un HMV ha avuto un calo > 10% dal 67% al basale al 56% al giorno 22
- o Follow-up EF al giorno 85 = 60%
- o Il cardiologo ha confermato l'assenza di evidenze di cardiotoxicità
- o Calo dovuto alla variabilità del metodo di imaging

FIG. 18

FIG. 19

Sostanza farmacologica a supporto delle FDC

Trastuzumab (Herceptin SC DS)

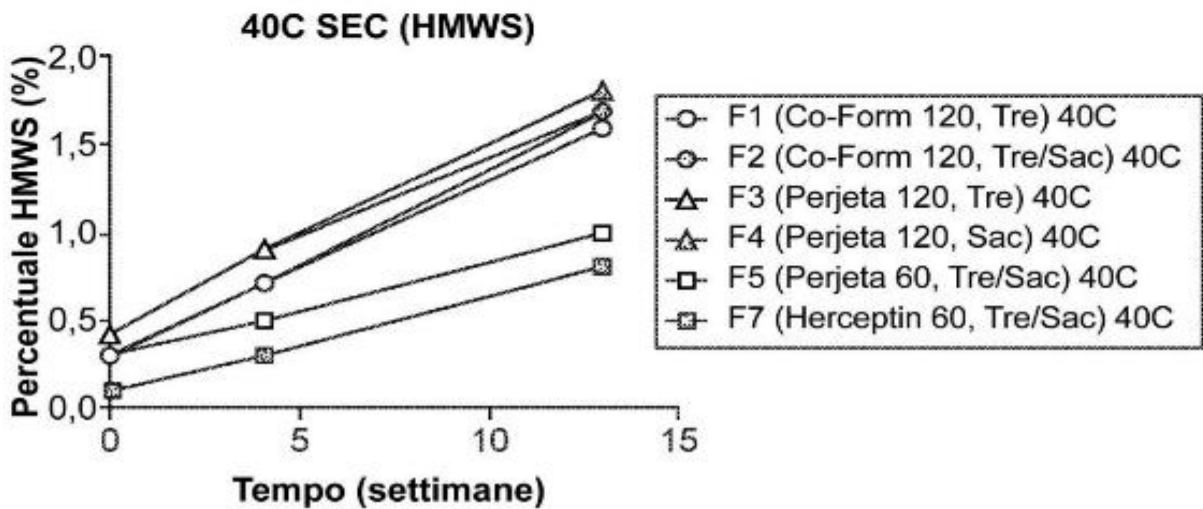
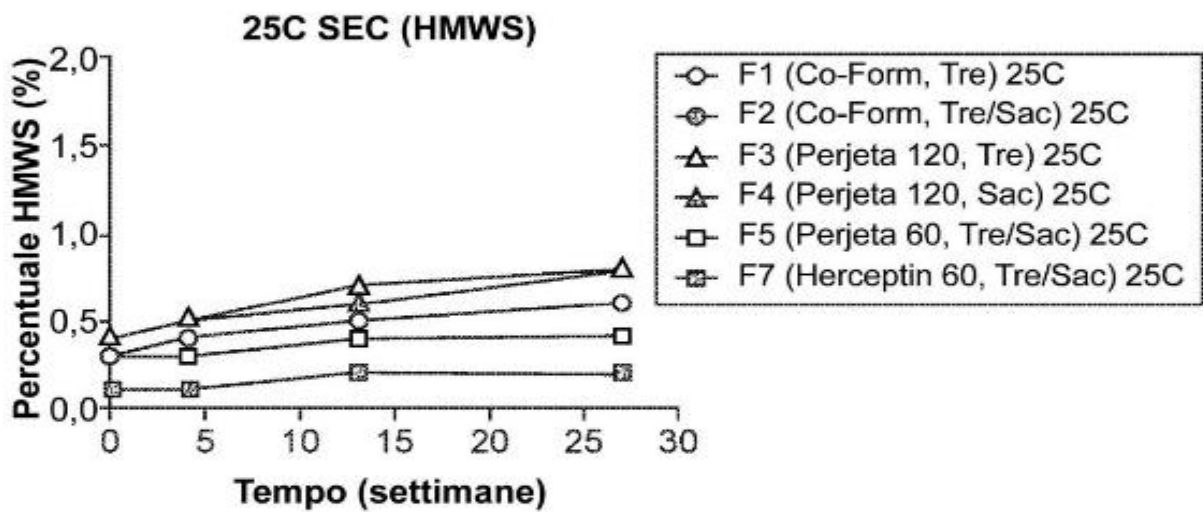
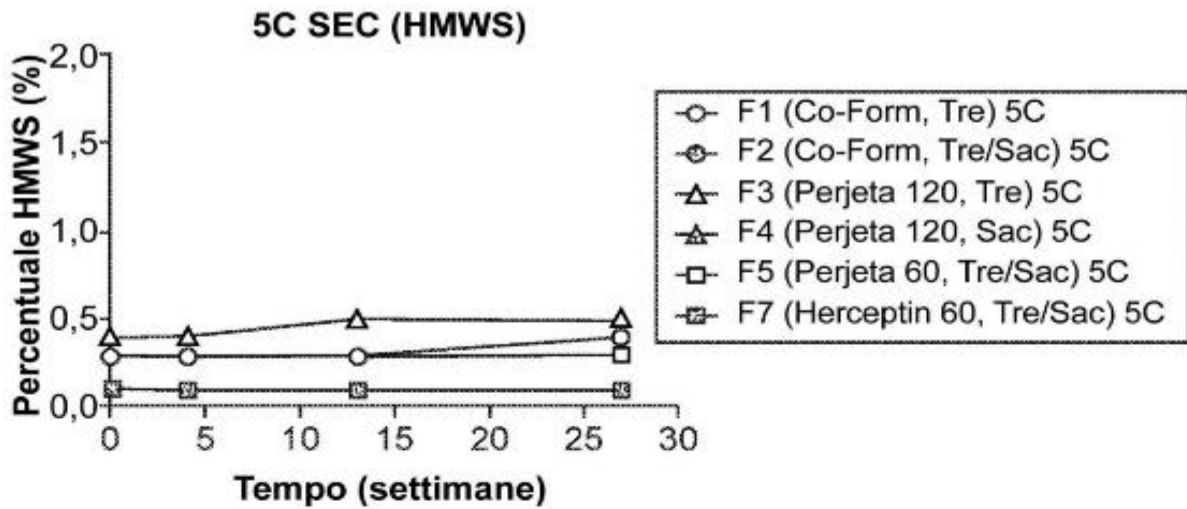
- Trastuzumab: 120 mg/ml
- pH 5,5
- 20 mM di His-HCl
- 210 mM di trealosio
- 0,04% di PS20
- 10 mM di metionina

