

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992570** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.20

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.04.27

(54) СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К RANKL, А ТАКЖЕ СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/492,056

(32) 2017.04.28

(33) US

(86) PCT/US2018/029728

(87) WO 2018/200918 2018.11.01

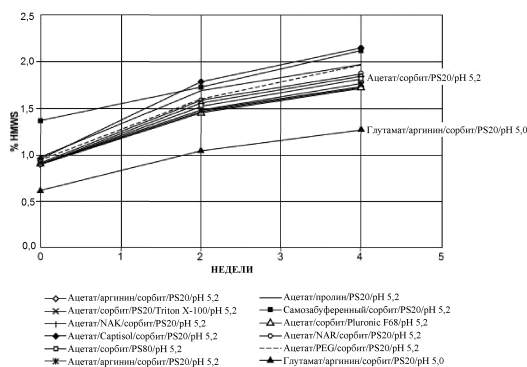
(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Брич Стивен Роберт, Вонг
Лиэнн М., Фэллон Джеймилл, Госс
Моника Мичелл, Гу Цзянь Хуа,
Гхаттивенкатакришна Паван К. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе раскрыты водные фармацевтические составы, содержащие деносумаб или другое человеческое моноклональное антитело к RANKL или его часть, а также характеристики pH, буферных систем и аминокислотных ингибиторов агрегации. Также раскрыты форма выпуска состава для применения, например, в виде одноразового флакона, одноразового шприца или стеклянного контейнера, способы применения составов и изделий для предупреждения или лечения заболеваний и соответствующие наборы.



A1

201992570

201992570

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-558478EA/018

СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К RANKL, А ТАКЖЕ СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственную заявку

[0001] Настоящим заявляется приоритет согласно 35 U.S.C. §119(e) по предварительной заявке на патент США №62/492056, поданной 28 апреля 2017 года, и ее раскрытие настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, включенный посредством ссылки во всей своей полноте, подается одновременно с настоящей заявкой и обозначен следующим образом: ASCII-файл (текстовый) размером 49 килобайт под названием "51689A_Seqlisting.txt," созданный 20 апреля 2018 г.

Предпосылки к созданию изобретения

Область техники, к которой относится изобретение

[0003] Настоящее изобретение относится к человеческим моноклональным антителам к RANKL, в том числе к высококонцентрированным водным составам на основе деносумаба и его биологическим аналогам.

Краткое описание родственных технологий

[0004] Деносумаб коммерчески доступен в форме растворов с концентрациями 60 мг/мл и 70 мг/мл.

[0005] Повышение концентрации белковых составов может вызывать проблемы со стабильностью, например, агрегацию, приводящую к образованию высокомолекулярных разновидностей (HMWS). HMWS, в частности, те, которые сохраняют большую часть нативной конфигурации мономерного аналога, могут представлять особую проблему в случае некоторых белковых составов. Также агрегация потенциально может воздействовать на подкожную биодоступность и фармакокинетику терапевтического белка.

[0006] Операции заполнения и окончательного концентрировать, а также введение, могут предусматривать стадии поступления растворов белка через поршневые насосы, перистальтические насосы или иглы для инъекций. Такие процессы могут создавать напряжение сдвига и механическое напряжение, которые могут вызывать денатурацию белков и приводить к агрегации. Это явление может усугубляться по мере того, как белковые растворы становятся более концентрированными.

Краткое описание

[0007] В настоящем изобретении впервые представлено раскрытие, демонстрирующее, что добавление аминокислотного ингибитора агрегации к водному раствору, содержащему высокую концентрацию антитела к RANKL, приводит к снижению количеству агрегатов антитела, образующихся со временем, а также замедляет

скорость образования таких агрегатов. В настоящем раскрытии также рассмотрено влияние pH на образование агрегатов в концентрированных водных растворах антитела к RANKL, где уменьшение образования агрегатов наблюдают, если pH водных растворов находится в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2. Кроме того, в настоящем раскрытии, представленном в данном документе, предполагается, что стабилизация антитела к RANKL происходит за счет взаимодействий между аминокислотным ингибитором агрегации и антителом. Без привязки к какой-либо конкретной теории, предусмотрено, что гидрофобные взаимодействия, а также другие типы межмолекулярных взаимодействий между аминокислотным ингибитором агрегации и антителом к RANKL оказывают стабилизирующее влияние на концентрированные растворы антител. Соответственно, настоящее раскрытие по настоящему изобретению относится к стабильным водным фармацевтическим составам, содержащим высокую концентрацию антитела к RANKL, при этом составы содержат низкие количества (например, менее приблизительно 2%) агрегатов.

[0008] Соответственно, один аспект настоящего раскрытия представляет собой водный фармацевтический состав, содержащий человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть в концентрации более 70 мг/мл и характеризующийся pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2.

[0009] Другой аспект настоящего раскрытия представляет собой водный фармацевтический состав, содержащий смесь человеческого моноклонального антитела к лиганду рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающей части и аминокислотного ингибитора агрегации. В иллюстративных аспектах аминокислотный ингибитор агрегации предусматривает аминокислоту, содержащую заряженную боковую цепь, ароматическую аминокислоту или гидрофобную аминокислоту. В иллюстративных случаях аминокислота, содержащая заряженную боковую цепь, представляет собой аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь, такую как, например, аргинин и лизин. В иллюстративных аспектах ароматическая аминокислота содержит фенил или индол. Необязательно, ароматическая аминокислота дополнительно содержит C₁-C₆алкильную цепь между альфа-углеродом и фенилом или индолом. Аминокислоты, в том числе, например, фенилаланин и триптофан, представляют собой иллюстративные аминокислотные ингибиторы агрегации. В иллюстративных случаях аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой гидрофобную аминокислоту, характеризующуюся показателем по шкале гидрофобности Кайта и Дулиттла, составляющим более приблизительно 2,5. Необязательно, гидрофобная аминокислота представляет собой валин, лейцин или изолейцин. Предусмотрены дополнительные аминокислотные ингибиторы агрегации, как описано в данном документе.

[0010] В иллюстративных случаях водный фармацевтический состав дополнительно содержит модификатор тоничности, поверхностно-активное вещество, буфер или любую их комбинацию.

[0011] Другой аспект настоящего раскрытия представляет собой форму выпуска состава для хранения или применения, например, в одноразовом флаконе, одноразовом шприце или стеклянном, футерованном стеклом или покрытом стеклом первичном контейнере. Иллюстративный аспект настоящего раскрытия представляет собой контейнер, необязательно флакон, предварительно заполненный шприц (PFS) или стеклянный контейнер, содержащие любой из водных фармацевтических составов, описанных в данном документе. В иллюстративных случаях контейнер содержит водный фармацевтический состав в объеме приблизительно 1 мл или меньше (например, приблизительно 0,5 мл).

[0012] В другом аспекте настоящего раскрытия представлены способы получения стабильного водного фармацевтического состава, содержащего человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть, предусматривающие объединение моноклонального антитела к RANKL или его антигенсвязывающей части в концентрации более 70 мг/мл с аминокислотным ингибитором агрегации, буфером, поверхностно-активным веществом и необязательно модификатором тоничности. Аспекты раскрытия включают стабильный водный фармацевтический состав, полученный в соответствии с любым из способов получения стабильного водного фармацевтического состава, описанного в данном документе.

[0013] В другом аспекте настоящего изобретения представлены способы применения состава, описываемого в данном документе, для предупреждения или лечения заболевания, реагирующего на человеческое моноклональное антитело к RANKL или его антигенсвязывающую часть. В иллюстративных аспектах применение охватывает терапевтическое лечение субъекта, охватывающее лечение или предупреждение костного осложнения (SRE), лечение или предупреждение гигантоклеточной опухоли кости, лечение или предупреждение гиперкальциемии злокачественного новообразования, лечение или предупреждение остеопороза или увеличение костной массы у субъекта. Например, терапевтическое лечение охватывает: (a) лечение или предупреждение SRE у субъекта с метастазами солидных опухолей в кости, (b) лечение или предупреждение SRE у субъекта, который является взрослым или достигшим скелетной зрелости подростком с гигантоклеточной опухолью кости, которая является неоперабельной или хирургическая резекция которой вероятно приведет к тяжелым осложнениям, (c) лечение гиперкальциемии злокачественного новообразования, резистентного к терапии бисфосфонатами, у субъекта, (d) лечение или предупреждение SRE у субъекта с множественной миеломой или с метастазами солидной опухоли в кости, (e) лечение остеопороза у постменопаузных женщин с высоким риском перелома, (f) лечение, направленное на увеличение костной массы у женщин с высоким риском перелома, получающих адъювантную терапию ингибитором ароматазы при раке молочной железы, (g) лечение, направленное на увеличение костной массы у мужчин с высоким риском перелома, получающих антиандрогенную терапию при неметастатическом раке предстательной железы, (h) лечение для увеличения костной массы у мужчин с

остеопорозом с высоким риском перелома, (i) терапию с помощью кальция или витамина D.

[0014] Дополнительные аспекты настоящего раскрытия включают способ предупреждения костного осложнения (SRE) у нуждающегося в этом пациента, способ лечения гигантоклеточной опухоли кости у нуждающегося в этом пациента, способ лечения гиперкальциемии злокачественного новообразования у нуждающегося в этом пациента, способ лечения остеопороза у нуждающегося в этом пациента и способ увеличения костной массы у нуждающегося в этом пациента. Способы предусматривают введение пациенту эффективного количества любого из составов, описанных в данном документе. В иллюстративных случаях состав доставляется пациенту подкожным путем.

[0015] В другом аспекте настоящего раскрытия представлено применение деносумаба или другого человеческого моноклонального антитела к RANKL или его антигенсвязывающей части при производстве описываемого в данном документе лекарственного препарата для лечения пациента, нуждающегося в человеческом моноклональном антителе к RANKL.

[0016] Другой аспект настоящего раскрытия представляет собой набор, включающий композицию или изделие, описанные в данном документе, вместе с листком-вкладышем, этикеткой, инструкциями или другой маркировкой, в которой указаны или раскрыты любые из способов или вариантов осуществления, раскрытых в данном документе.

[0017] Другой аспект настоящего раскрытия представляет собой способ улучшения стабильности водного фармацевтического состава, включающего человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть в концентрации более 70 мг/мл, предусматривающий стадию получения водного фармацевтического состава, включающего человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть, при pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2, где водный фармацевтический состав демонстрирует улучшенную стабильность при pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2 по сравнению с эквивалентным водным фармацевтическим составом, pH которого не находится в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2.

[0018] Другой аспект настоящего раскрытия представляет собой способ улучшения стабильности водного фармацевтического состава, включающего человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть, предусматривающий стадию получения водного фармацевтического состава, содержащего человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть в смеси с аминокислотным ингибитором агрегации, где водный фармацевтический состав с

аминокислотным ингибитором агрегации демонстрирует улучшенную стабильность по сравнению с эквивалентным водным фармацевтическим составом без аминокислотного ингибитора агрегации.

[0019] Другой аспект настоящего раскрытия представляет собой способ снижения уровня агрегатов HMWS в растворе деносуаба или другого человеческого моноклонального антитела к RANKL.

[0020] Дополнительные аспекты и преимущества будут очевидны для специалистов в данной области техники при ознакомлении со следующим подробным описанием, приведенном в сочетании с фигурами. Несмотря на то, что композиции, изделия и способы допускают варианты осуществления в различных формах, приведенное ниже описание включает конкретные варианты осуществления с пониманием того, что настоящее раскрытие является иллюстративным и не предназначено для ограничения настоящего изобретения конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Предусмотрено, что в случае композиций, изделий и способов, описанных в данном документе, необязательные признаки, в том числе без ограничения компоненты, их диапазоны в композициях, заместители, условия и стадии, следует выбирать из различных аспектов, вариантов осуществления и примеров, представленных в данном документе.

Краткое описание графических материалов

[0021] На фигурах 1, 2 и 8 показан процент HMWS, отслеживаемых с помощью SE-UHPLC, в зависимости от состава и времени при 37°C для различных высококонцентрированных составов на основе деносуаба. Легенда на фигуре 1 соответствует сокращенным названиям составов, приведенным в таблице 1. Легенда на фигуре 8 соответствует букве, представленной в таблице 5.

[0022] На фигуре 3 представлены хроматограммы, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии, для различных высококонцентрированных составов на основе деносуаба после хранения при 37°C в течение 1 месяца. Легенда на фигуре 3 соответствует сокращенным названиям составов, приведенным в таблице 2.

[0023] Фигура 4 представляет собой график % HMWS, отслеживаемых с помощью SE-UHPLC, в зависимости от времени для каждого состава с соответствующим № F, показанным в таблице 3A.

[0024] Фигура 5 представляет собой пару хроматограмм, полученных с помощью эксклюзионной хроматографии, для составов, перечисленных в таблице 3A. Легенда на фигуре 5 соответствует названию состава, указанному в таблице 3B.

[0025] Фигура 6 представляет собой график % HMWS, отслеживаемых с помощью SE-UHPLC, в зависимости от времени хранения при 37°C для каждого состава с соответствующим № F, показанным в таблице 4A.

[0026] На фигуре 7A показаны хроматограммы, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии, для составов при pH 4,8, концентрация деносуаба в которых указана в таблице 4A.

[0027] На фигуре 7B показаны хроматограммы, полученные с помощью

эксклюзионной хроматографии, для составов при pH 5,1, концентрация деносуаба в которых указана в таблице 4А.

[0028] На фигуре 9 представлен график % HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от времени хранения при 37°C для каждого состава с соответствующим № F, показанным в таблице 6В.

[0029] На фигуре 10 представлены хроматограммы, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии, в зависимости от состава после хранения при 37°C в течение 1 месяца для составов с названием, указанным в таблице 6В.

[0030] Фигура 11А представляет собой график процента HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от времени при 37°C для состава с буквой, указанной в таблице 7В.

[0031] Фигура 11В представляет собой график процента HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от времени при 40°C для состава с буквой, указанной в таблице 7С.

[0032] На фигуре 12А показаны хроматограммы, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии, для составов из таблицы 7В.

[0033] На фигуре 12В показаны хроматограммы, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии, для составов из таблицы 7С.

[0034] Фигуры 13, 14 и 15 представляют собой графики процента HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от времени хранения при 37°C для каждого состава с соответствующей буквой состава, показанной в таблице 8А. Фигуры 16, 17 и 18 представляют собой наложения хроматограмм для составов, перечисленных в таблице 8А, после хранения при 37°C в течение 1 месяца. Фигуры 13 и 16 относятся к составам, содержащим ароматические аминокислоты, фигуры 14 и 17 относятся к составам, содержащим полярные/заряженные аминокислоты, а фигуры 15 и 18 относятся к составам, содержащим гидрофобные аминокислоты.

[0035] Фигуры 19–24 представляют собой графики % включения дейтерия при 4°C в зависимости от времени (log (с)) для аминокислот 28–33 легкой цепи (фигура 19), аминокислот 108–116 легкой цепи (фигура 20), аминокислот 125–132 легкой цепи (фигура 21), аминокислот 47–59 тяжелой цепи (фигура 22), аминокислот 243–253 тяжелой цепи (фигура 23) и аминокислот 392–399 тяжелой цепи (фигура 24) в случае каждого из составов 35–38.

[0036] Фигуры 25–30 представляют собой графики % включения дейтерия при 37°C в зависимости от времени (log (с)) для аминокислот 28–33 легкой цепи (фигура 25), аминокислот 108–117 легкой цепи (фигура 26), аминокислот 124–131 легкой цепи (фигура 27), аминокислот 47–59 тяжелой цепи (фигура 28), аминокислот 242–253 тяжелой цепи (фигура 29) и аминокислот 392–399 тяжелой цепи (фигура 30) в случае каждого из составов 35–38.

[0037] Фигура 31 представляет собой график процента HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от функция состава и времени при 37°C с названием

состава, указанным в таблице 10.

[0038] Фигура 32 представляет собой график процента LMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от состава и времени при 37°C с названием состава, указанным в таблице 11.

[0039] Фигура 33 представляет собой график процента HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от функция состава и времени при 37°C с названием состава, указанным в таблице 12.

[0040] Фигура 34 представляет собой график процента LMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от состава и времени при 37°C с названием состава, указанным в таблице 13.

[0041] Фигура 35 представляет собой график процента HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от функция состава и времени при 37°C с названием состава, указанным в таблице 14.

[0042] Фигура 36 представляет собой график процента LMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от состава и времени при 37°C с названием состава, указанным в таблице 15.

[0043] Фигура 37 представляет собой наложения хроматограмм, полученных с помощью эксклюзионной хроматографии, для каждого состава с названием состава, указанным в таблице 10.

[0044] Фигура 38 представляет собой наложения хроматограмм, полученных с помощью эксклюзионной хроматографии, для каждого состава с названием состава, указанным в таблице 12.

[0045] Фигура 39 представляет собой наложения хроматограмм, полученных с помощью эксклюзионной хроматографии, для каждого состава с названием состава, указанным в таблице 14.

[0046] Фигуры 40А и 40В представляют собой графики, содержащие кривые изотермической химической денатурации деносуаба в отсутствие аргинина при pH 4,5, 4,8 и 5,0. Фигура 40А представляет собой график доли денатурированного деносуаба в зависимости от концентрации денатурирующего средства. Фигура 40В представляет собой график, на который нанесена $dF/d[\text{денатурирующего средства}]$ в зависимости от концентрации денатурирующего средства.

[0047] Фигуры 41А и 41В представляют собой графики, на которых изображены кривые изотермической химической денатурации деносуаба в присутствии 75 мМ аргинина–HCl при pH 4,5, 4,8 и 5,2. Фигура 41А представляет собой график доли денатурированного деносуаба в зависимости от концентрации денатурирующего средства. Фигура 41В представляет собой график, на который нанесена $dF/d[\text{денатурирующего средства}]$ в зависимости от концентрации денатурирующего средства.

[0048] Фигуры 42 и 43 представляют собой графики процента HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от времени при 25°C в течение 3

месяцев и 37°C в течение 2 месяцев, соответственно, для состава с названием состава, приведенным в таблице 17.

Подробное описание

[0049] Было бы желательно обеспечить более концентрированный водный раствор деносуаба и других человеческих антител к RANKL и их антигенсвязывающих частей, который был бы такими же стабильным или более стабильным, чем разбавленные растворы. Более концентрированный раствор мог бы быть более комфортным для пациента, например, за счет введения меньшего объема, такого как инъекция 1 мл, для доставки 120 мг активного вещества, такого как деносуаб, вместо инъекции 1,7 мл или 2 мл более разбавленного состава активного вещества. Кроме того, это обеспечило бы даже меньший объем инъекционного раствора для доставки более низкой дозы активного вещества, например, 0,5 мл при концентрации деносуаба 120 мг/мл для доставки дозы 60 мг. Также было бы желательно обеспечить водный раствор деносуаба и других человеческих антител к RANKL и их антигенсвязывающих частей, который является более стабильным, чем растворы, известные из уровня техники. Стабильный концентрированный состав также будет иметь другие преимущества, такие как обеспечение обработки и транспортировки меньших объемов продукта и обеспечение более длительного срока хранения продуктов.

[0050] Агрегаты в биологических продуктах могут отличаться по происхождению, размеру и типу. Агрегаты, которые могут воздействовать на эффективность или безопасность биологического продукта, представляют собой особую проблему, например, агрегаты, которые могут усиливать иммунные ответы и вызывать неблагоприятные клинические эффекты. Высокомолекулярные агрегаты, иначе называемые высокомолекулярные разновидности (HMWS), в частности, те, которые сохраняют большую часть нативной конфигурации мономерного аналога, могут представлять особую проблему. Также агрегация потенциально может воздействовать на подкожную биодоступность и фармакокинетику терапевтического белка.

[0051] Причины образования агрегатов могут быть различными. Обычно агрегация белка происходит в результате конформационной нестабильности, которая является результатом изменений структуры белка, и коллоидной нестабильности, при которой преобладают межмолекулярные силы. В случае если для индуцирования осаждения требуется критическое событие нуклеации, кинетика агрегации белка может характеризоваться включением фазы времени задержки.

[0052] Агрегация, обусловленная конформационной нестабильностью, охватывает стадии разворачивания и ассоциации. Разворачивание молекулы белка открывает гидрофобные аминокислотные остатки. Затем гидрофобные остатки развернутых молекул могут претерпевать ассоциацию, что приводит к агрегации (например, в виде димеров, тримеров, других мультимеров и агрегатов высокого порядка). Такие ассоциации зависимы от концентрации. Увеличение концентрации белка в водном растворителе обычно увеличивает скорость и степень агрегации, включая термически индуцированную агрегацию. Таким образом, добавки, которые воздействуют на свободную энергию

разворачивания белка в растворе, могут воздействовать на конформационную стабильность.

[0053] Коллоидная нестабильность приводит к агрегатам, образующимся за счет сил внутримолекулярной ассоциации белок–белок. На такие силы может воздействовать один или несколько факторов, включая ионную силу, pH раствора и типы буферов.

[0054] Деносумаб коммерчески доступен в форме растворов с концентрациями 60 мг/мл и 70 мг/мл. Попытки составлять растворы деносумаба с более высокой концентрацией с применением тех же вспомогательных веществ показали, что более высокая концентрация воздействует на стабильность продукта в виде сопутствующего и пропорционального увеличения HMWS. Например, концентрация деносумаба, составляющая 120 мг/мл, более чем на 70% превышает концентрацию деносумаба, составляющую 70 мг/мл, и в два раза превышает концентрацию 60 мг/мл.

[0055] Соответственно, стабилизированный водный состав по настоящему раскрытию будет противостоять образованию агрегатов в большей степени, чем ранее известные составы. Один аспект настоящего раскрытия представляет собой стабилизированный водный состав, характеризующийся pH от 5,0 до менее 5,2. Другой неисключающий аспект настоящего раскрытия представляет собой стабилизированный водный состав, включающий аминокислотный ингибитор агрегации. Также представлены соответствующие дозированные формы выпуска, например, в виде одноразовых флаконов, шприцев и стеклянных контейнеров, и связанные с ними способы лечения. Также представлены способы получения стабильных водных фармацевтических составов.

[0056] Как описано ниже, pH и аминокислотный ингибитор агрегации (например, аргинин, дипептид аргинин–аргинин, дипептид аргинин–фенилаланин) представляю собой два средства воздействия, которые, как показано, снижают уровень HMWS и скорость образования HMWS деносумаба при 120 мг/мл. HMWS можно описать как продукты межмолекулярных белковых взаимодействий, которые являются либо необратимыми (например, продукты ковалентных взаимодействий), либо обратимыми (например, продукты нековалентных самоассоциированных взаимодействий). Известны четыре общепринятых причины реакций самоассоциации белков, которые могут приводить к увеличению вязкости и образованию HMWS; гидрофобные, заряженные, полярные и дипольные взаимодействия. Как pH состава, так и аргинин (высокозаряженная основная аминокислота при значениях pH от нейтральных до кислых) могут противодействовать межмолекулярным силам заряженного белка. Безотносительно к какой-либо конкретной теории, не исключено, что образование HMWS деносумаба при 120 мг/мл основано на заряде белка, и такие изменения состава разрушают силы заряда, вовлеченные в механизм образования HMWS. Кроме того, безотносительно к какой-либо конкретной теории, не исключено, что при образовании HMWS также могут происходить взаимодействия самоассоциации гидрофобного белка, поскольку аргинин содержит короткую алифатическую цепь углеводов в боковой цепи. Такая алифатическая цепь может нарушать гидрофобные взаимодействия между белками. Эта идея дополнительно

подтверждается при включении в состав фенилаланина, что приводит к дополнительному снижению уровней HMWS. Без привязки к какой-либо конкретной теории, аргинин стабилизирует антитело к RANKL способом, отличным от такового для фенилаланина, так что, если аргинин взаимодействует с антителом посредством гидрофобных взаимодействий, то аргинин может взаимодействовать с антителом с помощью одного или нескольких других путей.

[0057] Другие вспомогательные вещества, которые потенциально могут оказывать положительное влияние на снижение уровня и скорость образования HMWS, могут иметь положительно заряженную группу при значениях pH от нейтральных до кислых, аналогичную таковой у аргинина, и/или могут быть гидрофобными по природе, аналогично фенилаланину. Примеры таких вспомогательных веществ могут включать лизин, N-ацетиларгинин, N-ацетиллизин, тирозин, триптофан и лейцин.

[0058] Предполагают, что составы, дозированные формы выпуска и способы включают варианты осуществления, включающие любую комбинацию одного или нескольких дополнительных необязательных элементов, признаков и стадий, дополнительно описанных ниже (в том числе показанных на фигурах), если не указано иное.

[0059] В странах и на территориях, в которых запрещено патентование способов, осуществляемых на практике в отношении организма человека, значение "введения" композиции человеку должно ограничиваться назначением контролируемого вещества, которое человек будет самостоятельно вводить с помощью любой методики (например, перорально, в виде ингаляции, в качестве местного нанесения, инъекции, вставки и т. д.). Предусматривается самая широкая приемлемая интерпретация, которая согласуется с законами или правилами, определяющими патентоспособность объекта изобретения. В странах и территориях, в которых не запрещено патентование способов, осуществляемых на практике в отношении организма человека, "введение" композиций включает как способы, осуществляемых на практике в отношении организма человека, так и вышеупомянутые действия.

[0060] Используемый в данном документе термин "содержащий" указывает на потенциальное включение других средств, элементов, стадий или признаков, в дополнение к указанным.

[0061] Следует понимать, что каждое максимальное числовое ограничение, приводимое на протяжении всего настоящего описания, в качестве альтернативных аспектов включают диапазоны, образованные каждым соответствующим более низким числовым ограничением, как если бы такие диапазоны были указаны явным образом. Каждое минимальное числовое ограничение, приводимое на протяжении всего настоящего описания, в качестве альтернативных аспектов будет включать диапазоны, образованные каждым более высоким числовым ограничением, как если бы такие диапазоны были указаны явным образом. Каждый числовой диапазон, приводимый на протяжении всего настоящего описания, будет включать каждый более узкий числовой диапазон, который

находится в пределах такого более широкого числового диапазона, как если бы все такие более узкие числовые диапазоны были указаны явным образом в данном документе. Следует понимать, что размеры и значения, раскрытые в данном документе, охватывают раскрытие и приведенного значения, и соответствующего точного числового значения, например, следует понимать, что значение, описанное как "приблизительно 10 мМ", включает в качестве альтернативного раскрытия "10 мМ".

[0062] Используемые в данном документе термины "терапевтически эффективное количество" относятся к количеству соединения, достаточному для лечения, улучшения или предупреждения указанного заболевания или состояния или для демонстрации обнаруживаемого терапевтического, профилактического или ингибирующего эффекта. Например, эффект можно обнаруживать по улучшению клинического состояния или уменьшению симптомов. Точное эффективное количество для субъекта будет зависеть от массы тела, размера и здоровья субъекта; природы и степени выраженности состояния; а также терапевтического средства или комбинации терапевтических средств, выбранных для введения. Если лекарственное средство было одобрено Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA), то "терапевтически эффективное количество" относится к дозировке, утвержденной FDA или аналогичным зарубежным агентством для лечения указанного заболевания или состояния.

[0063] В настоящем раскрытии представлены стабилизированные (или стабильные) водные фармацевтические составы, что демонстрирует сниженные количества агрегатов и/или сниженная скорости образования агрегатов после хранения. Как описано в данном документе, на стабильность таких составов указывает сниженные количества HMWS и/или сниженные скорости образования HMWS после хранения в течение различных периодов времени и при различных температурах. Как правило, составам с более высокой стабильностью соответствуют более низкие количества HMWS, более низкие скорости образования HMWS и/или более высокие главные пики антител при более высоких температурах хранения в сравнении с более низкими температурами. Используемый в данном документе термин "высокомолекулярные разновидности" или "HMWS" относится к агрегатам высокого порядка из антитела в составах, а также к агрегатам низкого порядка из антитела в составах. Например, агрегаты низкого порядка включают димерные разновидности. Количества и скорости образования агрегатов можно измерять или отслеживать посредством таких методик, как, например, SE-UHPLC. В некоторых случаях на хроматограммах антитела, полученных с помощью SE-UHPLC, отмечается пик приблизительно в 5,8 минуты, представляющий количество HMWS в водном фармацевтическом составе, пик приблизительно в 6,7 минуты, представляющий димерные разновидности, и пик приблизительно в 8,0 минуты, отражающий количество интактных неагрегированных форм антитела. В сравнении с хранением при 4°C хранение при 37°C позволяет ускорить анализ стабильности, так что стабильность конкретного состава можно определить за более короткий период времени, в сравнении с таковым при периоде хранения при 4°C. Например, хранение при 37°C в течение 1, 2 или 3 месяцев может

указывать или прогнозировать хранение при 4°C в течение 36 месяцев.

[0064] В одном варианте осуществления стабилизированный состав, описанный в данном документе, будет демонстрировать сниженную степень и скорость образования HMWS после 3 месяцев хранения при 37°C в сравнении с контрольным составом с эквивалентной концентрацией, состоящим из 10 mM ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, 0,01% (вес/объем) полисорбата-20 в качестве вспомогательных веществ и имеющим pH раствора 5,2.

[0065] В другом варианте осуществления стабилизированный состав, описанный в данном документе и включающий аминокислотный ингибитор агрегации, будет демонстрировать сниженную степень образования HMWS после 1 месяца хранения при 37°C по сравнению с эквивалентным контрольным составом без аминокислотного ингибитора агрегации. Например, степень образования может быть снижена, так что % количество HMWS, определенное с помощью SE-UPHLC, снижается на по меньшей мере приблизительно 0,1%, или на приблизительно 0,2%, или на приблизительно 0,3%, или на приблизительно 0,4%, или на приблизительно 0,5%, или на приблизительно 0,6%, или на приблизительно 0,7%, например, в диапазоне от приблизительно 0,1% до приблизительно 2%, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 1%, по сравнению с контрольным составом после 1 месяца хранения при 37°C.

[0066] В другом варианте осуществления стабилизированный состав, описываемый в данном документе, будет характеризоваться низким количеством HMWS после хранения в течение 1 месяца при 37°C, как определено с помощью SE-UHPLC. Например, количество HMWS может составлять не более 2%, или менее 2%, или не более 1,9%, или менее 1,9%, или не более 1,8%, или менее 1,8%, или не более 1,7%, или менее 1,7%, или не более 1,6%, или менее 1,6%, или не более 1,5%, или менее 1,5%, или не более 1,4%, или менее 1,4%, или не более 1,3%, или менее 1,3%, или не более 1,2%, или менее 1,2%, например, в диапазоне от приблизительно 0,01% до приблизительно 2%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,9%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,8%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,7%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,6%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,5%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,4%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,3% или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,2%. В другом варианте осуществления количество HMWS после хранения в течение 1 месяца при 37°C, определенное с помощью SE-UHPLC, может составлять более 2%, например, более 2% и до 3%, в то время как снижение скорости агрегации, обеспечиваемое за счет аминокислотного ингибитора агрегации, будет обеспечивать подходящий срок хранения продукта, например, до трех лет или до двух лет.

[0067] В другом варианте осуществления стабилизированный состав, описываемый в данном документе, будет характеризоваться низким количеством HMWS после хранения в течение 3 месяцев при 37°C, как определено с помощью SE-UHPLC. Например, количество HMWS может составлять не более 2%, или менее 2%, или не более 1,9%, или

менее 1,9%, или не более 1,8%, или менее 1,8%, или не более 1,7%, или менее 1,7%, или не более 1,6%, или менее 1,6%, или не более 1,5%, или менее 1,5%, или не более 1,4%, или менее 1,4%, или не более 1,3%, или менее 1,3%, или не более 1,2%, или менее 1,2%, например, в диапазоне от приблизительно 0,01% до приблизительно 2%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,9%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,8%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,7%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,6%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,5%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,4%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,3% или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,2%.

[0068] В другом варианте осуществления стабилизированный состав, описываемый в данном документе, будет характеризоваться низким количеством HMWS после хранения в течение 36 месяцев при 4°C, как определено с помощью SE-UHPLC. Например, количество HMWS может составлять не более 2%, или менее 2%, или не более 1,9%, или менее 1,9%, или не более 1,8%, или менее 1,8%, или не более 1,7%, или менее 1,7%, или не более 1,6%, или менее 1,6%, или не более 1,5%, или менее 1,5%, или не более 1,4%, или менее 1,4%, или не более 1,3%, или менее 1,3%, или не более 1,2%, или менее 1,2%, например, в диапазоне от приблизительно 0,01% до приблизительно 2%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,9%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,8%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,7%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,6%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,5%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,4%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,3% или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,2%.

[0069] В другом варианте осуществления стабилизированный состав, описываемый в данном документе, будет характеризоваться высоким количеством главного пика деносуаба или другого антитела (или его антигенсвязывающей части) после хранения в течение 1 месяца при 37°C, как определено с помощью SE-UHPLC. Например, количество главного пика может составлять по меньшей мере 95%, или более 95%, или по меньшей мере 96%, или более 96%, или по меньшей мере 97%, или более 97%, или по меньшей мере 97,5% или более 97,5%, или по меньшей мере 98%, или более 98%, или по меньшей мере 98,1%, или более 98,1%, или по меньшей мере 98,2%, или более 98,2%, или по меньшей мере 98,3%, или более 98,3%, или по меньшей мере 98,4%, или более 98,4%, или по меньшей мере 98,5%, или более 98,5%, или по меньшей мере 98,6%, или более 98,6%, например в диапазоне приблизительно от 95% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 96% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 97% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 97,5% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,1% до приблизительно 99,9% или от приблизительно 98,2% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,3% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,4% до приблизительно 99,9%, или от

приблизительно 98,5% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,6% до приблизительно 99,9%.

[0070] В другом варианте осуществления стабилизированный состав, описываемый в данном документе, будет характеризоваться высоким количеством главного пика деносуаба или другого антитела (или его антигенсвязывающей части) после хранения в течение 3 месяцев при 37°C, как определено с помощью SE–UHPLC. Например, количество главного пика может составлять по меньшей мере 95%, или более 95%, или по меньшей мере 96%, или более 96%, или по меньшей мере 97%, или более 97%, или по меньшей мере 97,5% или более 97,5%, или по меньшей мере 98%, или более 98%, или по меньшей мере 98,1%, или более 98,1%, или по меньшей мере 98,2%, или более 98,2%, или по меньшей мере 98,3%, или более 98,3%, или по меньшей мере 98,4%, или более 98,4%, или по меньшей мере 98,5%, или более 98,5%, или по меньшей мере 98,6%, или более 98,6%, например в диапазоне приблизительно от 95% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 96% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 97% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 97,5% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,1% до приблизительно 99,9% или от приблизительно 98,2% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,3% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,4% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,5% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,6% до приблизительно 99,9%.

[0071] В другом варианте осуществления стабилизированный состав, описываемый в данном документе, будет характеризоваться высоким количеством главного пика деносуаба или другого антитела (или его антигенсвязывающей части) после хранения в течение 36 месяцев при 4°C, как определено с помощью SE–UHPLC. Например, количество главного пика может составлять по меньшей мере 95%, или более 95%, или по меньшей мере 96%, или более 96%, или по меньшей мере 97%, или более 97%, или по меньшей мере 97,5% или более 97,5%, или по меньшей мере 98%, или более 98%, или по меньшей мере 98,1%, или более 98,1%, или по меньшей мере 98,2%, или более 98,2%, или по меньшей мере 98,3%, или более 98,3%, или по меньшей мере 98,4%, или более 98,4%, или по меньшей мере 98,5%, или более 98,5%, или по меньшей мере 98,6%, или более 98,6%, например в диапазоне приблизительно от 95% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 96% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 97% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 97,5% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,1% до приблизительно 99,9% или от приблизительно 98,2% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,3% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,4% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,5% до приблизительно 99,9%, или от приблизительно 98,6% до приблизительно 99,9%.

[0072] В дополнительных вариантах осуществления предусмотрено, что после хранения стабилизированный состав будет характеризоваться как низким содержанием

HMWS, так и высоким содержанием главного пика, соответствующим представленному выше описанию.

[0073] В иллюстративных аспектах после хранения водные фармацевтические составы содержат не более приблизительно 4% высокомолекулярных разновидностей (HMWS) и/или содержат более приблизительно 96% главного пика антитела, как измерено с помощью SE-UHPLC. В иллюстративных аспектах после хранения водные фармацевтические составы содержат не более приблизительно 3% высокомолекулярных разновидностей (HMWS) и/или содержат более приблизительно 97% главного пика антитела, как измерено с помощью SE-UHPLC. В иллюстративных аспектах после хранения водные фармацевтические составы содержат менее приблизительно 2% HMWS и/или более приблизительно 98% главного пика антитела, как измерено с помощью SE-UHPLC. В иллюстративных аспектах хранение происходит при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C (например, приблизительно 2°C, приблизительно 3°C, приблизительно 4°C, приблизительно 5°C, приблизительно 6°C, приблизительно 7°C, приблизительно 8°C) в течение по меньшей мере 12 месяцев, 24 месяцев или 36 месяцев (например, по меньшей мере или приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере или приблизительно 16 месяцев, по меньшей мере или приблизительно 20 месяцев, по меньшей мере или приблизительно 24 месяца, по меньшей мере или приблизительно 28 месяцев, по меньшей мере или приблизительно 32 месяца, по меньшей мере или приблизительно 36 месяцев, необязательно, дольше). В иллюстративных аспектах хранение проводится при температуре от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C (например, от приблизительно 21°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 22°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 23°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 24°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 25°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 26°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 27°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 28°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 28°C до приблизительно 30°C, от приблизительно 20°C до приблизительно 29°C, приблизительно 20°C до приблизительно 28°C, от приблизительно 20°C до приблизительно 27°C, от приблизительно 20°C до приблизительно 26°C, от приблизительно 20°C до приблизительно 25°C, от приблизительно 20°C до приблизительно 24°C, от приблизительно 20°C до приблизительно 23°C, от приблизительно 20°C до приблизительно 22°C) в течение приблизительно 1 месяца (например, приблизительно 26 дней, приблизительно 27 дней, приблизительно 28 дней, приблизительно 29 дней, приблизительно 30 дней, приблизительно 31 дня, приблизительно 32 дней, приблизительно 33 дней, приблизительно 34 дней, приблизительно 35 дней, приблизительно 36 дней). В иллюстративных аспектах хранение предусматривает первичное хранение, за которым следует вторичное хранение, при этом первичное хранение происходит при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C в течение по меньшей мере 12 месяцев, 24 месяцев или 36 месяцев, а вторичное хранение происходит при температуре от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C в течение приблизительно 1 месяца. В иллюстративных случаях

водные фармацевтические составы содержат не более 2% HMWS, или менее 2% HMWS, или не более 1,9% HMWS, или менее 1,9% HMWS, или не более 1,8% HMWS, или менее 1,8% HMWS, или не более 1,7% HMWS, или менее 1,7% HMWS, или не более 1,6% HMWS, или менее 1,6% HMWS, или не более 1,5% HMWS, или менее 1,5% HMWS, или не более 1,4% HMWS, или менее 1,4% HMWS, или не более 1,3% HMWS, или менее 1,3% HMWS, или не более 1,2% HMWS, или менее 1,2% HMWS, например, в диапазоне от приблизительно 0,01% до приблизительно 2% HMWS, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,9% HMWS, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,8% HMWS, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,7% HMWS, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,6% HMWS, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,5% HMWS, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,4% HMWS, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,3% HMWS, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 1,2% HMWS, необязательно, как измерено с помощью SE-UHPLC. В альтернативных или дополнительных аспектах водные фармацевтические составы содержат более 98% главного пика антитела, или по меньшей мере 95% главного пика антитела, или более 95% главного пика антитела, или по меньшей мере 96% главного пика антитела, или более 96% главного пика антитела, или по меньшей мере 97% главного пика антитела, или более 97% главного пика антитела, или по меньшей мере 97,5% главного пика антитела, или более 97,5% главного пика антитела, или по меньшей мере 98% главного пика антитела, или более 98% главного пика антитела, или по меньшей мере 98,1% главного пика антитела, или более 98,1% главного пика антитела, или по меньшей мере 98,2% главного пика антитела, или более 98,2% главного пика антитела, или по меньшей мере 98,3% главного пика антитела, или более 98,3% главного пика антитела, или по меньшей мере 98,4% главного пика антитела, или более 98,4% главного пика антитела, или по меньшей мере 98,5% главного пика антитела, или более 98,5% главного пика антитела, или по меньшей мере 98,6% главного пика антитела, или более 98,6% главного пика антитела, например, в диапазоне от приблизительно 95% до приблизительно 99,9% главного пика антитела, или от приблизительно 96% до приблизительно 99,9% главного пика антитела, или от приблизительно 97% до приблизительно 99,9% главного пика антитела, или от приблизительно 97,5% до приблизительно 99,9% главного пика антитела, или от приблизительно 98% до приблизительно 99,9% главного пика антитела, или от приблизительно 98,1% до приблизительно 99,9% главного пика антитела, или от приблизительно 98,2% до приблизительно 99,9% главного пика антитела, или от приблизительно 98,3% до приблизительно 99,9% главного пика антитела, или от приблизительно 98,4% до приблизительно 99,9% главного пика антитела, или от приблизительно 98,5% до приблизительно 99,9% главного пика антитела, или от приблизительно 98,6% до приблизительно 99,9% главного пика антитела, необязательно, как измерено с помощью SE-UHPLC.

[0074] Используемый в данном документе термин "антитело" относится к белку в

формате стандартного иммуноглобулина, содержащему тяжелые и легкие цепи и содержащему переменные и константные области. Например, антитело может представлять собой IgG, который имеет "Y-образную" структуру из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну "легкую" (как правило, характеризующуюся молекулярной массой, составляющей приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (как правило, характеризующуюся молекулярной массой, составляющей приблизительно 50–70 кДа). Антитело имеет переменную область и константную область. У IgG-форматов переменная область обычно состоит из приблизительно 100–110 или более аминокислот, содержит три определяющие комплементарность области (CDR), в первую очередь отвечает за распознавание антигена и существенно отличается в других антителах, которые связываются с разными антигенами. См., например, Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999).

[0075] Вкратце, в остове антитела CDR заключены между каркасными областями в переменной области тяжелой и легкой цепи, где они составляют области, как правило, ответственные за связывание и распознавание антигена. Переменная область содержит по меньшей мере три CDR тяжелой цепи или три CDR легкой цепи (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; см. также Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901–917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877–883) между каркасными областями (обозначены как каркасные области 1–4, FR1, FR2, FR3 и FR4 согласно Kabat et al., 1991, выше; см. также Chothia and Lesk, 1987, выше).

[0076] Человеческие легкие цепи классифицируют как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эpsilon-цепь, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включая без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая без ограничения IgM1 и IgM2. Варианты осуществления настоящего раскрытия включают все такие классы или изотипы антител. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа, например, человеческую константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа. Константная область тяжелой цепи может представлять собой, например, константные области тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например, человеческие константные области тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа. Соответственно, в иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, включая любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В иллюстративных аспектах антитело к RANKL представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4.

[0077] В различных аспектах антитело может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело. В некоторых аспектах антитело содержит последовательность, которая фактически аналогична таковой у встречающегося в природе антитела, продуцируемого млекопитающим, например, мышью, крысой, кроликом, козой,

лошадью, курицей, хомяком, свиньей, человеком и т. п. В этом отношении антитело может рассматриваться как антитело млекопитающего, например, мышинное антитело, крысиное антитело, кроличье антитело, козье антитело, лошадиное антитело, антитело курицы, антитело хомяка, антитело свиньи, человеческое антитело и т. п. В определенных аспектах антитело к RANKL представляет собой человеческое моноклональное антитело. В определенных аспектах рекомбинантный белок представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело. Термин "химерное антитело" используется в данном документе для обозначения антитела, содержащего константные домены от одного вида и переменные домены от второго или, в более общем случае, содержащего отрезки аминокислотной последовательности от по меньшей мере двух видов. Термин "гуманизированное" при использовании в отношении антител относится к антителам, имеющим по меньшей мере области CDR из источника, отличного от человека, которые конструируют, чтобы они имели структуру и иммунологическую функцию, более сходные с таковыми настоящих человеческих антител, чем антитела из исходного источника. Например, гуманизация может предусматривать пересаживание CDR из антитела, отличного от человеческого, такого как мышинное антитело, в человеческое антитело. Гуманизация также может предусматривать отбор аминокислотных замен, чтобы сделать последовательность, отличную от человеческой, более похожей на человеческую последовательность.