Pertuzumab SC DS

- Pertuzumab: 120 mg/ml
- pH 5,5
- 20 mM di His-HCl
- 200 mM di saccarosio
- 0,04% di PS20
- 10 mM di metionina

rHuPH20

10 mg/ml di rHuPH20 in tampone His-HCl pH 6,5,
NaCl 130 mM, Polisorbato 80 0,05% (p/v)
diluito ~ 435X in DP (trascurabile)



Nota: HMWS più alto per una maggiore concentrazione di

FIG. 20

FIG. 21

Profilo concentrazione-tempo medio di partuzumab sierico per coorte (HMV)

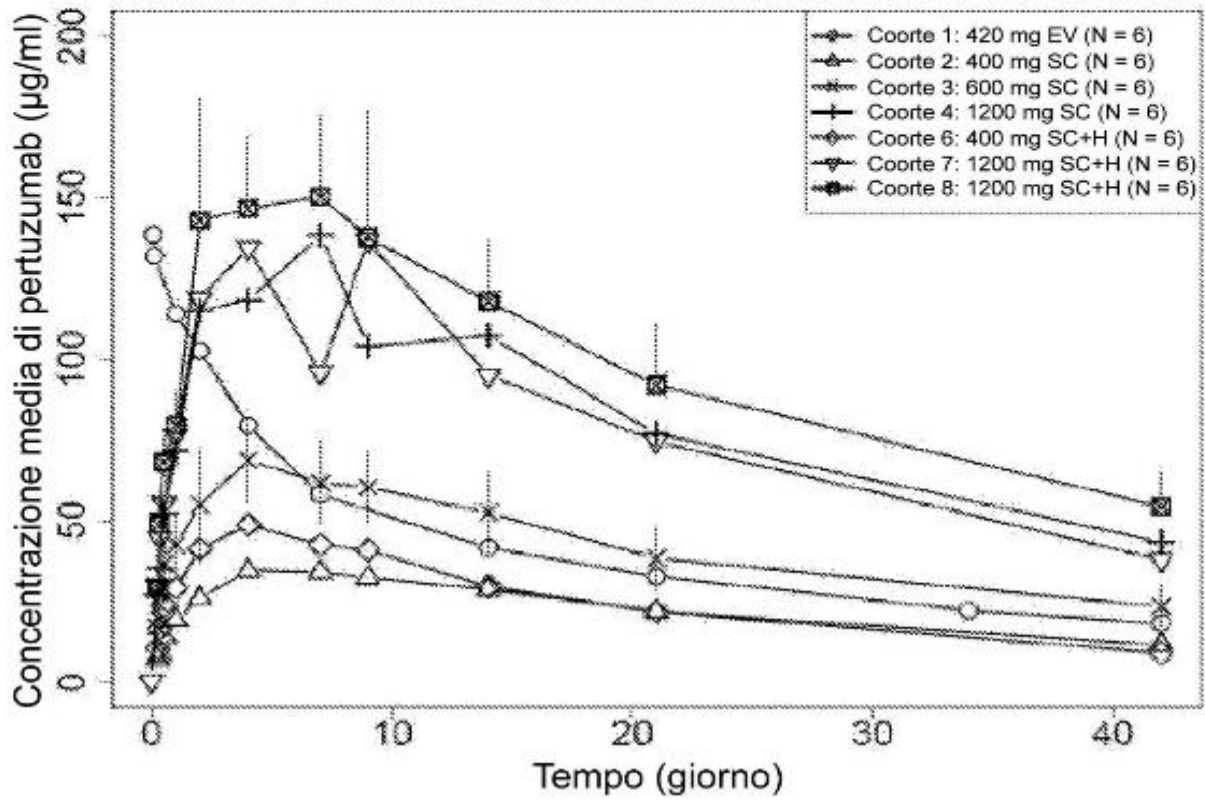
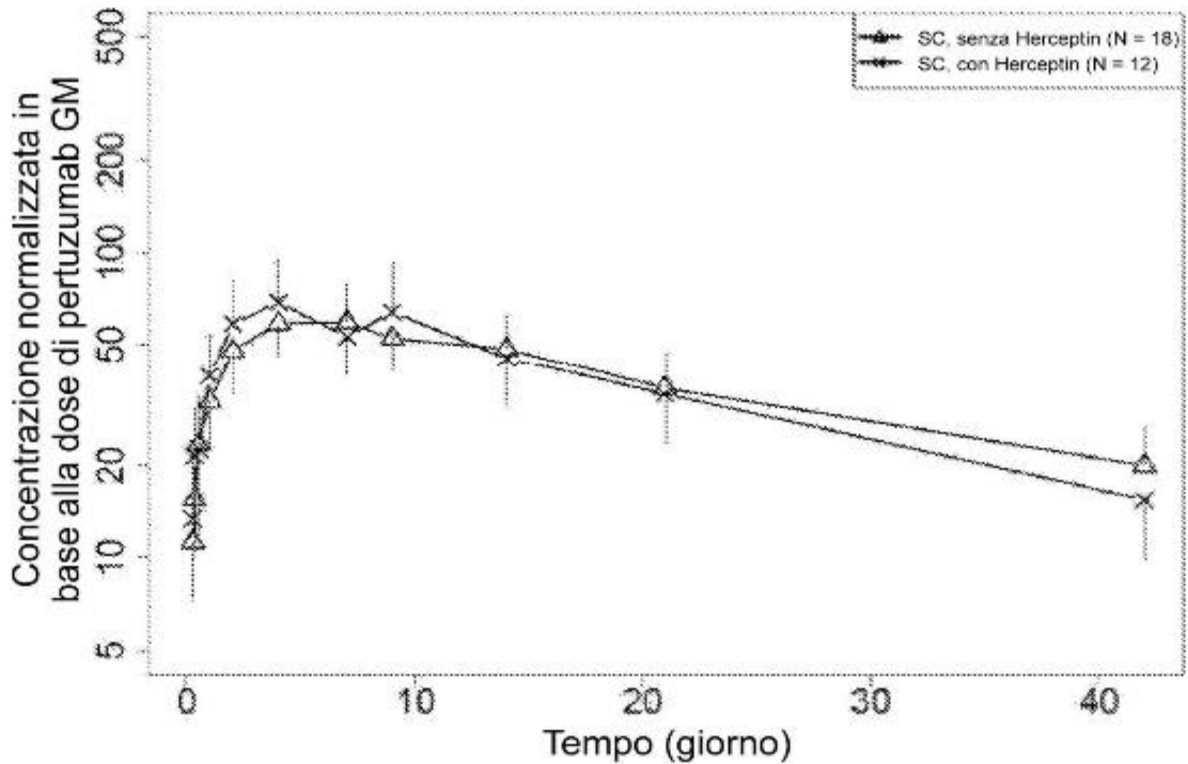


FIG. 22

Profilo di concentrazione-tempo medio geometrico normalizzato in base alla dose di pertuzumab sierico, con e senza Herceptin concomitante



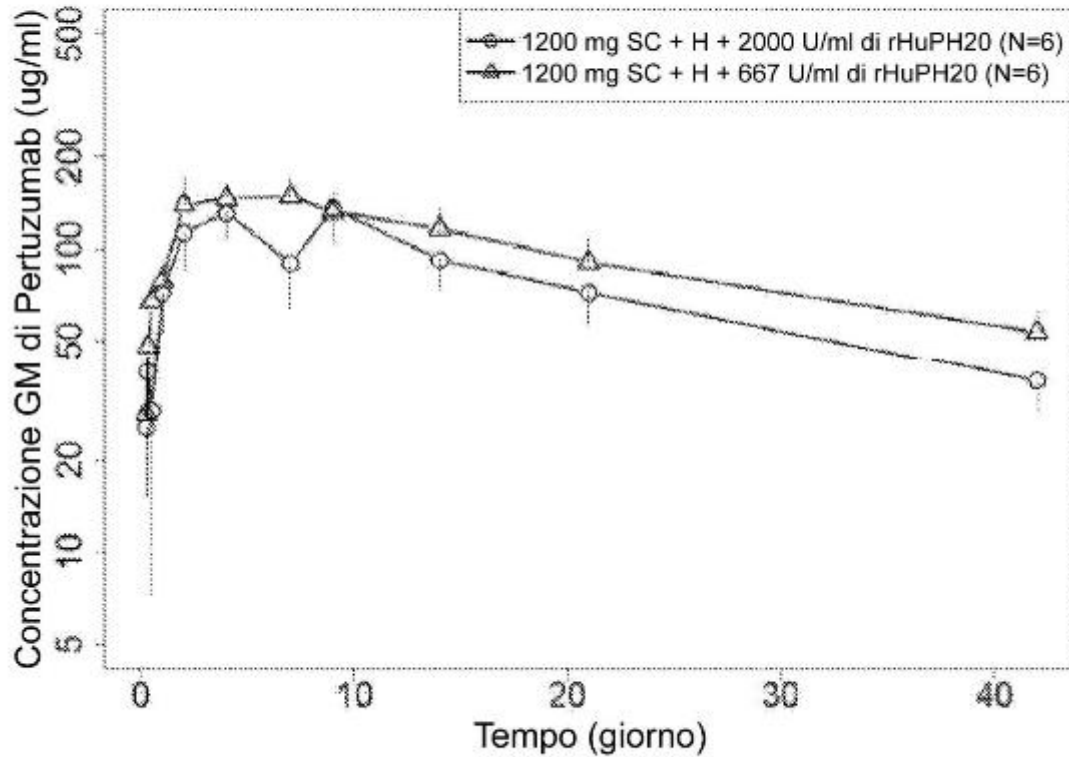
GM = media geometrica: SC = Sottocutaneo.

Tutti i valori di concentrazione di pertuzumab sono normalizzati a una dose di 600 mg.

Le barre verticali, quando visualizzate, rappresentano intervalli di confidenza del percentile 2,5 o 97,5 sulla media geometrica.