[0078] В различных аспектах антитело расщепляется на фрагменты под действием ферментов, таких как, например, папаин и пепсин. Папаин расщепляет антитело с образованием двух фрагментов Fab и одного фрагмента Fc. Пепсин расщепляет антитело с образованием фрагмента $F(ab')_2$ и фрагмента pFc' . В иллюстративных аспектах водный фармацевтический состав содержит фрагмент антитела, например, Fab, Fc, $F(ab')_2$ или pFc' , который сохраняет по меньшей мере один сайт связывания антигена (RANKL). Что касается водных фармацевтических составов и способов по настоящему раскрытию, антитело может не содержать определенных частей антитела и может представлять собой фрагмент антитела, который связывается с RANKL. В иллюстративных аспектах фрагмент антитела представляет собой антигенсвязывающую часть антитела к RANKL.

[0079] Белковые продукты антитела могут представлять собой антигенсвязывающий формат на основе фрагментов антитела, например, scFv, Fab и VHH/VN, которые сохраняют полную способность связывания антигена. Самым маленьким антигенсвязывающим фрагментом, который сохраняет свой полный антигенсвязывающий сайт, является фрагмент Fv, который полностью состоит из переменных (V) областей. Растворимый гибкий аминокислотный пептидный линкер используют для соединения V-областей в фрагмент scFv (одноцепочечный переменный фрагмент) для стабилизации молекулы, или константные (C) домены добавляют к V-областям для получения фрагмента Fab [антигенсвязывающий фрагмент]. Как scFv, так и Fab являются широко используемыми фрагментами, которые можно легко получать в хозяевах, например, прокариотических хозяевах. Другие белковые продукты антитела включают scFv, стабилизированный

дисульфидной связью (ds-scFv), одноцепочечный Fab (scFab), а также ди- и мультимерные форматы антитела, такие как диа-, триа- и тетратела, или мини-тела (мини-Ab), которые включают различные форматы, состоящие из scFv, связанных с доменами олигомеризации. Самые маленькие фрагменты представляют собой VHH/VH из тяжелой цепи Ab верблюда, а также однодоменные Ab (sdAb). Строительным блоком, который чаще всего используется для создания новых форматов антитела, является фрагмент на основе одноцепочечного переменного (V) домена антитела (scFv), который содержит V-домены из тяжелой и легкой цепи (домен VH и VL), связанные с помощью пептидного линкера из ~15 аминокислотных остатков. Пептидное антитело или слияние пептид-Fc представляют собой еще один белковый продукт антитела. Структура пептидного антитела состоит из биологически активного пептида, привитого на Fc-домен. Пептидные антитела подробно описаны в уровне техники. См., например, Shimamoto и др., *mAbs* 4(5): 586–591 (2012).

[0080] Другие белковые продукты антитела включают одноцепочечное антитело (SCA); диатело; триатело; тетратело; биспецифические или триспецифические антитела и т. п. Биспецифические антитела можно разделить на пять основных классов: BsIgG, сцепленные IgG, фрагменты BsAb, биспецифические слитые белки и конъюгаты BsAb. См., например, Spiess et al., *Molecular Immunology* 67(2) Part A: 97–106 (2015).

[0081] В иллюстративных аспектах антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержит, фактически состоит из или состоит из любого из таких белковых продуктов антитела (например, scFv, Fab VHH/VH, фрагмента Fv, ds-scFv, scFab, димерного антитела, мультимерного антитела (например, диатела, триатела, тетратела), мини-Ab, пептидного антитела VHH/VH из тяжелой цепи антитела верблюда, sdAb, диатела; триатела; тетратела; биспецифического или триспецифического антитела, BsIgG, сцепленного IgG, фрагмента BsAb, биспецифического слитого белка и конъюгата BsAb).

[0082] В иллюстративных аспектах антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержит, фактически состоит из или состоит из белкового продукта антитела в мономерной форме, или в полимерной, олигомерной или мультимерной форме. В определенных вариантах осуществления, в которых антитело содержит два или более различных фрагментов на основе антигенсвязывающих областей, антитело считается биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим, или двухвалентным, трехвалентным или мновалентным, в зависимости от количества различных эпитопов, которые распознаются и связываются антителом.

[0083] Человеческое антитело к лиганду рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающая часть для применения в составе представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связывают белок RANKL человека или белок остеопротегрин (OPGL) человека или их фрагмент, и ингибируют или нейтрализуют активность белка RANKL или OPGL, и/или ингибируют сигнальный путь RANK/RANKL, и они упоминаются в данном документе как человеческое моноклональное антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть. Например, составы, описанные в данном документе, могут

содержать человеческое моноклональное антитело к RANKL, которое специфически связывается с аминокислотной последовательностью RANKL человека (SEQ ID NO: 12), или его часть. Белок RANKL человека представляет собой трансмембранный или растворимый белок, который закодирован в полинуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 11, который, как известно, необходим для образования, функционирования и выживания остеокластов. Например, человеческие антитела к RANKL ингибируют взаимодействие RANKL с его рецептором RANK.

[0084] Примером человеческого моноклонального антитела к RANKL является деносумаб, который продается в коммерческой форме как Xgeva® и Prolia®. Xgeva® представляет собой состав с дозой 120 мг деносумаба в 1,7 мл раствора (70 мг/мл) в одноразовом флаконе, содержащем 120 мг деносумаба, ацетат (18 мМ), сорбит (4,6%), воду для инъекций (USP) и гидроксид натрия для обеспечения pH 5,2. Prolia® доступен в виде составов с дозой 60 мг деносумаба в 1 мл раствора (60 мг/мл). Каждый 1-мл предварительно заполненный шприц Prolia® для одноразового использования содержит 60 мг деносумаба (раствор 60 мг/мл), 4,7% сорбита, 17 мМ ацетата, 0,01% полисорбата 20, воду для инъекций (USP) и гидроксид натрия для обеспечения pH 5,2. В частности предусматриваются композиции, описываемые в данном документе, и включающие деносумаб или его часть. Деносумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG2, которое связывается с RANKL человека. Деносумаб характеризуется приблизительной молекулярной массой, составляющей 147 кДа, и экспрессируется в линии клеток яичника китайского хомячка (CHO). Аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи (LC) и вариабельной области тяжелой цепи (HC) деносумаба изложены под SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно, а полноразмерные LC и HC изложены под SEQ ID NO: 3 и 4; соответственно. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 (вариабельная область LC деносумаба), в некоторых аспектах представляет собой нуклеиновую кислоту под SEQ ID NO: 19. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (вариабельная область HC деносумаба), в некоторых аспектах представляет собой нуклеиновую кислоту под SEQ ID NO: 20. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 (полноразмерная LC деносумаба), в некоторых аспектах представляет собой нуклеиновую кислоту под SEQ ID NO: 21. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 (полноразмерная HC деносумаба), в некоторых аспектах представляет собой нуклеиновую кислоту под SEQ ID NO: 23. Зрелая форма LC, которая представлена аминокислотами 21–235 из полноразмерной LC, изложена под SEQ ID NO: 13, тогда как зрелая форма HC, которая представлена аминокислотами 20–467 из полноразмерной LC, изложена под SEQ ID NO: 14. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность

под SEQ ID NO: 13 (зрелая форма LC), в некоторых аспектах представляет собой нуклеиновую кислоту под SEQ ID NO: 22. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 (зрелая форма HC), в некоторых аспектах представляет собой нуклеиновую кислоту под SEQ ID NO: 24. Кроме того, CDR LC деносумаба изложены под SEQ ID NO: 5 (CDR1 LC), SEQ ID NO: 6 (CDR2 LC) и SEQ ID NO: 7 (CDR3 LC). CDR HC деносумаба изложены под SEQ ID NO: 8 (CDR1 HC), SEQ ID NO: 9 (CDR2 HC) и SEQ ID NO: 10 (CDR3 HC). Деносумаб был описан и заявлен в международной заявке на патент № WO 03/002713 и патенте США № 7364736, раскрытия которых настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

[0085] Используемый в данном документе термин "деносумаб" включает биологические аналоги деносумаба. Используемый в данном документе "биологический аналог" (одобренного эталонного продукта/биологического лекарственного средства, такого как белковое терапевтическое средство, антитело и т. д.) относится к биологическому продукту, который является подобным эталонному продукту на основе данных, полученных из (a) аналитических исследований, которые показывают, что биологический продукт очень похож на эталонный продукт, невзирая на незначительные отличия в клинически неактивных компонентах; (b) исследований на животных (включая оценку на токсичность) и/или (c) клинического исследования или исследований (включая оценку иммуногенности и фармакокинетики или фармакодинамики), которых достаточно, чтобы продемонстрировать безопасность, чистоту и эффективность при одном или нескольких соответствующих условиях применения, при которых лицензирован и предназначен для применения эталонный продукт, и при которых добиваются выдачи лицензии для биологического продукта. В одном варианте осуществления биологический продукт, являющийся биологическим аналогом, и эталонный продукт используют один и тот же механизм или механизмы действия для условия или условий использования, предписанных, рекомендованных или предложенных в предлагаемой маркировке, но только в той степени, в которой механизм или механизмы действия известны для эталонного продукта. В одном варианте осуществления условие или условия использования, предписанные, рекомендованные или предложенные в маркировке, предлагаемой для биологического продукта, были ранее одобрены для эталонного продукта. В одном варианте осуществления путь введения, лекарственная форма и/или концентрация биологического продукта являются такими же, как и у эталонного продукта. В одном варианте осуществления установку, в которой биологический продукт производят, обрабатывают, упаковывают или хранят, соответствует стандартам, разработанным для обеспечения того, чтобы биологический продукт оставался безопасным, чистым и эффективным. Эталонный продукт может быть одобренным по меньшей мере в одном из США, Европы или Японии. Биологическим аналогом может быть, например, антитело, имеющее такую же первичную аминокислотную последовательность, что и имеющееся в продаже антитело, но которое может быть получено в клетках другого типа или с помощью

других способов получения, очистки или составления.

[0086] Составы могут содержать человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 1–4, 13, 14 или его часть. Составы могут содержать человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну из аминокислотных последовательностей CDR, изложенных под SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере две из аминокислотных последовательностей CDR, изложенных под SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере три из аминокислотных последовательностей CDR, изложенных под SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере четыре из аминокислотных последовательностей CDR, изложенных под SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере пять из аминокислотных последовательностей CDR, изложенных под SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере шесть из аминокислотных последовательностей CDR, изложенных под SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

[0087] Составы могут содержать человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична любой из SEQ ID NO: 1–4, 13 и 14, и ингибирует взаимодействие между RANKL и его рецептором, RANK, или человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85% идентична любой из SEQ ID NO: 1–4, 13 и 14, и ингибирует взаимодействие между RANKL и его рецептором, RANK, или человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична любой из SEQ ID NO: 1–4, 13 и 14, и ингибирует взаимодействие между RANKL и его рецептором, RANK, или человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 91% идентична любой из SEQ ID NO: 1–4, 13 и 14, и ингибирует взаимодействие между RANKL и его рецептором, RANK, или человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 92% идентична любой из SEQ ID NO: 1–4, 13 и 14, и ингибирует взаимодействие между RANKL и его рецептором, RANK, или человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 93% идентична любой из SEQ ID NO: 1–4, 13 и 14, и ингибирует взаимодействие между RANKL и его рецептором, RANK, или человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 94% идентична любой из SEQ ID NO: 1–4, 13 и 14, и ингибирует взаимодействие между RANKL и его рецептором, RANK, или человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%

идентична любой из SEQ ID NO: 1–4, 13 и 14, и ингибирует взаимодействие между RANKL и его рецептором, RANK, или человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 96% идентична любой из SEQ ID NO: 1–4, 13 и 14, и ингибирует взаимодействие между RANKL и его рецептором, RANK, или человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 97% идентична любой из SEQ ID NO: 1–4, 13 и 14, и ингибирует взаимодействие между RANKL и его рецептором, RANK, или человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична любой из SEQ ID NO: 1–4, 13 и 14, и ингибирует взаимодействие между RANKL и его рецептором, RANK, или человеческое антитело к RANKL, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична любой из SEQ ID NO: 1–4, 13 и 14, и ингибирует взаимодействие между RANKL и его рецептором, RANK.

[0088] В иллюстративных вариантах осуществления водный фармацевтический состав содержит антитело к RANKL или его антигенсвязывающую часть, включая белковый продукт антитела, описываемый в данном документе. В иллюстративных аспектах антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5. В альтернативных и дополнительных случаях антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6. В альтернативных и дополнительных аспектах антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10. В некоторых случаях антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 10. В иллюстративных аспектах антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат: (i) переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 7; (ii) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, необязательно под SEQ ID NO: 27; (iii) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9, или (iv) любую их комбинацию. В некоторых аспектах антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат: (A) переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, переменный домен легкой цепи, содержащий CDR2 легкой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и (B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 (необязательно под SEQ ID NO: 27), переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10. В иллюстративных аспектах антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат: (A) переменный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из: (i) переменного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 1; (ii) переменного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 19; и (iii) переменного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 19; или (B) переменный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из: (i) переменного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 2; (ii) переменного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 20; и (iii) переменного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 20; или (C) переменный домен легкой цепи из (A) и переменный домен тяжелой цепи из (B). В иллюстративных аспектах антитело к RANKL представляет собой полностью человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело. В иллюстративных случаях антигенсвязывающая часть представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂ или одноцепочечный Fv. В иллюстративных аспектах антитело к RANKL представляет собой антитело IgG₁, IgG₂ или IgG₄, при этом необязательно антитело к RANKL содержит последовательность под SEQ ID NO: 15. В некоторых аспектах антитело к RANKL содержит последовательность под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18. В иллюстративных аспектах антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат: (A) легкую цепь, выбранную из группы, состоящей

из: (i) легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 13; (ii) легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 21 или 23; и (iii) легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 21 или 23; или (B) тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из: (i) тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; (ii) тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 22 или 24; и (iii) тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 22 или 24; или (C) вариабельный домен легкой цепи из (A) и вариабельный домен тяжелой цепи из (B).

[0089] Концентрация деносуаба или другого человеческого антитела к RANKL или их антигенсвязывающей части в водном составе обычно может находиться в любом применимом диапазоне, например, от приблизительно 0,1 до приблизительно 200 мг/мл. По мере увеличения концентрации происходит увеличение вязкости, что может затруднять обработку состава с получением стерильной дозированной формы выпуска для фармацевтического применения.

[0090] В одном аспекте улучшенная стабильность состава за счет аминокислотного ингибитора агрегации может наблюдаться при любой концентрации деносуаба или другого человеческого антитела к RANKL или их антигенсвязывающей части, включая от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, или от приблизительно 15 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл, или от приблизительно 30 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, или от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, или от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 180 мг/мл, или от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 160 мг/мл, или от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл, или от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 140 мг/мл, или от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 130 мг/мл, или от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 120 мг/мл, или от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 110 мг/мл, или от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл, или приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 90

мг/мл, или от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 80 мг/мл, или от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 70 мг/мл, или от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, или от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 180 мг/мл, или от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 160 мг/мл, или от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл, или от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 140 мг/мл, или от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 130 мг/мл, или от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 120 мг/мл, или от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 110 мг/мл, или от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл, или от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 90 мг/мл или от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 80 мг/мл, например 120 мг/мл.

[0091] В другом аспекте предусматривается, что концентрация деносуаба или другого человеческого антитела к RANKL или их антигенсвязывающей части в случае составов, имеющих pH от приблизительно 5,0 до менее 5,2, включает диапазоны более 70 мг/мл, или по меньшей мере 71 мг/мл, или по меньшей мере приблизительно 75 мг/мл, или по меньшей мере приблизительно 80 мг/мл, или по меньшей мере приблизительно 85 мг/мл, или по меньшей мере приблизительно 90 мг/мл, или по меньшей мере приблизительно 95 мг/мл, или по меньшей мере приблизительно 100 мг/мл, или по меньшей мере приблизительно 105 мг/мл, или по меньшей мере приблизительно 110 мг/мл, или по меньшей мере, приблизительно 115 мг/мл, или по меньшей мере, приблизительно 120 мг/мл, и до приблизительно 200 мг/мл. Например, предусматриваемые диапазоны включают от 71 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, или от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, или от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 180 мг/мл, или от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 160 мг/мл, или от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл, или от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 140 мг/мл, или от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 130 мг/мл, или от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 120 мг/мл, или от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 110 мг/мл, или от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл, или от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 90 мг/мл, или от приблизительно 120 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, или от приблизительно 120 мг/мл до приблизительно 180 мг/мл, или от приблизительно 120 мг/мл до приблизительно 160 мг/мл, или от приблизительно 120 мг/мл до приблизительно 140 мг/мл, например 120 мг/мл.

[0092] В иллюстративных аспектах водный фармацевтический состав содержит антитело или его антигенсвязывающую часть в концентрации, составляющей более 70 мг/мл, например, более 80 мг/мл, более 90 мг/мл, более 100 мг/мл, более 125 мг/мл, более 150 мг/мл, более 175 мг/мл, более 200 мг/мл, более 225 мг/мл, более 250 мг/мл, более 275 мг/мл. В иллюстративных аспектах водный фармацевтический состав содержит антитело или его антигенсвязывающую часть в концентрации, составляющей менее приблизительно 300 мг/мл, например, менее приблизительно 275 мг/мл, менее приблизительно 250 мг/мл, менее приблизительно 225 мг/мл, менее приблизительно 200 мг/мл, менее приблизительно 175 мг/мл или менее приблизительно 150 мг/мл. В иллюстративных аспектах концентрация

антитела или его антигенсвязывающей части в составе находится в диапазоне от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, например, от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от приблизительно 125 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от приблизительно 150 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от приблизительно 175 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от приблизительно 200 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от приблизительно 225 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от приблизительно 250 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от приблизительно 275 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 275 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 250 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 225 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 175 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 125 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 75 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл или от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл. В иллюстративных аспектах концентрация антитела или его антигенсвязывающей части в водном фармацевтическом составе находится в диапазоне от более 70 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, например, от более 80 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от более 90 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от более 100 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от более 125 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от более 150 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от более 175 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от более 200 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, от более 70 мг/мл до приблизительно 275 мг/мл, от более приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 250 мг/мл, от более приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 225 мг/мл, от более приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от более приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 175 мг/мл, от более приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл, от более приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 125 мг/мл, от более приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл. В иллюстративных аспектах концентрация антитела или его антигенсвязывающей части в водном фармацевтическом составе находится в диапазоне от приблизительно 100 до приблизительно 140 мг/мл, например, составляет приблизительно 110 мг/мл, приблизительно 120 мг/мл, приблизительно 130 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация антитела или его антигенсвязывающей части в водном фармацевтическом составе составляет приблизительно 120 мг/мл $\pm$ 12 мг/мл, например, от приблизительно 108 мг/мл до приблизительно 132 мг/мл, от приблизительно 115 мг/мл до приблизительно 125 мг/мл, приблизительно 116 мг/мл, приблизительно 117 мг/мл, приблизительно 118 мг/мл, приблизительно 119 мг/мл, приблизительно 120 мг/мл, приблизительно 121 мг/мл, приблизительно 122 мг/мл, приблизительно 123 мг/мл, приблизительно 124 мг/мл.

[0093] Деносумаб и другие человеческие моноклональные антитела к RANKL и их антигенсвязывающие части могут быть получены в соответствии с описанием,

приведенным в международной патентной публикации WO 2003002713 A2.

[0094] Исследования составов, проводимые на растворах деносуаба с высокой концентрацией (например, 120 мг/мл), описанные ниже, показали значительное увеличение образования (скорости и степени) HMWS при pH ниже 5 и особенно при более низком pH (например, pH 4,5). Показано, что по мере увеличения pH наблюдается увеличение образования димерных разновидностей. Для уравнивания этих двух эффектов, предусматривается, что состав, описанный в данном документе, будет иметь pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,19, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,15, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,10, например, приблизительно 5,0, приблизительно 5,05, приблизительно 5,1 или приблизительно 5,15.

[0095] Исследования, описанные в данном документе, также показали независимый стабилизирующий и уменьшающий агрегацию эффект, который стал возможным благодаря включению аминокислотного ингибитора агрегации. Соответственно, предусматривается, что при включении аминокислотного ингибитора агрегации, pH состава может находиться в диапазоне от приблизительно 4,9 до приблизительно 5,4, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,4, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2, или от приблизительно 5,0 до менее 5,2, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,19, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,15, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,10, например, составлять приблизительно 5,0, приблизительно 5,05, приблизительно 5,1, или приблизительно 5,15, или приблизительно 5,2.

[0096] Водный состав может быть забуференным. В случае применения буфер может представлять собой органический буфер. При 25°C буферная система может быть центрирована, например, вокруг pH 4–5,5, или 4,5–5,5, или 4,5–5. Например, при 25°C буферная система может характеризоваться pKa в пределах одной единицы pH от pH 5,0–5,2. Одна такая буферная система представляет собой систему на основе уксусной кислоты/ацетата, характеризующуюся pKa, составляющей приблизительно 4,75 при 25°C. Другая такая буферная система представляет собой систему на основе глутаминовой кислоты/глутамата, характеризующуюся pKa, составляющей приблизительно 4,27 при 25°C. Другие предусмотренные альтернативные буферные системы включают системы на основе ионов, включающих сукцинат (pKa 4,21 при 25°C), пропионат (pKa 4,87 при 25°C), малат (pKa 5,13 при 25°C), пиридин (pKa 5,23 при 25°C) и пиперазин (pKa 5,33 при 25°C). Предусматривается, что буфер может обеспечиваться в виде натриевой соли (или динатриевой соли, в зависимости от ситуации) или, в качестве альтернативы, в виде калиевой, магниевой или аммониевой соли. Например, буферы могут быть основаны на ацетате, цитрате, сукцинате, фосфате и гидроксиметиламинометане (Tris). В частности, предусматриваются буферы на основе ацетата, глутамата и сукцината, например, ацетата или глутамата.

[0097] Сравнение образования HMWS с помощью эксклюзионной ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC) в составах на основе

120 мг/мл деносуаба, имеющих ацетатный или глутаматный буферы, но эквивалентных в других отношениях, показало, что при оценке в течение четырех недель хранения при 37°C отсутствовали различия между типами буферов.

[0098] В случае применения буфер будут включать в количестве, достаточном для поддержания выбранного pH состава при условиях хранения в течение срока хранения продукта, например, 3 лет при 4°C, 1 месяца при 25°C, 2 недель при 25°C или 7 дней при 25°C. Концентрация буфера может находиться в диапазоне от приблизительно 2 мМ до приблизительно 40 мМ, или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ, или от приблизительно 10 мМ до приблизительно 25 мМ, или от приблизительно 15 мМ до приблизительно 25 мМ, например, составлять 10 мМ, или 15 мМ, или 18 мМ, или 25 мМ. Например, ацетатный буфер, используемый с моноклональным антителом к RANKL (например, деносуабом) и фенилаланином, может находиться в диапазоне от приблизительно 2 мМ до приблизительно 30 мМ, или от приблизительно 16 мМ до приблизительно 41 мМ, или от приблизительно 25 мМ до приблизительно 39 мМ, или от приблизительно 30 мМ до приблизительно 34 мМ. Другими словами, буфер для диафильтрации, используемый для концентрирования антитела до концентрации более 70 мг/мл (например, 120 мг/мл), может находиться в диапазоне от 5 мМ до приблизительно 30 мМ, или от приблизительно 15 мМ до приблизительно 25 мМ, или составлять приблизительно 20 мМ. Также предполагается обеспечение стабилизированного аминокислотами состава, который является самозабуференным. В иллюстративных аспектах буфер включают в количестве, достаточном для поддержания выбранного pH состава при условиях хранения в течение срока хранения продукта, например, 36 месяцев при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C, необязательно, за которыми следует приблизительно 1 месяц при от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C.

[0099] В некоторых аспектах водный фармацевтический состав содержит буфер, и, необязательно, при 25°C буфер центрирован в диапазоне от приблизительно pH 4,0 до приблизительно pH 5,5. В некоторых аспектах при 25°C буфер характеризуется рКа в пределах одной единицы pH от pH 5,0–5,2. В определенных аспектах водный фармацевтический состав содержит от приблизительно 5 мМ до приблизительно 60 мМ буфера, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 50 мМ буфера или от приблизительно 9 мМ до приблизительно 45 мМ буфера (например, от приблизительно 15 мМ до приблизительно 30 мМ буфера, например, приблизительно 20 мМ, приблизительно 25 мМ буфера). В иллюстративных аспектах буфер представляет собой ацетат или глутамат.

[00100] Состав также может включать один или несколько стабилизаторов для предотвращения агрегации белка и другие вспомогательные вещества состава. Предполагается, что такие стабилизаторы и вспомогательные вещества включают без ограничения аминокислотные ингибиторы агрегации, модификаторы тоничности, поверхностно-активные вещества, солюбилизующие средства (например, N-метил-2-пирролидон), средства для конъюгации с PEG и циклодекстрины (например, Captisol®).

[00101] Термин "аминокислотный ингибитор агрегации" относится к аминокислоте или комбинации аминокислот (например, смеси, или дипептидам, или олигопептидам, имеющим от 2 до 10 остатков), где любая заданная аминокислота присутствует либо в форме своего свободного основания, либо в форме своей соли (например, аргинин-HCl), или к аналогу аминокислоты, и он снижает число HMWS или ингибирует образование HMWS. Предусматриваются соли, включая натриевые соли, калиевые соли и гидрохлоридные соли. Кроме того, предусматриваются гидрохлоридные, глутаматные, бутиратные и гликолятные соли аргинина. Если используют комбинацию аминокислот, все из аминокислот могут присутствовать в форме своего свободного основания, все могут присутствовать в форме своих солей, или некоторые могут присутствовать в форме своего свободного основания, тогда как другие присутствуют в форме своих солей. В дополнение к дипептидам и олигопептидам или в качестве их альтернативы можно применять смеси одной или нескольких аминокислот, например, смесь аргинина и фенилаланина. В альтернативных вариантах осуществления в водном фармацевтическом составе присутствует только один тип аминокислотного ингибитора агрегации. В иллюстративных аспектах присутствует только одна аминокислота, например, в составе присутствует только L-аргинин или только L-фенилаланин.

[00102] Предполагается применение одной или нескольких аминокислот, которые несут заряженную боковую цепь, например, одного или нескольких из аргинина, лизина, гистидина, аспартата и глутамата. Аминокислоты могут быть выбраны из основных аминокислот, например, аргинина, лизина, гистидина или их комбинации. В частности, предусматривается аргинин. Любой стереоизомер (т. е. L-, D- или DL-изомер) конкретной аминокислоты или комбинации этих стереоизомеров можно применять в способе или составе по настоящему изобретению, при условии, что конкретная аминокислота присутствует в форме своего свободного основания или в форме своей соли. В частности, предусматривается L-стереоизомер, например, L-аргинин. Необязательно аминокислота представляет собой аминокислоту с положительно заряженной боковой цепью, например, аргинин.

[00103] В другом аспекте предусматривается применение одной или нескольких аминокислот, которые имеют ароматические кольца в своих боковых цепях, например, фенилаланин, тирозин, триптофан или их комбинация. В частности, предусматривается фенилаланин.

[00104] В другом аспекте предусматривается применение одной или нескольких гидрофобных аминокислот, например, аланина, изолейцина, лейцина, фенилаланина, валина, пролина или глицина.

[00105] В другом аспекте предусматривается применение одной или нескольких алифатических, гидрофобных аминокислот, например, аланина, изолейцина, лейцина или валина. В частности, предусматривается лейцин.

[00106] Аналоги аминокислот, которые демонстрируют эффекты снижения или ингибирования агрегации, также можно будет применять в способе или составе по

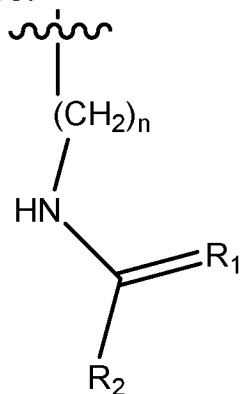
настоящему изобретению. Термин "аналог аминокислоты" относится к производному встречающейся в природе аминокислоты. Предполагаемые аналоги включают, например, аминок- и N-моноэтил- и н-ацетилпроизводные. Другие предполагаемые аналоги включают дипептиды или олигопептиды, имеющие от 2 до 10 остатков, например, аргинин-аргинин и фенилаланин-аргинин. В одном варианте осуществления предполагается, что н-ацетиларгинин и н-ацетиллизин не будут использоваться по отдельности, но могут использоваться в комбинации с другим аминокислотным ингибитором агрегации. Как и в случае аминокислот, аналоги аминокислот применяют в способе или составе по настоящему изобретению в форме своего свободного основания или в форме своей соли.

[00107] Аминокислотный ингибитор(-ы) агрегации, применяемый в способе или составе по настоящему изобретению, защищает терапевтически активный белок от различных стрессов, тем самым увеличивая или/и поддерживая стабильность белка или состава, содержащего белок, в течение срока годности белка (до и во время хранения, перед применением). В данном документе термин "стресс" включает без ограничения нагревание, замораживание, рН, воздействие света, перемешивание, окисление, дегидратацию, взаимодействия на поверхности, сдвиг, замораживание/оттаивание, давление, воздействие тяжелых металлов, фенольных соединений, денатурирующих веществ и т. д., имеющие любое происхождение, например, возникающие при транспортировке. В частности, предусматривается тепловой стресс. Термин "стресс" охватывает любой фактор, который модулирует (т. е. снижает, поддерживает или увеличивает) стабильность белка или состава, содержащего белок. Повышение и/или поддержание стабильности при добавлении аминокислотного ингибитора агрегации зависит от его концентрации. То есть увеличение концентраций аминокислотного ингибитора агрегации приводит к увеличению и/или поддержанию стабильности белка или состава, содержащего белок по настоящему изобретению, в то время как такой белок или состав, содержащий этот белок, обычно демонстрируют образование агрегатов в отсутствие аминокислотного ингибитора агрегации. Как показано в приведенных ниже примерах, включение аминокислотного ингибитора агрегации в состав также может снижать количество уже образованных HMWS. Например, такие аминокислотные ингибиторы агрегации включают аргинин и дипептид аргинин-фенилаланин. Определение количества конкретного аминокислотного ингибитора агрегации, которое следует применять в способе или составе по настоящему изобретению для уменьшения образования агрегатов, тем самым увеличивая стабильность белка и тем самым увеличивая стабильность состава в течение всего срока годности белка, может быть легко проведено в отношении деносумага или любого конкретного человеческого моноклонального антитела к RANKL, представляющего интерес с точки зрения раскрытия в данном документе.

[00108] Было показано, что присутствие аминокислотного ингибитора агрегации в составе снижает количество димерных разновидностей и кинетическую скорость их образования. Например, включение аргинина в концентрации 75 мМ в состав на основе деносумага с рН 5,2 привело к снижению количества димерных разновидностей и

кинетической скорости их образования на приблизительно 0,3% и 25%, соответственно, через 1 месяц при 37°C по сравнению с аналогичным составом без аргинина при pH 5,2. Напротив, было обнаружено, что моноклональное антитело, которое не является человеческим моноклональным антителом к RANKL, не стабилизируется за счет включения аргинина, а вместо этого происходит увеличение числа HMWS. Соответственно, другой способ по настоящему раскрытию представляет собой способ снижения HMWS в составе на основе деносуаба или другого человеческого моноклонального антитела к RANKL за счет добавления аминокислотного ингибитора агрегации, например, аргинина или фенилаланина.

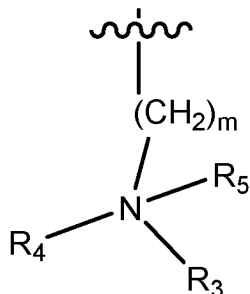
[00109] Соответственно, в иллюстративных вариантах осуществления водный фармацевтический состав содержит аминокислотный ингибитор агрегации, который необязательно представляет собой аминокислоту. В иллюстративных аспектах аминокислота представляет собой L-стереоизомер аминокислоты (L-аминокислоту), хотя предусматриваются D-стереоизомеры аминокислот (D-аминокислоты). В некоторых аспектах аминокислотный ингибитор агрегации предусматривает аминокислоту, содержащую заряженную боковую цепь, также называемую в данном документе "заряженной аминокислотой". Термин "заряженная аминокислота" относится к аминокислоте, которая содержит боковую цепь, которая является отрицательно заряженной (т. е. депротонированной) или положительно заряженной (т. е. протонированной) в водном растворе при физиологическом pH. Например, отрицательно заряженные аминокислоты включают, например, аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту, тогда как положительно заряженные аминокислоты включают, например, аргинин, лизин и гистидин. Заряженные аминокислоты включают заряженные аминокислоты из 20 аминокислот генетического кода, а также атипичные или не встречающиеся в природе аминокислоты или аминокислоты, не закодированные в генетическом коде. Соответственно, в иллюстративных аспектах аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь. В иллюстративных случаях аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, содержит структуру боковой цепи формулы I или формулы II:



[Формула I],

где n составляет от 1 до 7, где каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы,

состоящей из H, C₁–C₁₈алкила, (C₁–C₁₈алкил)ОН, (C₁–C₁₈алкил)NH₂, NH, NH₂(C₁–C₁₈алкил)SH, (C₀–C₄алкил)(C₃–C₆)циклоалкила, (C₀–C₄алкил)(C₂–C₅гетероциклил), (C₀–C₄алкил)(C₆–C₁₀арил)R₇ и (C₁–C₄алкил)(C₃–C₉гетероарил), где R₇ представляет собой H или ОН, где необязательно один из R₁ и R₂ представляет собой свободную аминогруппу (–NH₃⁺),



[Формула II],

где m составляет от 1 до 7, где каждый из R₃ и R₄ независимо выбран из группы A, состоящей из: H, C₁–C₁₈алкила, (C₁–C₁₈алкил)ОН, (C₁–C₁₈алкил)NH₂, (C₁–C₁₈алкил)SH, (C₀–C₄алкил)(C₃–C₆)циклоалкила, (C₀–C₄алкил)(C₂–C₅гетероциклил), (C₀–C₄алкил)(C₆–C₁₀арил)R₈ и (C₁–C₄алкил)(C₃–C₉гетероарил), где R₈ представляет собой H или ОН, где R₅ необязательно присутствует и, если присутствует, выбран из группы A, где необязательно каждый из R₃, и R₄, и R₅ представляет собой H.

[00110] В иллюстративных аспектах аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, содержит структуру боковой цепи формулы I, а n находится в диапазоне от 2 до 4. В альтернативных или дополнительных аспектах R₁ представляет собой NH или NH₂. В иллюстративных аспектах R₂ представляет собой NH₂ или NH₃⁺. В иллюстративных случаях аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, представляет собой аргинин. В иллюстративных аспектах аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, содержит структуру боковой цепи формулы II, а m находится в диапазоне от 3 до 5. В некоторых аспектах каждый из R₃ и R₄ представляет собой H. В определенных случаях R₅ присутствует и необязательно представляет собой H. В некоторых случаях аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, представляет собой лизин. В некоторых аспектах аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, присутствует в составе в виде соли, необязательно, в виде гидрохлоридной соли (HCl). Соответственно, в иллюстративных аспектах водная фармацевтическая композиция содержит L–аргинин–HCl или L–лизин–HCl.

[00111] В иллюстративных аспектах аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой ароматическую аминокислоту. В некоторых случаях ароматическая аминокислота содержит фенил или индол. В иллюстративных аспектах ароматическая аминокислота содержит C₁–C₆алкильную цепь (например, C₁–C₃алкильную цепь) между альфа–углеродом и фенилом или индолом. В иллюстративных случаях ароматическая аминокислота представляет собой L–фенилаланин. В других случаях ароматическая аминокислота представляет собой L–триптофан.

[00112] В иллюстративных аспектах аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой гидрофобную аминокислоту. Гидрофобность может измеряться или оцениваться в соответствии с любой из шкал гидрофобности, известных из уровня техники. В целом, чем более положителен данный показатель, тем более гидрофобной является аминокислота. В некоторых случаях гидрофобность оценивается по шкале гидрофобности Кайта и Дулиттла (*Kyte J, Doolittle RF (May 1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein". J. Mol. Biol. 157 (1): 105–32.*) В некоторых аспектах гидрофобная аминокислота характеризуется показателем по шкале гидрофобности Кайта и Дулиттла, составляющим более приблизительно 2,5. В определенных аспектах гидрофобная аминокислота содержит боковую цепь, содержащую C₂–C₁₂алкил с разветвленной или прямой цепью или C₄–C₈циклоалкил, C₄–C₈гетероцикл, содержащий гетероатом азота, где необязательно гетероцикл представляет собой имидазол, пиррол или индол. Для целей данного документа термин "циклоалкил" охватывает любое углеродную циклическую структуру, включая углеродные бициклы или трициклы.

[00113] В иллюстративных аспектах гидрофобная аминокислота содержит C₃–C₈алкил, необязательно гидрофобная аминокислота содержит C₃алкил с разветвленной цепью или C₄алкил с разветвленной цепью. В определенных аспектах гидрофобная аминокислота представляет собой L–валин, L–лейцин или L–изолейцин.

[00114] Аминокислотный ингибитор агрегации применяют в количестве, эффективном для обеспечения повышенной стабильности, и его можно применять в концентрации в диапазоне от приблизительно 10 мМ до приблизительно 200 мМ, например, в диапазоне от приблизительно 30 мМ до приблизительно 120 мМ, или от приблизительно 38 мМ до приблизительно 150 мМ, или от приблизительно 38 мМ до приблизительно 113 мМ, или от приблизительно 38 мМ до приблизительно 75 мМ, например, при приблизительно 10 мМ, приблизительно 38 мМ, приблизительно 75 мМ, приблизительно 113 мМ или приблизительно 150 мМ. В иллюстративных аспектах водный фармацевтический состав содержит от приблизительно 5 мМ до приблизительно 300 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, необязательно от приблизительно 25 мМ до приблизительно 90 мМ аминокислотного ингибитора агрегации. В некоторых аспектах водный фармацевтический состав содержит от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ (например, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 150 мМ, от приблизительно 15 мМ до приблизительно 150 мМ, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 150 мМ, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 140 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 130 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 120 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 110 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 100 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 90 мМ) аминокислотного ингибитора агрегации, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь, необязательно L–аргинин. В некоторых аспектах водный фармацевтический состав

содержит от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ (например, приблизительно 35 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 45 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 55 мМ, приблизительно 60 мМ, приблизительно 65 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 75 мМ) аминокислотного ингибитора агрегации, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь, необязательно L–аргинин.

[00115] В некоторых аспектах водный фармацевтический состав содержит от приблизительно 5 мМ до приблизительно 180 мМ (например, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 180 мМ, от приблизительно 15 мМ до приблизительно 180 мМ, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 180 мМ, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 180 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 170 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 170 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 160 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 140 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 130 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 120 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 110 мМ) аминокислотного ингибитора агрегации, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой ароматическую аминокислоту, необязательно L–фенилаланин. В иллюстративных случаях водный фармацевтический состав содержит от приблизительно 5 мМ до приблизительно 100 мМ (например, приблизительно 10 мМ, приблизительно 15 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 25 мМ, приблизительно 30 мМ, приблизительно 35 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 45 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 55 мМ, приблизительно 60 мМ, приблизительно 65 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 75 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 85 мМ, приблизительно 90 мМ, приблизительно 95 мМ) аминокислотного ингибитора агрегации, необязательно от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой ароматическую аминокислоту, необязательно L–фенилаланин.

[00116] Необязательно водный фармацевтический состав содержит от приблизительно 5 мМ до приблизительно 300 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой гидрофобную аминокислоту, необязательно L–валин, L–изолейцин или L–лейцин. Необязательно водный фармацевтический состав содержит от приблизительно 5 мМ до приблизительно 200 мМ (например, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 30 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 40 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 60 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 70 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 80 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 90 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 100 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 5 мМ до

приблизительно 290 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 280 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 270 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 260 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 250 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 240 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 230 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 220 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 210 мМ) аминокислотного ингибитора агрегации, необязательно от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой гидрофобную аминокислоту, необязательно L-валин, L-изолейцин или L-лейцин. В иллюстративных аспектах водная фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ гидрохлорида L-аргинина; от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L-фенилаланина; от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L-триптофана; от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ гидрохлорида L-лизина; от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L-лейцина; от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L-изолейцина; от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L-валина или любую их комбинацию.

[00117] В иллюстративных аспектах концентрация аминокислотного ингибитора агрегации связана молярным отношением с антителом. В некоторых аспектах молярное отношение аминокислотного ингибитора агрегации к антителу к RANKL составляет от приблизительно 10 до приблизительно 200 (например, от приблизительно 25 до приблизительно 150, от приблизительно 50 до приблизительно 100), если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой ароматическую аминокислоту, необязательно L-фенилаланин. Необязательно молярное отношение составляет от приблизительно 20 до приблизительно 90. В иллюстративных аспектах молярное отношение аминокислотного ингибитора агрегации к антителу RANKL составляет от приблизительно 20 до 300, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь, необязательно L-аргинин. Необязательно молярное отношение составляет от приблизительно 45 до приблизительно 180.

[00118] Поверхностно-активные вещества представляют собой поверхностно-активные средства, которые являются амфипатическими (имеют полярную головку и гидрофобный хвост). Поверхностно-активные вещества преимущественно накапливаются на границах раздела, что приводит к снижению поверхностного натяжения на границе раздела фаз. Необязательно в состав может быть включено поверхностно-активное вещество. Применение поверхностно-активного вещества также может содействовать уменьшению образования крупных белковых частиц.

[00119] В одном варианте осуществления поверхностно-активное вещество может представлять собой неионогенное поверхностно-активное вещество. Примеры включают сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирной кислоты (например, полисорбат 20, полисорбат 80), простые алкиларилловые полиэфиры, например, оксиэтилированный алкилфенол (например, Triton™ X-100) и полуксамеры (например, Pluronic®, например

Pluronic® F68) и комбинации любых из вышеперечисленных, либо в пределах класса поверхностно-активных веществ, либо между разными классами поверхностно-активных веществ. В частности, предусматриваются полисорбат 20 и полисорбат 80.

[00120] Подходящей является концентрация поверхностно-активного вещества в диапазоне от приблизительно 0,004% (вес/объем) до приблизительно 0,1% (вес/объем) (например, в случае полисорбата 20 или полисорбата 80), например, от приблизительно 0,004% до приблизительно 0,05%, или от приблизительно 0,004% до приблизительно 0,02%, или приблизительно 0,01%. В иллюстративных аспектах состав содержит по меньшей мере приблизительно 0,004% (вес/объем) поверхностно-активного вещества, и необязательно меньше приблизительно 0,15% (вес/объем). В иллюстративных аспектах в составе присутствует от приблизительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015% (вес/объем) поверхностно-активного вещества, необязательно приблизительно 0,005% (вес/объем), приблизительно 0,006% (вес/объем), приблизительно 0,007% (вес/объем), приблизительно 0,008% (вес/объем), приблизительно 0,009% (вес/объем), приблизительно 0,010% (вес/объем), приблизительно 0,011% (вес/объем), приблизительно 0,012% (вес/объем), приблизительно 0,013% (вес/объем) или приблизительно 0,014% (вес/объем).

[00121] Стабилизированный водный состав может подходить для введения с помощью любого приемлемого пути введения, включая парентеральный и, в частности, подкожный. Например, подкожное введение может осуществляться в плечо, верхнюю часть бедра или живот. Другие пути введения включают, например, внутривенный, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутриузловой и внутриселезеночный. Подкожный путь является предпочтительным.

[00122] Если раствор находится в форме, предназначенной для введения субъекту, его можно сделать изотоническим относительно предполагаемого участка введения. Например, осмоляльность может находиться в диапазоне от приблизительно 270 до приблизительно 350 мОсм/кг, или от приблизительно 285 до приблизительно 345 мОсм/кг, или от приблизительно 300 до приблизительно 315 мОсм/кг. Например, если раствор находится в форме, предназначенной для парентерального введения, он может быть изотоническим относительно крови (осмоляльность составляет приблизительно 300 мОсм/кг). В иллюстративных аспектах водный фармацевтический состав характеризуется осмоляльностью в диапазоне от приблизительно 200 мОсм/кг до приблизительно 500 мОсм/кг, или от приблизительно 225 мОсм/кг до приблизительно 400 мОсм/кг, или от приблизительно 250 мОсм/кг до приблизительно 350 мОсм/кг.