FIG. 23

Profilo concentrazione-tempo medio geometrico di Pertuzumab sierico, con 667 U/ml o 2.000 U/ml di rHuPH20 (HMV)

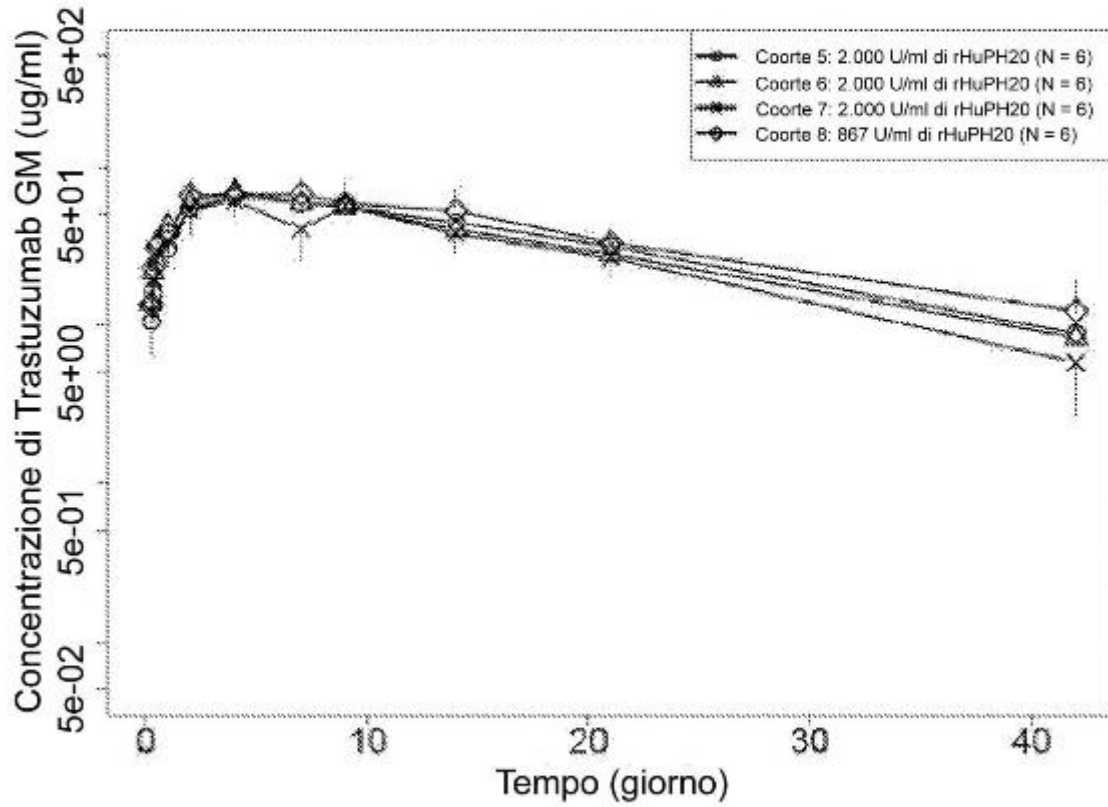


GM = media geometrica; H = Herceptin; SC = Sottocutaneo.

Le barre verticali, quando visualizzate, rappresentano intervalli di confidenza del percentile 2,5 o 97,5 sulla media geometrica.

FIG. 24

Profilo concentrazione-tempo medio geometrico sierico di trastuzumab, con 667 U/ml o 2.000 U/ml di rHuPH20 (HMV)

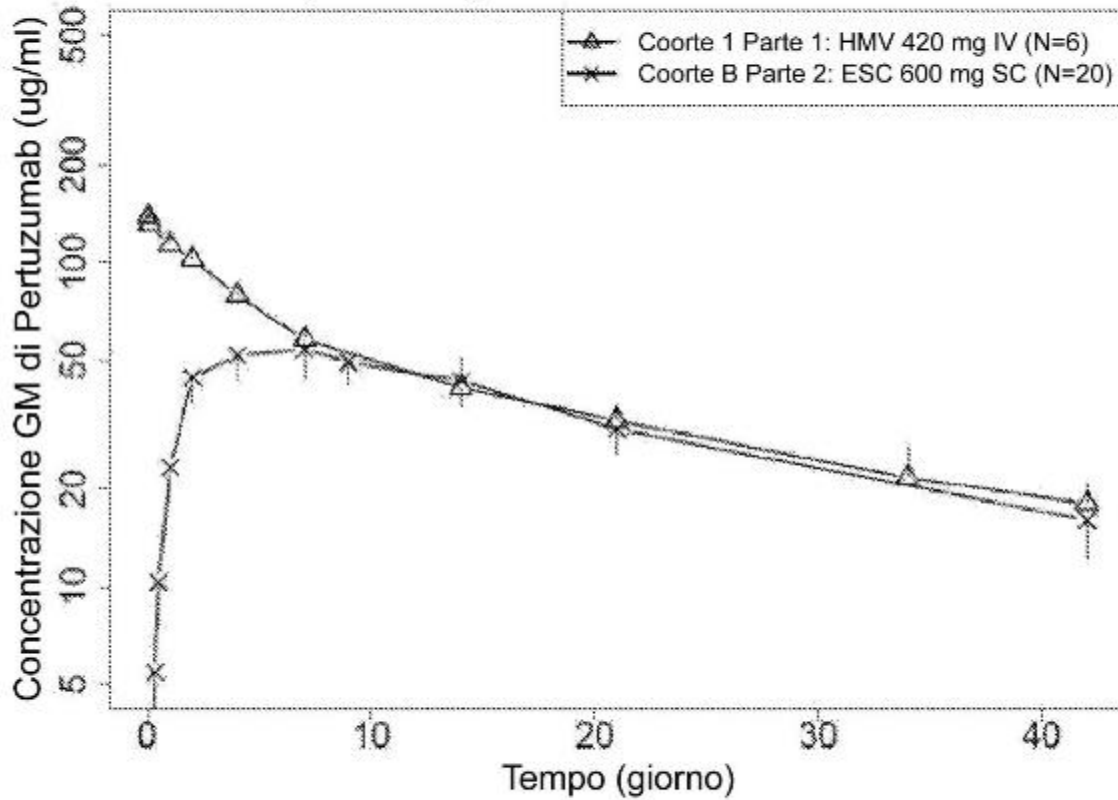


GM = media geometrica.