[00123] В иллюстративных аспектах водный фармацевтический состав характеризуется проводимостью в диапазоне от приблизительно 500 мкСм/см до приблизительно 5500 мкСм/см, где необязательно проводимость находится в диапазоне от приблизительно 2500 мкСм/см до приблизительно 5500 мкСм/см, если состав содержит аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь, или в диапазоне от приблизительно 500 мкСм/см до приблизительно 2000 мкСм/см, если состав содержит ароматическую аминокислоту или не содержит аминокислотного ингибитора агрегации.

Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся вязкостью, которая не превышает приблизительно 6 сП при 5°C, где необязательно вязкость составляет от приблизительно 4,5 сП до приблизительно 5,5 сП. В определенных аспектах водный фармацевтический состав характеризуется вязкостью, которая составляет менее приблизительно 13 сП при 25°C, необязательно от приблизительно 2,0 сП до приблизительно 10 сП, необязательно от приблизительно 2,5 сП до приблизительно 4 сП.

[00124] Модификаторы тоничности или средства, регулирующие тоничность, известны из уровня техники, и они включают такие соединения, как соли (например, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, фосфат натрия, фосфат калия, бикарбонат натрия, карбонат кальция, лактат натрия), сахара (например, декстран, декстозу, лактозу, трегалозу) и сахароспирты (например, маннит, сорбит, ксилит, глицерин, пропиленгликоль). В определенных аспектах модификатор тоничности выбран из группы, состоящей из сорбита, маннита, сахарозы, трегалозы, глицерина и их комбинаций. В иллюстративных случаях модификатор тоничности представляет собой сорбит. Сорбит можно применять, например, в концентрации в диапазоне от 0,1% (вес/объем) до 5% (вес/объем) или от 1,2% (вес/объем) до 5% (вес/объем), например, при 3,6% (вес/объем), 4,6% (вес/объем) или 4,7% (вес/объем). Необязательно, композиция содержит от приблизительно 1,0% (вес/вес) до приблизительно 5,0% (вес/вес) модификатора тоничности. Например, состав содержит от приблизительно 2,0% (вес/вес) до приблизительно 5,0% (вес/вес) сорбита, или от приблизительно 3,5% (вес/вес) до приблизительно 5,0% (вес/вес) сорбита, или от приблизительно 4,0% (вес/вес) до приблизительно 5,0% (вес/вес) сорбита. В некоторых аспектах композиция не содержит какое-либо количество сорбита или не содержит сорбит. В иллюстративных аспектах композиция не содержит какой-либо модификатор тоничности.

[00125] Другие вспомогательные вещества, известные в данной области техники, можно применять в составе, при условии, что они не оказывают отрицательного воздействия на стабильность. Сахара и многоатомные спирты можно применять для защиты белков от агрегации, включая обеспечение стабильности при замораживании/оттаивании. Такие соединения включают сорбит, маннит, глицерин, эритрит, каприлат, триптофанат, саркозид и глицин. Для приготовления лиофилизированных препаратов также можно применять стабилизаторы, например, стабилизирующие сахара, например дисахариды, такие как трегалоза и сахароза. Лيوфилизированный препарат также может включать объемообразующее средство, известное в данной области техники. Другие вспомогательные вещества, известные в данной области техники для стабилизации белка, включают солюбилизующие средства (например, N-метил-2-пирролидон), полиэтиленгликоль (PEG) и циклодекстрины (например, Captisol®). Для регулирования pH раствора можно применять фармацевтически приемлемые кислоты и основания, например, гидроксид натрия.

[00126] Для парентерального введения состав может быть в форме апирогенного, приемлемого для парентерального введения, стерильного водного раствора, содержащего

деносуаб или другое человеческое моноклональное антитело к RANKL, с дополнительными терапевтическими средствами или без них, в фармацевтически приемлемом носителе. В определенных вариантах осуществления носитель для парентеральной инъекции представляет собой стерильную дистиллированную воду, в которой деносуаб или другое человеческое моноклональное антитело к RANKL с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством или без него составлены в виде стерильного изотонического раствора. Композиция будет содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, например, вспомогательные вещества класса USP (Фармакопея США).

[00127] "Консервант" представляет собой соединение, которое можно включать в фармацевтический состав для снижения жизнедеятельности бактерий в нем, например, с облегчением, таким образом, получения состава для множественных применений. Примеры консервантов включают хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония (смесь хлоридов алкилбензилдиметиламмония, в котором алкильные группы представляют собой длинноцепочечные соединения) и хлорид бензетония. Другие типы консервантов включают ароматические спирты, включая фенол, бутиловый и бензиловый спирт, алкилпарабены, включая метил- и пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и мета-крезол. В альтернативном варианте состав может не содержать консервантов. Например, состав, представленный в виде лекарственной формы для однократного применения, может не содержать консервантов.

[00128] Несмотря на то, что состав был описан в данном документе в его водной форме, стабилизированный состав также можно впоследствии лиофилизировать с получением лиофилизата. Соответственно, если контекст не определяет обратное, предполагается, что ссылки на состав и способ его применения включают лиофилизат, полученный из стабилизированного водного раствора.

[00129] Фармацевтический состав, предназначенный для применения *in vivo*, как правило, является стерильным. В определенных вариантах осуществления этого можно достигнуть за счет фильтрации через мембраны для стерилизующей фильтрации. В определенных вариантах осуществления композиции для парентерального введения помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет для внутривенного раствора, или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций, или предварительно заполненный шприц. В определенных вариантах осуществления состав может храниться либо в готовой к употреблению форме, либо в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают или разбавляют перед введением.

[00130] В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на наборы для получения единицы для введения однократной дозы. В определенных вариантах осуществления каждый набор может содержать как первый контейнер с высушенным препаратом деносуаба или другого человеческого моноклонального антитела к RANKL, полученным из состава в виде раствора, описанного

в данном документе, так и второй контейнер со стерильной водой или водным раствором. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидким содержимым и шприцы с лиофилизатом).

[00131] Описанный в данном документе стабилизированный состав можно применять вместе с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, например, кальцием и соединением на основе витамина D. Описанный в данном документе стабилизированный состав можно вводить пациенту, получающему терапию дополнительным терапевтическим средством, или описанный в данном документе стабилизированный состав можно вводить совместно с дополнительным терапевтическим средством.

[00132] Описанный в данном документе стабилизированный состав в любом из своих аспектов и вариантов осуществления можно применять для предупреждения или лечения любого заболевания, реагирующего на деносумаб или другое человеческое моноклональное антитело к RANKL или их антигенсвязывающую часть. Такие пути применения и связанные способы включают без ограничения аспекты и варианты осуществления, описанные ниже.

[00133] В одном аспекте состав можно применять для предупреждения костного осложнения (SRE) у нуждающегося в этом пациента, предусматривающего введение эффективного количества стабилизированного состава, описанного в данном документе. Например, SRE может быть выбрано из группы, состоящей из патологического перелома, лучевой терапии кости, операции на кости и компрессии спинного мозга. Пациентом может быть субъект, у которого имеется метастаз в кости из солидной опухоли. Сольная опухоль может представлять собой, например, одно или несколько из рака молочной железы, рака простаты, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого и почечноклеточной карциномы. Количество состава может быть эффективным для снижения уровня маркера костного ремоделирования, N-концевого телопептида в моче, скорректированного по креатинину (uNTx/Cr), необязательно на по меньшей мере 80%. Пациент может быть пациентом с множественной миеломой.

[00134] В другом аспекте состав можно применять для лечения пациента с гигантоклеточной опухолью кости, предусматривающего введение эффективного количества стабилизированного состава, описанного в данном документе. В одном варианте осуществления у пациента имеется гигантоклеточная опухоль кости, которая является рецидивирующей, неоперабельной, или хирургическая резекция которой вероятно приведет к тяжелым осложнениям. Пациентом может быть, например, взрослый или достигший скелетной зрелости подросток.

[00135] В другом аспекте состав можно применять для лечения пациента с гиперкальциемией злокачественного новообразования кости, предусматривающего введение эффективного количества стабилизированного состава, описанного в данном документе. В одном аспекте злокачественное новообразование может быть резистентным к

терапии бисфосфонатами. Способ или применение могут предусматривать введение состава в количестве, эффективном для снижения или поддержания кальция в сыворотке крови пациента на уровне, равном приблизительно 11,5 мг/дл или меньше.

[00136] В другом аспекте состав можно применять для лечения остеопороза у нуждающегося в этом пациента, предусматривающего введение эффективного количества стабилизированного состава, описанного в данном документе. Например, пациент может быть постменопаузной женщиной с высоким риском перелома. В другом варианте осуществления пациент может быть мужчиной с высоким риском перелома.

[00137] В другом аспекте состав применяют для увеличения костной массы у нуждающегося в этом пациента, предусматривающего введение эффективного количества стабилизированного состава, описанного в данном документе. Например, количество вводимого состава может представлять собой количество, эффективное для уменьшения частоты новых переломов позвонков и/или невертебральных переломов. В другом варианте осуществления количество вводимого состава может представлять собой количество, эффективное для уменьшения резорбции кости. В другом варианте осуществления количество состава может представлять собой количество, эффективное для увеличения плотности кости у пациента в по меньшей мере одной области, выбранной из поясничного отдела позвоночника, тазобедренного сочленения и шейки бедра. В другом варианте осуществления количество состава может представлять собой количество, эффективное для увеличения костной массы в трубчатой кости и/или губчатой кости пациента. В другом варианте осуществления количество состава может представлять собой количество, эффективное для снижения уровня маркера костной резорбции, С-телопептида типа 1 в сыворотке крови (СТХ). Нуждающийся в этом пациент необязательно может иметь остеопороз. В другом варианте осуществления нуждающийся в этом пациент может быть женщиной с высоким риском перелома, получающей адъювантную терапию ингибитором ароматазы при раке молочной железы. В другом варианте осуществления нуждающийся в этом пациент может представлять собой мужчину с высоким риском перелома, получающего антиандрогенную терапию при метастатическом раке предстательной железы. В другом варианте осуществления нуждающийся в этом пациент может быть мужчиной с остеопорозом с высоким риском перелома.

[00138] В другом аспекте состав можно применять в качестве адъювантного лечения для постменопаузных женщин на ранней стадии рака молочной железы с высоким риском рецидива заболевания, получающих адъювантную/неадъювантную терапию рака.

[00139] В другом аспекте состав можно применять в качестве терапии первой линии у пациентов с метастатическим немелкоклеточным раком легкого в комбинации с химиотерапией на основе платины.

[00140] В другом аспекте состав можно применять для лечения идиопатического субглottического стеноза (ISS).

[00141] В другом аспекте состав можно применять для предупреждения рака молочной железы и рака яичников у здоровых женщин с мутацией BRCA-1.

[00142] Необязательно состав можно применять в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек. Необязательно ингибитор иммунных контрольных точек является специфическим в отношении белка, который функционирует в пути иммунных контрольных точек, например, CTLA4, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7H4, BTLA, SLAM, 2B4, CD160, KLRG-1 или TIM3. Необязательно ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или белковый продукт антитела, специфический в отношении CTLA4, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7H4, BTLA, SLAM, 2B4, CD160, KLRG-1 или TIM3. Такие ингибиторы иммунных контрольных точек включают без ограничения атезолизумаб, авелумаб, ипилимумаб, тремелиумаб, BMS-936558, MK3475, CT-011, AM-224, MDX-1105, IMP321, MGA271. Ингибиторы PD-1 включают, например, пембролизумаб и ниволумаб. Ингибиторы PD-L1 включают, например, атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб. Ингибиторы CTLA4 включают, например, ипилимумаб. В другом аспекте состав можно применять для лечения пациентов с меланомой, имеющих метастазы в кости, необязательно в комбинации с антителом к PD-1 (например, ниволумабом, пембролизумабом). В другом аспекте состав можно применять для лечения пациентов с раком молочной железы, необязательно в комбинации с ингибитором CTLA4, таким как ипилимумаб.

[00143] В другом аспекте состав можно применять для лечения опухолей с повышенным содержанием гигантских клеток, например, в случае гиперпаратиреоза или вторичной доброкачественной костной аневризмы.

[00144] В другом аспекте состав можно применять для лечения прогрессирующего метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы (mCRPC). В другом аспекте состав можно применять для лечения кастрационно-чувствительного рака предстательной железы. В другом аспекте состав можно применять для лечения гормоно-резистентного рака предстательной железы.

[00145] В другом аспекте состав можно применять для лечения метастатического рака молочной железы (mBC). В другом аспекте состав можно применять для предоперационного лечения рака молочной железы. В другом аспекте состав можно применять для лечения раннего рака молочной железы. В других аспектах состав можно применять для лечения гормон-рецептор-негативного, RANK-позитивного или RANK-негативного первичного рака молочной железы. В другом аспекте состав можно применять для лечения постменопаузного HER2-негативного рака молочной железы.

[00146] В другом аспекте состав можно применять для лечения миелодиспластического синдрома, например, у пожилого пациента.

[00147] В другом аспекте состав можно применять для лечения потери костной массы, индуцированной лечением рака (CTIBL).

[00148] В другом аспекте состав можно применять для лечения опухоли шейки матки.

[00149] В другом аспекте состав можно применять для индуцирования иммуномодулирующих эффектов у пациентов с иммунотерапией или без нее.

[00150] В другом аспекте состав можно применять для предупреждения или лечения потери костной массы, ассоциированной с остеопорозом, болезнью Педжета, остеомиелитом, гиперкальциемией, остеопенией, остеонекрозом и ревматоидным артритом. В другом аспекте состав можно применять для предупреждения или лечения воспалительных состояний с потерей костной массы. В другом аспекте состав можно применять для предупреждения или лечения аутоиммунных состояний с потерей костной массы. В другом аспекте состав можно применять для предупреждения или лечения потери костной массы, ассоциированной с раком, включая виды рака молочной железы, предстательной железы, щитовидной железы, почки, легкого, пищевода, прямой кишки, мочевого пузыря, шейки матки, яичника, печени и желудочно-кишечного тракта, множественную миелому, лимфому и болезнь Ходжкина.

[00151] Состав можно вводить согласно любой подходящей временной схеме. В одном варианте осуществления введения проводят по схеме, включающей один раз через каждые четыре недели. Необязательно введение может предусматривать введение в дни 8 и 15 первого месяца терапии. В другом варианте осуществления введение можно осуществлять по схеме, предусматривающей один раз через каждые шесть месяцев. Например, при остеопорозе и в случае увеличения костной массы схема предусматривает введение один раз через каждые шесть месяцев. Другие предусматриваемые поддерживающие дозы составляют через каждые 3 недели, через каждые 3 месяца и через каждые 6 недель.

[00152] В некоторых аспектах водный фармацевтический состав применяют для лечения пациента с множественной миеломой или метастазами в кости из солидной опухоли. В определенных аспектах состав вводят при дозе, составляющей приблизительно 120 мг, через каждые 4 недели в виде подкожной инъекции в плечо, верхнюю часть бедра или живот.

[00153] В некоторых аспектах водный фармацевтический состав применяют для лечения пациента с гигантоклеточной опухолью кости. В определенных аспектах состав вводят при дозе, составляющей приблизительно 120 мг, через каждые 4 недели с дополнительными дозами по 120 мг в дни 8 и 15 первого месяца терапии. В некоторых аспектах состав вводят подкожно в плечо, верхнюю часть бедра или живот пациента. В некоторых случаях пациенту вводят кальций и витамин D для лечения или предупреждения гипокальциемии.

[00154] В некоторых аспектах водный фармацевтический состав применяют для лечения пациента с гиперкальциемией злокачественного образования. В определенных аспектах состав вводят при дозе, составляющей приблизительно 120 мг, через каждые 4 недели с дополнительными дозами по 120 мг в дни 8 и 15 первого месяца терапии. В некоторых аспектах состав вводят подкожно в плечо, верхнюю часть бедра или живот.

[00155] В некоторых аспектах водный фармацевтический состав применяют для лечения постменопаузных женщин с остеопорозом с высоким риском перелома, или для увеличения костной массы у мужчин с высоким риском переломов, получающих

антиандрогенную терапию при неметастатическом раке предстательной железы, или у женщин с высоким риском переломов, получающих адъювантную терапию ингибитором ароматазы при раке молочной железы. В некоторых аспектах водный фармацевтический состав вводит медицинский работник и при дозе 60 мг через каждые 6 месяцев в виде подкожной инъекции в плечо, верхнюю часть бедра или живот. В некоторых аспектах пациенту также предписывают принимать 1000 мг кальция в день и по меньшей мере 400 МЕ витамина D в день.

[00156] Один тип состава согласно настоящему раскрытию будет содержать деносумаб, ацетат и аргинин. Аргинин необязательно представляет собой L-аргинин. Аргинин необязательно представляет собой гидрохлорид L-аргинина. Состав может необязательно включать сорбит. Состав может необязательно включать полисорбат. Полисорбат необязательно может представлять собой полисорбат 20. pH необязательно может составлять от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2 или менее 5,2.

[0100] Другой тип состава согласно настоящему раскрытию будет содержать деносумаб, ацетат и фенилаланин. Состав может необязательно включать сорбит. Состав может необязательно включать полисорбат. Полисорбат необязательно может представлять собой полисорбат 20. pH необязательно может составлять от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2 или менее 5,2. Например, состав может включать деносумаб в концентрации от приблизительно 108 мг/мл до приблизительно 132 мг/мл, от приблизительно 28,8 mM до приблизительно 35,2 mM ацетата, от 33,3 mM до приблизительно 40,7 mM фенилаланина, от 3,51% (вес/объем) до приблизительно 4,29% (вес/объем) сорбита и от приблизительно 0,009% (вес/объем) до приблизительно 0,011% (вес/объем) полисорбата 20 при pH 5,1, и необязательно он может содержаться в PFS, необязательно содержащем состав в количестве приблизительно 1 мл или менее приблизительно 1 мл (например, приблизительно 0,5 мл). Например, композиция может включать деносумаб в концентрации, составляющей 120 мг/мл, 32 mM ацетата, 37 mM фенилаланина, 3,9% (вес/объем) сорбита и 0,01% (вес/объем) полисорбата 20 при pH 5,1, и необязательно она может содержаться в PFS, необязательно содержащем состав в количестве приблизительно 1 мл или менее приблизительно 1 мл (например, приблизительно 0,5 мл). Состав можно изготавливать путем концентрирования деносумаба с применением буфера для диафильтрации, содержащего 20 mM ацетата, 4,2% (вес/объем) сорбита и 40 mM фенилаланина, при pH 4,7.

[0101] Другой тип состава согласно настоящему раскрытию будет содержать деносумаб, глутамат и аргинин. Аргинин необязательно представляет собой L-аргинин. Аргинин необязательно представляет собой гидрохлорид L-аргинина. Состав может необязательно включать сорбит. Состав может необязательно включать полисорбат. Полисорбат необязательно может представлять собой полисорбат 20. pH необязательно может составлять от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2 или менее 5,2.

[0102] Другой тип состава согласно настоящему раскрытию будет содержать деносумаб, ацетат, аргинин и фенилаланин. Состав может необязательно включать сорбит.

Состав может необязательно включать полисорбат. Полисорбат необязательно может представлять собой полисорбат 20. pH необязательно может составлять от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2 или менее 5,2.

[0103] Другой тип состава согласно настоящему раскрытию будет содержать деносумаб, глутамат, аргинин и фенилаланин. Аргинин необязательно представляет собой L-аргинин. Аргинин необязательно представляет собой гидрохлорид L-аргинина. Состав может необязательно включать сорбит. Состав может необязательно включать полисорбат. Полисорбат необязательно может представлять собой полисорбат 20. pH необязательно может составлять от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2 или менее 5,2.

[0104] Составы согласно настоящему раскрытию могут быть изготовлены с помощью любого подходящего способа. В одном типе способа раствор, содержащий моноклональное антитело к RANKL (например, деносумаб), может быть приготовлен в концентрации менее 70 мг/мл, в раствор можно добавить подходящее количество аминокислотного ингибитора агрегации, описанного в данном документе, и затем раствор можно концентрировать до описанного в данном документе значения, превышающего 70 мг/мл, например 120 мг/мл. Необязательно вначале раствор может быть сверхконцентрированным, т. е. доведен до концентрации моноклонального антитела к RANKL (например, деносумаба), превышающей конечную целевую концентрацию, а затем сверхконцентрированный раствор можно разбавлять, например, с помощью буферного раствора с отрегулированным pH, до конечной целевой концентрации и pH. Например, сверхконцентрирование может приводить к значению моноклонального антитела к RANKL (например, деносумаба) в диапазоне от 130 мг/мл до 300 мг/мл или от 180 мг/мл до 300 мг/мл. Начальная концентрация деносумаба перед концентрированием конкретно не ограничивается, и она может составлять, например, приблизительно 1 мг/мл, или приблизительно 2 мг/мл, или приблизительно 5 мг/мл, или приблизительно 8 мг/мл, или приблизительно 10 мг/мл, или приблизительно 20 мг/мл, или приблизительно 30 мг/мл, или приблизительно 40 мг/мл, или приблизительно 50 мг/мл, или приблизительно 60 мг/мл, или приблизительно 70 мг/мл, или находиться в диапазоне, ограниченном любыми такими концентрациями, например, от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 70 мг/мл или от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл.

[0105] Концентрирование состава можно осуществлять с помощью любого подходящего способа. В одном аспекте способ концентрирования может предусматривать центрифугирование. В другом аспекте способ концентрирования может предусматривать ультрафильтрацию.

[0106] Введение аминокислотного ингибитора агрегации в состав можно осуществлять с помощью любого подходящего способа. Например, аминокислотный ингибитор агрегации можно вводить в состав путем простого добавления (введения) в состав, например, как описано в примерах ниже. В другом способе аминокислотный ингибитор агрегации можно вводить в состав путем диафильтрации против буферного раствора, содержащего аминокислотный ингибитор агрегации, например, как описано в

примерах ниже. Аминокислотный ингибитор агрегации можно вводить в состав перед концентрированием или после концентрирования моноклонального антитела к RANKL до значения выше 70 мг/мл. Как показано в приведенных ниже примерах, предпочтительно добавлять аминокислотный ингибитор агрегации в раствор перед концентрированием, поскольку он ингибирует агрегацию во время процесса концентрирования.

[0107] Соответственно, в настоящем раскрытии представлены способы получения стабильного водного фармацевтического состава, содержащего человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора–активатора ядерного фактора каппа–В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть. В иллюстративных случаях способ предусматривает объединение моноклонального антитела к RANKL или его антигенсвязывающей части в концентрации более 70 мг/мл с аминокислотным ингибитором агрегации, буфером, поверхностно–активным веществом и необязательно модификатором тоничности. Антитело или его антигенсвязывающая часть могут представлять собой любые из описанных в данном документе, а концентрация антитела или его антигенсвязывающей части может соответствовать идеям, приведенным в данном документе. Аминокислотный ингибитор агрегации может представлять собой любой из описанных в данном документе. Например, аминокислотный ингибитор агрегации может представлять собой положительно заряженную аминокислоту, ароматическую аминокислоту или гидрофобную аминокислоту. Аминокислотный ингибитор агрегации может находиться в молярном отношении с антителом, описываемым в данном документе. Количество и выбор ингибитора агрегации, поверхностно–активного вещества, модификатора тоничности и буфера являются такими, как описано выше. В настоящем раскрытии также представлены составы, полученные с помощью способов получения, описанных в данном документе.

[0108] Состав согласно настоящему раскрытию может предусматривать регуляцию pH у высококонцентрированного раствора моноклонального антитела к RANKL (например, деносуаба), описанного в данном документе, например, раствора с концентрацией, превышающей 70 мг/мл или 120 мг/мл. В другом аспекте состав можно получать путем регулирования pH у раствора с низкой концентрацией моноклонального антитела к RANKL (например, деносуаба), а затем концентрирования раствора до требуемой, более высокой конечной концентрации. Подходящие средства, регулирующие pH, известны в данной области техники.

[0109] *Варианты осуществления*

[0110] Ниже приведен перечень конкретных предусматриваемых вариантов осуществления:

1. Водный фармацевтический состав, содержащий человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора–активатора ядерного фактора каппа–В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть в концентрации более 70 мг/мл и характеризующийся pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2.
2. Состав по варианту осуществления 1, характеризующийся pH в диапазоне от

приблизительно 5,0 до 5,19, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,15, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,1.

3. Состав по варианту осуществления 2, характеризующийся рН, составляющим приблизительно 5,1.

4. Состав по любому из вариантов осуществления 1–3, дополнительно содержащий аминокислотный ингибитор агрегации.

5. Водный фармацевтический состав, содержащий смесь человеческого моноклонального антитела к лиганду рецептора–активатора ядерного фактора каппа–В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающей части и аминокислотного ингибитора агрегации.

6. Состав по варианту осуществления 5, характеризующийся рН в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,4, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2, или от приблизительно 5,0 до менее 5,2, или от приблизительно 5,0 до 5,19, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,15, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,1.

7. Состав по варианту осуществления 6, характеризующийся рН, составляющим приблизительно 5,1.

8. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащий буфер, обеспечивающий требуемый рН.

9. Состав по любому из вариантов осуществления 5–8, где концентрация антитела или его антигенсвязывающей части находится в диапазоне от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл.

10. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где концентрация антитела или его антигенсвязывающей части находится в диапазоне от более 70 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл.

11. Состав по варианту осуществления 10, где концентрация антитела или его антигенсвязывающей части находится в диапазоне от приблизительно 100 до приблизительно 140 мг/мл.

12. Состав по варианту осуществления 11, где концентрация антитела или его антигенсвязывающей части составляет приблизительно 120 мг/мл.

13. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антитело представляет собой деносуаб или его биологический аналог.

14. Состав по варианту осуществления 13, где антитело представляет собой деносуаб.

15. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где аминокислотный ингибитор агрегации выбран из одной или нескольких аминокислот, их дипептидов или олигопептидов, имеющих от 2 до 10 остатков.

16. Состав по варианту осуществления 15, где аминокислотный ингибитор агрегации предусматривает смесь из по меньшей мере двух аминокислот.

17. Состав по варианту осуществления 16, где аминокислоты включают аргинин и

фенилаланин.

18. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где аминокислотный ингибитор агрегации выбран из одной или нескольких гидрофобных аминокислот, их дипептидов или олигопептидов, имеющих от 2 до 10 остатков и содержащих одну или несколько гидрофобных аминокислот.

19. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где аминокислотный ингибитор агрегации выбран из одной или нескольких аминокислот, несущих заряженную боковую цепь, их дипептидов или олигопептидов, имеющих от 2 до 10 остатков и содержащих одну или несколько аминокислот, несущих заряженную боковую цепь.

20. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где аминокислотный ингибитор агрегации выбран из одной или нескольких основных аминокислот, их дипептидов или олигопептидов, имеющих от 2 до 10 остатков и содержащих одну или несколько основных аминокислот.

21. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где аминокислотный ингибитор агрегации выбран из одного или нескольких дипептидов.

22. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где аминокислотный ингибитор агрегации выбран из одного или нескольких олигопептидов, имеющих от 2 до 10 аминокислотных остатков.

23. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где аминокислотный ингибитор агрегации содержит аргининовый остаток, или аминокислотный ингибитор агрегации предусматривает аргинин.

24. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где аминокислотный ингибитор агрегации предусматривает дипептид аргинин–фенилаланин.

25. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где аминокислотный ингибитор агрегации присутствует в составе в концентрации в диапазоне от приблизительно 10 мМ до приблизительно 200 мМ.

26. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащий поверхностно–активное вещество.

27. Состав по варианту осуществления 26, где поверхностно–активное вещество выбрано из одного или нескольких сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (например, полисорбата 20, полисорбата 80), или одного или нескольких простых алкиларилowych полиэфиров, например оксиэтилированного алкилфенола (например, Triton® X–100), или одного или нескольких полуксамеров (например, Pluronic®, например Pluronic® F68) и их комбинации.

28. Состав по варианту осуществления 26 или 27, где поверхностно–активное вещество присутствует в концентрации в диапазоне от приблизительно 0,004% (вес/объем) до приблизительно 0,1% (вес/объем).

29. Состав по варианту осуществления 28, где поверхностно–активное вещество присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 0,01% (вес/объем).

30. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащий буфер.

31. Состав по варианту осуществления 30, где при 25°C буфер центрирован в диапазоне от приблизительно рН 4 до приблизительно рН 5,5.

32. Состав по варианту осуществления 30 или 31, где при 25°C буфер характеризуется рКа в пределах одной единицы рН от рН 5,0–5,2.

33. Состав по любому из вариантов осуществления 30–32, где буфер содержит ацетат.

34. Состав по любому из вариантов осуществления 30–32, где буфер содержит глутамат.

35. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащий модификатор тоничности.

36. Состав по варианту осуществления 35, где модификатор тоничности выбран из одного или нескольких из сорбита, маннита, сахарозы, трегалозы, глицерина и их комбинаций.

37. Состав по варианту осуществления 36, где модификатор тоничности предусматривает сорбит.

38. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащий одно или несколько дополнительных вспомогательных веществ, выбранных из сахаров, многоатомных спиртов, солюбилизирующих средств (например, N–метил–2–пирролидона), гидрофобных стабилизаторов (например, пролина), полиэтиленгликоля, циклодекстринов и их комбинаций.

39. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий менее 2% высокомолекулярных разновидностей человеческого моноклонального антитела к RANKL, как определено с помощью SE–UHPLC, после хранения при 37°C в течение трех месяцев.

40. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий менее 2% высокомолекулярных разновидностей человеческого моноклонального антитела к RANKL, как определено с помощью SE–UHPLC, после хранения при 4°C в течение 36 месяцев.

41. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий по меньшей мере 98% главного пика антитела, как определено с помощью SE–UHPLC, после хранения при 37°C в течение трех месяцев.

42. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий по меньшей мере 98% главного пика антитела, как определено с помощью SE–UHPLC, после хранения при 4°C в течение 36 месяцев.

43. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий деносуаб; аминокислотный ингибитор агрегации, выбранный из одного или нескольких из аргинина, его дипептида или олигомера, имеющего 2–10 остатков и содержащего аргинин; ацетатный буфер; сорбит и поверхностно–активное вещество, характеризующееся

pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2.

44. Состав по варианту осуществления 43, где аминокислотный ингибитор агрегации выбран из аргинина, аргинин–аргинина или аргинин–фенилаланина.

45. Состав по варианту осуществления 43, где аминокислотный ингибитор агрегации содержит смесь аргинина и фенилаланина.

46. Состав по любому из вариантов осуществления 43–45, где ацетатный буфер присутствует в диапазоне от приблизительно 5 мМ до приблизительно 25 мМ.

47. Состав по любому из вариантов осуществления 43–46, где сорбит присутствует в диапазоне от 0,1% (вес/объем) до 5% (вес/объем).

48. Состав по любому из вариантов осуществления 43–47, где поверхностно–активное вещество выбрано из одного или нескольких из полисорбата 20 и полисорбата 80.

49. Состав по любому из вариантов осуществления 43–48, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,15.

50. Состав по варианту осуществления 49, где pH составляет приблизительно 5,10.

51. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где состав подходит для подкожной инъекции.

52. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где состав является стерильным и не содержит консервантов.

53. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где человеческое моноклональное антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат: (1) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1; или (2) области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно, и области CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно.

54. Состав по любому из предыдущих вариантов осуществления, где человеческое моноклональное антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть представляют собой антитело.

55. Состав по любому из вариантов осуществления 1–53, где человеческое моноклональное антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть представляют собой антигенсвязывающую часть.

56. Флакон, предварительно заполненный шприц или стеклянный контейнер, содержащие состав по любому из вариантов осуществления 1–55.

57. Флакон, предварительно заполненный шприц или стеклянный контейнер по варианту осуществления 56, содержащие состав в количестве приблизительно 1 мл или меньше.

58. Способ предупреждения костного осложнения (SRE) у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение эффективного количества состава по любому из вариантов осуществления 1–55.

59. Способ по варианту осуществления 58, где SRE выбрано из группы, состоящей из патологического перелома, лучевой терапии кости, операции на кости и компрессии

спинного мозга.

60. Способ по варианту осуществления 58 или 59, где у пациента имеется метастаз в кости из солидной опухоли.

61. Способ по варианту осуществления 60, где солидная опухоль выбрана из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого и почечноклеточной карциномы.

62. Способ по варианту осуществления 58 или 59, где у пациента имеется множественная миелома.

63. Способ по любому из вариантов осуществления 58–62, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для снижения уровня маркера костного ремоделирования, N-концевого телопептида в моче, скорректированного по креатинину (uNTx/Cr), необязательно на по меньшей мере 80%.

64. Способ лечения гигантоклеточной опухоли кости у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение эффективного количества состава по любому из вариантов осуществления 1–55.

65. Способ по варианту осуществления 64, где у пациента имеется гигантоклеточная опухоль кости, которая является рецидивирующей, неоперабельной, или хирургическая резекция которой вероятно приведет к тяжелым осложнениям.

66. Способ лечения гиперкальциемии злокачественного новообразования у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение эффективного количества состава по любому из вариантов осуществления 1–55.

67. Способ по варианту осуществления 66, где злокачественное новообразование является резистентным к терапии бисфосфонатами.

68. Способ по варианту осуществления 66 или 67, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для снижения или поддержания кальция в сыворотке крови пациента на уровне, равном приблизительно 11,5 мг/дл или меньше.

69. Способ по любому из вариантов осуществления 58–68, где состав содержит человеческое антитело к RANKL в концентрации, составляющей приблизительно 120 мг/мл.

70. Способ по любому из вариантов осуществления 58–69, предусматривающий введение состава по схеме, включающей один раз через каждые четыре недели.

71. Способ по любому из вариантов осуществления 58–70, предусматривающий введение состава в дни 8 и 15 первого месяца терапии.

72. Способ лечения остеопороза у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение эффективного количества состава по любому из вариантов осуществления 1–55.

73. Способ по варианту осуществления 72, где пациент представляет собой постменопаузную женщину с высоким риском перелома.

74. Способ по варианту осуществления 72, где пациент представляет собой мужчину с высоким риском перелома.

75. Способ увеличения костной массы у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение эффективного количества состава по любому из вариантов осуществления 1–55.

76. Способ по варианту осуществления 75, где у пациента имеется остеопороз.

77. Способ по варианту осуществления 75, где пациент представляет собой женщину с высоким риском перелома, получающую адъювантную терапию ингибитором ароматазы при раке молочной железы.

78. Способ по варианту осуществления 75, где пациент представляет собой мужчину с высоким риском перелома, получающего антиандрогенную терапию при неметастатическом раке предстательной железы.

79. Способ по любому из вариантов осуществления 75–78, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для снижения частоты новых переломов позвонков и/или невертебральных переломов.

80. Способ по любому из вариантов осуществления 75–79, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для уменьшения резорбции кости.

81. Способ по любому из вариантов осуществления 75–80, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для увеличения плотности кости у пациента в по меньшей мере одной области, выбранной из поясничного отдела позвоночника, тазобедренного сочленения и шейки бедра.

82. Способ по любому из вариантов осуществления 75–81, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для увеличения костной массы в трубчатой кости и/или губчатой кости пациента.

83. Способ по любому из вариантов осуществления 75–82, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для снижения уровня маркера костной резорбции, С-телопептида типа 1 в сыворотке крови (СТХ).

84. Способ по любому из вариантов осуществления 75–83, предусматривающий введение состава по схеме, включающей один раз через каждые шесть месяцев.

85. Способ по любому из вариантов осуществления 58–84, предусматривающий введение состава в объеме 1 мл или меньше.

86. Способ по любому из вариантов осуществления 58–85, предусматривающий введение состава подкожно.

87. Способ по варианту осуществления 86, предусматривающий введение состава подкожно в плечо, верхнюю часть бедра или живот.

88. Способ по любому из вариантов осуществления 58–87, где пациент получает один или оба из кальция и витамина D.

89. Способ улучшения стабильности водного фармацевтического состава, содержащего человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора–активатора ядерного фактора каппа–В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть в концентрации более 70 мг/мл, предусматривающий:

получение указанного водного фармацевтического состава, содержащего указанное

человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора–активатора ядерного фактора каппа–В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть, при pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2,

где указанный водный фармацевтический состав демонстрирует улучшенную стабильность при pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2 по сравнению с эквивалентным водным фармацевтическим составом, pH которого не находится в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2.

90. Способ улучшения стабильности водного фармацевтического состава, содержащего человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора–активатора ядерного фактора каппа–В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть, предусматривающий:

получение указанного водного фармацевтического состава, содержащего указанное человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора–активатора ядерного фактора каппа–В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть в смеси с аминокислотным ингибитором агрегации,

где указанный водный фармацевтический состав с аминокислотным ингибитором агрегации демонстрирует улучшенную стабильность по сравнению с эквивалентным водным фармацевтическим составом без аминокислотного ингибитора агрегации.

ПРИМЕРЫ

[0111] Следующие примеры приведены для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. На протяжении всех примеров, представленных в данном документе, используются следующие сокращения: DF, диафильтрация; PS20, полисорбат 20, HCl, гидрохлорид, UF/DF, ультрафильтрация/диафильтрация; № F, номер состава; HMWS, высокомолекулярные разновидности; SE–UHPLC, эксклюзионная ультравысокоэффективная жидкостная хроматография. Кроме того, на протяжении всех данных примеров представлена композиция буфера для DF или буфера для диализа, применяемых для приготовления конечного состава, содержащего деносумаб, а также рассчитанные концентрации компонентов конечного состава. Конечные концентрации определенных компонентов конечных составов, хранящихся и впоследствии анализируемых в отношении стабильности, могут отличаться от концентраций буфера для DF или диализа, в зависимости от присутствия или отсутствия противоиона (например, HCl). Без противоиона составы характеризуются низкой ионной силой. В таких случаях ацетат концентрируется совместно с деносумабом, вследствие чего конечные составы содержат более высокую концентрацию ацетата относительно концентрации в буфере для DF или диализа. Например, применение буфера для DF, содержащего 10 мМ ацетата, приводит к ~23 мМ ацетата в конечном составе деносумаба (120 мг/мл) (pH 5,1), если ни буфер для DF, ни конечный препарат не содержат противоион (например, HCl) и, таким образом, состав имеет низкую ионную силу. Аналогично, буфер для DF, содержащий 20 мМ ацетата, приводит к ~32 мМ ацетата в конечном составе деносумаба (120 мг/мл) при pH 5,1 при

отсутствии противоиона (например, HCl). Если противоион (например, HCl в аргинин–HCl) присутствует, ацетат не концентрируется совместно с деносумабом, и, следовательно, концентрация ацетата в буфере для DF и концентрация ацетата в конечном составе обычно эквивалентны. Кроме того, вспомогательные вещества могут исключаться волюметрически или могут подвергаться воздействию неспецифических взаимодействий. Например, в составе на основе 120 мг/мл деносумаба концентрации фенилаланина и сорбита на приблизительно 7–10% ниже, чем концентрации, указанные в буфере для DF, а концентрация аргинина на приблизительно 10–15% ниже. Ввиду вышеизложенного на протяжении всех следующих примеров представлены концентрации компонентов в конечных составах, учитывающие вышеописанные эффекты исключения вспомогательных веществ и совместного концентрирования ацетата.

ПРИМЕР 1

[0112] Проводили первоначальную оценку двенадцати составов в отношении их влияний, связанных со сведением к минимуму количества (%) HMWS в высококонцентрированном жидком составе на основе деносумаба (120 мг/мл) и их образования с течением времени. Альтернативные составы предусматривали изменения типа буфера, стабилизаторов и pH раствора. Протестированные составы A–L описаны в таблице 1 ниже. Все указанные значения буферов приводятся для концентрации буфера, против которого диафильтруется антитело. Каждое вспомогательное вещество и поверхностно-активное вещество добавляли в раствор после замены буфера до уровня, указанного в таблице. Хотя концентрации ацетата в составах по настоящему изобретению не измеряли, составы на основе 120 мг/мл деносумаба, содержащие сорбит, диафильтрацию которых проводили против 10 mM ацетата, характеризовались приблизительными конечными значениями ацетата, составляющими от 25 mM до 35 mM ацетата.

[0113] Деносумаб при 70 мг/мл в ацетате, pH 5,2 подвергали UF/DF против 10 mM ацетата, pH 5,2, и концентрировали до 160 мг/мл. Исходные растворы, которые готовили в 10 mM ацетате при pH 5,2, состояли из:

[0114] 35% сорбита

[0115] 1% полисорбата 20

[0116] 1% полисорбата 80

[0117] 30% Pluronic® F-68

[0118] 3% Triton™ X-100

[0119] 250 mM L-аргинина–HCl

[0120] 250 mM N-ацетиларгинина (NAR)

[0121] 250 mM N-ацетиллизина (NAK)

[0122] 250 mM пролина

[0123] 250 mM полиэтиленгликоля (PEG) 3350

[0124] 250 mM циклодекстрина Captisol®

[0125] Чтобы получить составы A–J, материал с концентрацией 160 мг/мл, приготовленный с помощью 10 mM ацетата, pH 5,2 разбавляли до 120 мг/мл с применением

10 мМ ацетата при pH 5,2 с последующим добавлением соответствующих исходных растворов сорбита, вспомогательного вещества и/или поверхностно-активного вещества до целевой конечной концентрации, перечисленной в таблице 1. Чтобы получить составы К и L, самозабуференный и глутаматный составы, соответственно, две отдельные аликвоты материала с концентрацией 160 мг/мл подвергали дополнительной замене буфера путем центрифугирования. Затем материал для составов К и L разбавляли до 120 мг/мл с применением соответствующего буфера с последующим добавлением соответствующих исходных растворов сорбита и полисорбата 20 до целевой конечной концентрации, перечисленной в таблице составов в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1

	<i>Сокращение</i>	<i>Композиция состава</i>
A	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,2	10 мМ ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, 0,01 (вес/объем) полисорбата 20, pH 5,2
B	Ацетат/сорбит/PS80/pH 5,2	10 мМ ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, 0,01 (вес/объем) полисорбата 80, pH 5,2
C	Ацетат/сорбит/Pluronic F68/pH 5,2	10 мМ ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, 0,01 (вес/объем) Pluronic F68, pH 5,2
D	Ацетат/сорбит/Triton X-100/pH 5,2	10 мМ ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, 0,01 (вес/объем) Triton X-100, pH 5,2
E	Ацетат/аргинин/сорбит/PS20 /pH 5,2	10 мМ ацетата, 10 мМ L-аргинина-HCl, 2,4% (вес/объем) сорбита, 0,01 (вес/объем) полисорбата 20, pH 5,2
F	Ацетат/NAR/сорбит/PS20/pH 5,2	10 мМ ацетата, 10 мМ NAR, 3,7% (вес/объем) сорбита, 0,01 (вес/объем) полисорбата 20, pH 5,2
G	Ацетат/NAK/сорбит/PS20/pH 5,2	10 мМ ацетата, 10 мМ NAK, 3,7% (вес/объем) сорбита, 0,01 (вес/объем) полисорбата 20, pH 5,2
H	Ацетат/пролин/PS20/pH 5,2	10 мМ ацетата, 10 мМ L-пролина, 0,01 (вес/объем) полисорбата 20, pH 5,2
I	Ацетат/PEG/сорбит/PS20/pH 5,2	10 мМ ацетата, 5 мМ PEG3350, 5% (вес/объем) сорбита, 0,01 (вес/объем) полисорбата 20, pH 5,2
J	Ацетат/Captisol/сорбит/PS20/ pH 5,2	10 мМ ацетата, 2,7 мМ Captisol, 5% (вес/объем) сорбита, 0,01 (вес/объем) полисорбата 20, pH 5,2
K	Самозабуференный/сорбит/P S20/pH 5,2	5% (вес/объем) сорбита, 0,01% (вес/объем) полисорбата 20, pH 5,2
L	Глутамат/аргинин/сорбит/PS	10 мМ глутамата, 10 мМ L-аргинина-HCl, 2,4%

	20/pH 5,0	(вес/объем) сорбита, 0,01 (вес/объем) полисорбата 20, pH 5,0
--	-----------	--

[0126] На фигуре 1 показан процент HMWS, отслеживаемых с помощью SE-UHPLC, в зависимости от состава и времени при 37°C. В случае состава L, состоящего из приблизительно 10 мМ глутаматного буфера, 10 мМ L-аргинина-HCl, 2,4% (вес/объем) сорбита в качестве модификатора тоничности, 0,01% (вес/объем) полисорбата 20 в качестве поверхностно-активного вещества и при значении pH 5,0, показано как уменьшение начальных количеств HMWS, что предполагает некоторое снижение уже сформировавшихся агрегатов, так и уменьшенная кинетика образования HMWS при 37°C.

ПРИМЕР 2

[0127] Оценка составов со вспомогательными веществами, представляющими собой 10 мМ ацетата, 75 мМ L-аргинина, 2,4% (вес/объем) сорбита, 0,01% (вес/объем) полисорбата 20, а также составов со вспомогательными веществами, представляющими собой 10 мМ ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, 0,01% (вес/объем) полисорбата 20, причем все составы с высокой концентрацией (120 мг/мл) деносуаба, при температуре 37°C в течение максимум 1 месяца выявила влияние pH и аминокислотного ингибитора агрегации на скорость и степень образования HMWS. Протестированные составы описаны в таблице 2 ниже. Все указанные значения буферов и вспомогательных веществ приводятся для концентраций буферов и вспомогательных веществ, против которых диафильтруется антитело.

[0128] Для приготовления тестируемых образцов M-Q, 3-мл аликвоту деносуаба при 70 мг/мл в ацетате, pH 5,2, диализировали против 500 мл буфера для DF, описанного ниже, при суммарных 3 сменах буфера с достижением разведения первоначального состава в 1 миллион раз, чтобы гарантировать полную замену буфера. Затем материал подвергали сверхконцентрированию с применением центрифуги-концентратора с последующим разбавлением до 120 мг/мл и добавлением полисорбата 20 до конечной концентрации, составляющей 0,01%.

ТАБЛИЦА 2

	<i>Сокращение</i>	<i>Композиция состава для DF</i>
M	Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 4,5	10 мМ ацетата, 75 мМ L-аргинина-HCl, 2,4% (вес/объем) сорбита, pH 4,5
N	Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 4,8	10 мМ ацетата, 75 мМ L-аргинина-HCl, 2,4% (вес/объем) сорбита, pH 4,8
O	Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,2	10 мМ ацетата, 75 мМ L-аргинина-HCl, 2,4% (вес/объем) сорбита, pH 5,2
P	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,2	10 мМ ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, pH 4,5
Q	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,3	10 мМ ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, pH

		4,8
--	--	-----

[0129] На фигуре 2 показан процент HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от состава и времени при 37°C. На фигуре 3 показаны хроматограммы, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии, в зависимости от состава после хранения при 37°C в течение 1 месяца.

[0130] По мере уменьшения pH раствора наблюдали увеличение образования крупных агрегатов. При pH ниже 4,8 и особенно 4,5 крупные агрегаты являлись доминирующими HMWS, при этом резкое увеличение наблюдали в тестируемом составе при pH 4,5. Как показано на фигуре 3, составы P и Q характеризовались самым низким количеством HMWS высокого порядка (время удерживания приблизительно 6 минут), за которыми следовали сравнительные составы O, N и M с понижающимися значениями pH.

[0131] Однако, по мере увеличения pH обычно происходило увеличение количества димеров. Как показано на фигуре 3, состав N характеризовался самым низким количеством димеров (время удерживания приблизительно 6,8 минут), за которым следуют составы M, O, P и Q.

[0132] Присутствие в составе O аргинина в концентрации 75 mM приводило к снижению количества димерных разновидностей и кинетической скорости их образования приблизительно на 0,3% и 25%, соответственно, через 1 месяц при 37°C по сравнению с составом P, характеризующимся таким же pH, но не содержащим аргинина.

ПРИМЕР 3

[0133] Данный пример демонстрирует влияние pH на высококонцентрированные составы на основе деносумаба.

[0134] Деносумаб (в концентрации 120 мг/мл) составляли с ацетатом, сорбитом и полисорбатом 20 (PS20) в присутствии аминокислотного ингибитора агрегации или без него при трех различных значениях pH: 4,8, 5,1 и 5,4. В данном исследовании аминокислотный ингибитор агрегации представлял собой L–аргинин–HCl. Все составы получали путем замены буфера в начальном растворе, содержащем низкую концентрацию деносумаба, с последующим сверхконцентрированием материала деносумаба, а затем разбавлением материала деносумаба с помощью требуемых количеств буфера, вспомогательных веществ и поверхностно–активных веществ. Вкратце, аликвоту деносумаба при 70 мг/мл в ацетате, pH 5,2 (начальный материал), диализировали против буфера для DF, описываемого в таблице 3A, при суммарных 3 сменах буфера с достижением разведения начального материала в 1 миллион раз, чтобы гарантировать полную замену буфера. Затем материал деносумаба, подвергнутый замене буфера, концентрировали с применением центрифуги–концентратора до концентрации деносумаба, превышающей 120 мг/мл, и концентрированный материал впоследствии разбавляли с достижением концентрации 120 мг/мл деносумаба. PS20 добавляли до конечной концентрации, составляющей 0,01%.

[0135] Предполагали, что белок при высокой концентрации вносит вклад в pH раствора в зависимости от его состояния заряда. Концентрацию ацетата в составе 1

увеличивали, чтобы достичь целевого конечного значения pH, а концентрации ацетата в составах 2 и 3 соответствовали концентрации в составе 1. Чтобы концентрации ацетата в составах 4–6 соответствовали конечным концентрациям ацетата в составах 1–3, требуется еще большее количество ацетата, вследствие того, что ацетат подвергается совместному концентрированию в присутствии соли HCl. Состав 7 выступал в качестве контроля, чтобы гарантировать, что повышенная концентрация ацетата в составах 4–6 не препятствует стабильности белка в составах с гидрохлоридом аргинина.

[0136] Разные составы на основе деносуаба, полученные и протестированные в этом исследовании, описаны в таблице 3А.

ТАБЛИЦА 3А

№ F	Рассчитанный конечный состав*	Композиция буфера для DF
1	40 mM ацетата/4,58% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 4,8	30 mM ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, pH 4,35
2	40 mM ацетата/4,58% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	30 mM ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, pH 4,9
3	40 mM ацетата/4,58% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,4	30 mM ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, pH 5,2
4	40 mM ацетата/65 mM аргинина/3,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 4,8	40 mM ацетата, 3,6% (вес/объем) сорбита, 75 mM аргинина-HCl, pH 4,8
5	40 mM ацетата/65 mM аргинина/3,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,4	40 mM ацетата, 3,6% (вес/объем) сорбита, 75 mM аргинина-HCl, pH 5,4
6	40 mM ацетата/65 mM аргинина/3,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	40 mM ацетата, 3,6% (вес/объем) сорбита, 75 mM аргинина-HCl, pH 5,1
7	10 mM ацетата/65 mM аргинина/3,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 3,6% (вес/объем) сорбита, 75 mM аргинина-HCl, pH 5,1

*Конечные составы содержали 120 мг/мл деносуаба и PS20 в конечной концентрации 0,01% (вес/объем) и характеризовались указанным pH. Согласно оценке концентрации сорбита на 8,5% ниже, чем концентрация сорбита в буфере для DF. Согласно оценке концентрации аргинина на 12,5% ниже, чем концентрация аргинина в буфере для DF.

[0137] Образцом каждого состава заполняли контейнер при объеме заполнения 1 мл и хранили при температуре 37°C в течение максимум 4 недель. Ингибирование агрегации и стабильность за счет ингибирования агрегации с течением времени, исходя из образования HMWS и димерных разновидностей, оценивали с применением SE-UHPLC. Профили ингибирования агрегации у таких составов сравнивали при начальных условиях, а также во время и после периода хранения.

[0138] Процент HMWS отслеживали с помощью SE–UHPLC в зависимости от состава и времени при 37°C. На фигуре 4 представлен график процента HMWS в зависимости от времени для составов 1–7, а в таблице 3В представлены точки данных для данного графика.

ТАБЛИЦА 3В

	Название состава	Время хранения при 37°C		
		0 недель	2 недели	4 недели
1	Ацетат(40)/сорбит/PS20/pH 4,8	0,7	1,2	1,6
2	Ацетат(40)/сорбит/PS20/pH 5,1	0,9	1,5	2,0
3	Ацетат(40)/сорбит/PS20/pH 5,4	1,5	2,1	2,7
4	Ацетат(40)/аргинин/сорбит/PS20/pH 4,8	0,6	1,2	1,9
5	Ацетат(40)/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,4	0,9	1,3	1,7
6	Ацетат(40)/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1	0,7	1,1	1,4
7	Ацетат(10)/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1	0,8	1,1	1,4

№ F, показанный в левом столбце, соответствует № F из таблицы 3А.

[0139] На фигуре 5 показаны хроматограммы, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии, для каждого состава после хранения при 37°C в течение 1 месяца. Составы без аргинина показаны на левой панели, тогда как составы с аргинином показаны на правой панели.

[0140] Как показано на фигуре 4, составы, содержащие аргинин, показывали лучшие результаты, чем контрольные составы без гидрохлорида аргинина, и составы при pH 5,1 показывали лучшие результаты, чем сравнимые составы при pH 4,8 и pH 5,4. В случае составов 1–3, не содержащих гидрохлорид аргинина, содержание димерных разновидностей увеличивалось при увеличении pH раствора до 5,4 (фигура 5А). В случае составов 4–6, содержащих гидрохлорид аргинина, по мере снижения pH раствора до 4,8 наблюдалось увеличение образования крупных агрегатов, а также увеличение содержания димерных разновидностей по мере увеличения pH раствора до 5,4 (фигура 5В). Состав 6, в котором присутствовал гидрохлорид аргинина, с pH раствора, составляющим 5,1, характеризовался самым низким количеством суммарных HMWS по сравнению с составом 2, в котором не присутствовал гидрохлорид аргинина. Кроме того, поведение состава 7 продемонстрировало, что увеличение концентрации ацетатного буфера от 10 mM до 40 mM оказывало относительное небольшое влияние на образование HMWS.

ПРИМЕР 4

[0141] В данном примере продемонстрирована взаимосвязь между pH и образованием HMWS для разных составов на основе деносумаба, содержащих различные концентрации деносумаба.

[0142] Оценивали концентрации белка деносумаба от 15 мг/мл до 150 мг/мл, чтобы оценить влияние pH на образования HMWS при различных концентрациях белка и при

концентрациях гидрохлорида аргинина, составляющих 75 мМ. По два значения рН, т. е. рН 4,8 и 5,1, оценивали для каждой из тестируемых концентраций белка: 15, 60, 120 и 150 мг/мл.

[0143] Суммарно в данном исследовании оценивали 8 составов (составы 8–15; описанные в таблице 4А). Для приготовления данных составов по две аликвоты деносумаба с концентрацией 70 мг/мл в ацетате при рН 5,2 диализировали против соответствующего буфера для DF, описанного в таблице 4А. Обе установки для диализа № 1 и № 2 подвергали суммарно 3 заменам буфера с достижением разбавления первоначального состава в 1 миллион раз, чтобы гарантировать полную замену буфера. После диализа из каждой установки для диализа № 1 и № 2, описанной в таблице 4А, извлекали аликвоты для подготовки стадии разбавления для составов 8, 9, 12 и 13. Оставшийся материал затем подвергали сверхконцентрированию с применением центрифуги–концентратора с последующим разбавлением до соответствующих концентраций деносумаба, указанных в таблице 4А, и добавлением PS20 до конечной концентрации 0,01%.

ТАБЛИЦА 4А

№ F	Рассчитанный конечный состав*	Композиция буфера для DF	Установка для диализа
8	15 мг/мл деносумаба/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/рН 4,8	10 мМ ацетата, 2,4% (вес/объем) сорбита, 75 мМ аргинина–HCl, рН 4,8	1
9	60 мг/мл деносумаба/ацетата/аргинина/сорбита/PS20/рН 4,8	10 мМ ацетата, 2,4% (вес/объем) сорбита, 75 мМ аргинина–HCl, рН 4,8	
10	120 мг/мл деносумаба/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/рН 4,8	10 мМ ацетата, 2,4% (вес/объем) сорбита, 75 мМ аргинина–HCl, рН 4,8	
11	150 мг/мл деносумаба/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/рН 4,8	10 мМ ацетата, 2,4% (вес/объем) сорбита, 75 мМ аргинина–HCl, рН 4,8	
12	15 мг/мл деносумаба/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/рН 5,1	10 мМ ацетата, 2,4% (вес/объем) сорбита, 75 мМ аргинина–HCl, рН 5,1	2
13	60 мг/мл деносумаба/ацетата/аргина	10 мМ ацетата, 2,4% (вес/объем) сорбита, 75 мМ аргинина–HCl, рН 5,1	

	нина/сорбита/PS20/pH 5,1		
14	120 мг/мл деносуаба/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 2,4% (вес/объем) сорбита, 75 mM аргинина-HCl, pH 5,1	
15	150 мг/мл деносуаба/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 2,4% (вес/объем) сорбита, 75 mM аргинина-HCl, pH 5,1	

*Конечные составы содержали PS20 в конечной концентрации 0,01% (вес/объем) и характеризовались указанный pH. Рассчитанная концентрация ацетата составляла 10 mM. Согласно оценке концентрации сорбита на ~ 8,5% ниже, чем концентрация сорбита в буфере для DF. Согласно оценке концентрации аргинина составляли 65 mM. Согласно оценке концентрации сорбита составляли в 2,2% (вес/объем).

[0144] Составы заполняли в контейнеры при объеме заполнения 1 мл и хранили при температуре 37°C в течение максимум 1 месяца. Ингибирование агрегации и стабильность за счет ингибирования агрегации с течением времени, исходя из образования HMWS и димерных разновидностей, оценивали с применением SE-UHPLC. Профили ингибирования агрегации у таких составов сравнивали при начальных условиях, а также во время и после периода хранения.

[0145] На фигуре 6 представлен график процента HMWS, отслеживаемых посредством SE-UHPLC, в зависимости от времени хранения при 37°C для каждого состава, а в таблице 4B представлены точки данных для графика.

ТАБЛИЦА 4B

Состав		Процентное содержание HMWS		
		0	2 недели	4 недели
8	15 мг-мл/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 4,8	0,4	0,4	0,5
9	60 мг-мл/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 4,8	0,4	0,8	1,1
10	120 мг-мл/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 4,8	0,5	1,4	1,9
11	150 мг-мл/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 4,8	0,6	1,7	2,4
12	15 мг-мл/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1	0,4	0,3	0,4
13	60 мг-мл/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1	0,5	0,7	0,9
14	120 мг-мл/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1	0,6	1,2	1,5
15	150 мг-мл/ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1	0,7	1,3	1,7

[0146] На фигурах 7A и 7B показаны хроматограммы, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии, в зависимости от состава после хранения при 37°C в течение 1 месяца. Как показано на фигуре. 6, % HMWS увеличивался по мере увеличения

концентрации белка. Составы 8–11 с pH 4,8 систематически характеризовались более высокими уровнями HMWS по сравнению с соответствующими составами с pH 5,1 (составы 12–15). Увеличение % HMWS при pH 4,8 обусловлено большим пиком агрегатов, показанным на фигуре 7А (вверху), наблюдаемыми в приблизительно 5,75 минуты. Хотя в случае раствора с pH 5,1 по мере увеличения концентрации белка в % HMWS увеличивалось количество димерных разновидностей, суммарное содержание HMWS было ниже, чем у соответствующих концентраций белка в растворе с pH 4,8 (фигура 7В (внизу)).

[0147] Отличие в уровнях HMWS при pH 5,1 и pH 4,8 становилось большим по мере увеличения концентрации деносуаба, причем отличие была выше при более высоких концентрациях деносуаба.

ПРИМЕР 5

[0148] Составы с различными концентрациями аргинина, NAR и двух дипептидов, состоящих из аргинин–аргинина (Arg–Arg) и аргинин–фенилаланина (Arg–Phe), оценивали в отношении стабилизирующих влияний на растворы с концентрацией деносуаба, составляющей 120 мг/мл.

[0149] Протестированные составы описаны в таблице 5 ниже. Все указанные значения ацетата и вспомогательных веществ (за исключением дипептидов) приводятся для концентраций буферов и вспомогательных веществ, против которых диафильтруется антитело. Каждый дипептид добавляли в раствор после замены буфера до уровня, указанного в таблице. Составы R–X получали с помощью UF/DF против буфера для DF, перечисленного ниже. Составы Y–Z получали совместно в виде единого пула с помощью UF/DF против буфера для DF, содержащего 10 mM ацетата, 3,6% сорбита, pH 4,0. После UF/DF пул для составов Y и Z разделяли на 2, и затем вводили дипептиды Arg–Arg или Arg–Phe за счет 1 M исходного раствора, содержащего 3,6% сорбита, при pH 5,1. В каждый состав добавляли полисорбат 20 при конечной целевой концентрации 0,01%. В отсутствие аргинина ацетат подвергается совместному концентрированию, что приводит к конечной концентрации ацетата, составляющей приблизительно 25 mM, в составах S–X. Сорбит преимущественно исключается в процессе концентрирования, что приводит к снижению на приблизительно 7–8% (вес/объем) от исходной концентрации.

[0150] Составы заполняли в контейнеры при объеме заполнения 1,0 мл. Составы хранили при температуре от 2°C до 8°C в течение максимум 12 месяцев и при 25°C, 30°C и 37°C в течение 3 месяцев. Стабильность, исходя из образования HMWS, оценивали с применением SE–UHPLC. Стабильность таких составов, содержащих дипептиды, после хранения в течение одного месяца при 37°C сравнивали с составами, содержащими гидрохлорид аргинина, при 37°C, как показано на фигуре 8.

ТАБЛИЦА 5

<i>Рассчитанный конечный состав</i>	<i>Композиция состава для DF</i>
R Ацетат/5% сорбита/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, pH 4,0

S	Ацетат/3,6% сорбита/38 мМ аргинина–HCl/PS20/pH 5,2	10 мМ ацетата, 3,6% (вес/объем) сорбита, 38 мМ L–аргинина–HCl, pH 5,1
T	Ацетат/2,4% сорбита/75 мМ аргинина–HCl/PS20/pH 5,2	10 мМ ацетата, 2,4% (вес/объем) сорбита, 75 мМ L–аргинина–HCl, pH 5,1
U	18 мМ ацетата/2,4% сорбита/75 мМ аргинина–HCl/PS20/pH 5,2	18 мМ ацетата, 2,4% (вес/объем) сорбита, 75 мМ L–аргинина–HCl, pH 5,1
V	Ацетат/1,2% сорбита/113 мМ аргинина–HCl/PS20/pH 5,2	10 мМ ацетата, 1,2% сорбита, 113 мМ L–аргинина–HCl, pH 5,1
W	Ацетат/0% сорбита/150 мМ аргинина–HCl/PS20/pH 5,1	10 мМ ацетата, 0% (вес/объем) сорбита, 150 мМ L–аргинина–HCl, pH 5,1
X	Ацетат/150 мМ NAR/75 мМ аргинина–HCl/PS20/pH 5,2	10 мМ ацетата, 75 мМ L–аргинина–HCl, 150 мМ NAR, pH 5,1
Y	Ацетат/3,6% сорбита/38 мМ аргинин–аргинина/PS20/pH 5,1	10 мМ ацетата, 3,6% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
Z	Ацетат/3,6% сорбита/38 мМ аргинин–фенилаланина/PS20/pH 5,2	10 мМ ацетата, 3,6% (вес/объем) сорбита, pH 4,0

[0151] На фигуре 8 показан процент HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от состава и времени при 37°C. Результаты показывают, что аминокислотные ингибиторы агрегации ингибировали образование HMWS. Например, дипептид аргинин–фенилаланин показал значительное улучшение, приводящее к снижению HMWS на приблизительно 0,3% по сравнению с другими составами. Порядок расположения составов от самого низкого до самого высокого содержания HMWS был следующим: Z << V < Y ≈ T ≈ W ≈ X ≈ U < S < R. Как можно увидеть на фигуре, у обоих составов, содержащих дипептиды аргинин–аргинин (Arg–Arg) (состав Y) и аргинин–фенилаланин (Arg–Phe) (состав Z), снижалось образование HMWS по сравнению с контрольным составом, в котором отсутствуют аргинин и отсутствуют дипептиды, содержащие аргинин (состав R). Состав Z содержал наименьшее количество HMWS и превосходил состав Y.

ПРИМЕР 6

[0152] В данном примере продемонстрировано ингибирование агрегации и стабильность деносуаба в зависимости от различных концентраций аргинина и фенилаланина, а также смеси аргинина и фенилаланина для сравнения.

[0153] Как описано выше, обнаружили, что гидрохлорид (HCl) аргинина и дипептиды аргинин–HCl–фенилаланин снижают начальный исходный уровень и скорость

образования HMWS деносумаба. В данном исследовании составы, содержащие концентрации аргинина–HCl, концентрации фенилаланина и комбинацию аргинина–HCl и фенилаланина, оценивали в отношении стабилизирующих влияний на растворы, содержащие деносумаб при 120 мг/мл.

[0154] Протестированные составы (составы 16–20) описаны в таблице 6А ниже. Для приготовления данных составов аликвоту деносумаба при 70 мг/мл в ацетате, pH 5,2, диализировали против буфера для DF, описанного в таблице 6А, при суммарных 3 сменах буфера с достижением разведения первоначального состава в 1 миллион раз, чтобы гарантировать полную замену буфера. Затем материал подвергали сверхконцентрированию с применением центрифуги–концентратора с последующим разбавлением до 120 мг/мл и добавлением полисорбата 20 до конечной концентрации, составляющей 0,01%. Состав 16 рассматривали как контрольный состав.

Таблица 6А

	Рассчитанный конечный состав*	Композиция буфера для DF
16	23 mM ацетата/4,6% (вес/объем) сорбита /PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
17	10 mM ацетата/65 mM аргинина/2,2% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 75 mM L–аргинина–HCl, 2,4% (вес/объем) сорбита, pH 5,1
18	23 mM ацетата/35 mM фенилаланина/4% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 38 mM фенилаланина, 4,4% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
19	23 mM ацетата, 68 mM фенилаланина/3,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 75 mM фенилаланина, 3,6% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
20	10 mM ацетата/33 mM аргинина/35 mM фенилаланина/2,2% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 38 mM аргинина–HCl, 38 mM фенилаланина, 2,4% (вес/объем) сорбита, pH 5,1

*Конечные составы содержали 120 мг/мл деносумаба и PS20 в конечной концентрации 0,01% (вес/объем) и характеризовались указанным pH. Согласно оценке концентрации сорбита и фенилаланина на ~8,5% ниже, чем концентрация в буфере для DF. Согласно оценке концентрации аргинина на 12,5% ниже, чем концентрация в буфере для DF.

[0155] Составы заполняли в контейнеры при объеме заполнения 1,0 мл. Составы

хранили при температуре 37°C в течение максимум 1 месяца. Ингибирование агрегации и стабильность за счет ингибирования агрегации с течением времени, исходя из образования HMWS и димерных разновидностей, оценивали с применением SE–UHPLC. Профили ингибирования агрегации у таких составов сравнивали при начальных условиях, а также во время и после периода хранения.

[0156] На фигуре 9 показан процент HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от состава и времени при 37°C. На фигуре 10 показаны хроматограммы, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии, в зависимости от состава после хранения при 37°C в течение 1 месяца. В таблице 6В ниже показан процент HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от состава и времени при 37°C.

ТАБЛИЦА 6В

Состав	Процентное содержание HMWS		
	0	2 недели	4 недели
16 Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,1	0,9	1,5	2,0
17 Ацетат/75 мМ аргинина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,7	1,1	1,5
18 Ацетат/38 мМ фенилаланина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,5	0,9	1,3
19 Ацетат/75 мМ фенилаланина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,5	0,8	1,2
20 Ацетат/38 мМ аргинина/38 мМ фенилаланина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,7	1,0	1,4

[0157] Все составы, содержащие аминокислотный ингибитор агрегации, аргинин или фенилаланин (составы 17–20), превосходили контрольный состав, содержащий сорбит, в котором отсутствовал аминокислотный ингибитор агрегации (состав 16). Все составы, содержащие фенилаланин (составы 18, 19 и 20), аналогичным образом содержали низкие уровни HMWS по сравнению как с контрольным составом, так и с составом, содержащим аргинин–HCl (составы 16 и 17, соответственно) (фигура 9). Скорость образования HMWS была аналогичной у составов, содержащих аргинин–HCl и фенилаланин (составы 17–19), как показано на фигуре 9. В случае комбинированного состава, содержащего 38 мМ аргинина и 38 мМ фенилаланина (всего 76 нМ, состав 20), продемонстрирована лучшая стабильность, чем у состава, содержащего 75 мМ аргинина (состав 17) (фигура 9), но не лучше, чем у состава, содержащего 75 мМ фенилаланина (состав 19) (фигура 9).

ПРИМЕР 7

[0158] В данном примере продемонстрировано ингибирование агрегации и стабильность деносуаба в зависимости от различных концентраций фенилаланина.

[0159] В предыдущих исследованиях обнаружили, что гидрохлорид аргинина и дипептиды гидрохлорида аргинина и фенилаланина сводят к минимуму начальный исходный уровень и скорость образования HMWS деносуаба. Составы, содержащие

гидрохлорид аргинина, различные концентрации фенилаланина и комбинацию гидрохлорида аргинина и фенилаланина, оценивали в отношении стабилизирующих влияний на растворы, содержащие деносунаб при 120 мг/мл.

[0160] Протестированные составы описаны в таблице 7А ниже. Для приготовления тестируемых образцов А–Е аликвоту деносунаба при 70 мг/мл в ацетате, рН 5,2, диализировали против буфера для DF, описанного ниже, при суммарных 3 сменах буфера с достижением разведения первоначального состава в 1 миллион раз, чтобы гарантировать полную замену буфера. Затем материал подвергали сверхконцентрированию, получая от приблизительно 130 мг/мл до 150 мг/мл, с применением центрифуги–концентратора с последующим разбавлением до 120 мг/мл и добавлением полисорбата 20 до конечной концентрации 0,01%. Состав А рассматривали как контрольный состав.

[0161] Составы заполняли в контейнеры при объеме заполнения 1,0 мл. Составы хранили при температуре 37°C в течение максимум 1 месяца. Стабильность, исходя из образования HMWS, оценивали с применением SE–UHPLC. Профили стабильности данных составов после хранения в течение одного месяца при 37°C сравнивали с составами, содержащими сорбит и гидрохлорид аргинина/сорбит, при 37°C, как показано на фигуре 11А.

[0162] Для приготовления тестируемых образцов F–K аликвоту деносунаба при 70 мг/мл в ацетате, рН 5,2, подвергали ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF) против буферов для DF, описанных ниже, с применением суммарно 12 диаобъемов, чтобы гарантировать полную замену буфера. Затем материал подвергали сверхконцентрированию до примерно 200 мг/мл с применением ультрафильтрации с последующим разбавлением до 120 мг/мл и добавлением полисорбата 20 до конечной концентрации 0,01%. Концентрация ацетата в данных составах составляла 20 мМ. Состав F рассматривали как контрольный состав. Все указанные значения ацетата и вспомогательных веществ приводятся для концентраций буферов и вспомогательных веществ, против которых диализируется антитело.

[0163] Составы заполняли в контейнеры при объеме заполнения 1,0 мл. Составы хранили при температуре 40°C в течение максимум 1 месяца. Стабильность, исходя из образования HMWS, оценивали с применением SE–UHPLC. Профили стабильности данных составов после хранения в течение одного месяца при 40°C сравнивали с составами, содержащими сорбит и гидрохлорид аргинина/сорбит, при 40°C, как показано на фигуре 11В.

Таблица 7А

№ F	Рассчитанный конечный состав	Состав буфера для DF*
A	23 мМ ацетата/4,6% (вес/объем) сорбита/PS20/рН 5,1	10 мМ ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, рН 4,0
B	10 мМ ацетата/65 мМ	10 мМ ацетата, 75 мМ L–аргинина–HCl, 2,4%

	аргинина/2,2% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	(вес/объем) сорбита, pH 5,1
C	23 mM ацетата/35 mM фенилаланина/4,0% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 38 mM фенилаланина, 4,4% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
D	23 mM ацетата/69 mM фенилаланина/3,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 75 mM фенилаланина, 3,6% (вес/объем) сорбита, pH 5,1
E	10 mM ацетата/33 mM аргинина/35 mM фенилаланина/2,2% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 38 mM аргинина-HCl, 38 mM фенилаланина, 2,4% (вес/объем) сорбита, pH 5,1
F	23 mM ацетата/4,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	20 mM ацетата, 4,7% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
G	23 mM ацетата/4,6 mM фенилаланина/4,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	20 mM ацетата, 5 mM фенилаланина, 4,7% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
H	23 mM ацетата/9 mM фенилаланина/4,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	20 mM ацетата, 10 mM фенилаланина, 4,7% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
I	23 mM ацетата/18 mM фенилаланина/4,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	20 mM ацетата, 20 mM фенилаланина, 4,7% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
J	32 mM ацетата/37 mM фенилаланина/4,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	20 mM ацетата, 40 mM фенилаланина, 4,7% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
K	32 mM ацетата/55 mM фенилаланина/4,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	20 mM ацетата, 60 mM фенилаланина, 4,7% (вес/объем) сорбита, pH 4,0

*Конечные составы содержали 120 мг/мл деносуаба и PS20 в конечной концентрации 0,01% (вес/объем) и характеризовались указанным pH. Согласно оценке концентрации сорбита и фенилаланина на ~8,5% ниже, чем концентрация в буфере для DF. Согласно оценке концентрации аргинина на 12,5% ниже, чем концентрация в буфере для DF.

[0164] На фигуре 11A и в таблице 7B показан процент HMWS, отслеживаемых с

помощью SE–UHPLC, в зависимости от состава и времени при 37°C. На фигуре 11В и в таблице 7С показан процент HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от состава и времени при 40°C. На фигурах 12А и 12В показаны хроматограммы, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии, в зависимости от состава после хранения при 37°C и 40°C в течение 1 месяца, соответственно.

ТАБЛИЦА 7В

	Состав	Процентное содержание HMWS		
		0	2 недели	4 недели
A	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,1	0,9	1,5	2,0
B	Ацетат/75 мМ аргинина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,7	1,1	1,5
C	Ацетат/38 мМ фенилаланина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,5	0,9	1,3
D	Ацетат/75 мМ фенилаланина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,5	0,8	1,2
E	Ацетат/38 мМ аргинина/38 мМ фенилаланина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,7	1,0	1,4

Таблица 7С

	Состав	Процентное содержание HMWS		
		0	2 недели	4 недели
F	20 мМ ацетата/сорбит/PS20/pH 5,1	0,67	1,44	1,96
G	20 мМ ацетата/5 мМ фенилаланина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,64	1,34	1,74
H	20 мМ ацетата/10 мМ фенилаланина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,60	1,26	1,68
I	20 мМ ацетата/20 мМ фенилаланина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,53	1,12	1,51
J	20 мМ ацетата/40 мМ фенилаланина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,48	1,02	1,37
K	20 мМ ацетата/60 мМ фенилаланина/сорбит/PS20/pH 5,1	0,44	0,96	1,28

[0165] Все составы с фенилаланином (составы C, D, E, G–K) содержали более низкие уровни HMWS по сравнению с составами, содержащими сорбит и гидрохлорид аргинина/сорбит (составы A и B, соответственно). Комбинированный состав с гидрохлоридом аргинина и фенилаланином характеризовался аналогичной стабильностью по сравнению с составом с аргинином/сорбитом (состав B). Все составы превосходили

контрольный состав, содержащий сорбит (состав А и F).

ПРИМЕР 8

[0166] В данном примере продемонстрирована оценка разных аминокислотных ингибиторов агрегации.

[0167] Оценку разных аминокислотных ингибиторов агрегации проводили путем приготовления восьми составов с гидрофобной, ароматической или полярной/заряженной аминокислотой, чтобы определить их влияние на сведение к минимуму количества (%) НМWS в высококонцентрированном жидком составе на основе деносуаба (120 мг/мл), а также образование НМWS с течением времени. Состав включал одну из восьми L-аминокислот и сниженное количество сорбита относительно контрольного состава, не содержащего аминокислотный ингибитор агрегации и содержащего более высокое количество сорбита для регуляции изотоничности (состав 26).

[0168] Протестированные аминокислотные ингибиторы агрегации относились к одной из трех групп (группы I–III) и содержали следующее количество аминокислотного ингибитора агрегации:

I. Ароматические аминокислоты:

(a) 38 мМ фенилаланина (состав 27);

(b) 38 мМ триптофана (состав 28);

II. Полярные/заряженные аминокислоты:

(a) 75 мМ аргинина–HCl (состав 29);

(b) 75 мМ лизина (состав 30);

(c) 75 мМ гистидина (состав 31);

III. Гидрофобные аминокислоты:

(a) 38 мМ лейцина (состав 32);

(b) 38 мМ изолейцина (состав 33);

(c) 38 мМ валина (состав 34).

[0169] Для приготовления составов 26–34 аликвоту деносуаба при 70 мг/мл в ацетате, pH 5,2, диализовали против буфера для DF, описанного в таблице 8А, при суммарных 3 сменах буфера с достижением разведения первоначального состава в 1 миллион раз, чтобы гарантировать полную замену буфера. В случае диализа состава F с гистидином применяли буфер с начальным pH 4,0 и прогнозировали, что pH сместится к целевому pH 5,1 в ходе концентрирования белка из-за эффекта Доннана и совместного концентрирования ацетата. Однако после концентрирования белка до 120 мг/мл pH не сдвинулся к целевому pH 5,1, а остался на уровне pH 4,0. Чтобы довести pH состава с гистидином до pH 5,1, требовалась титрация с разбавленным (0,1 н.) NaOH. Остальные составы подвергали сверхконцентрированию с применением центрифуги-концентраторов с последующим разбавлением до 124–128 мг/мл и добавлением полисорбата 20 до конечной концентрации, составляющей 0,01% (вес/объем).

Таблица 8А

№ F	Рассчитанный конечный состав	Композиция буфера для диализа*
26 (A)	23 мМ ацетата/4,6% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1 (контроль)	10 мМ ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, 0,01% (вес/объем) полисорбата 20, pH 4,0
27 (B)	23 мМ ацетата/35 мМ фенилаланина/4% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 мМ ацетата, 38 мМ фенилаланина, 4,4% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
28 (C)	23 мМ ацетата/триптофан/4% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 мМ ацетата, 38 мМ триптофана, 4,4% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
29 (D)	10 мМ ацетата/66 мМ аргинина/2,2% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 мМ ацетата, 75 мМ аргинина–HCl, 2,4% (вес/объем) сорбита, pH 5,1
30 (E)	10 мМ ацетата/66 мМ лизина/2,2% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 мМ ацетата, 75 мМ лизина–HCl, 2,4% (вес/объем) сорбита, pH 5,1
31 (F)	10 мМ ацетата/гистидин/2,2% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 мМ ацетата, 75 мМ гистидина, 2,4% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
32 (G)	23 мМ ацетата/лейцин/4% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 мМ ацетата, 38 мМ лейцина, 4,4% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
33 (H)	23 мМ ацетата/изолейцин/4% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 мМ ацетата, 38 мМ изолейцина, 4,4% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
34 (I)	23 мМ ацетата/валин/4% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1	10 мМ ацетата, 38 мМ валина, 4,4% (вес/объем) сорбита, pH 4,0

*Конечные составы содержали 120 мг/мл деносуаба и PS20 в конечной

концентрации 0,01% (вес/объем) и характеризовались указанным pH. Согласно оценке концентрации сорбита и фенилаланина на ~8,5% ниже, чем концентрация сорбита в буфере для DF. Согласно оценке концентрации аргинина на ~12,5% ниже, чем концентрация аргинина в буфере для DF. Буквы в () после № F соответствуют фигурам 13–18

[0170] Составы заполняли в контейнеры при объеме заполнения 1,0 мл. Составы хранили при температуре 37°C в течение максимум 4 недель. Ингибирование агрегации и стабильность за счет ингибирования агрегации с течением времени, исходя из образования HMWS и димерных разновидностей, оценивали с применением SE–UHPLC. Профили ингибирования агрегации у таких составов сравнивали при начальных условиях, а также во время и после периода хранения.

[0171] На фигурах 13–15 представлены графики процента HMWS, отслеживаемых с помощью SE–UHPLC, в зависимости от времени хранения при 37°C для каждого состава, а в таблице 8B представлены точки данных для графиков. На фигурах 16–18 показаны наложения хроматограмм для составов, перечисленных в таблице 8A, после хранения при 37°C в течение 1 месяца. Фигуры 13 и 16 относятся к составам, содержащим ароматические аминокислоты, фигуры 14 и 17 относятся к составам, содержащим полярные/заряженные аминокислоты, а фигуры 15 и 18 относятся к составам, содержащим гидрофобные аминокислоты.

ТАБЛИЦА 8B

Состав		Процентное содержание HMWS			
		0 недель	2 недели	4 недели	Увеличение 0–4 недели
АРОМАТИЧЕСКИЕ АМИНОКИСЛОТЫ (фигура 13)					
26	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,1 (контроль)	0,9	1,9	2,3	1,4
27	Ацетат/фенилаланин/сорбит/PS 20/pH 5,1 (контроль)	0,5	0,9	1,2	0,7
28	Ацетат/триптофан/сорбит/PS 20/pH 5,1	0,5	0,7	0,9	0,4
<u>ПОЛЯРНЫЕ/ЗАРЯЖЕНН ЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ</u> (фигура 14)					
26	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,1 (контроль)	0,9	1,9	2,3	1,4
29	Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/	0,5	1,1	1,5	1,0

pH 5,1 (контроль)					
30	Ацетат/лизин/сорбит/PS20/pH 5,1	0,6	1,2	1,6	1,0
31	Ацетат/гистидин/сорбит/PS20/pH 5,1	1,7	2,1	2,7	1,0
ГИДРОФОБНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ					
(фигура 15)					
26	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,1 (контроль)	0,9	1,9	2,3	1,4
27	Ацетат/фенилаланин/сорбит/PS20/pH 5,1 (контроль)	0,5	0,9	1,2	0,7
32	Ацетат/лейцин/сорбит/PS20/pH 5,1	0,5	1,1	1,4	0,9
33	Ацетат/изолейцин/сорбит/PS20/pH 5,1	0,5	1,1	1,3	0,8
34	Ацетат/валин/сорбит/PS20/pH 5,1	0,5	1,0	1,3	0,8

№ F представлен в левом столбце и соответствует № F из таблицы 8А.

[0172] Как показано на фигурах 13–15, для всех составов, содержащих аминокислотный ингибитор агрегации (составы 27–34), продемонстрировано некоторое улучшение стабильности по сравнению с составом, содержащим ацетат/сорбит (состав 26). Для составов, содержащих ароматическую аминокислоту (составы 27 и 28), показано наибольшее снижение % HMWS. Для состава, содержащего фенилаланин (состав 27), также продемонстрировано значительное снижение HMWS, а для состава, содержащего триптофан, показано наибольшее снижение по сравнению с контролем (состав 26). Для составов деносуаба, содержащих полярные/заряженные аминокислоты (составы 29–31), в целом было показано большее количество агрегатов высокого порядка (фигура 17) по сравнению с другими составами, содержащими аминокислотные стабилизаторы (фигуры 16 и 18), а для данного специфического состава, содержащего гистидин, показано большее количество общих HWMS по сравнению с составом, содержащим ацетат/сорбит (состав 26) (фигура 14). Результаты для состава, содержащего гистидин, могли отклоняться за счет процесса диализа, более длительного времени содержания при pH 4,0 и титрования состава разбавленным NaOH. Для всех составов, содержащих гидрофобную аминокислоту (составы 32–34), продемонстрировано систематическое улучшение с точки зрения образования HMWS.

ПРИМЕР 9

[0173] В данном примере продемонстрирован возможный механизм действия аргинина и фенилаланина при стабилизации деносумаба. Масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS) представляет собой чувствительную и надежную технологию для определения характеристик взаимодействия белок-белок/лиганд/вспомогательное вещество. Данный метод обнаруживает изменения водородной связи амидной группы основной цепи, обусловленные взаимодействием со вспомогательным веществом.

[0174] Масс-спектрометрию водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS) проводили с деносумабом (при концентрации 3 мг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 5,2) ("A52") в присутствии L-аргинина (состав 35), L-фенилаланина (состав 36) или L-глицина (состав 37) и сравнивали с составом деносумаба, в котором отсутствуют какие-либо аминокислотные ингибиторы агрегации (состав 38). Эксперименты проводили при 4°C (при концентрации L-аргинина, L-фенилаланина или L-глицина, составляющей 75 мМ) и при 37°C (при концентрации L-аргинина, L-фенилаланина или L-глицина, составляющей 150 мМ). После анализа более 530 пептидов выявили небольшое число областей со значительным изменением конформации. Несколько репрезентативных пептидов из этих областей представлены на фигурах 19–30.

[0175] Фигуры 19–24 представляют собой графики % включения дейтерия при 4°C в зависимости от времени (log (с)) для аминокислот 28–33 легкой цепи (фигура 19), аминокислот 108–116 легкой цепи (фигура 20), аминокислот 125–132 легкой цепи (фигура 21), аминокислот 47–59 тяжелой цепи (фигура 22), аминокислот 243–253 тяжелой цепи (фигура 23) и аминокислот 392–399 тяжелой цепи (фигура 24) в случае каждого из составов 35–38.

[0176] Фигуры 25–30 представляют собой графики % включения дейтерия при 37°C в зависимости от времени (log (с)) для аминокислот 28–33 легкой цепи (фигура 25), аминокислот 108–117 легкой цепи (фигура 26), аминокислот 124–131 легкой цепи (фигура 27), аминокислот 47–59 тяжелой цепи (фигура 28), аминокислот 242–253 тяжелой цепи (фигура 29) и аминокислот 392–399 тяжелой цепи (фигура 30) в случае каждого из составов 35–38.

[0177] Эти данные подтверждают, что Arg и Gly оказывают аналогичное влияние при взаимодействии с деносумабом, хотя Arg характеризовался немного более сильным HDX-следом (изменения конформации) в отношении деносумаба: сильная стабилизация в области LC 28–33 Fab; слабая стабилизация в областях LC 108–132 и HC 47–59 Fab, HC 392–399 CH3 Fc; и слабая дестабилизация в области 243–253 CH2 Fc. Безотносительно к какой-либо конкретной теории предполагают, что влияние гидрохлорида аргинина обусловлено комбинированным преимущественным исключением из поверхности деносумаба и слабыми поверхностными взаимодействиями, в то время как глицин действует путем предпочтительного исключения.

[0178] Однако фенилаланин не продемонстрировал внесения значительных структурных изменений в деносумаб. Безотносительно к какой-либо конкретной теории

предполагают, что стабилизирующее влияние фенилаланина могло быть обусловлено одним или несколькими из следующих механизмов: взаимодействия боковых цепей, поскольку отсутствует влияние на пептидный остов (отсутствует HDX-след); и/или катион-пи-взаимодействием с боковыми цепями аргинина/лизина без воздействия на сеть водородных связей основной цепи.

ПРИМЕР 10

[0179] В данном примере продемонстрирован возможный механизм действия фенилаланина при стабилизации деносумага.

[0180] Для изучения специфического влияния Phe на деносумаб осуществляли имитационное моделирование молекулярной динамики. В частности, домен Fab деносумага сольватировали в имитационном боксе при избытке Phe и проводили два 10-нс имитационных моделирования. Обобщенно, остатки Phe, связанные с Fab в течение более 90% времени, отбирали для дальнейшего анализа. Выявили девять таких случаев. В 5 из 9 наблюдений длительного пребывания остаток Phe связывался с границей раздела областей VH/VL (вариабельная область тяжелой цепи/вариабельная область легкой цепи) и CH/CL (константная область тяжелой цепи/константная область легкой цепи). В одном примере предполагали, что боковая цепь Phe должна взаимодействовать с боковыми цепями гидрофобных остатков (например, V93, Y95 и W112 в тяжелой цепи и A44 и P45 в легкой цепи) на границе раздела VH/VL. В другом примере предполагали, что кольцо боковой цепи Phe должно взаимодействовать с группами NH₃⁺ и COO⁻ остатков (например, T165 в легкой цепи и G171, V172 и T174 в тяжелой цепи) на границе раздела CH1 и CL. Безотносительно к какой-либо конкретной теории, данное наблюдение подтолкнуло к идее, что специфическое влияние Phe в ослаблении агрегации деносумага обусловлено взаимодействием фенильной группы с гидрофобными остатками (например, R30, G31, R32 и Y33 в CDR1 легкой цепи, A52 в CDR2 легкой цепи и M106 в CDR3 тяжелой цепи) с образованием границы раздела константной области 1 тяжелой (Hc) и константной области легкой (Lc) цепей. Выдвинуто предположение, что данное взаимодействие замещает поверхность, которая ранее была гидрофобной, на относительно более заряженную (следовательно, гидрофильную) поверхность из групп NH₃(+) и COO(-) вспомогательного вещества Phe.