Le barre verticali, quando visualizzate, rappresentano intervalli di confidenza del percentile 2,5 o 97,5 sulla media geometrica.

FIG. 25

Media geometrica del profilo concentrazione-tempo di Pertuzumab sierico a seguito di dosi di Perjeta 600 mg SC e di Perjeta 420 mg EV

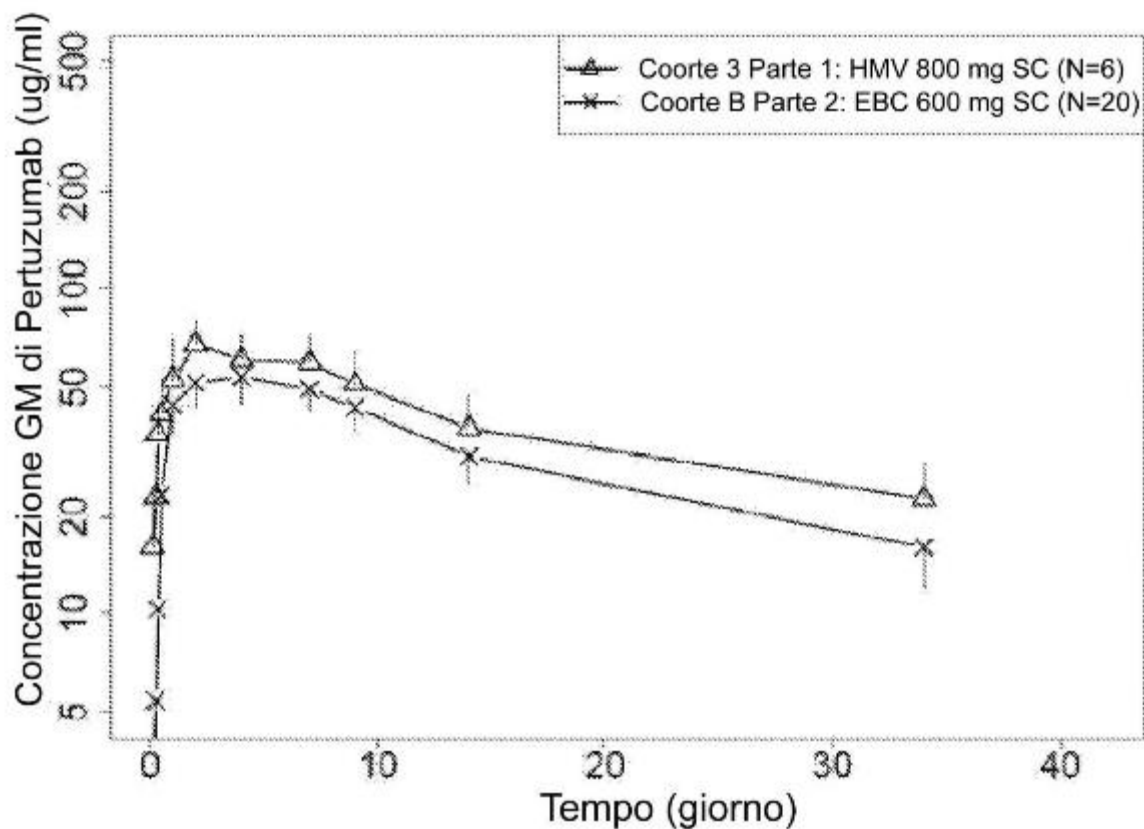


EBC = carcinoma mammario in fase iniziale; GM = media geometrica; HMV = volontario maschio sano; IV = endovenoso, SC = sottocutaneo.

Le barre verticali, quando visualizzate, rappresentano intervalli di confidenza del percentile 2,5 o 97,5 sulla media geometrica.

FIG. 26

Profilo concentrazione-tempo medio geometrico di pertuzumab sierico in HMV o pazienti con EBC