ПРИМЕР 11

[0181] Проводили оценку стабильности нескольких конструкций антител к RANKL (изотипов IgG1, IgG2 и IgG4). Как описано выше, как аргинин-HCl, так и фенилаланин сводили к минимуму исходные уровни HMWS и уровни образования HWMS с течением времени по сравнению с контрольным составом на основе деносумага (который представляет собой иммуноглобулин IgG2), содержащим ацетат/сорбит. Эту оценку проводили для сравнения потенциала Arg-HCl и Phe для снижения HMWS в составах, содержащих разные конструкции антител к RANKL. Конструкции IgG1 и IgG4, протестированные в данном исследовании, содержали те же определяющие комплементарность области (CDR), что и деносумаб, но содержали разные каркасы

константных доменов. Различные конструкции IgG2, протестированные в данном исследовании, имели отличающиеся CDR относительно деносуаба, но содержали один и тот же каркас константного домена.

[0182] Каждую тестируемую конструкцию антитела очищали и концентрировали от 8 мг/мл до 70 мг/мл с применением концентрирования с помощью центрифуги. Каждый объем после концентрирования разделяли на три аликвоты, а затем диализировали против ацетатного буфера, составленного с сорбитом, сорбитом/фенилаланином и сорбитом/гидрохлоридом аргинина, с получением составов 39–47, описываемых в таблице 9. Образцы после диализа подвергали сверхконцентрированию до более 120 мг/мл с концентрированием с помощью центрифуги. Белок антитела разбавляли до 120 мг/мл с помощью соответствующего буфера.

ТАБЛИЦА 9

№ F	Рассчитанный конечный состав	Композиция буфера для DF
39	23 mM ацетата/4,6% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1–IgG1	10 mM ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
40	10 mM ацетата/66 mM аргинина/3,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1–IgG1	10 mM ацетата, 3,6% (вес/объем) сорбита, 75 mM аргинина–HCl, pH 5,1
41	23 mM ацетата/35 mM фенилаланина/3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1–IgG1	10 mM ацетата, 3,3% (вес/объем) сорбита, 38 mM фенилаланина, pH 4,0
42	23 mM ацетата/4,6% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1–IgG2	10 mM ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
43	10 mM ацетата/66 mM аргинина/3,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1–IgG2	10 mM ацетата, 3,6% (вес/объем) сорбита, 75 mM аргинина–HCl, pH 5,1
44	23 mM ацетата/35 mM фенилаланина/3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1–IgG2	10 mM ацетата, 3,3% (вес/объем) сорбита, 38 mM фенилаланина, pH 4,0
45	23 mM ацетата/4,6% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1–IgG4	10 mM ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, pH 4,0
46	10 mM ацетата/66 mM аргинина/3,3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1–IgG4	10 mM ацетата, 3,6% (вес/объем) сорбита, 75 mM аргинина–HCl, pH 5,1
47	23 mM ацетата/35 mM	10 mM ацетата, 3,3% (вес/объем) сорбита, 38

№ F	Рассчитанный конечный состав	Композиция буфера для DF
	фенилаланина/3% (вес/объем) сорбита/PS20/pH 5,1-IgG4	мМ фенилаланина, pH 4,0

*Конечные составы содержали PS20 в конечной концентрации 0,01% (вес/объем) и характеризовались указанным pH. Согласно оценке концентрации сорбита и фенилаланина на ~8,5% ниже, чем концентрация в буфере для DF. Согласно оценке концентрации аргинина на ~12,5% ниже, чем концентрация в буфере для DF.

[0183] Составы заполняли в контейнеры в виде стеклянного флакона при объеме заполнения 1,0 мл. Составы хранили при температуре 37°C в течение максимум 1 месяца. Ингибирование агрегации и стабильность за счет ингибирования агрегации с течением времени, исходя из образования HMWS, оценивали с применением SE-UHPLC. Профили ингибирования агрегации у таких составов сравнивали при начальных условиях и после периода хранения. Стабильность данных составов после хранения сравнивали в пределах класса иммуноглобулинов.

[0184] На фигурах 31, 33 и 35 (и соответствующих таблицах 10, 12 и 14 ниже) показан процент HMWS, отслеживаемых с помощью SE-UHPLC, в зависимости от состава и времени при 37°C для иммуноглобулинов G (IgG1, IgG2 и IgG4, соответственно). На фигурах 32, 34 и 36 (и соответствующих таблицах 11, 13 и 15 ниже) показан процент низкомолекулярных соединений (LMWS, например, образованных за счет фрагментации белка), отслеживаемых с помощью SE-UHPLC, в зависимости от состава и времени при 37°C для иммуноглобулинов G (IgG1, IgG2 и IgG4, соответственно). На фигурах 37, 38 и 39 показаны наложения хроматограмм, полученных с помощью эксклюзионной хроматографии, в зависимости от состава после хранения при 37°C для t=4 недели.

ТАБЛИЦА 10. Сравнение % HMW для IgG1 (A, B, C) при 37°C в течение 4 недель

Состав		Процентное содержание HMWS		
		0	2 недели	4 недели
39	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,1-IgG1	0,3	0,7	0,9
40	Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1-IgG1	0,3	0,8	1,0
41	Ацетат/фенилаланин/сорбит/PS20/pH 5,1-IgG1	0,3	0,6	0,7

ТАБЛИЦА 11. Сравнение % LMWS для IgG1 (A, B, C) при 37°C в течение 4 недель

Состав		Процентное содержание LMWS		
		0	2 недели	4 недели
39	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,1-IgG1	1,2	2,4	3,1
40	Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1-IgG1	1,2	2,8	4,3
41	Ацетат/фенилаланин/сорбит/PS20/pH 5,1-IgG1	1,2	2,1	3,0

IgG1

ТАБЛИЦА 12. Сравнение % HMW для IgG2 (D, E, F) при 37°C в течение 4 недель				
Состав		Процентное содержание HMWS		
		0	2 недели	4 недели
42	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,1–IgG2	0,4	1,7	2,0
43	Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1 –IgG2	0,4	2,8	3,1
44	Ацетат/фенилаланин/сорбит/PS20/pH 5,1 – IgG2	0,3	1,8	2,4

ТАБЛИЦА 13. Сравнение % LMWS для IgG2 (D, E, F) при 37°C в течение 4 недель				
Состав		Процентное содержание LMWS		
		0	2 недели	4 недели
42	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,1–IgG2	0,7	4,0	7,8
43	Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1 –IgG2	0,8	8,2	16,2
44	Ацетат/фенилаланин/сорбит/PS20/pH 5,1 – IgG2	0,7	3,1	6,2

ТАБЛИЦА 14. Сравнение % HMW для IgG4 (G, H, I) при 37°C в течение 4 недель				
Состав		Процентное содержание HMWS		
		0	2 недели	4 недели
45	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,1–IgG4	0,6	1,1	1,3
46	Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1–IgG4	0,7	1,1	1,6
47	Ацетат/фенилаланин/сорбит/PS20/pH 5,1– IgG4	0,6	1,0	1,3

ТАБЛИЦА 15. Сравнение % LMWS для IgG4 (G, H, I) при 37°C в течение 4 недель				
Состав		Процентное содержание LMWS		
		0	2 недели	4 недели
45	Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,1–IgG4	0,7	1,6	1,9
46	Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,1–IgG4	0,8	1,6	2,1
47)	Ацетат/фенилаланин/сорбит/PS20/pH 5,1– IgG4	0,7	1,4	1,8

[0185] Как показано на фигурах 31 и 32, при добавлении фенилаланина для молекулы IgG1, которая имеет область CDR, аналогичную таковой у предыдущих образцов деносуаба, показано снижение HMWS на приблизительно 0,2% по сравнению с контрольным составом, содержащим ацетат/сорбит. Для образцов с IgG2, которые имеют отличающуюся CDR и изображены на фигурах 33 и 34, показано увеличение содержания HMWS в составе, содержащем ацетат/фенилаланин/сорбит, по сравнению с контрольным

составом, содержащим ацетат/сорбит. Составы, содержащие ацетат/сорбит и ацетат/фенилаланин/сорбит, характеризовались аналогичной стабильностью у образцов типа IgG4, при этом состав с ацетатом/сорбитом/аргинином характеризовался большим образованием HMWS, как показано на фигурах 35 и 36. Во всех случаях с образцами типа IgG1, IgG2 и IgG4 для состава, содержащего ацетат/сорбит/аргинин, показана повышенная деградация HMWS по сравнению с составами, содержащими ацетат/сорбит (контроль) и ацетат/фенилаланин/сорбит.

[0186] Вследствие значительного увеличения фрагментации белка в составе, содержащем ацетат/аргинин/сорбит, как изображено на фигурах 37 и 38, на фигурах 32, 34 и 36 показана взаимосвязь между фрагментацией и изоформой антитела. В литературе было показано, что агрегация, опосредованная фрагментацией моноклональных антител, может происходить у антител, хранящихся при 37°C [Perico N. et al., J.Pharm.Sci. (2009) 98, pgs. 3031–3042]. Данный механизм возможен в настоящем исследовании, поскольку фрагментация является наибольшей в составах, содержащих ацетат/аргинин/сорбит. Фрагментация сводится к минимуму в составе, содержащем ацетат/фенилаланин/сорбит, что потенциально приводит к меньшему содержанию разновидностей HMWS. Образец типа IgG4 не характеризуется ускоренной фрагментацией или агрегацией.

[0187] На основе данных, собранных в данном исследовании, а также предыдущих данных молекулярного моделирования, собранных для деносумаба, можно установить сильную корреляцию между аминокислотной последовательностью CDR и относительным влиянием на снижение содержания HMWS под действием фенилаланина. Снижение содержания разновидностей HMW наблюдали у деносумаба (IgG2) и варианта IgG1, которые имели идентичные аминокислоты CDR, но снижения содержания HMWS не наблюдали у варианта IgG2 с отличающимися доменами CDR. По-видимому, аминокислотные последовательности, содержащиеся в пределах доменов CDR, поддаются взаимодействию с фенилаланином и последующему ингибированию агрегации. Молекула IgG4 также имела области CDR, идентичные таковым деносумаба, но в ходе исследования обнаруживали минимальное изменение агрегации. Молекула IgG4 отличается от вариантов IgG1 и IgG2, в первую очередь, аминокислотной длиной своей шарнирной области и своей функционально активной структурой. Тогда как изоформы антитела IgG1 и IgG2 имеют вытянутую структуру, которая, как правило, описывается как "Y"-форма, домен CH1 Fab IgG4 взаимодействует с доменом CH2 с образованием более компактной структуры [Aalberse R.C. et al., Immunology (2002), 105, pgs. 9–19]. Данная компактная структура могла ингибировать реакции фрагментации и агрегации, обычно наблюдаемые в случае форм IgG1 и IgG2.

ПРИМЕР 12

[0188] Исследование проводили для отслеживания стабильности деносумаба, составленного, как описано ниже и в таблице 16 (составы 51–55). Буферы для диафильтрации отличались концентрацией ацетата и исходным pH для получения конечных составов с pH 5,1 при концентрации деносумаба 120 мг/мл. Кроме того, уровень

сорбита регулировали для поддержания изотоничности конечного продукта (~300 мОсм/кг). Деносумаб при 70 мг/мл подвергали диафильтрации против каждого буфера в количестве более 7 диаобъемов, затем подвергали ультрафильтрации до приблизительно 180 г/мл и разбавляли буфером для диафильтрации и полисорбатом до концентрации деносумаба 120 мг/мл и 0,01% полисорбата 20. Стабильность оценивали с применением SE–UHPLC после хранения при 37°C, и было показано, что стабильность деносумаба в данных составах является очень похожей. Начальное содержание разновидностей NMW немного снижается по мере увеличения начальных концентраций ацетата. Напротив, скорости агрегации немного увеличиваются в составах с более низкими уровнями ацетата.

ТАБЛИЦА 16

№ F	Буфер для DF	Рассчитанный конечный состав*	Осмоляльность (мОсм/кг)
51	5 mM ацетата, 40 mM фенилаланина, 4,4% сорбита, pH 4,0	16 mM ацетата, 37 mM фенилаланина, 4,1% сорбита	304
52	10 mM ацетата, 40 mM фенилаланина, 4,2% сорбита, pH 4,4	23 mM ацетата, 37 mM фенилаланина, 3,9% сорбита	300
53	20 mM ацетата, 40 mM фенилаланина, 4,0% сорбита, pH 4,7	32 mM ацетата, 37 mM фенилаланина, 3,7% сорбита	304
54	20 mM ацетата, 40 mM фенилаланина, 4,2% сорбита, pH 4,7	32 mM ацетата, 37 mM фенилаланина, 3,9% сорбита	315
55	30 mM ацетата, 40 mM фенилаланина, 3,7% сорбита, pH 4,8	41 mM ацетата, 37 mM фенилаланина, 3,4% сорбита	303

*Конечные составы содержали 120 мг/мл деносумаба и PS20 в конечной концентрации 0,01% (вес/объем) и характеризовались pH 5,1.

ПРИМЕР 13

[0189] В следующем примере сообщаются результаты исследований влияния аргинина на стабильность при химической денатурации деносумаба в случае трех различных значениях pH: 4,5, 4,8 и 5 (или 5,2).

[0190] Все эксперименты по химической денатурации проводили с применением прибора Unchained Labs – HUNK с флуоресцентным детектором. Длина волны возбуждения составляла 280 нм, а эмиссионные сканограммы регистрировали от 300 до 500 нм. В случае каждого эксперимента по денатурации белок, буфер и денатурирующее средство

(гуанидиний–HCl) распределяли в 36 лунок с линейным увеличением концентрации денатурирующего средства, что давало кривую из 36 точек для каждого условия. Для аппроксимации точек данных применяли программное обеспечение для аппроксимации кривой, предоставленное производителем прибора (Unchained Labs). Применяли модель двух состояний, поскольку имелись доказательства только одного перехода нативный $\square$ денатурированный. Эксперименты проводили с применением 0–6 М мочевины в 10 мМ ацетате с 5,0% вес/объем сорбита и титровали до требуемого значения pH 4,5, 4,8 или 5 (5,2). Концентрация белка деносуаба составляла 7 мг/мл во всех экспериментах.

[0191] На фигуре 40 показаны кривые изотермической химической денатурации деносуаба в отсутствие аргинина при pH 4,5, 4,8 и 5,0. В отсутствие аргинина $C_{1/2}$ химического денатурирующего средства, требуемая для разворачивания 50% молекул, является аналогичной для трех исследуемых условиях pH.

[0192] На фигуре 41 показаны кривые изотермической химической денатурации деносуаба в присутствии 75 мМ аргинина–HCl при pH 4,5, 4,8 и 5,2. Наблюдали заметное увеличение стабильности при химической денатурации в случае pH 5,2 по сравнению с pH 4,8 и 4,5. При pH 5,2 $C_{1/2}$ для 1 М денатурирующего средства, гуанидиния–HCl, увеличивалась по сравнению с более низким pH. Таким образом, защитная природа аргинина является неожиданной и сильно зависит от pH.

ПРИМЕР 14

[0193] В следующем примере представлены результаты исследований влияния аргинина и фенилаланина на стабильность высококонцентрированных составов на основе деносуаба в шприцах с течением времени.

[0194] В предыдущих исследованиях выявили, что гидрохлорид аргинина и фенилаланин снижают начальный исходный уровень и скорость образования HMWS у деносуаба. В данном исследовании составы, содержащие гидрохлорид аргинина, фенилаланин и комбинацию гидрохлорида аргинина и фенилаланина, оценивали в отношении стабилизирующих влияний на растворы, содержащие деносуаб при 120 мг/мл, и хранили в шприцах в течение максимум трех месяцев и при двух разных температурах.

[0195] Протестированные составы описаны в таблице 17 ниже. Для приготовления составов 56–59 деносуаб при 70 мг/мл в ацетате, pH 5,2, подвергали диафильтрации против буферов для диафильтрации (DF), описанных ниже, в количестве 8 диаобъемов, чтобы гарантировать полную замену буфера. Затем материал подвергали ультрафильтрации до более 180 мг/мл с последующим разбавлением до 120 мг/мл и добавлением полисорбата 20 до конечной концентрации 0,01%. Состав 56 рассматривали как контрольный состав. Значения ацетата, аргинина–HCl и фенилаланина перечислены для буфера для DF, и приведены рассчитанные уровни в конечном составе на основе деносуаба при 120 мг/мл, учитывающие исключение вспомогательного вещества и совместной концентрации ацетата, если не присутствуют другие противоионы. Вязкость при 5°C и 25°C измеряли с применением модульного компактного реометра Рааг при скоростях сдвига до 1000 с^{-1} (обратно пропорционально секундам). Составы заполняли в

стеклянные предварительно заполняемые шприцы при объеме заполнения 1,0 мл. Параллельные наборы шприцев хранили при температуре 25°C в течение 3 месяцев и 37°C в течение 2 месяцев, соответственно. Стабильность, исходя из образования HMWS, оценивали с применением SE-UHPLC.

ТАБЛИЦА 17

	Сокращенное название состава	Состав буфера для DF*	Рассчитанный конечный состав*	Проводимость (мкСм/см)	Вязкость при 5°C	Вязкость при 25°C
56	Ацетат/сорбит/PS20/ pH 5,0	20 mM ацетата, 5% (вес/объем) сорбита, pH 4,7	32 mM ацетата, 4,4% сорбита	600	5,2	3,1
57	Ацетат/аргинин- HCl/сорбит/PS20/ pH 5,1	10 mM ацетата, 75 mM L- аргинина-HCl, 2,4% (вес/объем) сорбита, pH 5,1	10 mM ацетата, 66 mM аргинина- HCl, 2,2% сорбита	5250	4,8	2,7
58	Ацетат/аргинин- HCl/фенилаланин/ сорбит/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 38 mM аргинина-HCl, 38 mM фенилаланина, 3,0% (вес/объем) сорбита, pH 5,1	10 mM ацетата, 33 mM аргинина- HCl, 35 mM фенилалан ина, 2,8% сорбита	3070	4,8	2,8
59	Ацетат/фенилаланин/ сорбит/PS20/pH 5,1	10 mM ацетата, 38 mM фенилаланина, 4,4% (вес/объем) сорбита, pH 4,0	23 mM ацетата, 35 mM фенилалан ина, 4,2% сорбита	800	4,9	2,9

*Каждый конечный состав содержит 120 мг/мл деносумаба и 0,01% PS20, а pH указан в сокращенном названии состава.

[0196] На фигурах 42 и 43 показан процент HMWS, отслеживаемых с помощью SE-UHPLC, в зависимости от состава и времени при 25°C в течение 3 месяцев и 37°C в течение 2 месяцев, соответственно.

[0197] В таблицах 18–21 представлены такие же данные в табличной форме, а также увеличение содержания HMWS относительно начальных уровней HMWS.

ТАБЛИЦА 18. Уровень HMWS% при 25°C в течение 12 недель

Название состава	Процентное содержание HMWS
------------------	----------------------------

	0	2	4	6	8	12
5	0,8	0,9	1,0	1,1	1,1	1,3
6 Ацетат/сорбит/pH 5,0	1	3	4	6	7	8
5	0,7	0,8	0,9	1,0	1,0	1,2
7 Ацетат/аргинин–HCl/сорбит/pH 5,1	2	5	3	2	7	1
5 Ацетат/аргинин–HCl/фенилаланин/ 8 сорбит/pH 5,1	0,5	0,7	0,8	0,9	0,9	1,1
5	9	5	5	3	7	2
9 Ацетат/фенилаланин/сорбит/pH 5,1	0,6		0,7	0,8	0,9	1,0
	6	0,7	9	8	2	8

ТАБЛИЦА 19. Увеличение содержания HMWS при 25°C в течение 12 недель

Состав	Увеличение содержания HMWS					
	0	2	4	6	8	12
5		0,1	0,2	0,3	0,3	0,5
6 Ацетат/сорбит/pH 5,0		2	3	5	6	7
5		0,1	0,2		0,3	0,4
7 Ацетат/аргинин–HCl/сорбит/pH 5,1		3	1	0,3	5	9
5 Ацетат/аргинин–HCl/фенилаланин/ 8 сорбит/pH 5,1		0,1	0,2	0,3	0,3	0,5
5		6	6	4	8	3
9 Ацетат/фенилаланин/сорбит/pH 5,1		0,0	0,1	0,2	0,2	0,4
		4	3	2	6	2

ТАБЛИЦА 20. Уровень % HMWS при 37°C в течение 8 недель

Состав	Процентное содержание HMWS				
	0	2	4	6	8
5					
6 Ацетат/сорбит/pH 5,0	0,81	1,3	1,66	1,94	2,49
5					
7 Ацетат/аргинин–HCl/сорбит/pH 5,1	0,72	1,2	1,5	1,94	2,23
5 Ацетат/аргинин– 8 HCl/фенилаланин/сорбит/pH 5,1	0,59	1,23	1,66	2,06	2,48
5					
9 Ацетат/фенилаланин/сорбит/pH 5,1	0,66	1,09	1,4	1,73	2,21

ТАБЛИЦА 21. Увеличение содержания HMWS при 37°C в течение 8 недель

Состав	Увеличение содержания HMWS			
	2	4	6	8

5					
6	Ацетат/сорбит/pH 5,0	0,49	0,85	1,13	1,68
5					
7	Ацетат/аргинин-HCl/сорбит/pH 5,1	0,48	0,78	1,22	1,51
5	Ацетат/аргинин-HCl/фенилаланин/сорбит/pH				
8	5,1	0,64	1,07	1,47	1,89
5					
9	Ацетат/фенилаланин/сорбит/pH 5,1	0,43	0,74	1,07	1,55

[0198] В данном примере показано, что добавление каждого из аргинина, фенилаланина и их комбинации снижает уровень исходных HMWS ($t=0$) в высококонцентрированных составах на основе деносуаба. При 25°C увеличение HMWS сокращается в составе 59, содержащем фенилаланин, по сравнению с контрольным составом 56. При 37°C составы 57 и 59 характеризовались снижением образования HMWS по сравнению с контрольным составом 56, содержащим сорбит. При 37°C образование HMWS происходило с более высокой скоростью в составе, содержащем аргинин-HCl и фенилаланин, по сравнению с другими составами, что указывает на то, что комбинация этих вспомогательных веществ является дестабилизирующей для деносуаба при таких высоких температурах у данного состава.

[0199] Вышеприведенное описание приведено только для ясности понимания, и оно не должно подразумевать каких-либо нежелательных ограничений, так как модификации в пределах объема настоящего изобретения могут быть очевидны для рядовых специалистов в данной области техники.

[0200] На протяжении всего настоящего описания и нижеследующей формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", будут подразумевать включение заявленного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но без исключения любого другого целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий.

[0201] На протяжении всего настоящего описания, где композиции описаны как включающие компоненты или материалы, предполагается, что композиции также могут фактически состоять или состоять из любой комбинации перечисленных компонентов или материалов, если не указано иное. Аналогичным образом, если способы описаны как предусматривающие конкретные стадии, предполагается, что способы также могут фактически состоять или состоять из любой комбинации перечисленных стадий, если не указано иное. Настоящее изобретение, раскрытое в данном документе иллюстративным образом, может быть осуществлено на практике соответствующим образом при отсутствии любого элемента или стадии, которые конкретно не раскрыты в данном документе.

[0202] Осуществление на практике способа, раскрытого в данном документе, и его индивидуальных стадий может проводиться вручную и/или с использованием автоматической обработки, обеспечиваемой электронным оборудованием. Хотя процессы

были описаны со ссылкой на конкретные варианты осуществления, рядовой специалист в данной области техники легко поймет, что можно использовать другие пути выполнения действий, связанных с указанными способами. Например, порядок различных стадий может быть изменен без отклонения от объема или сущности указанного способа, если не указано иное. Кроме того, некоторые индивидуальные стадии могут быть объединены, опущены или дополнительно подразделены на дополнительные стадии.

Все патенты, публикации и ссылки, цитируемые в данном документе, настоящим полностью включены посредством ссылки. В случае противоречия между настоящим раскрытием и включенными патентами, публикациями и ссылками настоящее раскрытие должно иметь преимущество.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Водный фармацевтический состав, содержащий: (i) человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора–активатора ядерного фактора каппа–В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть и (ii) аминокислотный ингибитор агрегации.

2. Водный фармацевтический состав, содержащий: (i) человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора–активатора ядерного фактора каппа–В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть в концентрации более 70 мг/мл, где водный фармацевтический состав характеризуется рН в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2.

3. Водный фармацевтический состав по п. 1 или п. 2, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5.

4. Водный фармацевтический состав по п. 3, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6.

5. Водный фармацевтический состав по п. 4, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10.

6. Водный фармацевтический состав по любому из пп. 3–5, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат: (i) вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; (ii) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8; (iii) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9, или (iv) любую их комбинацию.

7. Водный фармацевтический состав по любому из пп. 3–6, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат: (A) вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и (B) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9, и вариабельный

домен тяжелой цепи, содержащий CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

8. Водный фармацевтический состав по любому из пп. 1–7, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат:

(А) переменный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из:

переменного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 1;

переменного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 19;

переменного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 19; или

(В) переменный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из:

переменного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 2;

переменного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 20;

переменного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 20; или

(С) переменный домен легкой цепи из (А) и переменный домен тяжелой цепи из (В).

9. Водный фармацевтический состав по любому из пп. 1–8, где антитело к RANKL представляет собой полностью человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело.

10. Водный фармацевтический состав по любому из пп. 1–8, где антигенсвязывающая часть представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂ или одноцепочечный Fv.

11. Водный фармацевтический состав по любому из пп. 1–8, где антитело к RANKL представляет собой антитело IgG₁, IgG₂ или IgG₄, необязательно содержащее легкие каппа-цепи.

12. Водный фармацевтический состав по п. 11, где антитело к RANKL содержит последовательность под SEQ ID NO: 15.

13. Водный фармацевтический состав по п. 12, где антитело к RANKL содержит последовательность под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18.

14. Водный фармацевтический состав по любому из пп. 1–13, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат:

(А) легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из:

легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 13;

легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 21 или 23;

легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 21 или 23; или

(В) тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из:

тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14;

тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 22 или 24;

тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 22 или 24; или

(С) вариабельный домен легкой цепи из (А) и вариабельный домен тяжелой цепи из (В).

15. Водный фармацевтический состав по любому из п. 1 и пп. 3–14, где концентрация антитела или его антигенсвязывающей части превышает 70 мг/мл, необязательно находится в диапазоне от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл.

16. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, где концентрация антитела или его антигенсвязывающей части находится в диапазоне от более 70 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл, необязательно в диапазоне от более приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл.

17. Водный фармацевтический состав по п. 15 или п. 16, где концентрация антитела или его антигенсвязывающей части находится в диапазоне от приблизительно 100 до приблизительно 140 мг/мл.

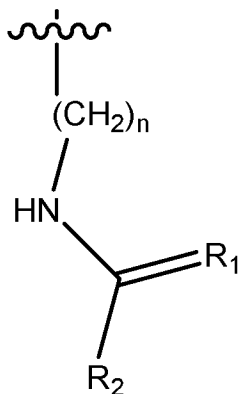
18. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, где концентрация антитела или его антигенсвязывающей части составляет приблизительно 120 мг/мл $\pm$ 12 мг/мл.

19. Водный фармацевтический состав по пп. 2–18, дополнительно содержащий аминокислотный ингибитор агрегации.

20. Водный фармацевтический состав по любому из п. 1 и пп. 3–19, где аминокислотный ингибитор агрегации предусматривает аминокислоту, содержащую заряженную боковую цепь, ароматическую аминокислоту или гидрофобную аминокислоту.

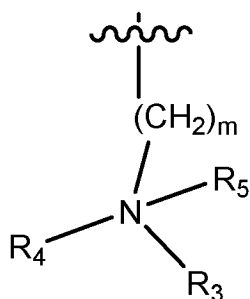
21. Водный фармацевтический состав по п. 20, где аминокислота, содержащая заряженную боковую цепь, представляет собой аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь.

22. Водный фармацевтический состав по п. 21, где аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, содержит структуру боковой цепи формулы I или формулы II:



[Формула I],

где n составляет от 1 до 7, где каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из H, $\text{C}_1\text{--C}_{18}$ алкила, $(\text{C}_1\text{--C}_{18}\text{алкил})\text{OH}$, $(\text{C}_1\text{--C}_{18}\text{алкил})\text{NH}_2$, NH , $\text{NH}_2(\text{C}_1\text{--C}_{18}\text{алкил})\text{SH}$, $(\text{C}_0\text{--C}_4\text{алкил})(\text{C}_3\text{--C}_6)\text{циклоалкила}$, $(\text{C}_0\text{--C}_4\text{алкил})(\text{C}_2\text{--C}_5\text{гетероциклил})$, $(\text{C}_0\text{--C}_4\text{алкил})(\text{C}_6\text{--C}_{10}\text{арил})\text{R}_7$ и $(\text{C}_1\text{--C}_4\text{алкил})(\text{C}_3\text{--C}_9\text{гетероарил})$, где R_7 представляет собой H или OH, где необязательно один из R_1 и R_2 представляет собой свободную аминогруппу ($-\text{NH}_3^+$),



[Формула II],

где m составляет от 1 до 7, где каждый из R_3 и R_4 независимо выбран из группы A, состоящей из: H, $\text{C}_1\text{--C}_{18}$ алкила, $(\text{C}_1\text{--C}_{18}\text{алкил})\text{OH}$, $(\text{C}_1\text{--C}_{18}\text{алкил})\text{NH}_2$, $(\text{C}_1\text{--C}_{18}\text{алкил})\text{SH}$, $(\text{C}_0\text{--C}_4\text{алкил})(\text{C}_3\text{--C}_6)\text{циклоалкила}$, $(\text{C}_0\text{--C}_4\text{алкил})(\text{C}_2\text{--C}_5\text{гетероциклил})$, $(\text{C}_0\text{--C}_4\text{алкил})(\text{C}_6\text{--C}_{10}\text{арил})\text{R}_8$ и $(\text{C}_1\text{--C}_4\text{алкил})(\text{C}_3\text{--C}_9\text{гетероарил})$, где R_8 представляет собой H или OH, где R_5 необязательно присутствует и, если присутствует, выбран из группы A, где необязательно каждый из R_3 , и R_4 , и R_5 представляет собой H.

23. Водный фармацевтический состав по п. 22, где n находится в диапазоне от 2 до 4.

24. Водный фармацевтический состав по п. 23, где R_1 представляет собой NH или NH_2 .

25. Водный фармацевтический состав по п. 24, где R_2 представляет собой NH_2 или NH_3^+ .

26. Водный фармацевтический состав по п. 25, где аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, представляет собой аргинин.

27. Водный фармацевтический состав по п. 22, где m находится в диапазоне от 3 до 5.

28. Водный фармацевтический состав по п. 27, где каждый из R_3 и R_4 , а также R_5 , в случае присутствия, представляет собой H , при этом R_5 необязательно присутствует.

29. Водный фармацевтический состав по п. 28, где аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, представляет собой лизин.

30. Водный фармацевтический состав по любому из пп. 21–29, где аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, присутствует в составе в виде соли.

31. Водный фармацевтический состав по п. 30, где соль представляет собой гидрохлоридную (HCl) соль.

32. Водный фармацевтический состав по п. 31, содержащий L -аргинин- HCl или L -лизин- HCl .

33. Водный фармацевтический состав по п. 20, где ароматическая аминокислота содержит фенил или индол.

34. Водный фармацевтический состав по п. 33, где ароматическая аминокислота содержит C_1 – C_6 алкильную цепь между альфа-углеродом и фенилом или индолом.

35. Водный фармацевтический состав по п. 34, где алкильная цепь представляет собой C_1 – C_3 алкильную цепь.

36. Водный фармацевтический состав по п. 35, где ароматическая аминокислота представляет собой L -фенилаланин.

37. Водный фармацевтический состав по п. 35, где ароматическая аминокислота представляет собой L -триптофан.

38. Водный фармацевтический состав по п. 20, где гидрофобная аминокислота характеризуется показателем по шкале гидрофобности Кайта и Дулиттла, составляющим более приблизительно 2,5.

39. Водный фармацевтический состав по п. 20 или п. 38, где гидрофобная аминокислота содержит боковую цепь, содержащую C_2 – C_{12} -алкил с разветвленной или прямой цепью или C_4 – C_8 циклоалкил, C_4 – C_8 гетероцикл, содержащий гетероатом азота, где необязательно гетероцикл представляет собой имидазол, пиррол или индол.

40. Водный фармацевтический состав по п. 39, где гидрофобная аминокислота содержит C_3 – C_8 алкил.

41. Водный фармацевтический состав по п. 40, где гидрофобная аминокислота содержит C_3 алкил с разветвленной цепью или C_4 алкил с разветвленной цепью.

42. Водный фармацевтический состав по п. 41, где гидрофобная аминокислота представляет собой L -валин, L -лейцин или L -изолейцин.

43. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, содержащий от приблизительно 5 мМ до приблизительно 300 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, необязательно содержащий от приблизительно 25 мМ до приблизительно 90 мМ аминокислотного ингибитора агрегации.

44. Водный фармацевтический состав по п. 43, содержащий от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь, необязательно L-аргинин.

45. Водный фармацевтический состав по п. 44, содержащий от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ аминокислотного ингибитора агрегации.

46. Водный фармацевтический состав по п. 43, содержащий от приблизительно 5 мМ до приблизительно 180 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой ароматическую аминокислоту, необязательно L-фенилаланин.

47. Водный фармацевтический состав по п. 46, содержащий от приблизительно 5 мМ до приблизительно 100 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, необязательно от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой ароматическую аминокислоту, необязательно L-фенилаланин.

48. Водный фармацевтический состав по п. 43, содержащий от приблизительно 5 мМ до приблизительно 300 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой гидрофобную аминокислоту, необязательно L-валин, L-изолейцин или L-лейцин.

49. Водный фармацевтический состав по п. 48, содержащий от приблизительно 5 мМ до приблизительно 200 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, необязательно от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой гидрофобную аминокислоту, необязательно L-валин, L-изолейцин или L-лейцин.

50. Водный фармацевтический состав по любому из пп. 43–49, содержащий:
от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ гидрохлорида L-аргинина;
от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L-фенилаланина;
от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L-триптофана;
от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ гидрохлорида L-лизина;
от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L-лейцина;
от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L-изолейцина;
от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L-валина или
любую их комбинацию.

51. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, содержащий только один аминокислотный ингибитор агрегации.

52. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, где молярное отношение аминокислотного ингибитора агрегации к антителу к RANKL составляет от приблизительно 10 до 200, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой ароматическую аминокислоту, необязательно L-фенилаланин.

53. Водный фармацевтический состав по п. 52, где молярное отношение составляет от приблизительно 20 до приблизительно 90.

54. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, где молярное отношение аминокислотного ингибитора агрегации к антителу к RANKL составляет от приблизительно 20 до 300, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь, необязательно L-аргинин.

55. Водный фармацевтический состав по п. 54, где молярное отношение составляет от приблизительно 45 до 180.

56. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащий модификатор тоничности, необязательно выбранный из группы, состоящей из сорбита, маннита, сахарозы, трегалозы, глицерина и их комбинаций.

57. Водный фармацевтический состав по п. 56, где модификатор тоничности предусматривает сорбит.

58. Водный фармацевтический состав по п. 56 или п. 57, содержащий от приблизительно 1,0% (вес/вес) до приблизительно 5,0% (вес/вес) модификатора тоничности.

59. Водный фармацевтический состав по п. 58, содержащий от приблизительно 2,0% (вес/вес) до приблизительно 5,0% (вес/вес) сорбита, или от приблизительно 3,5% (вес/вес) до приблизительно 5,0% (вес/вес) сорбита, или от приблизительно 4,0% (вес/вес) до приблизительно 5,0% (вес/вес) сорбита.

60. Водный фармацевтический состав по любому из пп. 1–59, который не содержит сорбит и необязательно не содержит какой-либо модификатор тоничности.

61. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащий поверхностно-активное вещество.

62. Водный фармацевтический состав по п. 61, где поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (например, полисорбата 20, полисорбата 80), или одного или нескольких простых алкилариловых полиэфиров, например, оксиэтилированного алкилфенола (например, Triton® X-100), или одного или нескольких полуксамеров (например, Pluronic®, например Pluronic® F68) и их комбинаций.

63. Водный фармацевтический состав по п. 62, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20.

64. Водный фармацевтический состав по любому из пп. 61–63, содержащий по меньшей мере приблизительно 0,004% (вес/объем) поверхностно-активного вещества, и необязательно содержащий менее 0,15% (вес/объем) поверхностно-активного вещества.

65. Водный фармацевтический состав по п. 64, содержащий от приблизительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015% (вес/объем) поверхностно-активного вещества.

66. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащий буфер, где необязательно при 25°C буфер центрирован в диапазоне от приблизительно pH 4,0 до приблизительно pH 5,5.

67. Водный фармацевтический состав по п. 66, где при 25°C буфер характеризуется рКа в пределах одной единицы pH от pH 5,0–5,2.

68. Водный фармацевтический состав по п. 66 или п. 67, содержащий от приблизительно 5 мМ до приблизительно 60 мМ буфера.

69. Водный фармацевтический состав по п. 68, содержащий от приблизительно 5 мМ до приблизительно 50 мМ буфера.

70. Водный фармацевтический состав по п. 69, содержащий от приблизительно 9 мМ до приблизительно 45 мМ буфера.

71. Водный фармацевтический состав по любому из пп. 66–70, где буфер представляет собой ацетат или глутамат.

72. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до 5,19.

73. Водный фармацевтический состав по п. 72, характеризующийся pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,15.

74. Водный фармацевтический состав по п. 73, характеризующийся pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,1.

75. Водный фармацевтический состав по любому из п. 1 и пп. 3–74, характеризующийся pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,4, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2, или от приблизительно 5,0 до менее 5,2, или от приблизительно 5,0 до 5,19, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,15, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,1.

76. Водный фармацевтический состав по п. 75, характеризующийся pH, составляющим приблизительно 5,1.

77. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся вязкостью, которая не превышает приблизительно 6 сП при 5°C, где необязательно вязкость составляет от приблизительно 4,5 сП до приблизительно 5,5 сП.

78. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся вязкостью, которая составляет менее приблизительно 13 сП при 25°C.

79. Водный фармацевтический состав по п. 78, характеризующийся вязкостью в диапазоне от приблизительно 2,0 сП до приблизительно 10 сП, необязательно от приблизительно 2,5 сП до приблизительно 4 сП.

80. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся проводимостью в диапазоне от приблизительно 500 мкСм/см до приблизительно 5500 мкСм/см, где необязательно проводимость находится в диапазоне от

приблизительно 2500 мкСм/см до приблизительно 5500 мкСм/см, если состав содержит аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь, или в диапазоне от приблизительно 500 мкСм/см до приблизительно 2000 мкСм/см, если состав содержит ароматическую аминокислоту или не содержит аминокислотного ингибитора агрегации.

81. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся осмоляльностью в диапазоне от приблизительно 200 мОсм/кг до приблизительно 500 мОсм/кг, или от приблизительно 225 мОсм/кг до приблизительно 400 мОсм/кг, или от приблизительно 250 мОсм/кг до приблизительно 350 мОсм/кг.

82. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, содержащий менее 2% высокомолекулярных разновидностей (HMWS) и/или более 98% главного пика антитела, как измерено с помощью SE-UHPLC, после хранения при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C в течение по меньшей мере 12 месяцев, 24 месяцев или 36 месяцев.

83. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, содержащий менее 2% высокомолекулярных разновидностей (HMWS) и/или более 98% главного пика антитела, как измерено с помощью SE-UHPLC, после хранения при температуре от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C в течение приблизительно 1 месяца.

84. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, содержащий менее 2% высокомолекулярных разновидностей (HMWS) и/или более 98% главного пика антитела, как измерено с помощью SE-UHPLC, после первичного хранения при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C в течение по меньшей мере 12 месяцев, 24 месяцев или 36 месяцев и вторичного хранения при температуре от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C в течение приблизительно 1 месяца.

85. Водный фармацевтический состав по любому из предыдущих пунктов, содержащий менее 2% высокомолекулярных разновидностей (HMWS) и/или более 98% главного пика антитела, как измерено с помощью SE-UHPLC, после хранения в течение приблизительно одного месяца при 37°C или в течение 3 месяцев при 30°C.

86. Контейнер, необязательно флакон, предварительно заполненный шприц (PFS) или стеклянный контейнер, содержащие водный фармацевтический состав по любому из пп. 1–85.

87. Контейнер по п. 86, содержащий состав в количестве приблизительно 1 мл или меньше, необязательно приблизительно 0,5 мл.

88. Способ получения стабильного водного фармацевтического состава, содержащего человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора–активатора ядерного фактора каппа–В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть, предусматривающий объединение моноклонального антитела к RANKL или его антигенсвязывающей части в концентрации более 70 мг/мл с аминокислотным ингибитором агрегации, буфером, поверхностно–активным веществом и необязательно модификатором тоничности.

89. Способ по п. 88, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5.

90. Способ по п. 89, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6.

91. Способ по п. 90, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10.

92. Способ по любому из пп. 89–91, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат: (i) переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; (ii) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8; (iii) переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9, или (iv) их комбинацию.

93. Способ по любому из пп. 88–92, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат: (A) переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, переменный домен легкой цепи, содержащий CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и (B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

94. Способ по любому из пп. 88–93, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат:

(A) переменный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из:

переменного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 1;

переменного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 19;

варибельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 19; или

(B) варибельный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из:

варибельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 2;

варибельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 20;

варибельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 20; или

(C) варибельный домен легкой цепи из (A) и варибельный домен тяжелой цепи из (B).

95. Способ по любому из пп. 88–94, где антитело к RANKL представляет собой полностью человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело.

96. Способ по любому из пп. 88–95, где антигенсвязывающая часть представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂ или одноцепочечный Fv.

97. Способ по любому из пп. 88–96, где антитело к RANKL представляет собой антитело IgG₁, IgG₂ или IgG₄, где необязательно антитело содержит легкие каппа-цепи.

98. Способ по п. 97, где антитело к RANKL содержит последовательность под SEQ ID NO: 15.

99. Способ по п. 98, где антитело к RANKL содержит последовательность под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18.

100. Способ по любому из пп. 88–99, где антитело к RANKL или его антигенсвязывающая часть содержат:

(A) легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из:

легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 13;

легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 21 или 23;

легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 21 или 23; или

(B) тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из:

тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14;

тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 22 или 24;

тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 22 или 24; или

(C) вариабельный домен легкой цепи из (A) и вариабельный домен тяжелой цепи из (B).

101. Способ по любому из пп. 88–100, предусматривающий объединение от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл антитела или его антигенсвязывающей части с аминокислотным ингибитором агрегации, буфером, поверхностно-активным веществом и необязательно модификатором тоничности.

102. Способ по любому из пп. 88–101, где стабильный водный фармацевтический состав содержит от более 70 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл антитела или его антигенсвязывающей части.

103. Способ по п. 101 или п. 102, где стабильный водный фармацевтический состав содержит от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 140 мг/мл антитела или его антигенсвязывающей части.

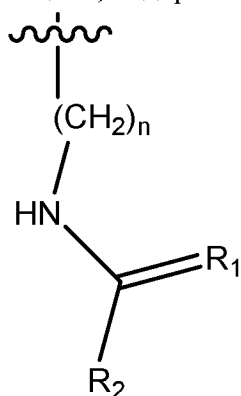
104. Способ по любому из пп. 88–103, где стабильный водный фармацевтический состав содержит приблизительно 120 мг/мл $\pm$ 12 мг/мл антитела или антигенсвязывающей части.

105. Способ по п. 104, где стабильный водный фармацевтический состав содержит приблизительно 120 мг/мл $\pm$ 5 мг/мл антитела или антигенсвязывающей части.

106. Способ по любому из пп. 88–105, где аминокислотный ингибитор агрегации предусматривает аминокислоту, содержащую заряженную боковую цепь, ароматическую аминокислоту или гидрофобную аминокислоту.

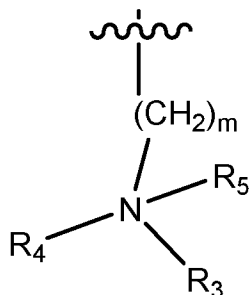
107. Способ по п. 106, где аминокислота, содержащая заряженную боковую цепь, представляет собой аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь.