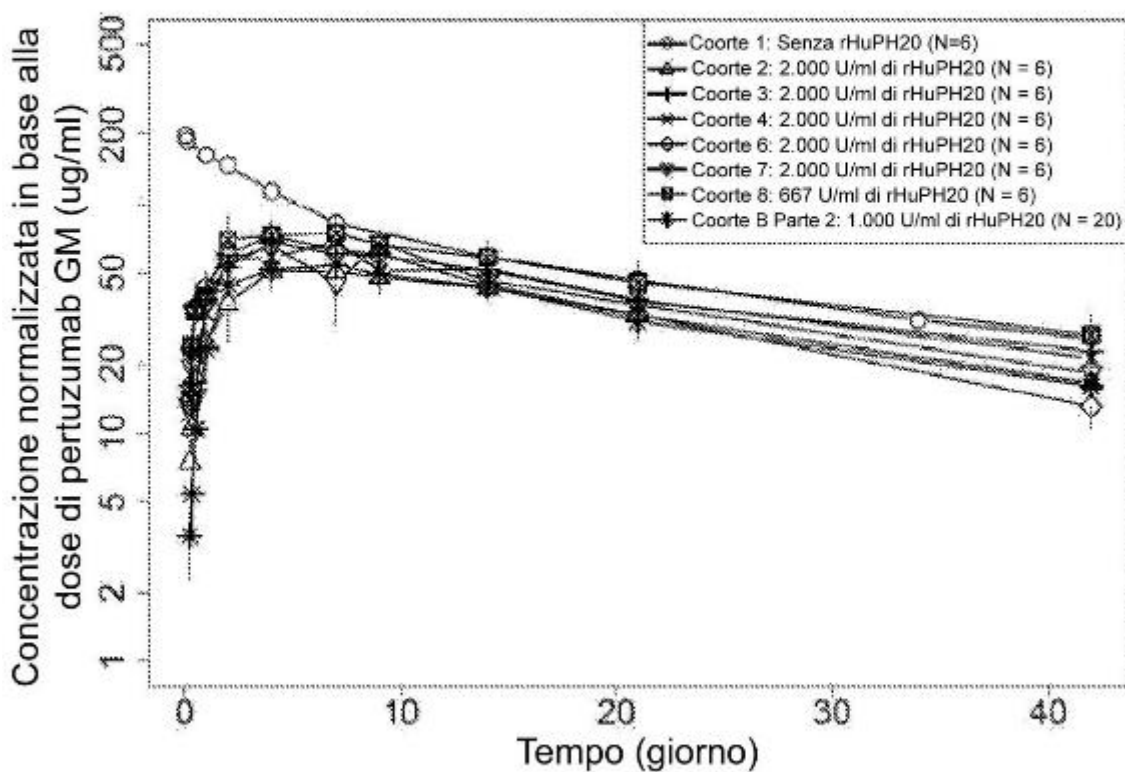


EBC = carcinoma mammario in fase iniziale, GM = media geometrica: HMV = volontario maschio sano: SC = sottocutaneo.

Le barre verticali, quando visualizzate, rappresentano intervalli di confidenza del percentile 2,5 o 97,5 sulla media geometrica.

FIG. 27

**Profilo concentrazione-tempo medio geometrico normalizzato
in base alla dose di pertuzumab sierico, con 667 U/ml,
1.000 U/ml o 2.000 U/ml di rHuPH20**



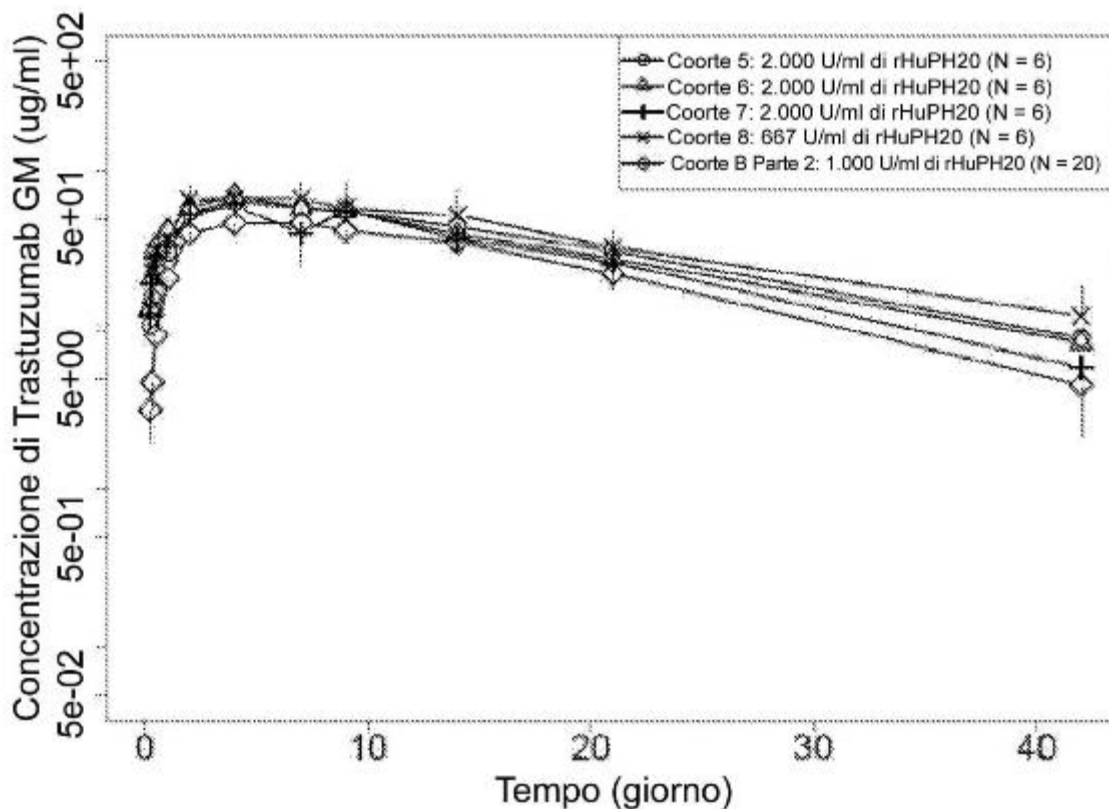
GM = media geometrica

Tutti i valori di concentrazione di pertuzumab sono normalizzati a una dose di 600 mg.

Le barre verticali, quando visualizzate, rappresentano intervalli di confidenza del percentile 2,5 o 97,5 sulla media geometrica.

FIG. 28

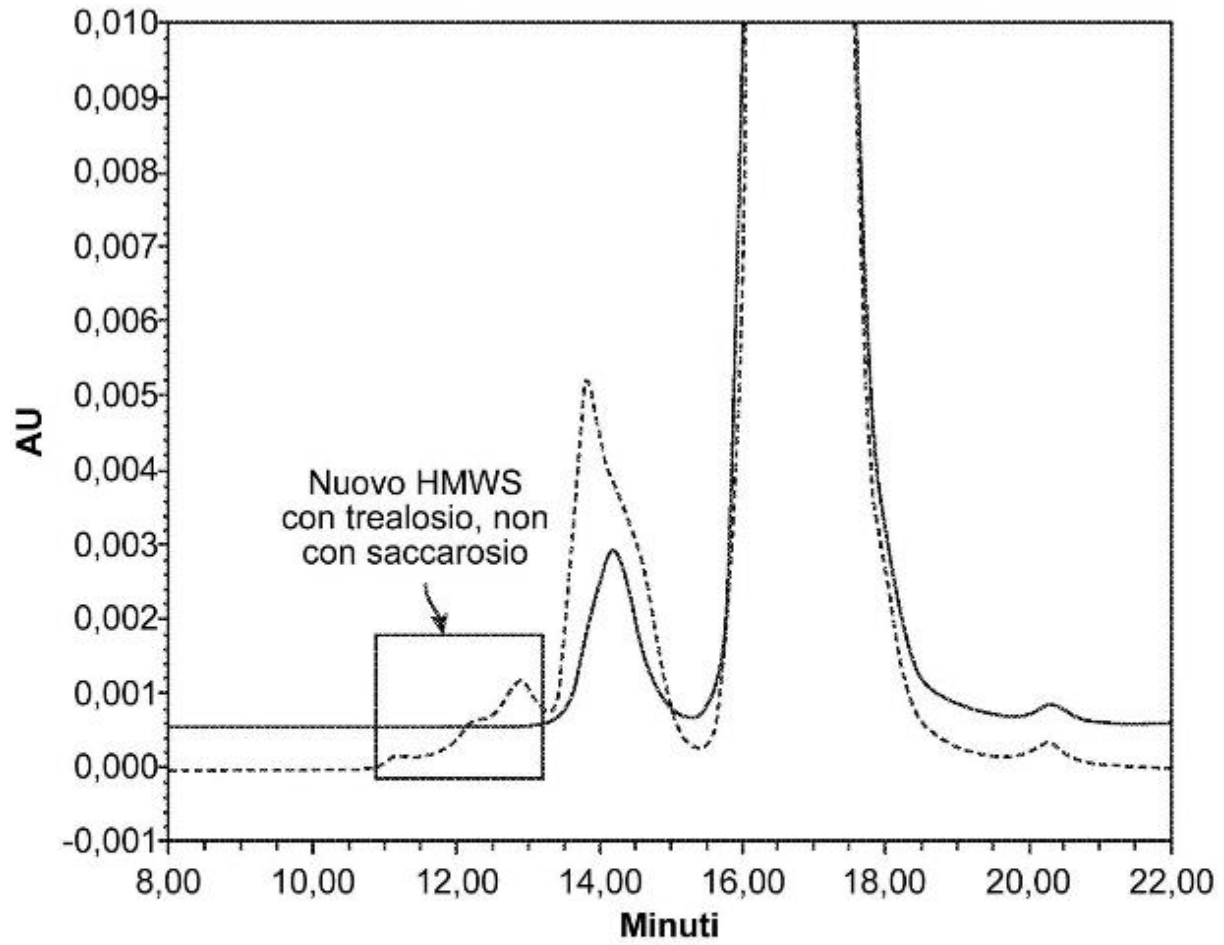
Profilo concentrazione-tempo medio geometrico di Trastuzumab sierico, con 667 U/ml, 1.000 U/ml o 2.000 U/ml di rHuPH20



GM = media geometrica

Le barre verticali, quando visualizzate, rappresentano intervalli di confidenza del percentile 2,5 o 97,5 sulla media geometrica.

52 settimane di sovrapposizione SEC di campioni di test S&S conservati a -20°C: trealosio (F3) vs saccarosio (F4)



----- F3_52s_-20°C_scalfittura; Iniezione 1;
20170420_scalfittura_52settimane; W2489 ChA280 nm