108. Способ по п. 107, где аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, содержит структуру боковой цепи формулы I или формулы II:



[Формула I],

где n составляет от 1 до 7, где каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из H, C_1 – C_{18} алкила, $(C_1$ – C_{18} алкил)ОН, $(C_1$ – C_{18} алкил)NH₂, NH, NH₂(C_1 – C_{18} алкил)SH, $(C_0$ – C_4 алкил)(C_3 – C_6)циклоалкила, $(C_0$ – C_4 алкил)(C_2 – C_5 гетероциклил), $(C_0$ – C_4 алкил)(C_6 – C_{10} арил) R_7 и $(C_1$ – C_4 алкил)(C_3 – C_9 гетероарил), где R_7 представляет собой H или ОН, где необязательно один из R_1 и R_2 представляет собой свободную аминогруппу ($-NH_3^+$),



[Формула II],

где m составляет от 1 до 7, где каждый из R_3 и R_4 независимо выбран из группы А, состоящей из: H, C_1 – C_{18} алкила, $(C_1$ – C_{18} алкил)ОН, $(C_1$ – C_{18} алкил)NH₂, $(C_1$ – C_{18} алкил)SH, $(C_0$ – C_4 алкил)(C_3 – C_6)циклоалкила, $(C_0$ – C_4 алкил)(C_2 – C_5 гетероциклил), $(C_0$ – C_4 алкил)(C_6 – C_{10} арил) R_8 и $(C_1$ – C_4 алкил)(C_3 – C_9 гетероарил), где R_8 представляет собой H или ОН, где R_5 необязательно присутствует и, если присутствует, выбран из группы А, где необязательно каждый из R_3 , и R_4 , и R_5 представляет собой H.

109. Способ по п. 108, где n находится в диапазоне от 2 до 4.
110. Способ по п. 109, где R_1 представляет собой NH или NH₂.
111. Способ по п. 110, где R_2 представляет собой NH₂ или NH₃⁺.
112. Способ по п. 111, где аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, представляет собой аргинин.
113. Способ по п. 108, где m находится в диапазоне от 3 до 5.
114. Способ по п. 113, где каждый из R_3 и R_4 , а также R_5 , в случае присутствия, представляет собой H, при этом R_5 необязательно присутствует.
115. Способ по п. 114, где аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, представляет собой лизин.
116. Способ по любому из пп. 107–115, где аминокислота, содержащая положительно заряженную боковую цепь, присутствует в составе в виде соли.
117. Способ по п. 116, где соль представляет собой гидрохлоридную (HCl) соль.
118. Способ по п. 117, предусматривающий L–аргинин–HCl или L–лизин–HCl.
119. Способ по п. 106, где ароматическая аминокислота содержит фенил или индол.
120. Способ по п. 119, где ароматическая аминокислота содержит C_1 – C_6 алкильную цепь между альфа–углеродом и фенилом или индолом.
121. Способ по п. 120, где алкильная цепь представляет собой C_1 – C_3 алкильную цепь.
122. Способ по п. 121, где ароматическая аминокислота представляет собой L–фенилаланин.

123. Способ по п. 121, где ароматическая аминокислота представляет собой L-триптофан.

124. Способ по п. 106, где гидрофобная аминокислота характеризуется показателем по шкале гидрофобности Кайта и Дулиттла, составляющим более приблизительно 2,5.

125. Способ по п. 106 или п. 124, где гидрофобная аминокислота содержит боковую цепь, содержащую C₂–C₁₂алкил с разветвленной или прямой цепью или C₄–C₈циклоалкил, C₄–C₈гетероцикл, содержащий гетероатом азота, где необязательно гетероцикл представляет собой имидазол, пиррол или индол.

126. Способ по п. 125, где гидрофобная аминокислота содержит C₃–C₈алкил.

127. Способ по п. 126, где гидрофобная аминокислота содержит C₃алкил с разветвленной цепью или C₄алкил с разветвленной цепью.

128. Способ по п. 127, где гидрофобная аминокислота представляет собой L-валин, L-лейцин или L-изолейцин.

129. Способ по любому из пп. 88–128, предусматривающий объединение от приблизительно 5 мМ до приблизительно 300 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, необязательно от приблизительно 15 мМ до приблизительно 200 мМ или от приблизительно 25 мМ до приблизительно 90 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, с антителом или антигенсвязывающей частью.

130. Способ по п. 129, предусматривающий объединение от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ аминокислотного ингибитора агрегации с антителом или антигенсвязывающей частью, где аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь, необязательно L-аргинин.

131. Способ по п. 130, предусматривающий объединение от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ аминокислотного ингибитора агрегации с антителом или антигенсвязывающей частью.

132. Способ по п. 129, предусматривающий объединение от приблизительно 5 мМ до приблизительно 180 мМ аминокислотного ингибитора агрегации с антителом или антигенсвязывающей частью, где аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой ароматическую аминокислоту, необязательно L-фенилаланин.

133. Способ по п. 132, предусматривающий объединение от приблизительно 5 мМ до приблизительно 100 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, необязательно от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, с антителом или антигенсвязывающей частью.

134. Способ по п. 129, предусматривающий объединение от приблизительно 5 мМ до приблизительно 300 мМ аминокислотного ингибитора агрегации с антителом или антигенсвязывающей частью, где аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой гидрофобную аминокислоту, необязательно L-валин, L-изолейцин или L-лейцин.

135. Способ по п. 134, предусматривающий объединение от приблизительно 5 мМ до приблизительно 200 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, необязательно от

приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ аминокислотного ингибитора агрегации, с антителом или антигенсвязывающей частью.

136. Способ по любому из пп. 88–135, предусматривающий объединение антитела или антигенсвязывающей части с:

от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ гидрохлорида L–аргинина;
от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L–фенилаланина;
от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L–триптофана;
от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ гидрохлорида L–лизина;
от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L–лейцина;
от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L–изолейцина;
от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ L–валина или
любой их комбинацией.

137. Способ по любому из пп. 88–136, предусматривающий объединение антитела или антигенсвязывающей части с только одним аминокислотным ингибитором агрегации.

138. Способ по любому из пп. 88–137, где водный фармацевтический состав содержит антитело и аминокислотный ингибитор агрегации при молярном отношении аминокислотного ингибитора агрегации к антителу, составляющем от приблизительно 10 до 200, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой ароматическую аминокислоту, необязательно L–фенилаланин.

139. Способ по п. 138, где молярное отношение составляет от приблизительно 20 до приблизительно 90.

140. Способ по любому из пп. 88–139, где водный фармацевтический состав содержит антитело и аминокислотный ингибитор агрегации при молярном отношении аминокислотного ингибитора агрегации к антителу к RANKL, составляющем от приблизительно 20 до 300, если аминокислотный ингибитор агрегации представляет собой аминокислоту с положительно заряженной боковой цепью, необязательно L–аргинин.

141. Способ по п. 140, где молярное отношение составляет от приблизительно 45 до 180.

142. Способ по любому из пп. 88–141, где антитело или антигенсвязывающую часть объединяют с модификатором тоничности, выбранным из группы, состоящей из сорбита, маннита, сахарозы, трегалозы, глицерина и их комбинаций.

143. Способ по п. 142, где модификатор тоничности предусматривает сорбит.

144. Способ по п. 142 или п. 143, предусматривающий от приблизительно 1,0% (вес/вес) до приблизительно 5,0% (вес/вес) модификатора тоничности.

145. Способ по п. 144, предусматривающий от приблизительно 2,0% (вес/вес) до приблизительно 5,0% (вес/вес) сорбита, или от приблизительно 3,5% (вес/вес) до приблизительно 5,0% (вес/вес) сорбита, или от приблизительно 4,0% (вес/вес) до приблизительно 5,0% (вес/вес) сорбита.

146. Способ по любому из пп. 88–145, который не предусматривает сорбит и необязательно не предусматривает какой–либо модификатор тоничности.

147. Способ по любому из пп. 88–146, где поверхностно–активное вещество выбрано из группы, состоящей из сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (например, полисорбата 20, полисорбата 80), или одного или нескольких простых алкилариловых полиэфиров, например, оксиэтилированного алкилфенола (например, Triton® X–100), или одного или нескольких полуксамеров (например, Pluronic®, например Pluronic® F68) и их комбинаций.

148. Способ по п. 147, где поверхностно–активное вещество представляет собой сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот.

149. Способ по п. 148, где поверхностно–активное вещество представляет собой полисорбат 20.

150. Способ по любому из пп. 147–149, предусматривающий по меньшей мере приблизительно 0,004% (вес/объем) поверхностно–активного вещества и необязательно предусматривающий менее 0,15% (вес/объем) поверхностно–активного вещества.

151. Способ по п. 150, предусматривающий от приблизительно 0,005% (вес/объем) до приблизительно 0,015% (вес/объем) поверхностно–активного вещества.

152. Способ по любому из пп. 88–151, предусматривающий объединение антитела или антигенсвязывающей части с буфером, где при 25°C буфер центрирован в диапазоне от приблизительно pH 4,0 до приблизительно pH 5,5.

153. Способ по п. 152, где при 25°C буфер характеризуется рКа в пределах одной единицы pH от pH 5,0–5,2.

154. Способ по п. 152 или п. 153, где водный фармацевтический состав содержит от приблизительно 5 mM до приблизительно 60 mM буфера.

155. Способ по п. 154, где водный фармацевтический состав содержит от приблизительно 5 mM до приблизительно 50 mM буфера.

156. Способ по п. 155, где водный фармацевтический состав содержит от приблизительно 9 mM до приблизительно 45 mM буфера.

157. Способ по любому из пп. 152–156, где буфер представляет собой ацетат или глутамат.

158. Способ по любому из пп. 88–157, где водный фармацевтический состав характеризуется pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до 5,19.

159. Способ по п. 158, где водный фармацевтический состав характеризуется pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,15.

160. Способ по п. 159, где водный фармацевтический состав характеризуется pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,1.

161. Способ по любому из пп. 88–160, где водный фармацевтический состав характеризуется pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,4, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2, или от приблизительно 5,0 до менее 5,2, или от приблизительно 5,0 до 5,19, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,15, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,1.

162. Способ по п. 161, где водный фармацевтический состав характеризуется рН, составляющим приблизительно 5,1.

163. Способ по любому из пп. 88–162, где водный фармацевтический состав характеризуется вязкостью, которая не превышает приблизительно 6 сП при 5°C, где необязательно вязкость составляет от приблизительно 4,5 сП до приблизительно 5,5 сП.

164. Способ по любому из пп. 88–163, где водный фармацевтический состав характеризуется вязкостью, составляющей менее приблизительно 13 сП при 25°C.

165. Способ по п. 164, где водный фармацевтический состав характеризуется вязкостью в диапазоне от приблизительно 2,0 сП до приблизительно 10 сП, необязательно от приблизительно 2,5 сП до приблизительно 4 сП.

166. Способ по любому из пп. 88–165, где водный фармацевтический состав характеризуется проводимостью в диапазоне от приблизительно 500 мкСм/см до приблизительно 5500 мкСм/см, где необязательно проводимость находится в диапазоне от приблизительно 2500 мкСм/см до приблизительно 5500 мкСм/см, если состав содержит аминокислоту, содержащую положительно заряженную боковую цепь, или в диапазоне от приблизительно 500 мкСм/см до приблизительно 2000 мкСм/см, если состав содержит ароматическую аминокислоту или не содержит аминокислотного ингибитора агрегации.

167. Способ по любому из пп. 88–166, где водный фармацевтический состав характеризуется осмоляльностью в диапазоне от приблизительно 200 мОсм/кг до приблизительно 500 мОсм/кг, или от приблизительно 225 мОсм/кг до приблизительно 400 мОсм/кг, или от приблизительно 250 мОсм/кг до приблизительно 350 мОсм/кг.

168. Способ по любому из пп. 88–167, где водный фармацевтический состав содержит менее 2% высокомолекулярных разновидностей (HMWS) и/или более 98% главного пика антитела, как измерено с помощью SE–UHPLC, после хранения при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C в течение по меньшей мере 12 месяцев, 24 месяцев или 36 месяцев.

169. Способ по любому из пп. 88–168, где водный фармацевтический состав содержит менее 2% высокомолекулярных разновидностей (HMWS) и/или более 98% главного пика антитела, как измерено с помощью SE–UHPLC, после хранения при температуре от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C в течение приблизительно 1 месяца.

170. Способ по любому из пп. 88–169, где водный фармацевтический состав содержит менее 2% высокомолекулярных разновидностей (HMWS) и/или более 98% главного пика антитела, как измерено с помощью SE–UHPLC, после первичного хранения при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C в течение по меньшей мере 12 месяцев, 24 месяцев или 36 месяцев и вторичного хранения при температуре от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C в течение приблизительно 1 месяца.

171. Способ по любому из пп. 88–170, где водный фармацевтический состав содержит менее 2% высокомолекулярных разновидностей (HMWS) и/или более 98%

главного пика антитела, как измерено с помощью SE–UHPLC, после хранения в течение приблизительно одного месяца при 37°C или в течение 3 месяцев при 30°C.

172. Стабильный водный фармацевтический состав, полученный согласно любому из предыдущих пунктов.

173. Применение водного фармацевтического состава по любому из пп. 1–85 и п. 172 для терапевтического лечения субъекта.

174. Применение по п. 173, где терапевтическое лечение охватывает лечение или предупреждение костного осложнения (SRE), лечение или предупреждение гигантоклеточной опухоли кости, лечение или предупреждение гиперкальциемии злокачественного новообразования, лечение или предупреждение остеопороза или увеличение костной массы у субъекта.

175. Применение по п. 174, где терапевтическое лечение охватывает: (a) лечение или предупреждение SRE у субъекта с метастазами солидных опухолей в кости, (b) лечение или предупреждение SRE у субъекта, который является взрослым или достигшим скелетной зрелости подростком с гигантоклеточной опухолью кости, которая является неоперабельной или хирургическая резекция которой вероятно приведет к тяжелым осложнениям, (c) лечение гиперкальциемии злокачественного новообразования, резистентного к терапии бисфосфонатами, у субъекта, (d) лечение или предупреждение SRE у субъекта с множественной миеломой или с метастазами солидной опухоли в кости, (e) лечение остеопороза у постменопаузных женщин с высоким риском перелома, (f) лечение, направленное на увеличение костной массы у женщин с высоким риском перелома, получающих адъювантную терапию ингибитором ароматазы при раке молочной железы, (g) лечение, направленное на увеличение костной массы у мужчин с высоким риском перелома, получающих антиандрогенную терапию при нематастатическом раке предстательной железы, (h) лечение для увеличения костной массы у мужчин с остеопорозом с высоким риском перелома, (i) терапию с помощью кальция или витамина D.

176. Способ предупреждения костного осложнения (SRE) у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение эффективного количества состава по любому из пп. 1–85 и п. 172.

177. Способ по п. 176, где SRE выбрано из группы, состоящей из патологического перелома, лучевой терапии кости, операции на кости и компрессии спинного мозга.

178. Способ по п. 176 или п. 177, где у пациента имеется метастаз в кости из солидной опухоли.

179. Способ по п. 178, где солидная опухоль выбрана из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого и почечноклеточной карциномы.

180. Способ по п. 178 или п. 179, где у пациента имеется множественная миелома.

181. Способ по любому из пп. 176–180, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для снижения уровня маркера костного ремоделирования, N–

концевого телопептида в моче, скорректированного по креатинину (uNTx/Cr), необязательно на по меньшей мере 80%.

182. Способ лечения гигантоклеточной опухоли кости у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение эффективного количества состава по любому из пп. 1–85 и п. 172.

183. Способ по п. 182, где у пациента имеется гигантоклеточная опухоль кости, которая является рецидивирующей, неоперабельной, или хирургическая резекция которой вероятно приведет к тяжелым осложнениям.

184. Способ лечения гиперкальциемии злокачественного новообразования у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение эффективного количества состава по любому из пп. 1–85 и п. 172.

185. Способ по п. 184, где злокачественное новообразование является резистентным к терапии бисфосфонатами.

186. Способ по п. 184 или п. 185, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для снижения или поддержания кальция в сыворотке крови пациента на уровне, равном приблизительно 11,5 мг/дл или меньше.

187. Способ по любому из пп. 184–186, где состав содержит человеческое антитело к RANKL в концентрации, составляющей приблизительно 120 мг/мл.

188. Способ по любому из пп. 176–187, предусматривающий введение состава по схеме, включающей один раз через каждые четыре недели.

189. Способ по любому из пп. 176–188, предусматривающий введение состава в дни 8 и 15 первого месяца терапии.

190. Способ лечения остеопороза у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение эффективного количества состава по любому из пп. 1–85 и п. 172.

191. Способ по п. 190, где пациент представляет собой постменопаузную женщину с высоким риском перелома.

192. Способ по п. 191, где пациент представляет собой мужчину с высоким риском перелома.

193. Способ увеличения костной массы у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение эффективного количества состава по любому из пп. 1–85 и п. 172.

194. Способ по п. 193, где пациент имеет остеопороз, где необязательно пациент представляет собой мужчину с остеопорозом с высоким риском перелома.

195. Способ по п. 194, где пациент представляет собой женщину с высоким риском перелома, получающую адъювантную терапию ингибитором ароматазы при раке молочной железы.

196. Способ по п. 194, где пациент представляет собой мужчину с высоким риском перелома, получающего антиандрогенную терапию при метастатическом раке предстательной железы.

197. Способ по любому из пп. 193–196, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для снижения частоты новых переломов позвонков и/или невертебральных переломов.

198. Способ по любому из пп. 193–197, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для уменьшения резорбции кости.

199. Способ по любому из пп. 193–198, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для увеличения плотности кости у пациента в по меньшей мере одной области, выбранной из поясничного отдела позвоночника, тазобедренного сочленения и шейки бедра.

200. Способ по любому из пп. 193–199, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для увеличения костной массы в трубчатой кости и/или губчатой кости пациента.

201. Способ по любому из пп. 193–200, предусматривающий введение состава в количестве, эффективном для снижения уровня маркера костной резорбции, С–телопептида типа 1 в сыворотке крови (СТХ).

202. Способ по любому из пп. 193–201, предусматривающий введение состава по схеме, включающей один раз через каждые шесть месяцев.

203. Способ по любому из пп. 193–202, предусматривающий введение состава в объеме 1 мл или меньше.

204. Способ по любому из пп. 176–203, предусматривающий введение состава подкожно.

205. Способ по п. 204, предусматривающий введение состава подкожно в плечо, верхнюю часть бедра или живот.

206. Способ по любому из пп. 176–205, где пациент получает один или оба из кальция и витамина D.

207. Способ улучшения стабильности водного фармацевтического состава, содержащего человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора–активатора ядерного фактора каппа–В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть в концентрации более 70 мг/мл, предусматривающий:

получение указанного водного фармацевтического состава, содержащего указанное человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора–активатора ядерного фактора каппа–В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть, при pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2,

где указанный водный фармацевтический состав демонстрирует улучшенную стабильность при pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2 по сравнению с эквивалентным водным фармацевтическим составом, pH которого не находится в диапазоне от приблизительно 5,0 до менее 5,2.

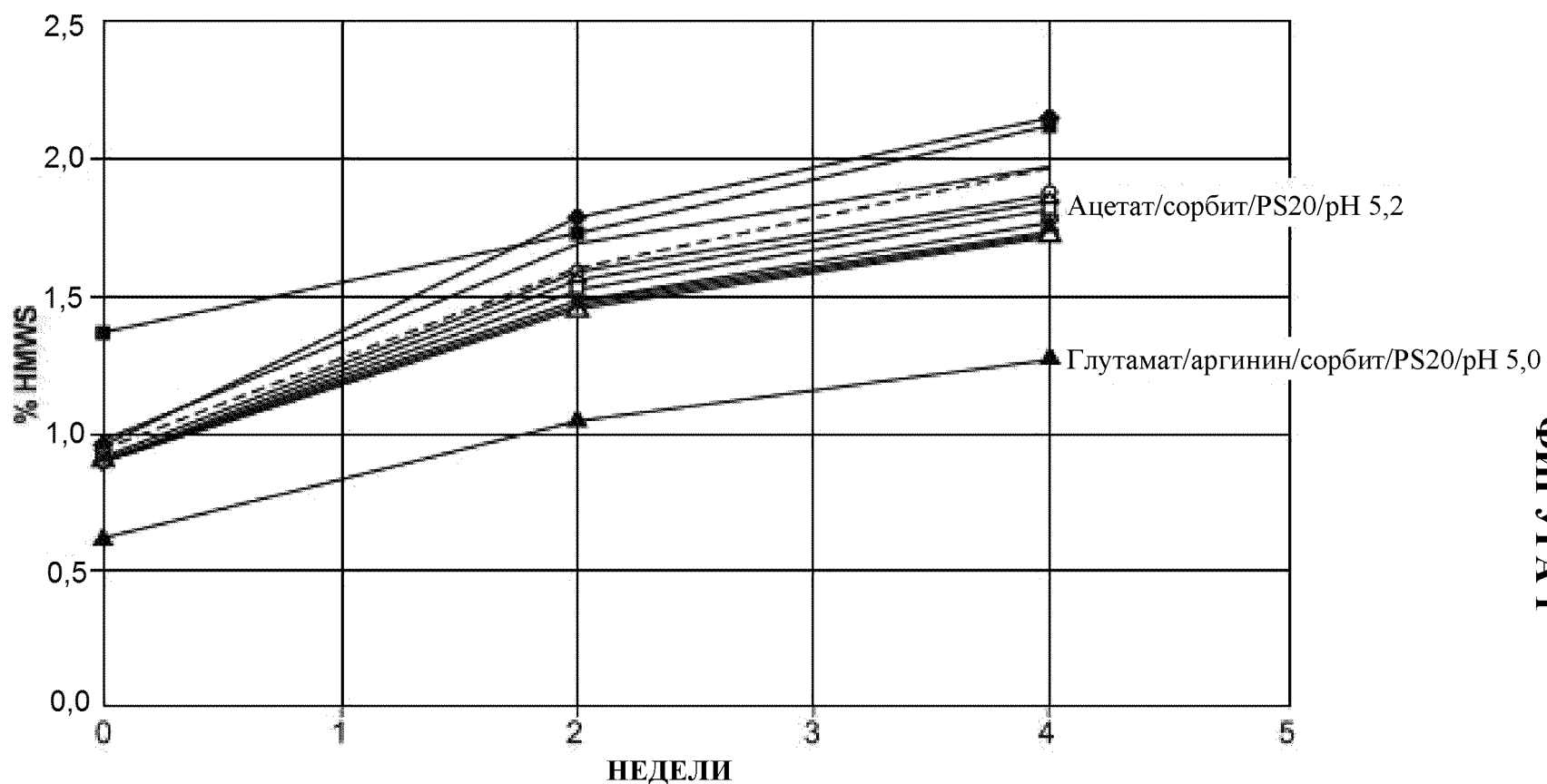
208. Способ улучшения стабильности водного фармацевтического состава, содержащего человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора–активатора

ядерного фактора каппа-В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть, предусматривающий:

получение указанного водного фармацевтического состава, содержащего указанное человеческое моноклональное антитело к лиганду рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В человека (антитело к RANKL) или его антигенсвязывающую часть в смеси с аминокислотным ингибитором агрегации,

где указанный водный фармацевтический состав с аминокислотным ингибитором агрегации демонстрирует улучшенную стабильность по сравнению с эквивалентным водным фармацевтическим составом без аминокислотного ингибитора агрегации.

По доверенности



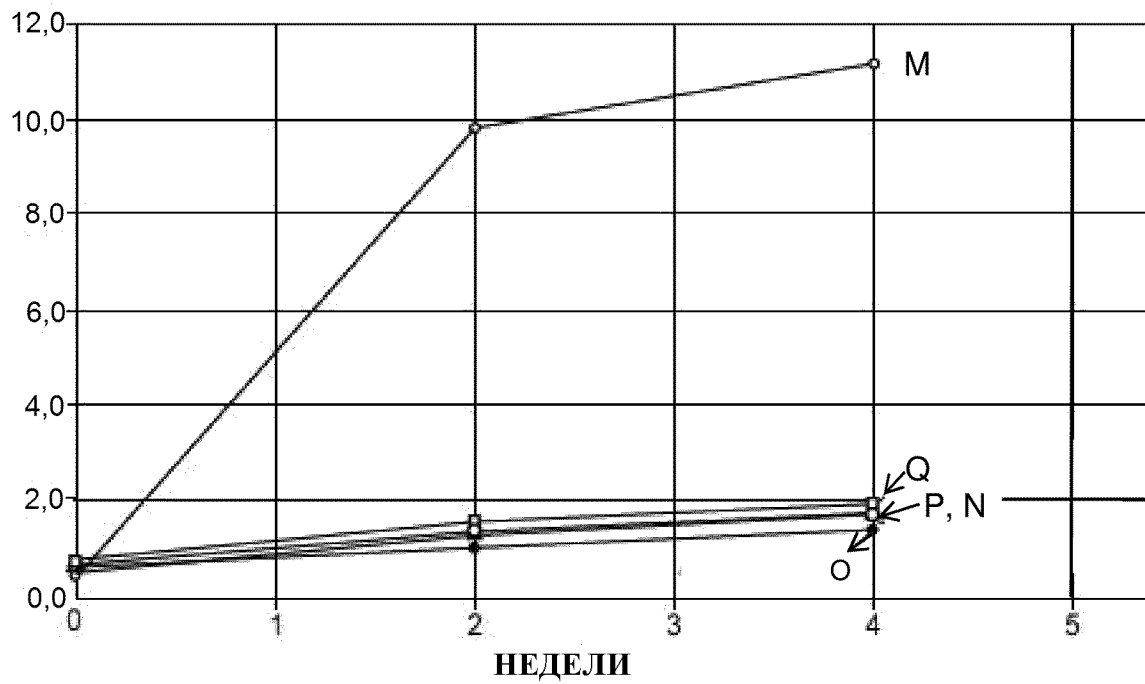
- | | |
|--|---|
| —◇— Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,2 | — Ацетат/пролин/PS20/pH 5,2 |
| —×— Ацетат/сорбит/PS20/Triton X-100/pH 5,2 | —■— Самозабуференный/сорбит/PS20/pH 5,2 |
| —+— Ацетат/NAK/сорбит/PS20/pH 5,2 | —△— Ацетат/сорбит/Pluronic F68/pH 5,2 |
| —●— Ацетат/Сартисол/сорбит/PS20/pH 5,2 | —○— Ацетат/NAR/сорбит/PS20/pH 5,2 |
| —□— Ацетат/сорбит/PS80/pH 5,2 | — --- — Ацетат/PEG/сорбит/PS20/pH 5,2 |
| —*— Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,2 | —▲— Глутамат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,0 |

ФИГУРА 1

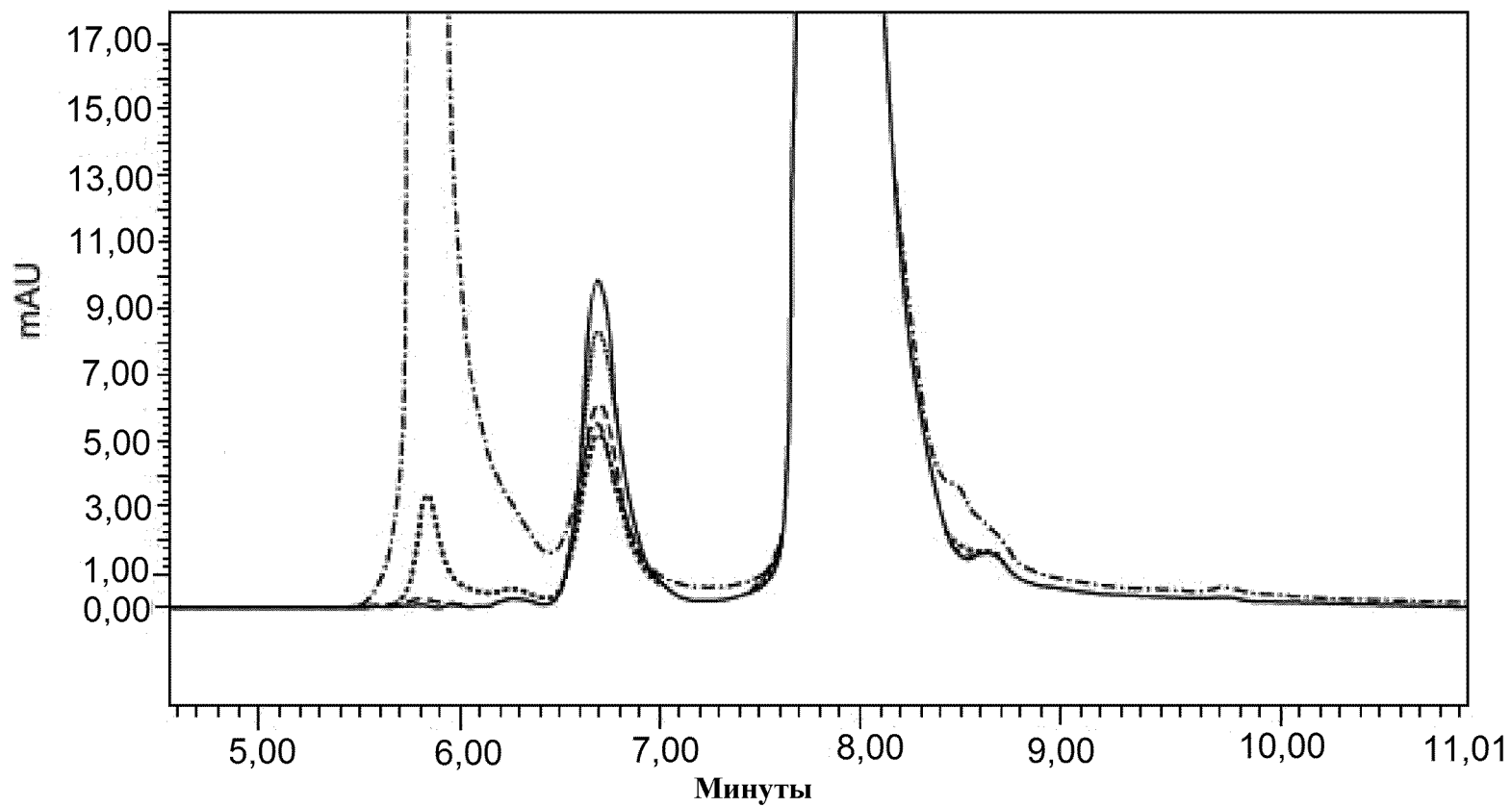
1/27

558478

ФИГУРА 2



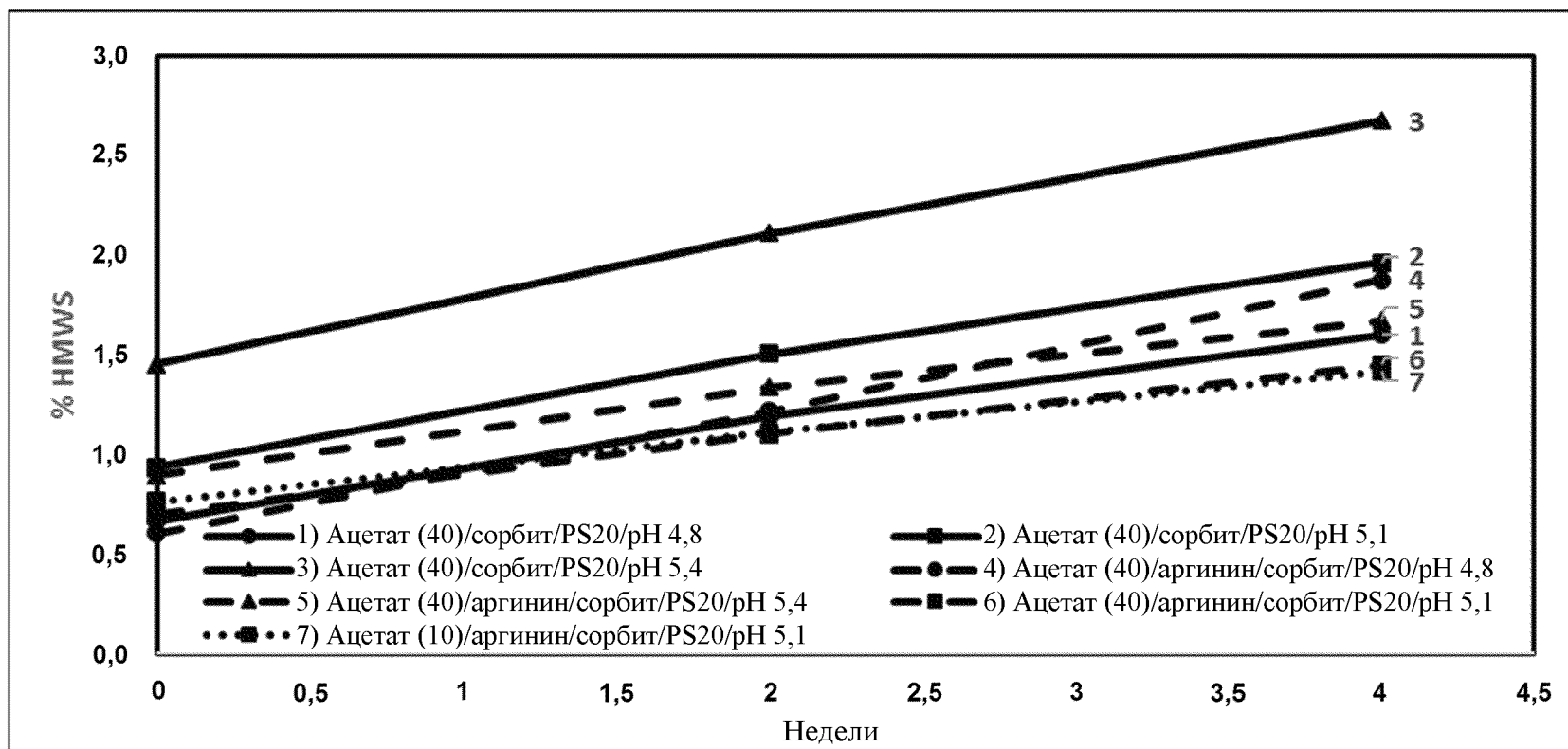
- (M) Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 4,5
- (P) Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,2
- △— (N) Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 4,8
- (Q) Ацетат/сорбит/PS20/pH 5,3
- (O) Ацетат/аргинин/сорбит/PS20/pH 5,2



- · — · — · — ацетат/аргинин/сорбит/полисорбат 20/pH 4,5
- ацетат/аргинин/сорбит/полисорбат 20/pH 4,8
- — — — — ацетат/аргинин/сорбит/полисорбат 20/pH 5,2
- ацетат/сорбит/полисорбат 20/pH 5,2
- ацетат/сорбит/полисорбат 20/pH 5,3

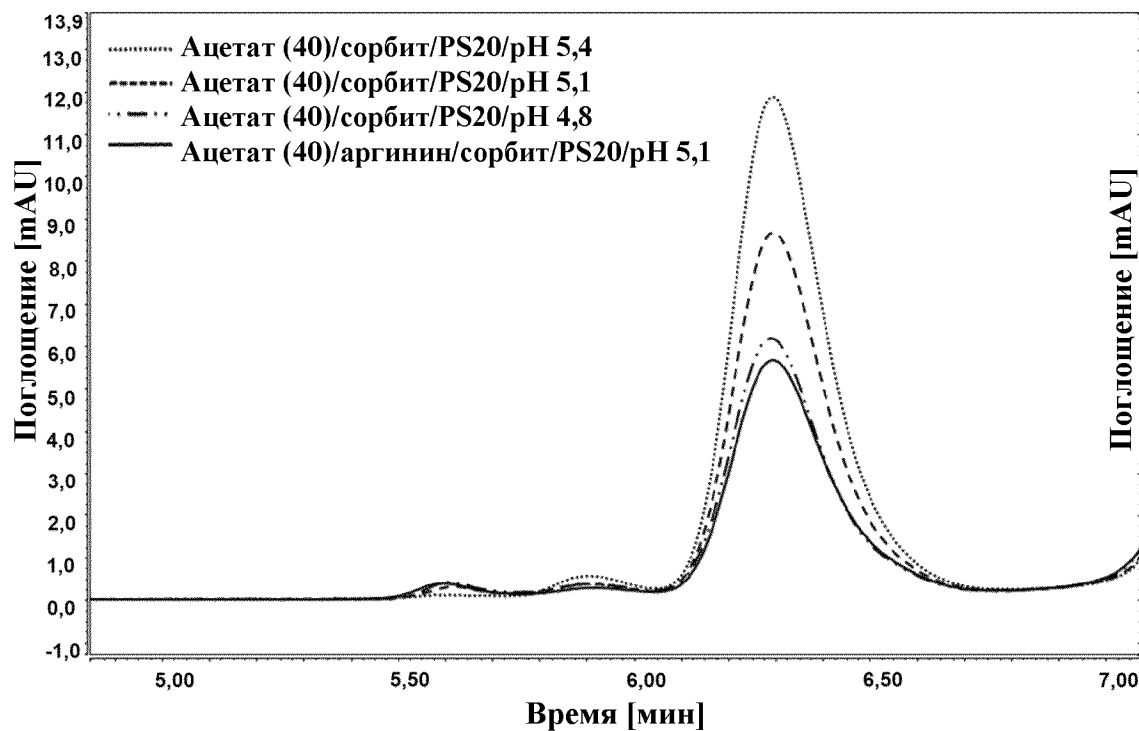
ФИГУРА 3

ФИГУРА 4

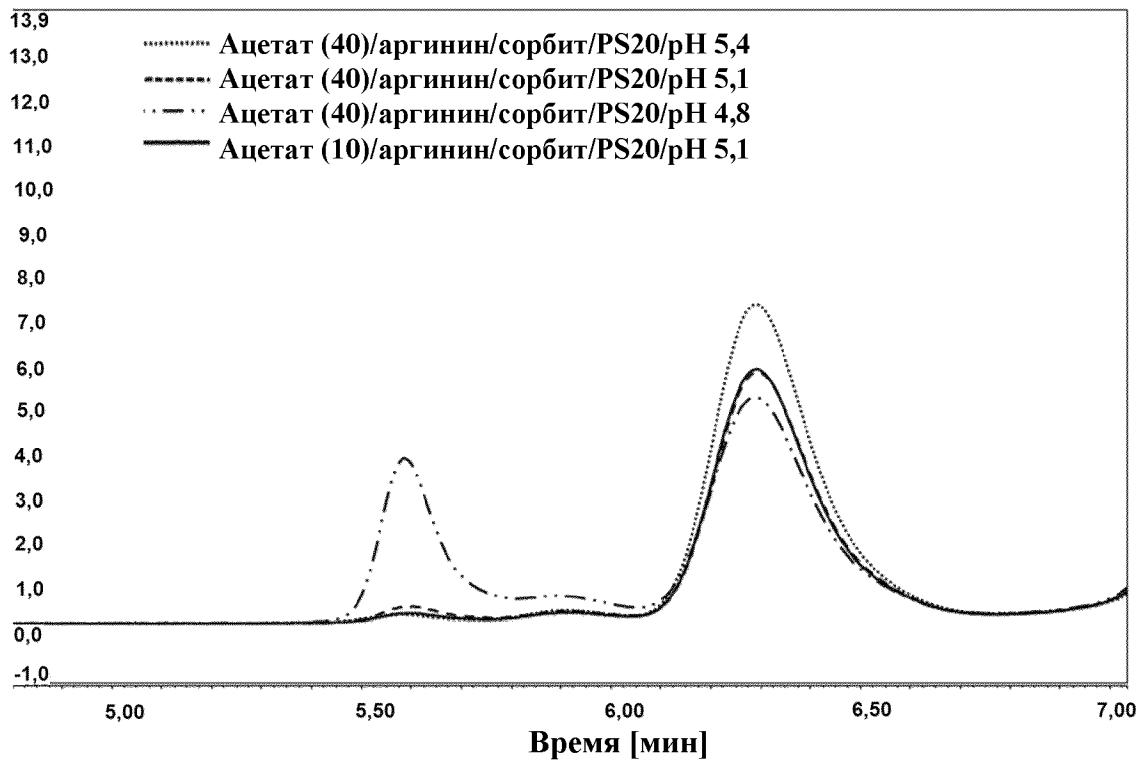


5/27

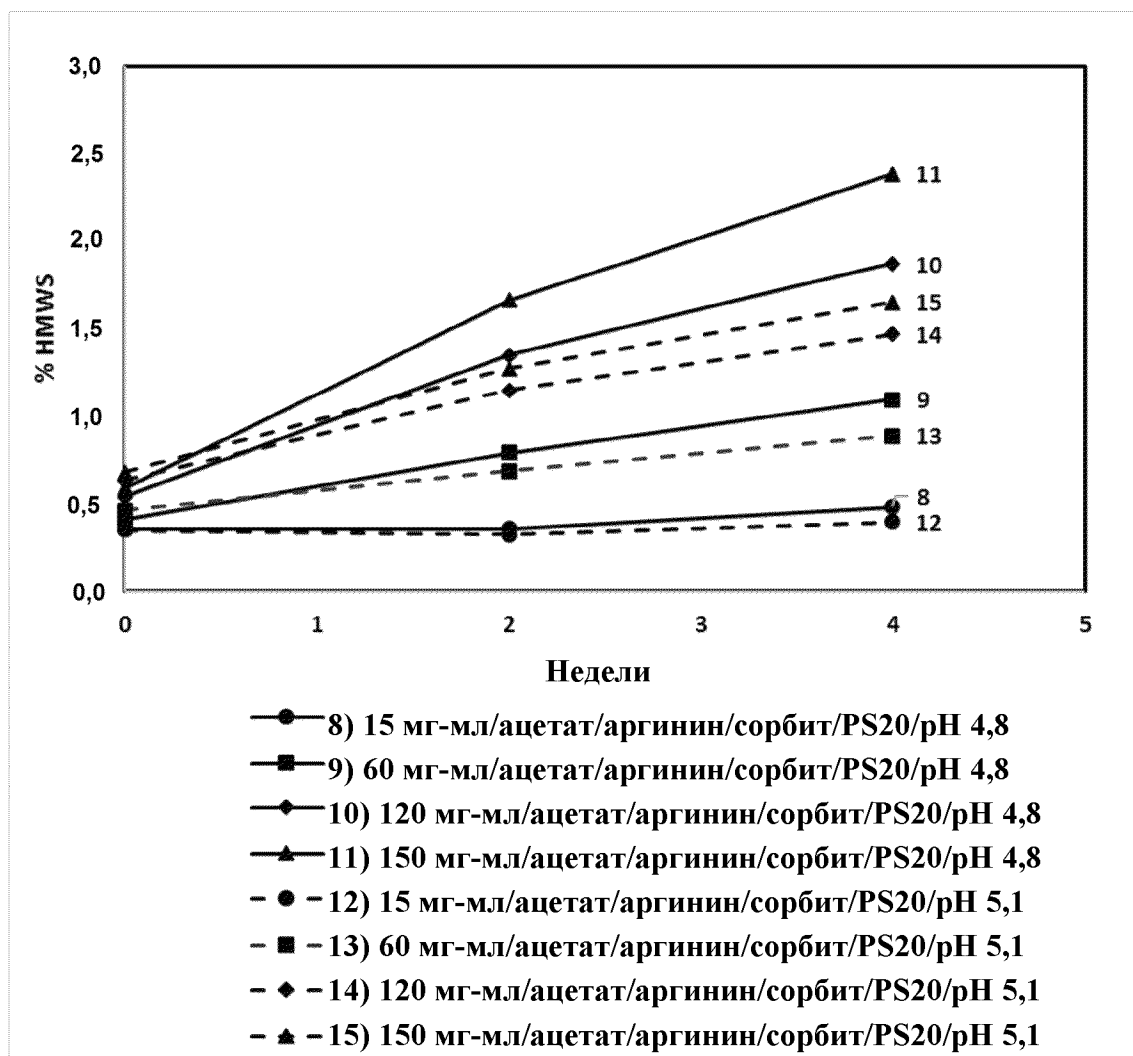
ФИГУРА 5А



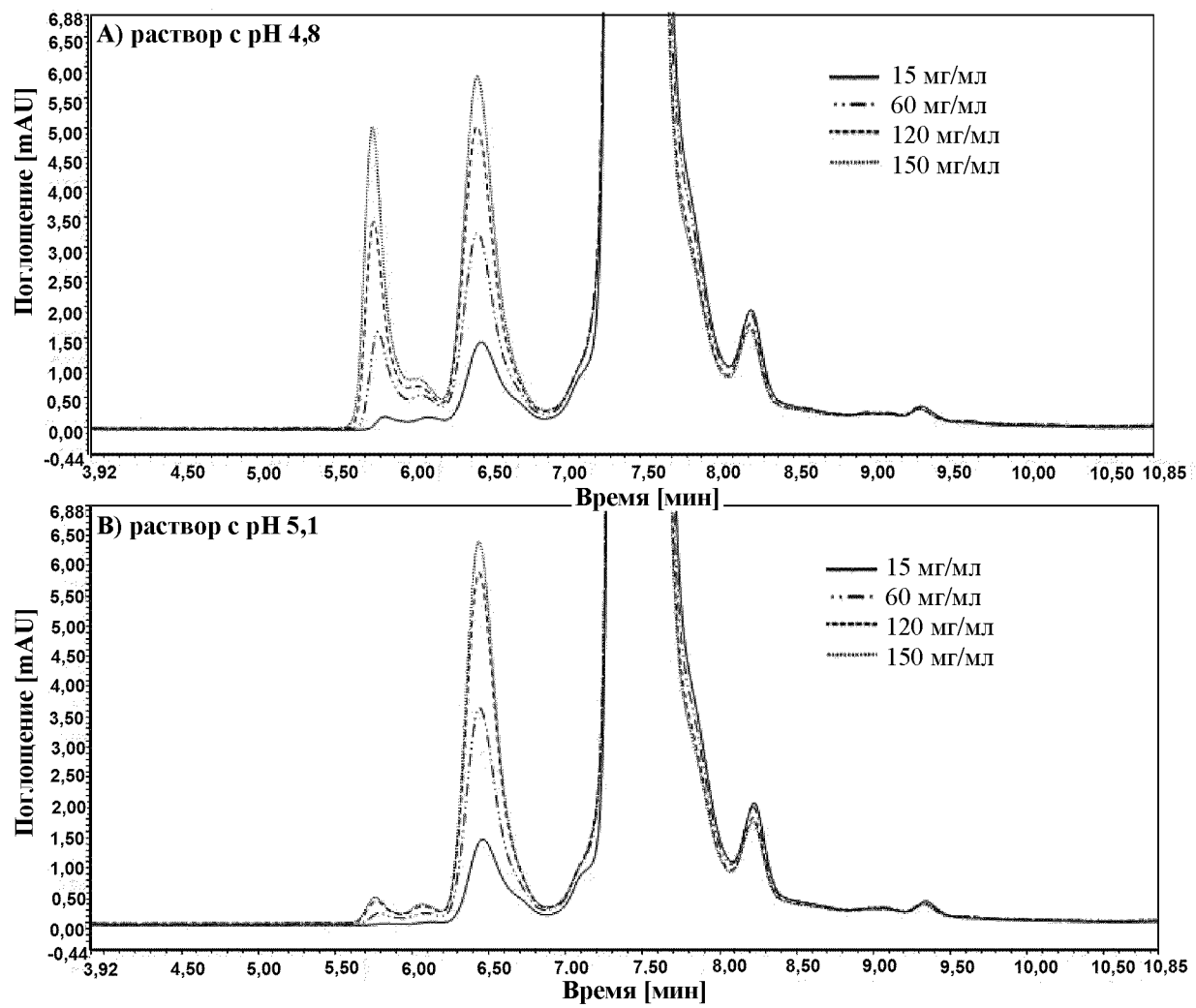
ФИГУРА 5В



ФИГУРА 6

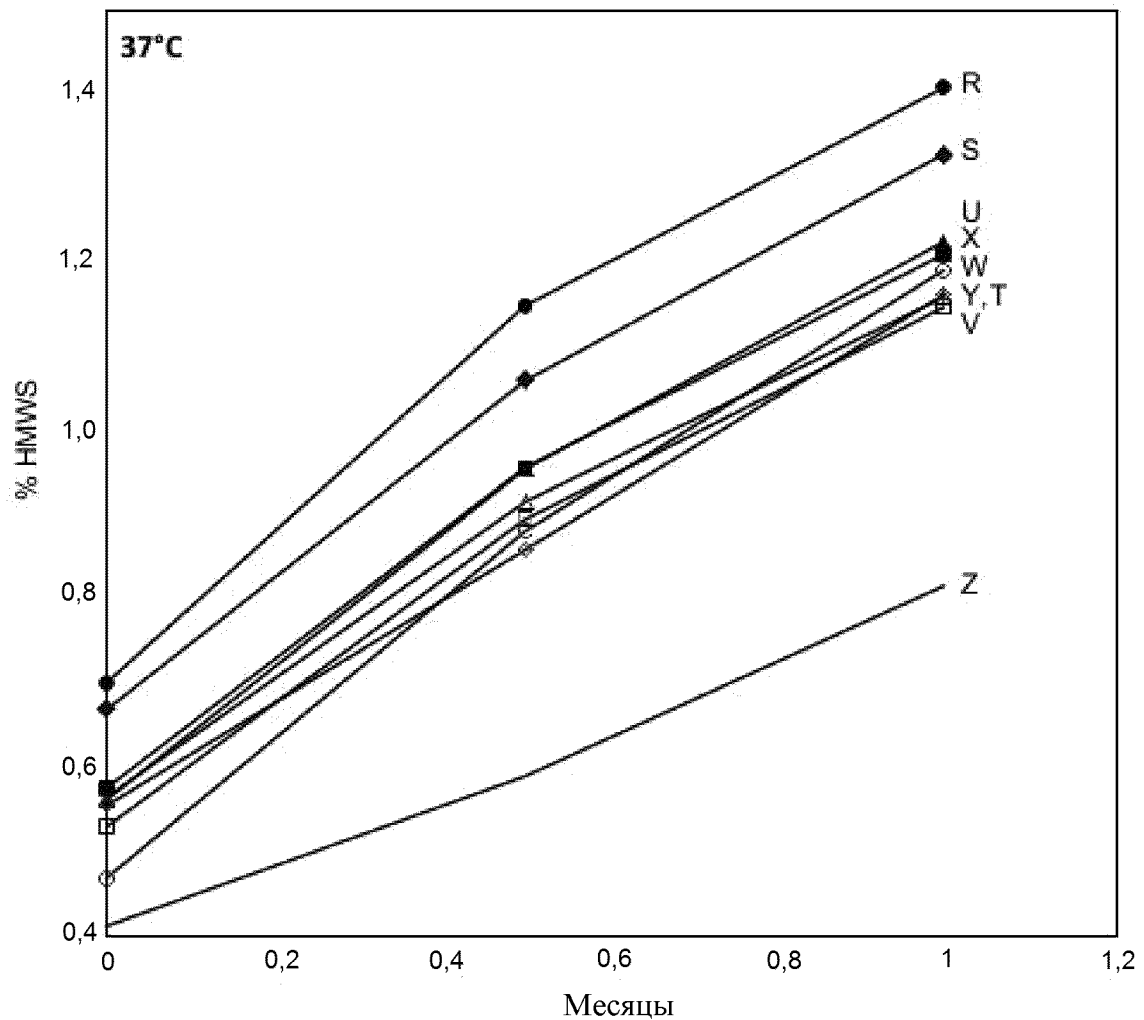


ФИГУРА 7



8/27

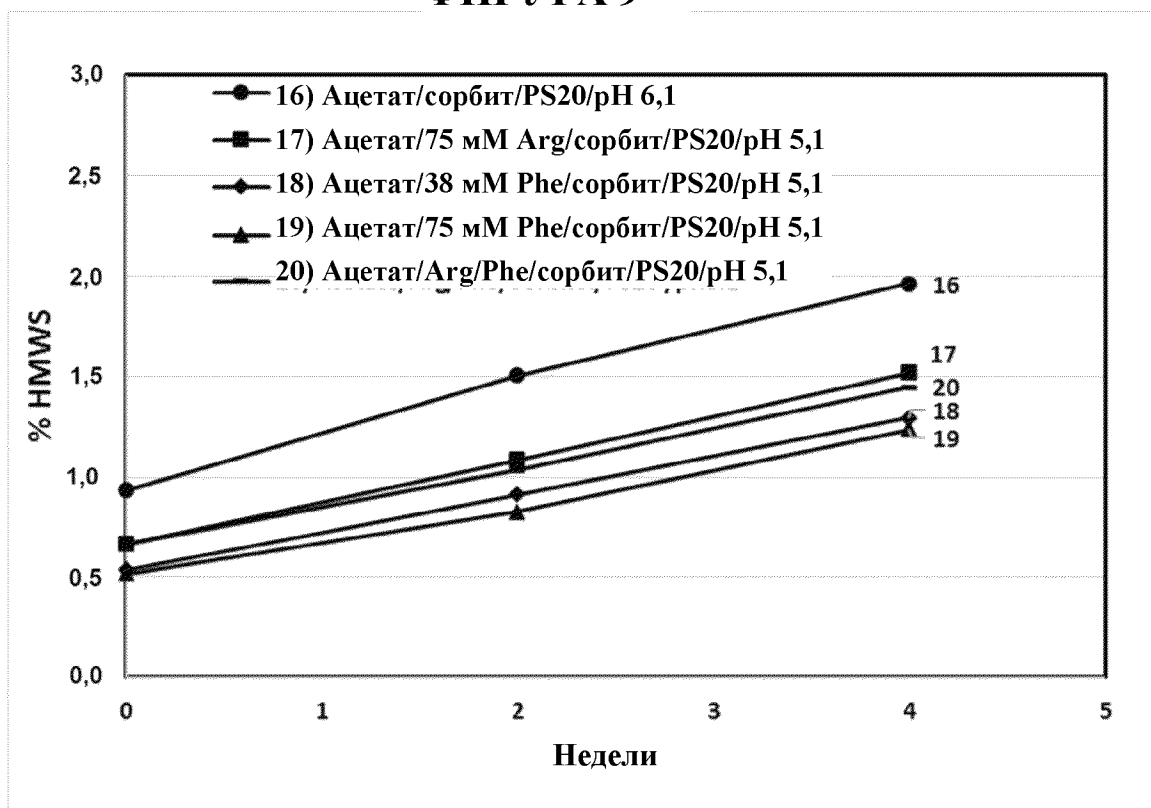
ФИГУРА 8



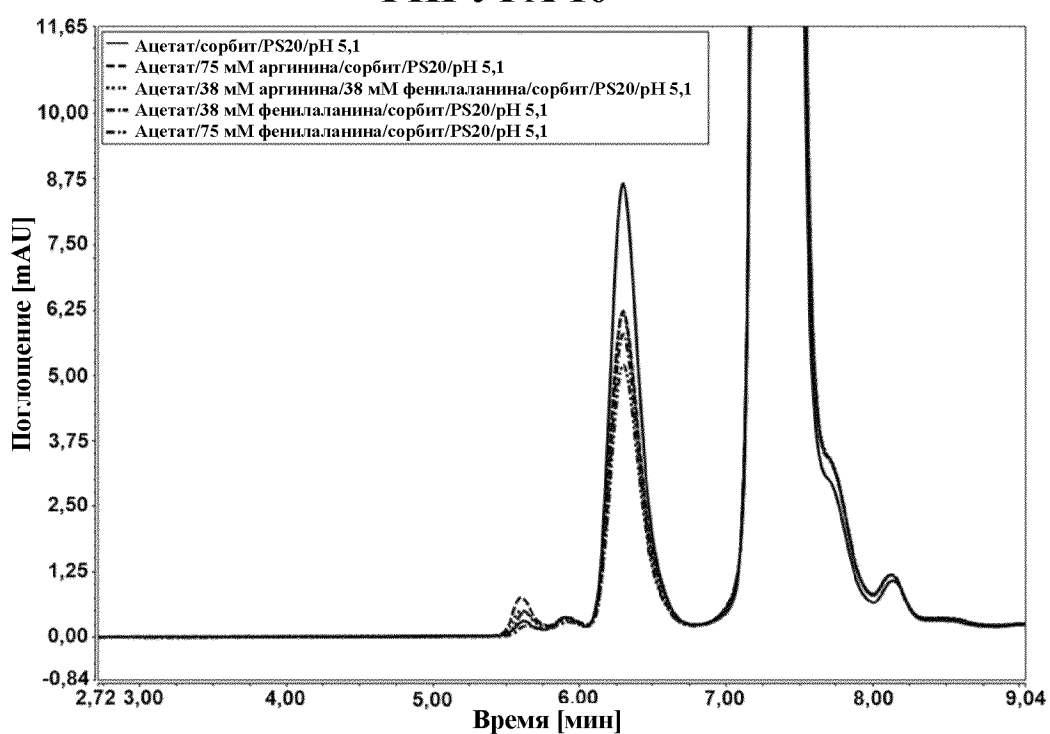
- R —●— Ацетат/5% сорбита/PS20/pH 5,1
- T —▲— Ацетат/2,4% сорбита/75 mM Arg-HCl/PS20/pH 5,2
- V —□— Ацетат/1,2% сорбита/113 mM Arg-HCl/PS20/pH 5,2
- X —■— Ацетат/150 mM NAR/75 mM Arg-HCl/PS20/pH 5,2
- Z ——— Ацетат/3,6% сорбита/38 mM Arg-Phe/PS20/pH 5,2
- S —◆— Ацетат/3,6% сорбита/38 mM Arg-HCl/PS20/pH 5,2
- U —▲— 18 mM ацетата/2,4% сорбита/75 mM Arg-HCl/PS20/pH 5,2
- W —○— Ацетат/0% сорбита/150 mM Arg-HCl/PS20/pH 5,1
- Y —●— Ацетат/3,6% сорбита/38 mM Arg-Arg/PS20/pH 5,1
- Z ——— Ацетат/3,6% сорбита/38 mM Arg-Phe/PS20/pH 5,2