_____ F4_52s_-20°C_scalfittura; Iniezione 1;
20170420_scalfittura_52settimane; W2489 ChA280 nm

FIG. 29

Torbidità

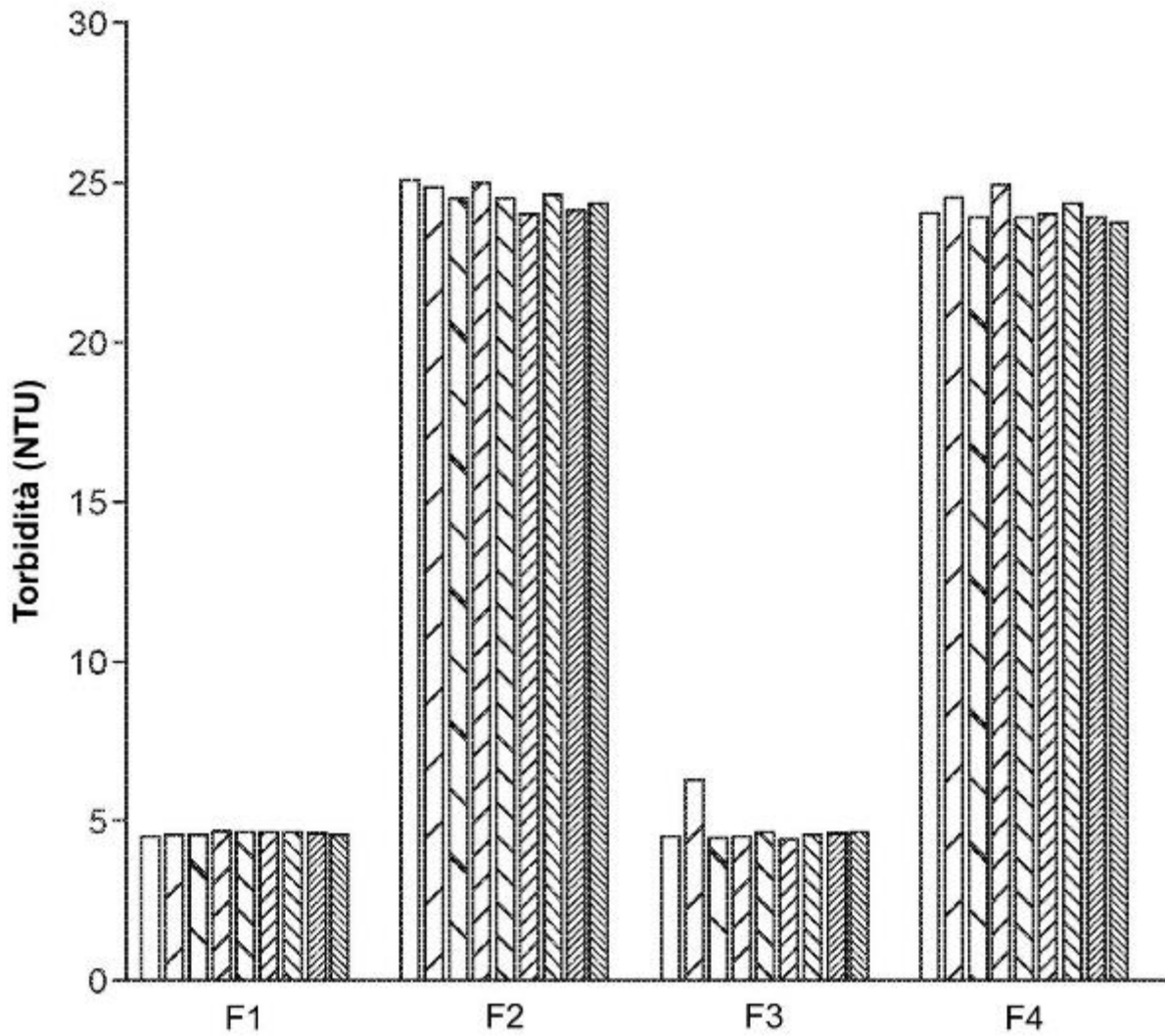


FIG. 30

HMW SEC

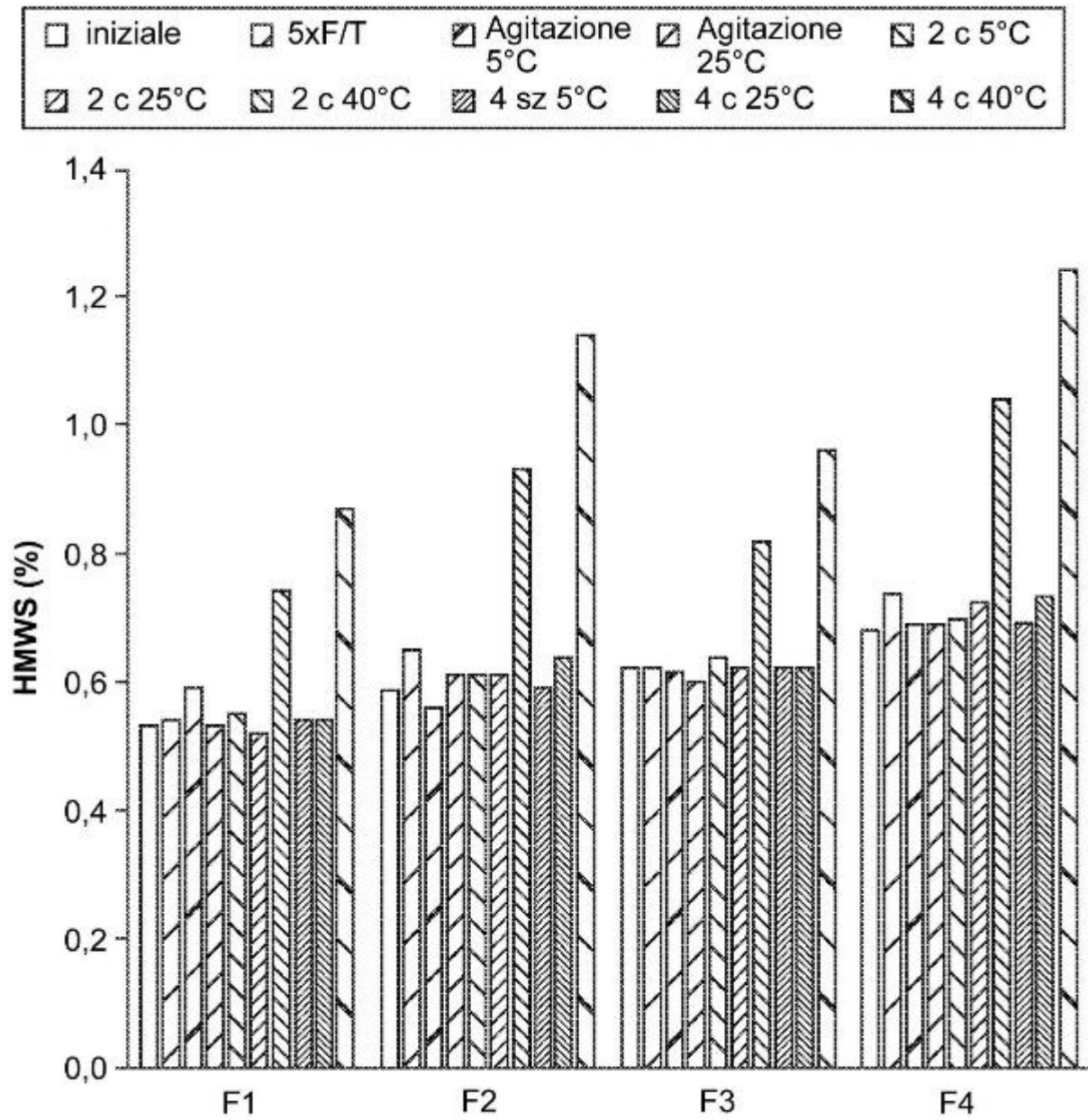


FIG. 31

PER TRADUZIONE CONFORME


 Marco Giovanni Mari
 USBM - CPI-090