9/27

ФИГУРА 9

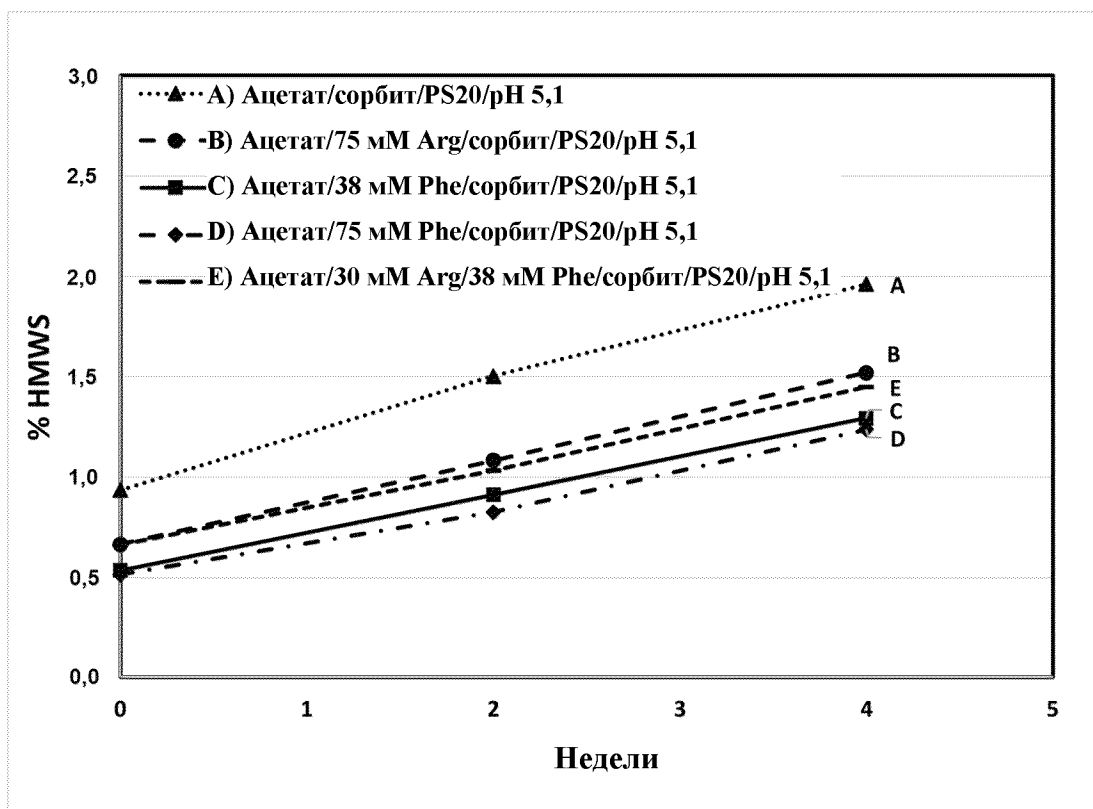


ФИГУРА 10

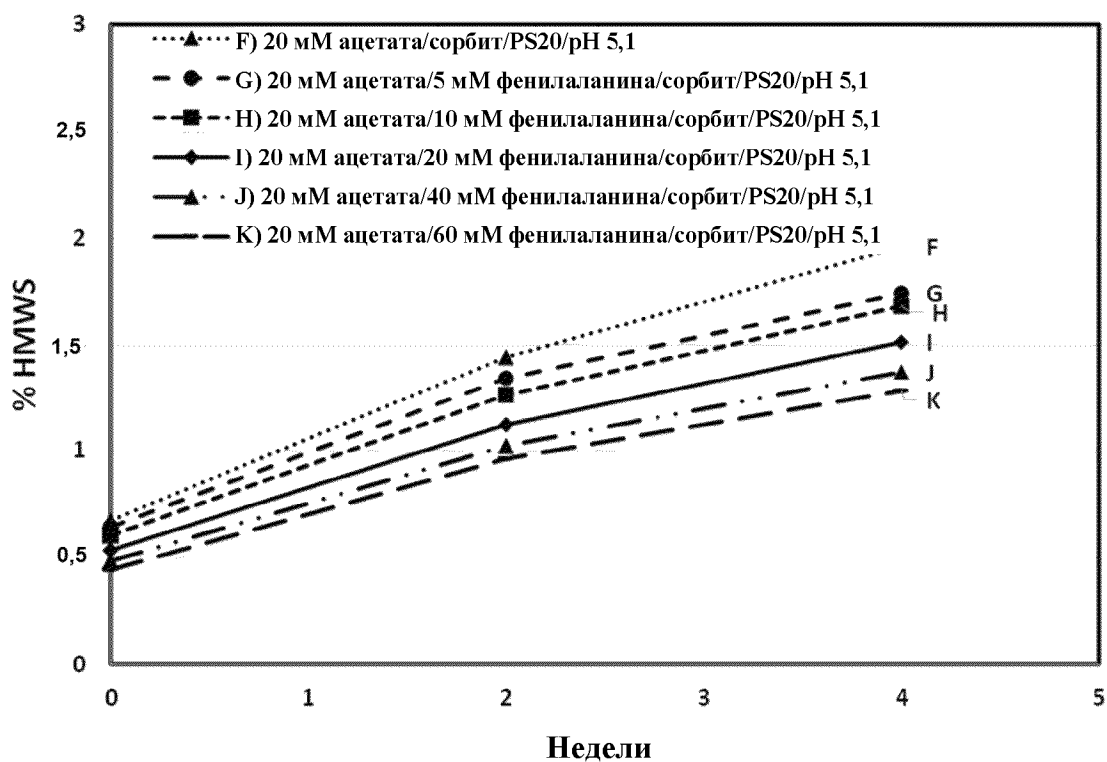


10/27

ФИГУРА 11А

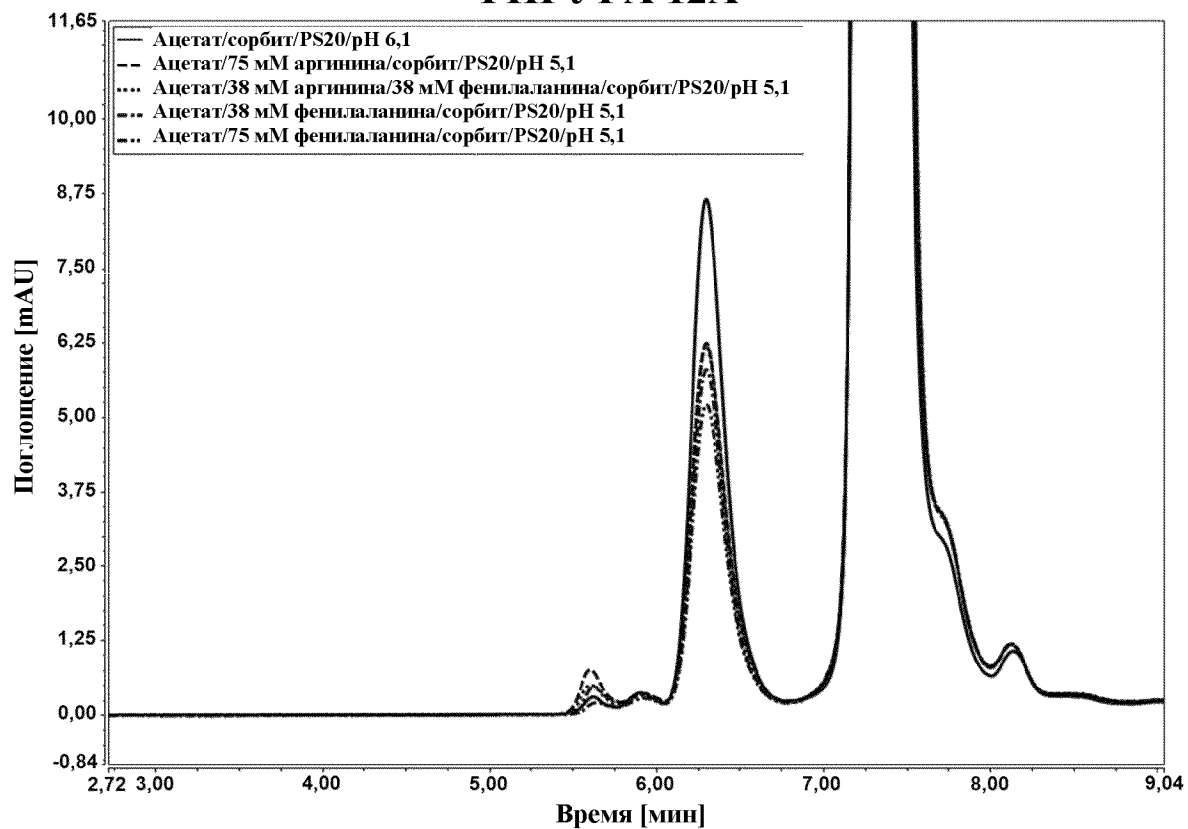


ФИГУРА 11В

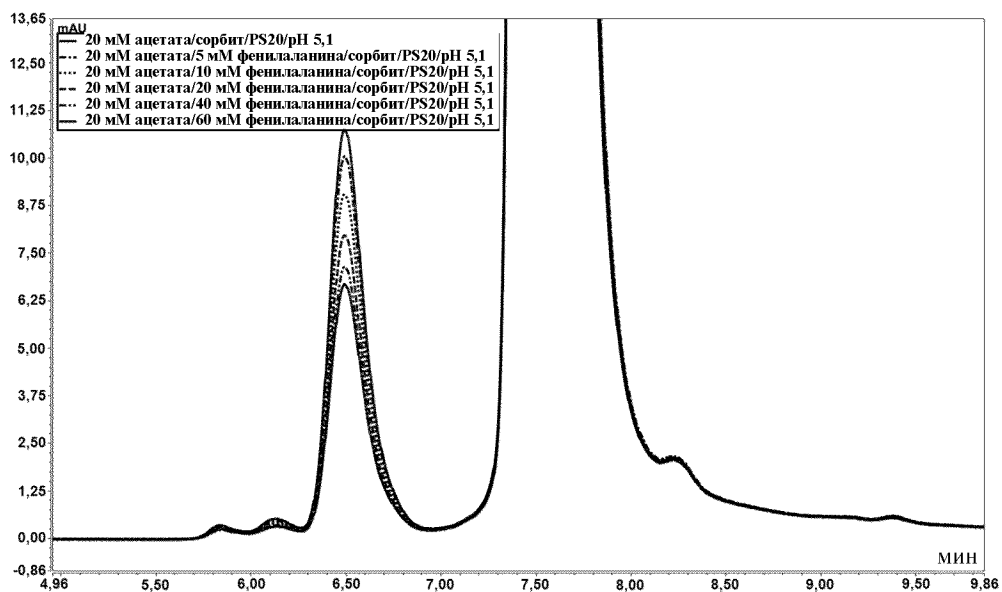


11/27

ФИГУРА 12А

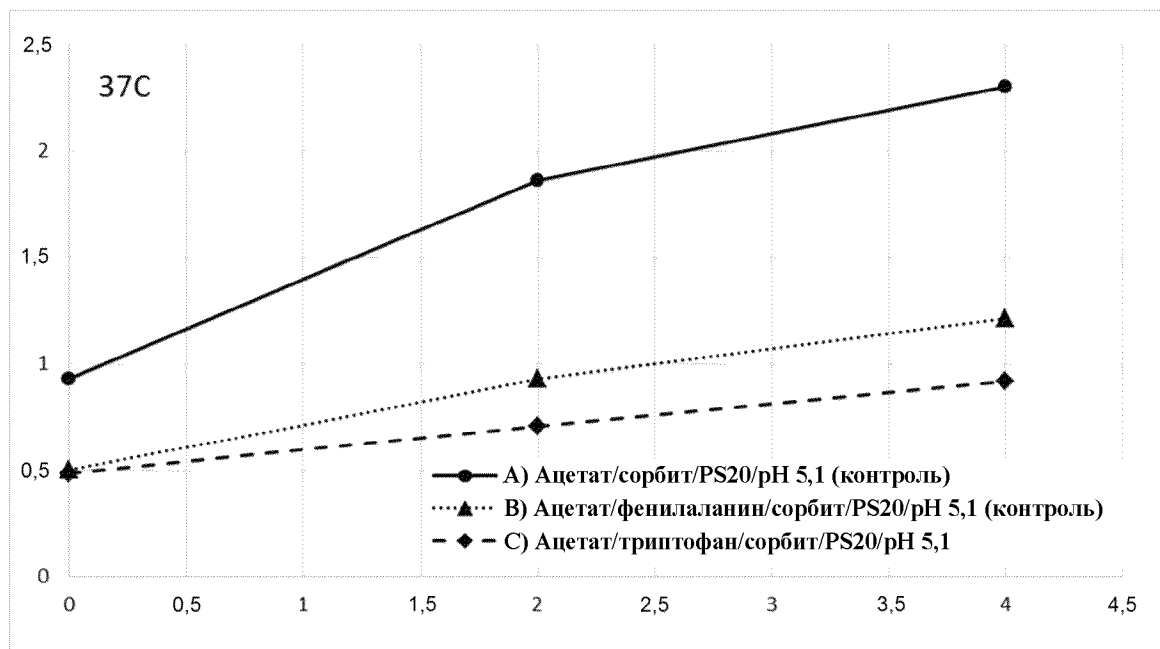


ФИГУРА 12В

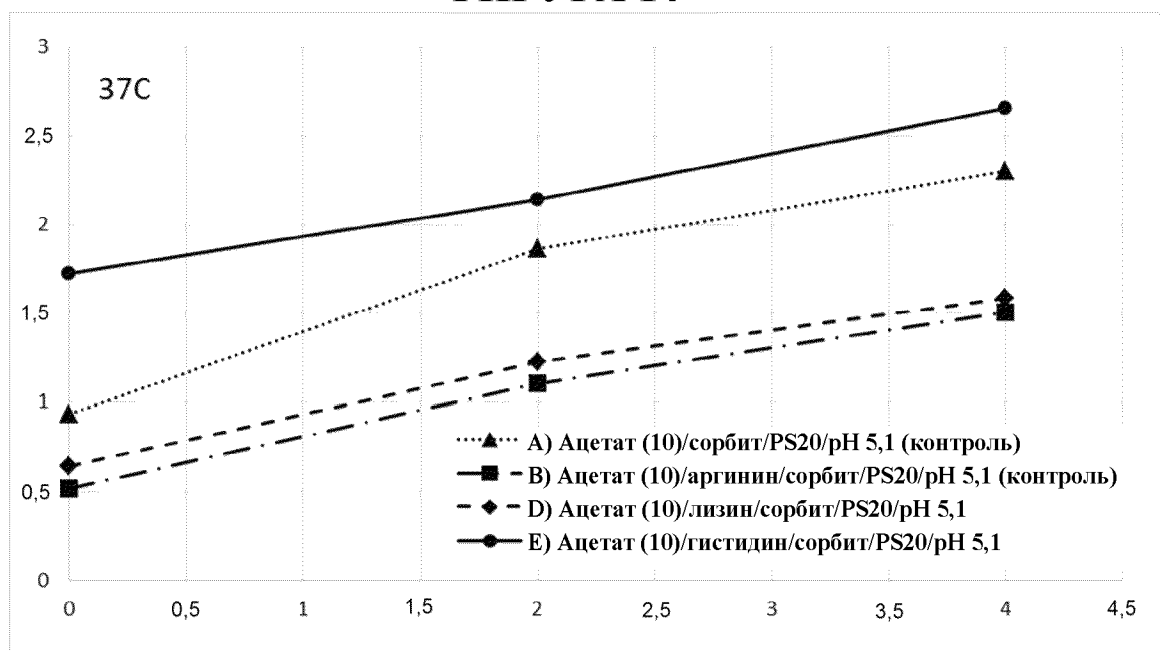


12/27

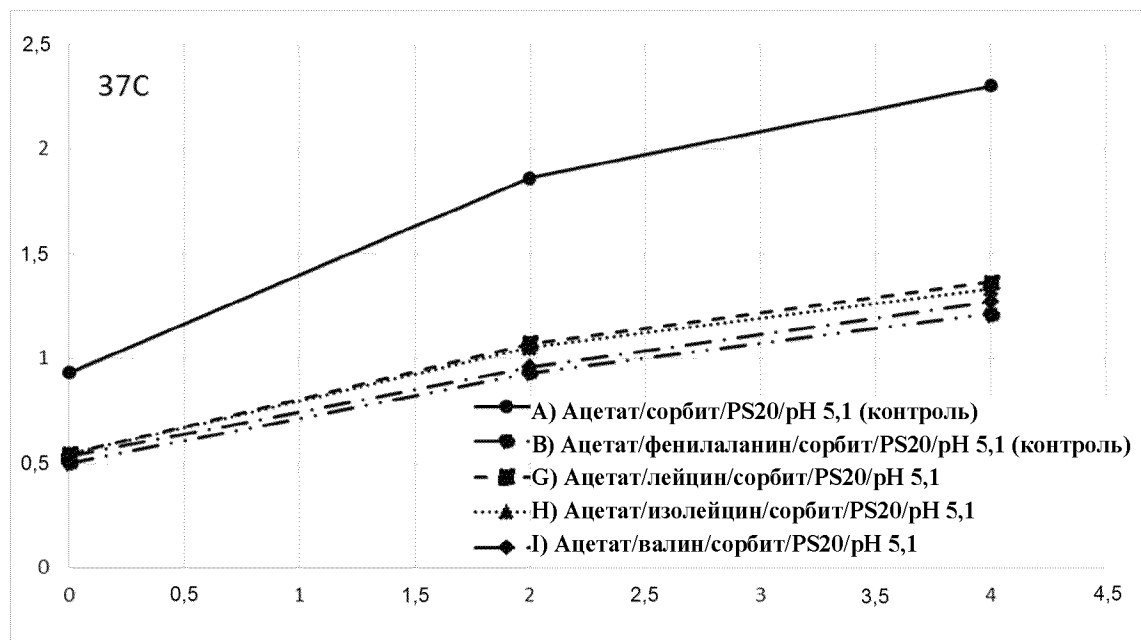
ФИГУРА 13



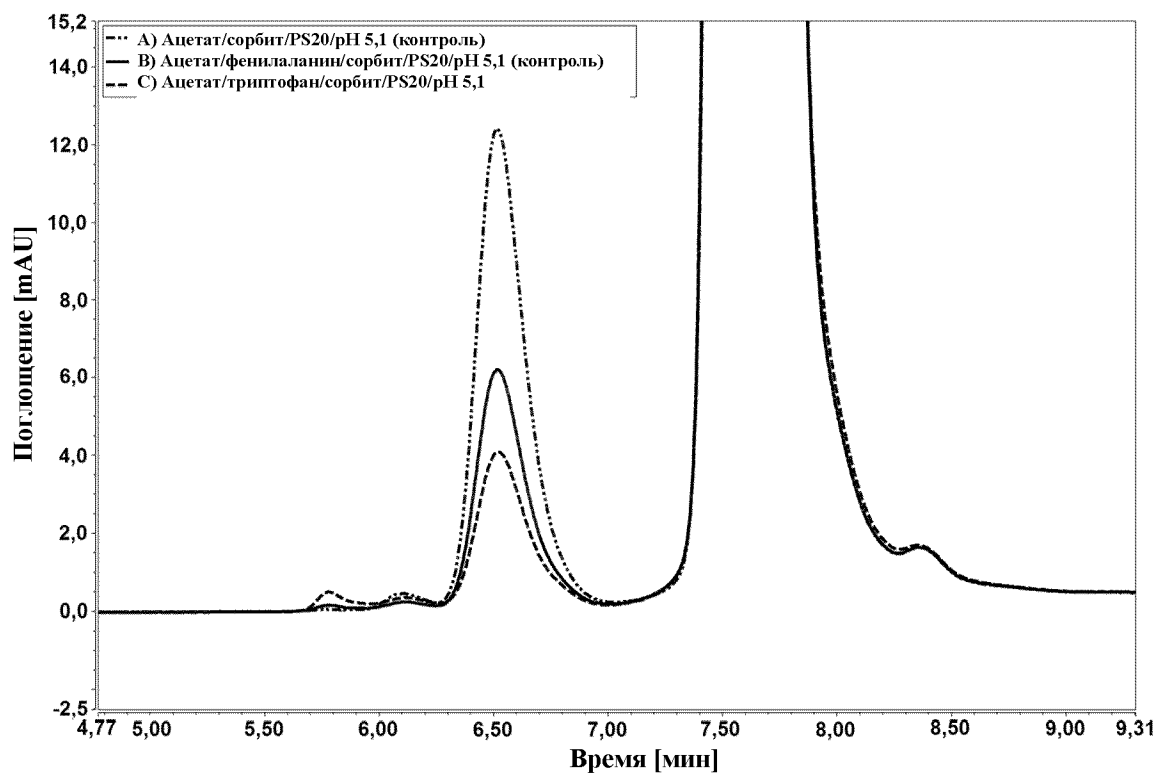
ФИГУРА 14



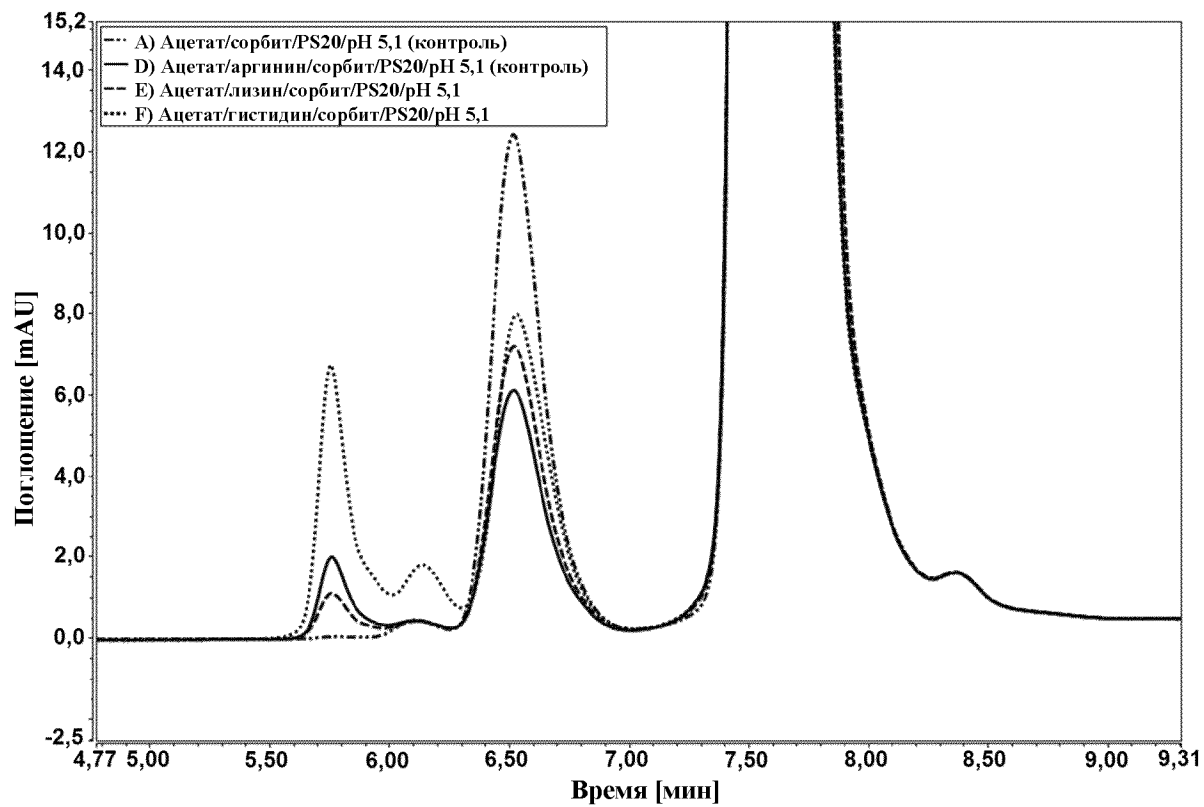
ФИГУРА 15



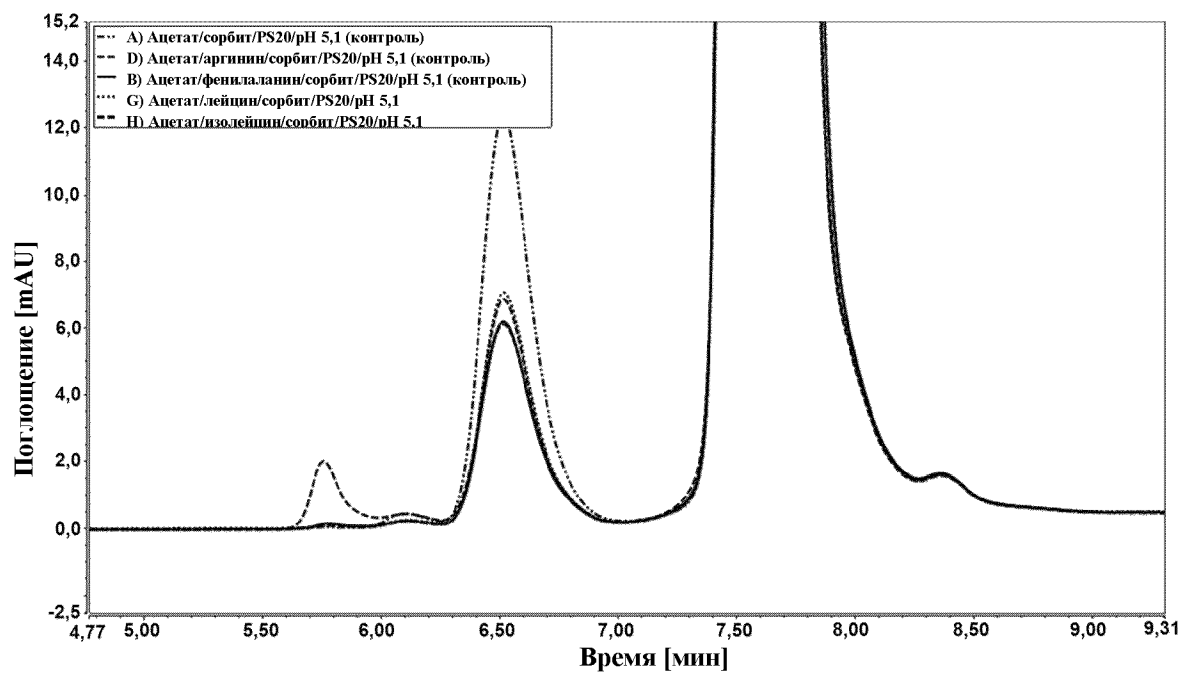
ФИГУРА 16



ФИГУРА 17



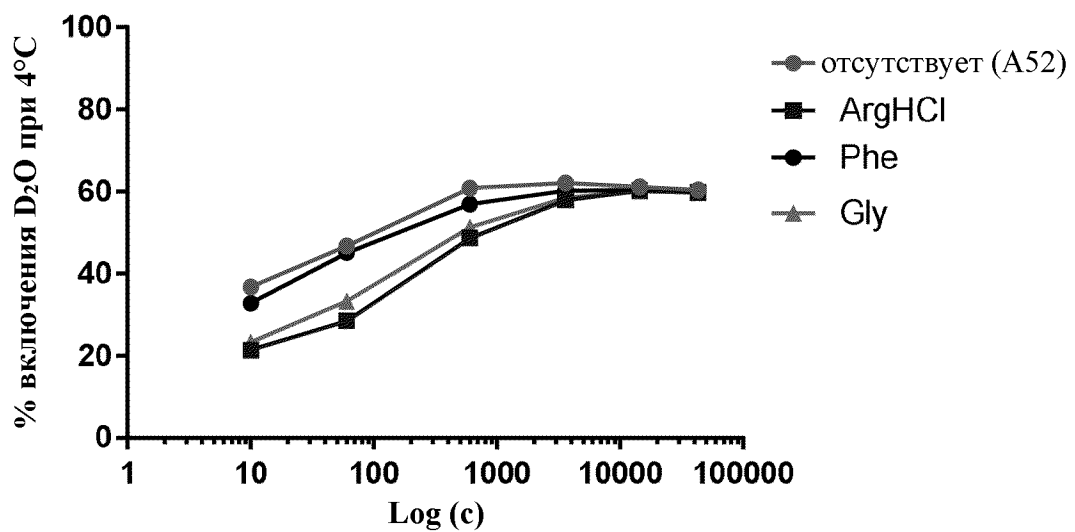
ФИГУРА 18



15/27

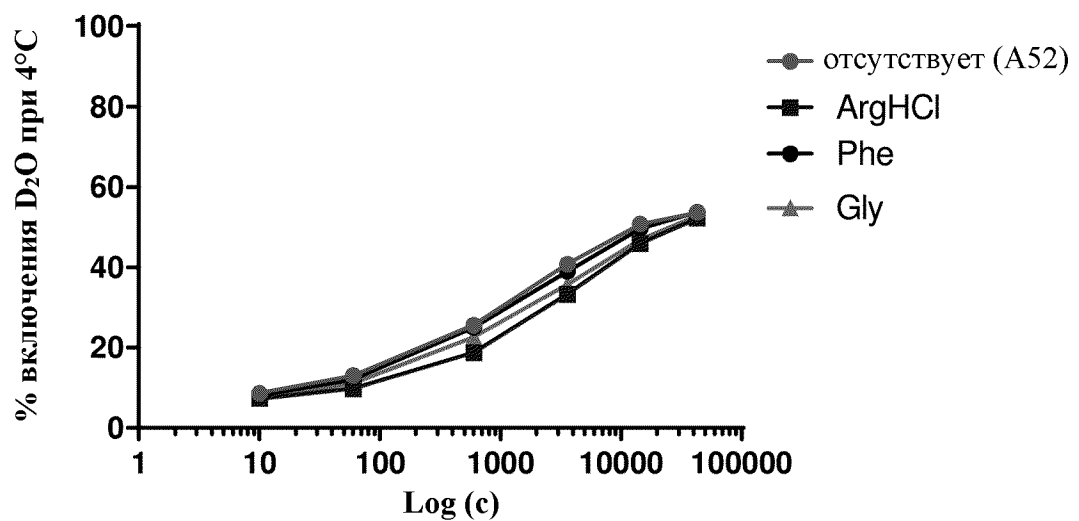
ФИГУРА 19

LC 28-33
QSVRGRY



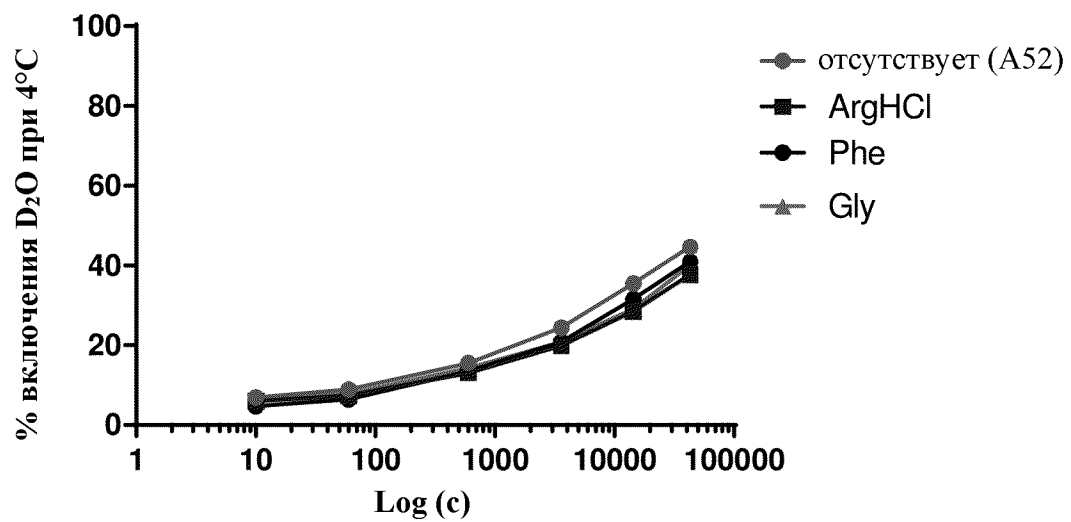
ФИГУРА 20

LC 108-116(+2)
KRTVAAPSV



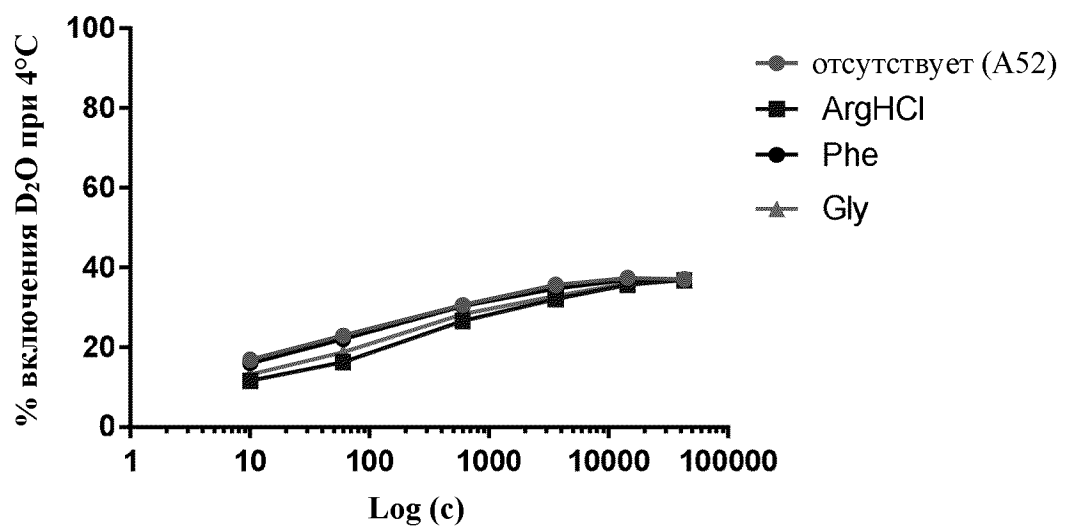
ФИГУРА 21

LC 125-132(+2)
QLKSGTAS



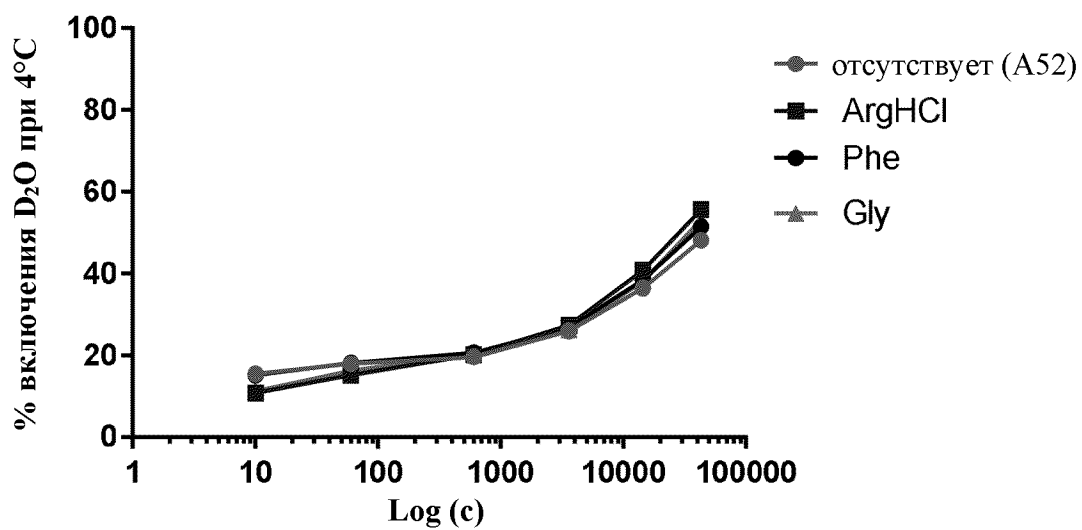
ФИГУРА 22

HC 47-59(+1)
WVSGITGSGGSTY



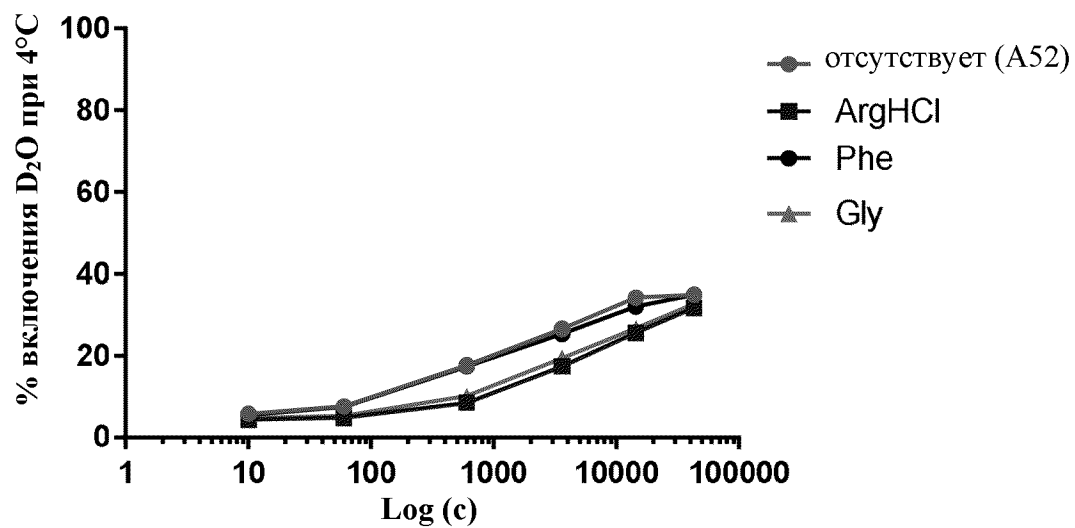
ФИГУРА 23

НС 243-253(+2)
LFPPKPKDTLM

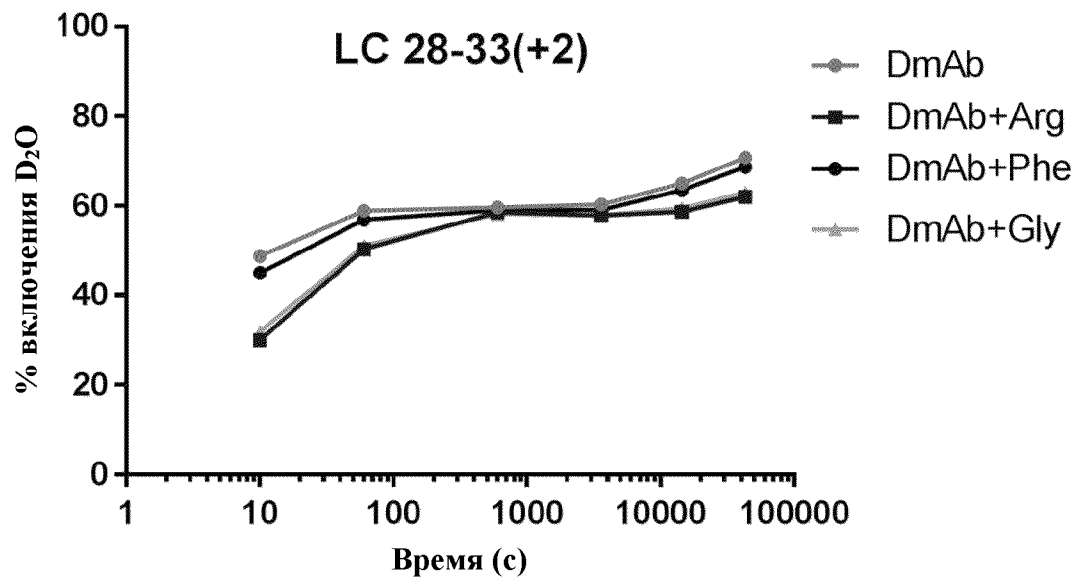


ФИГУРА 24

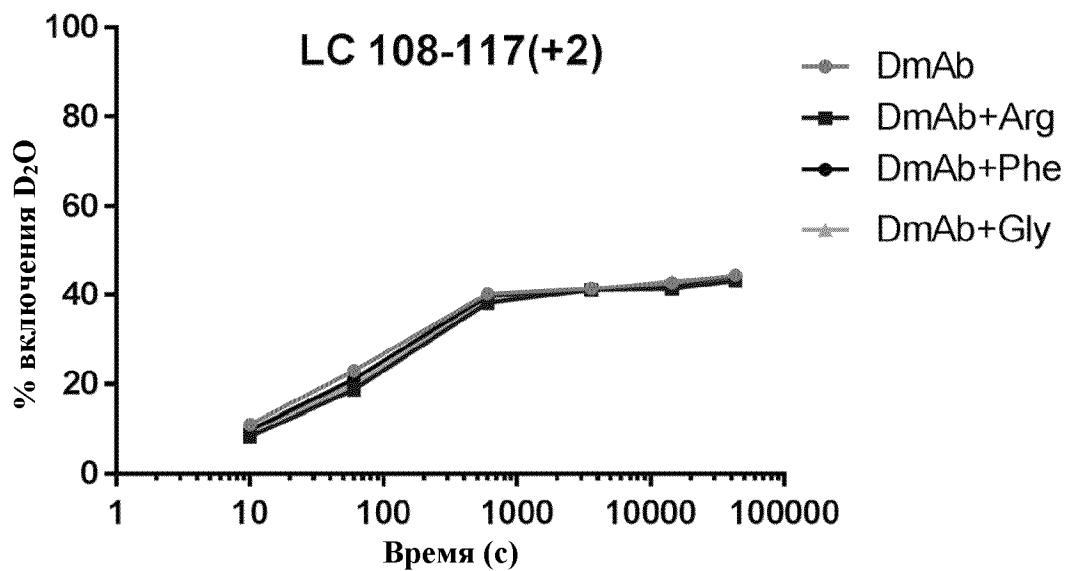
НС 392-399(+2)
YKTPRML



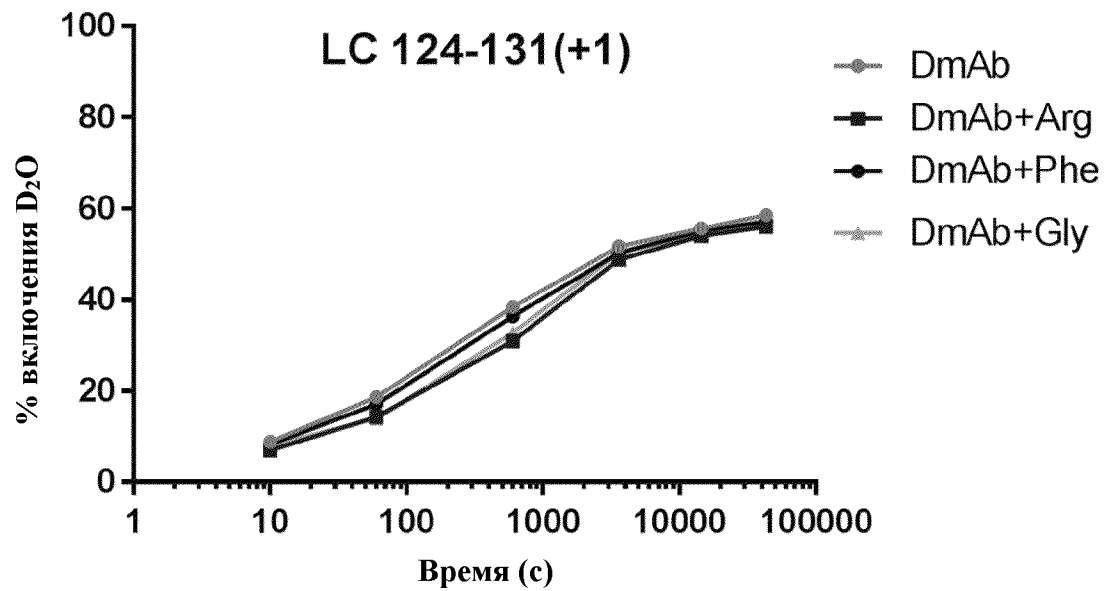
ФИГУРА 25



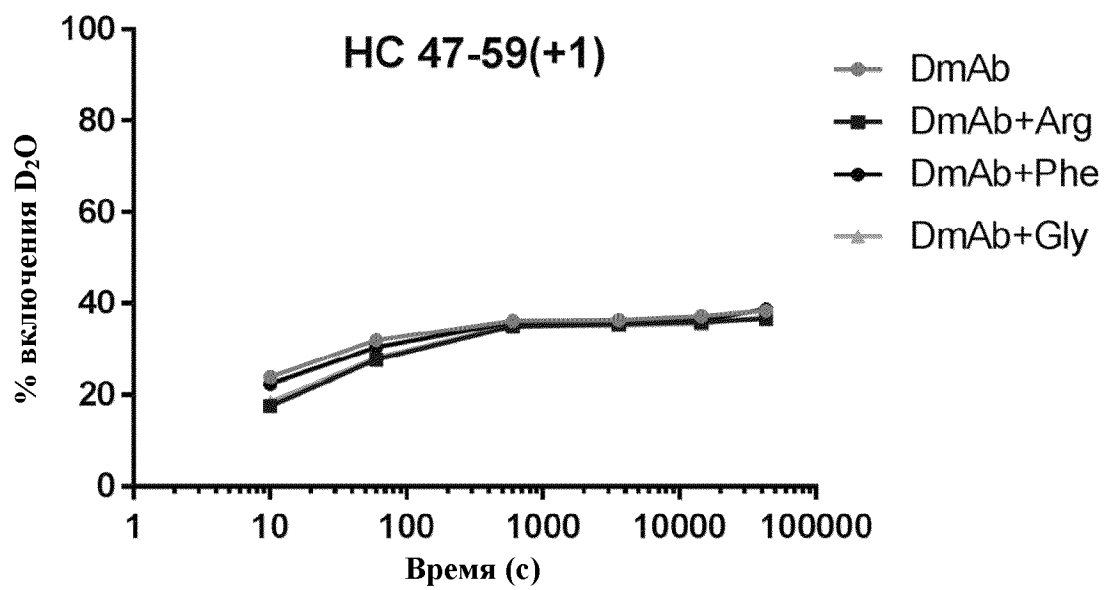
ФИГУРА 26



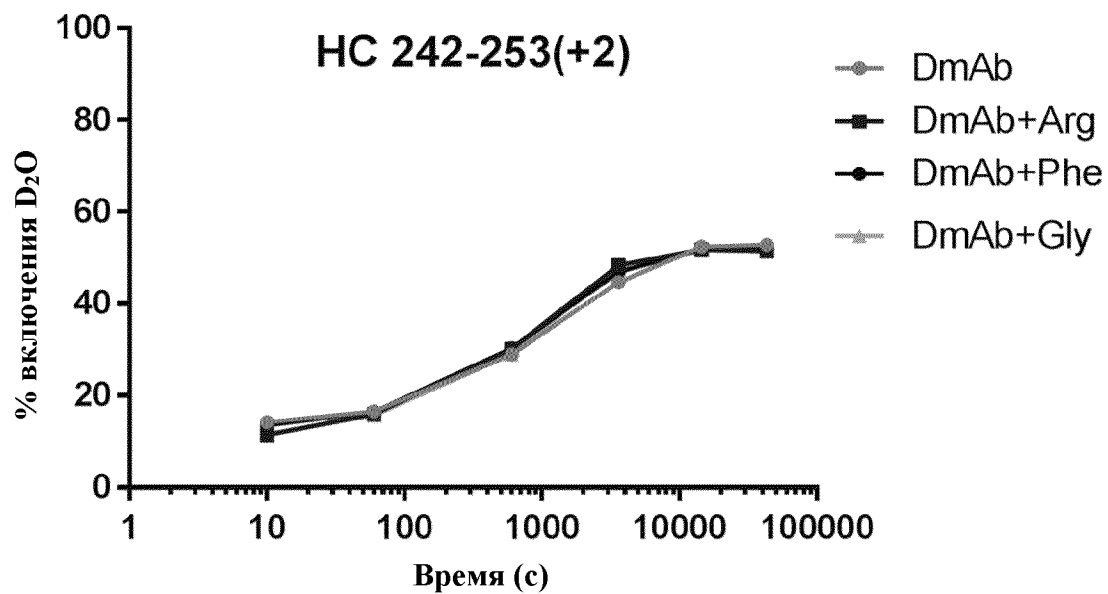
ФИГУРА 27



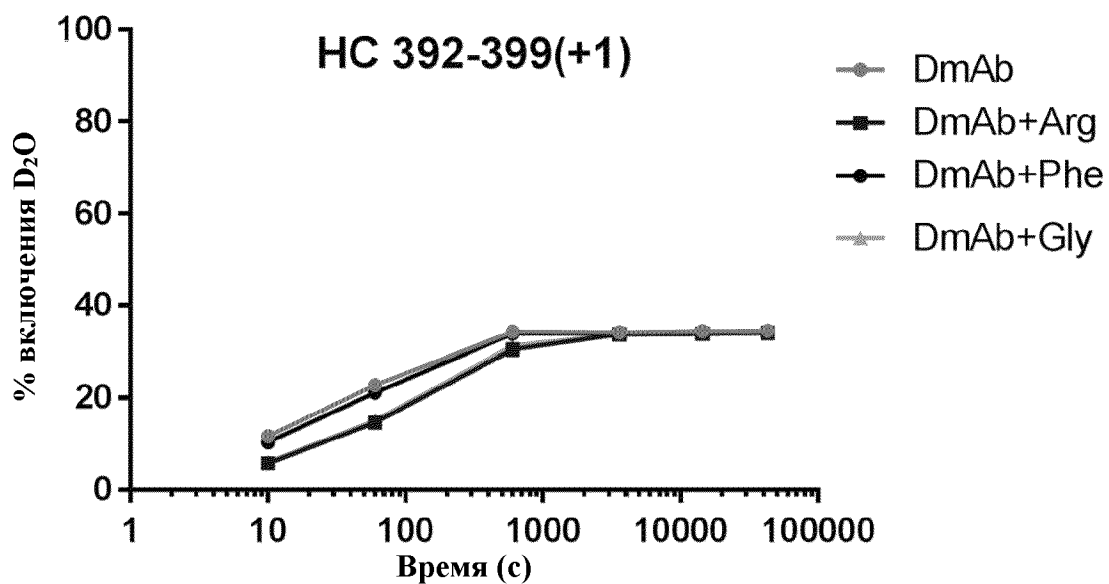
ФИГУРА 28



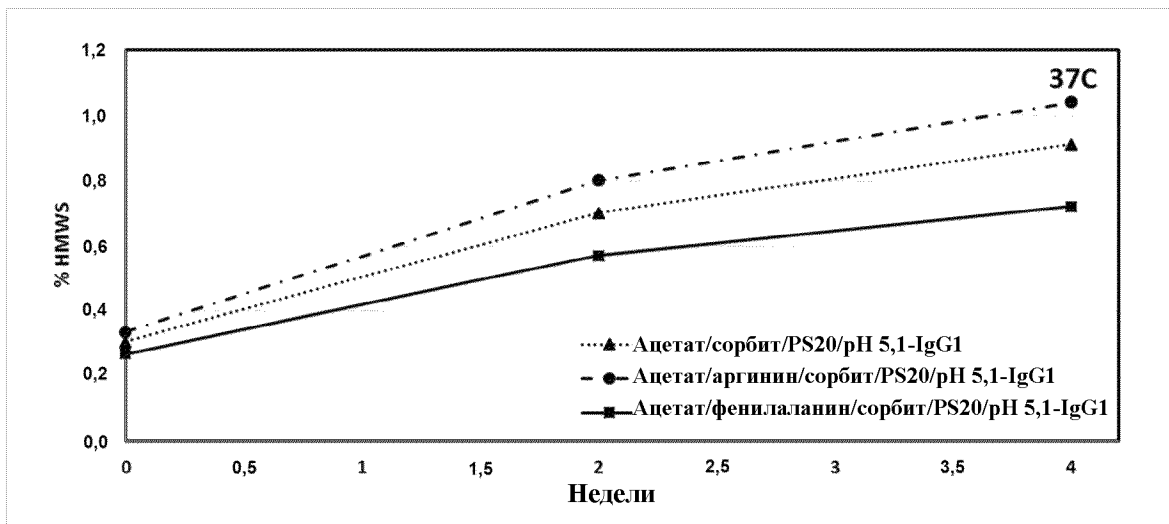
ФИГУРА 29



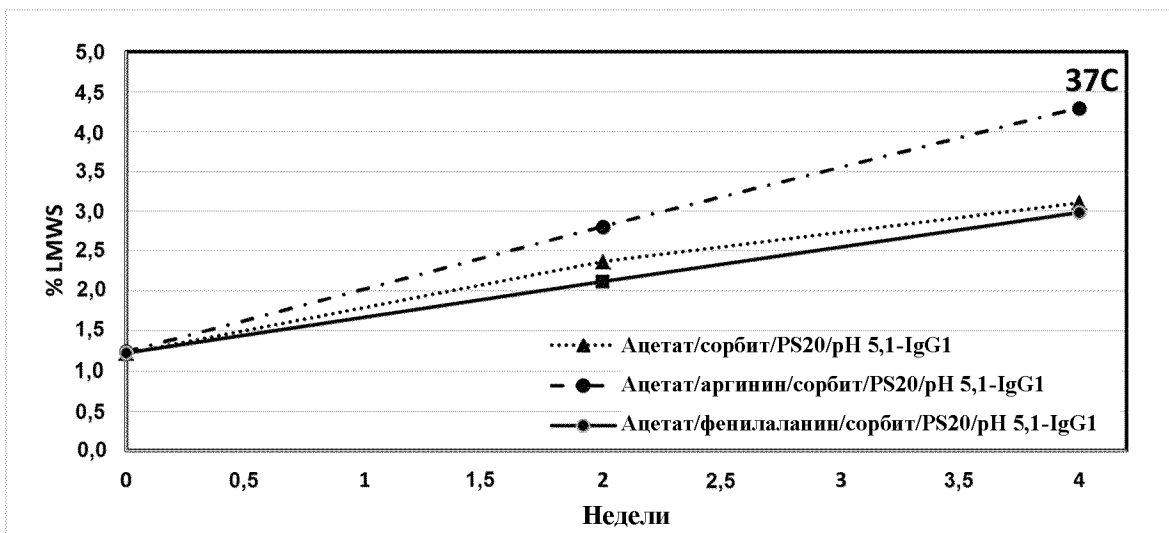
ФИГУРА 30



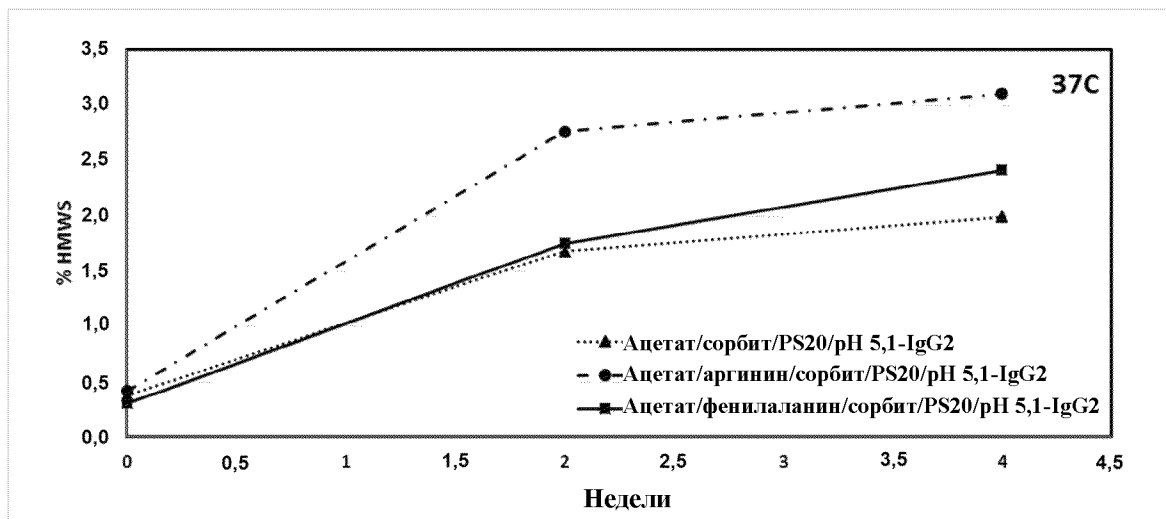
ФИГУРА 31



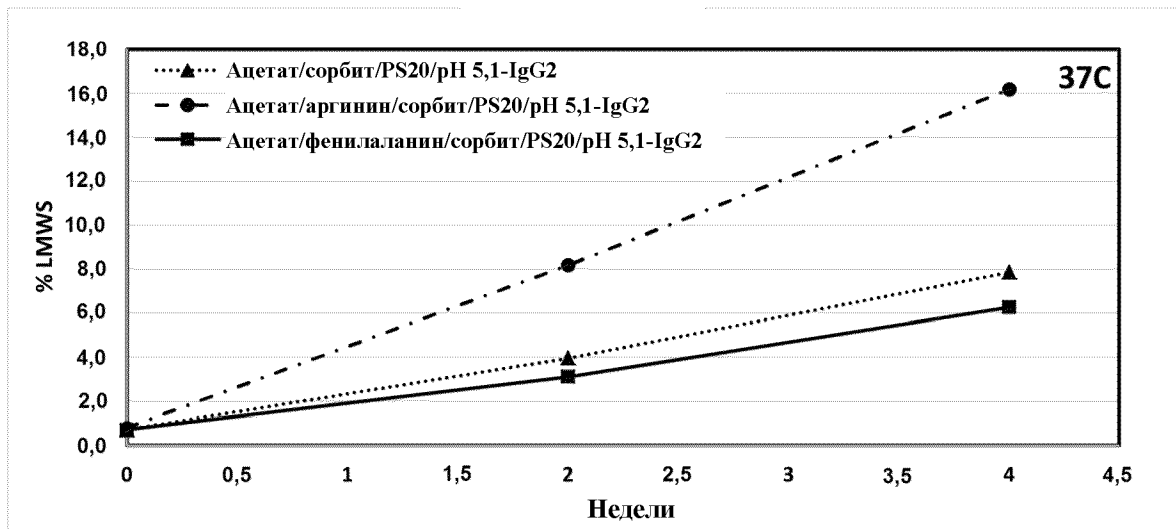
ФИГУРА 32



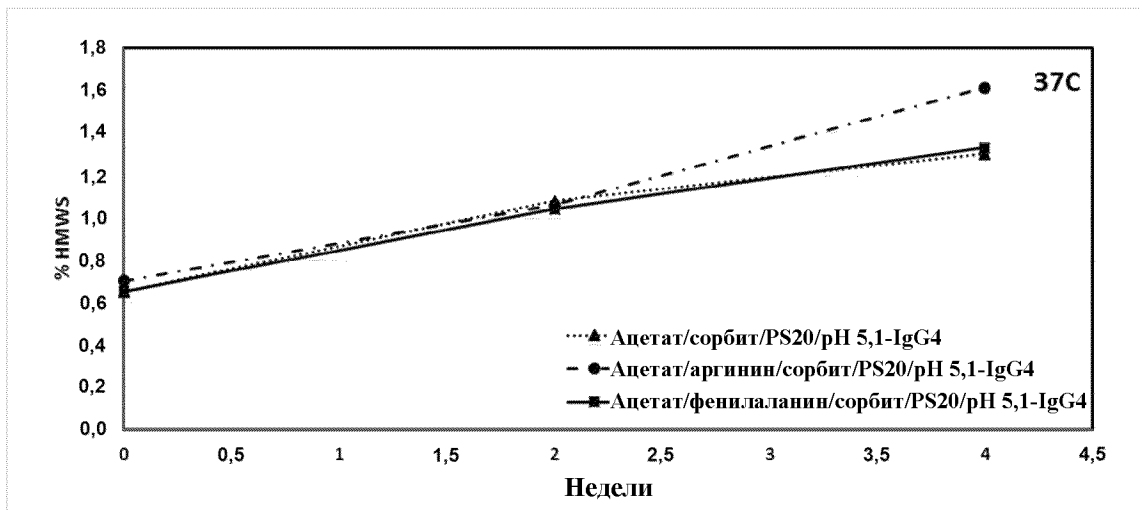
ФИГУРА 33



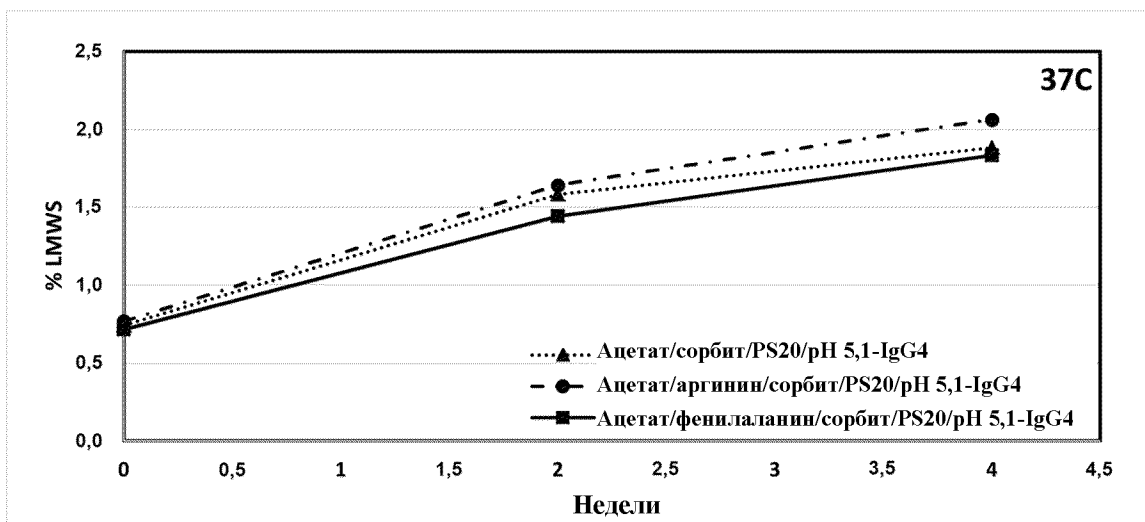
ФИГУРА 34



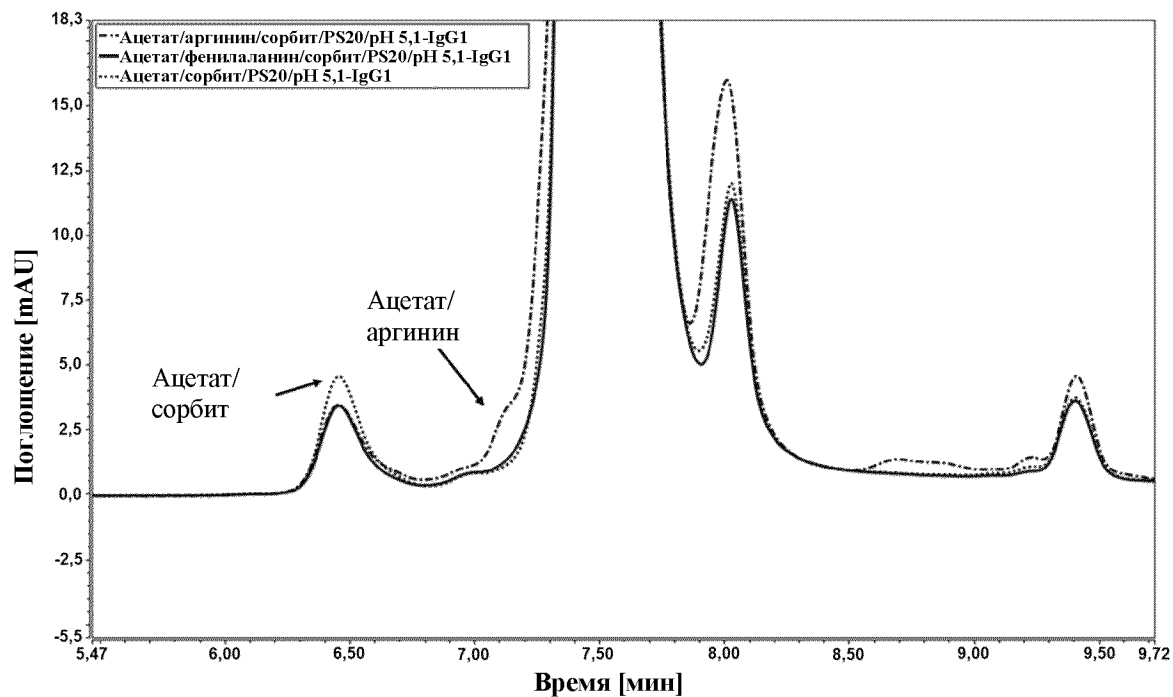
ФИГУРА 35



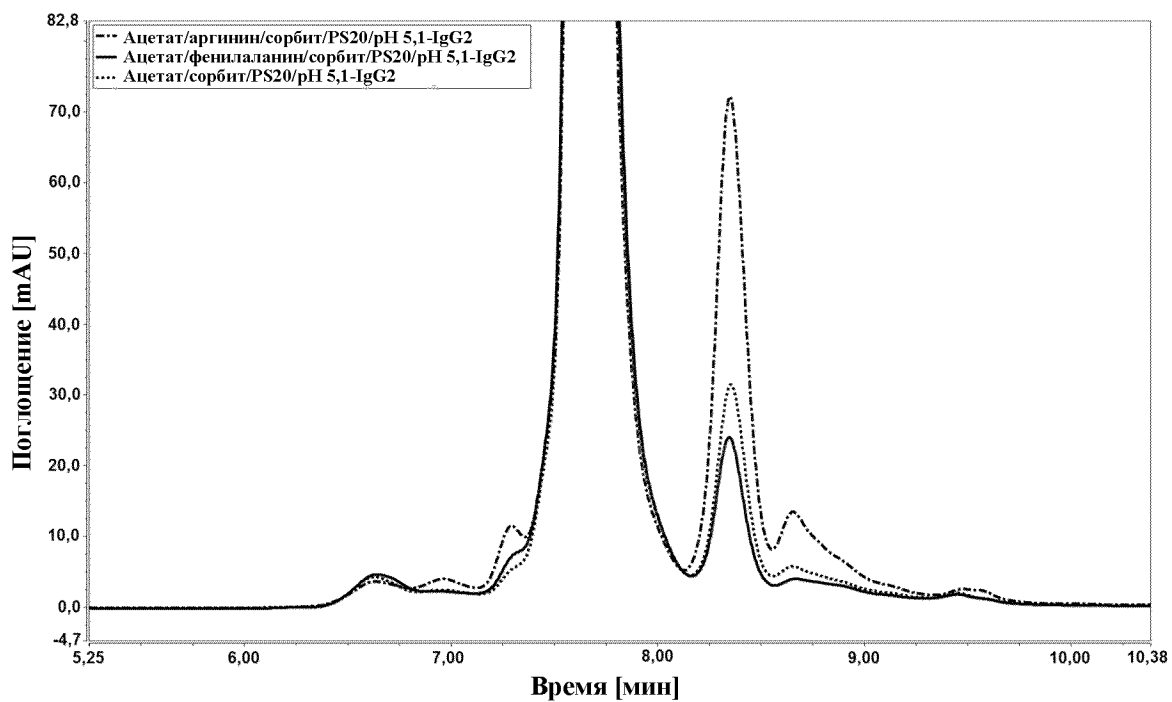
ФИГУРА 36



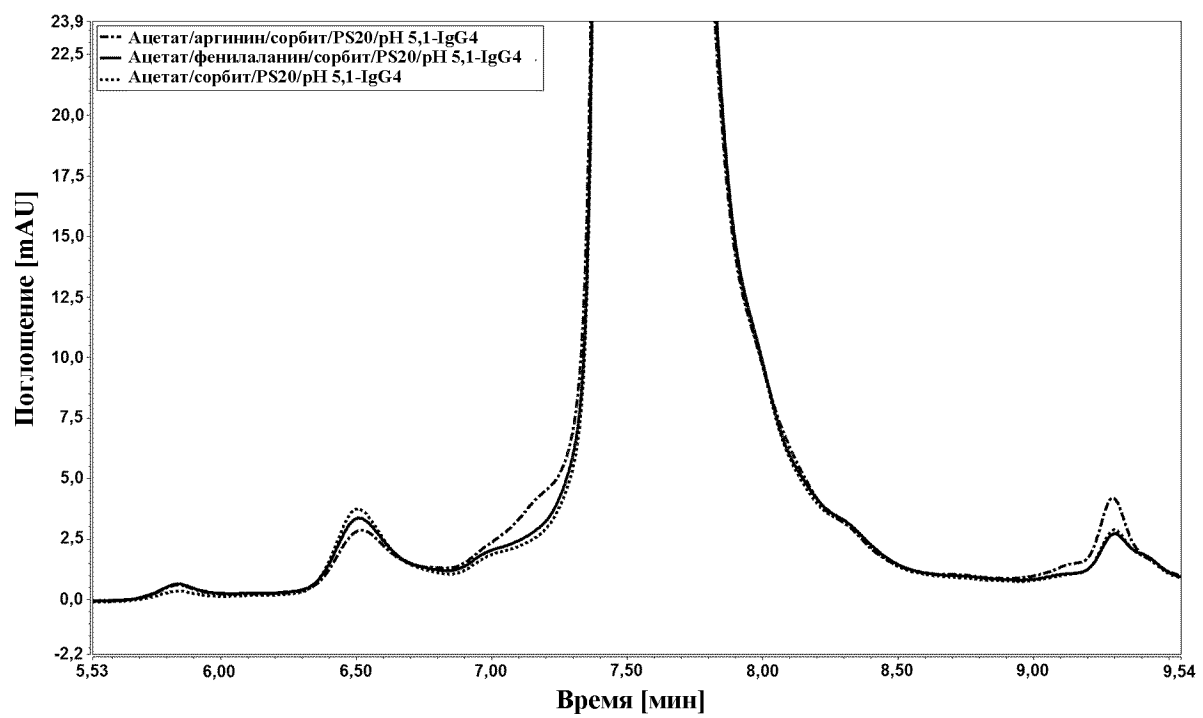
ФИГУРА 37



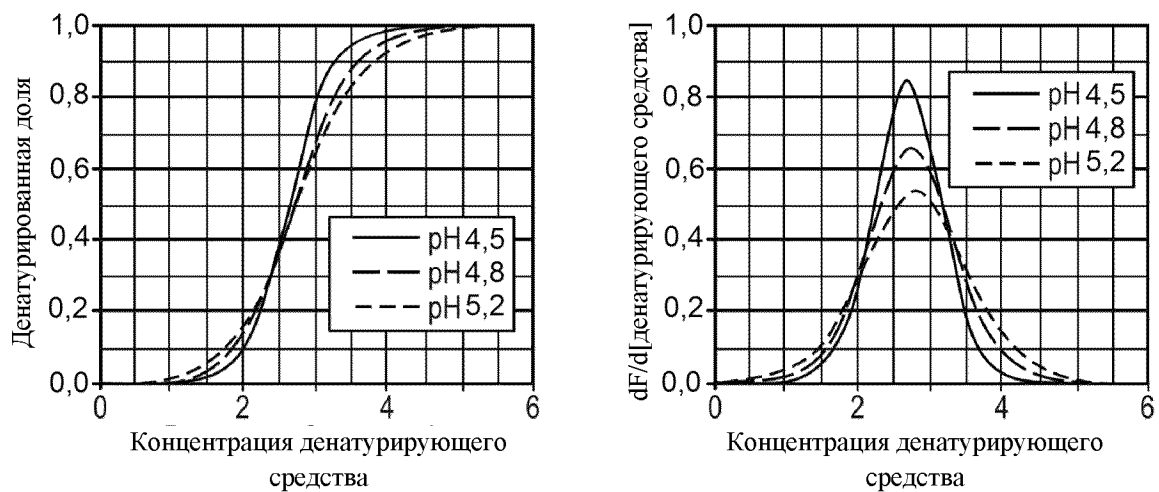
ФИГУРА 38



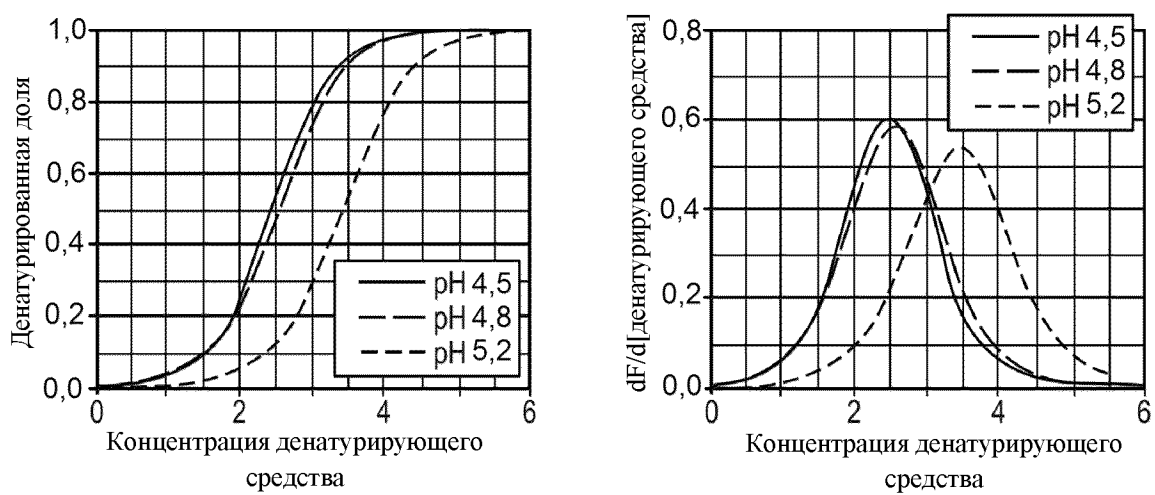
ФИГУРА 39



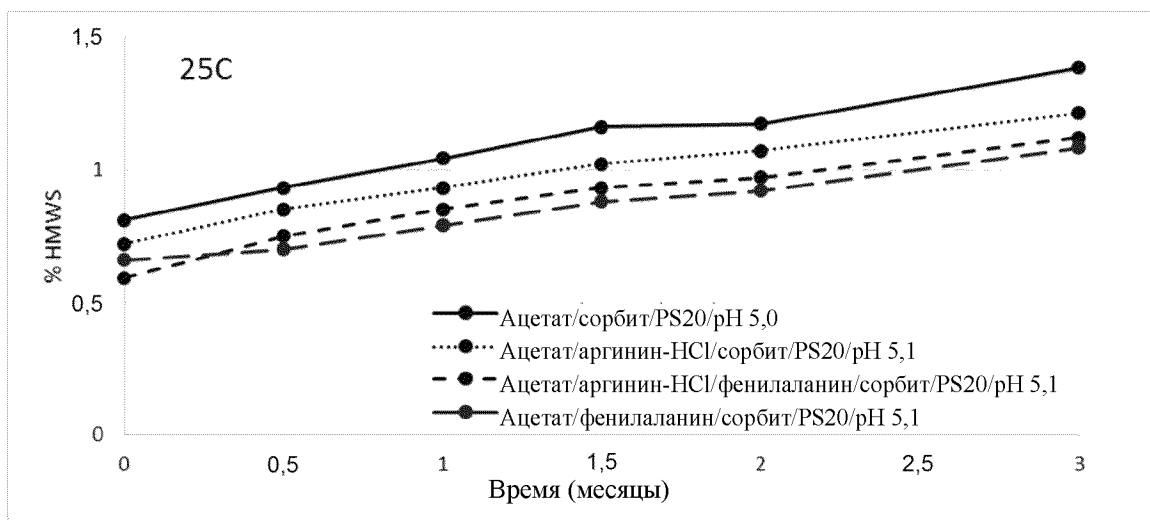
ФИГУРА 40



ФИГУРА 41



ФИГУРА 42



ФИГУРА 43

