

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037392**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |                                       |               |                              |
|---------------------------------------|---------------|------------------------------|
| (45) Дата публикации и выдачи патента | (51) Int. Cl. | <i>A61K 9/08</i> (2006.01)   |
| <b>2021.03.23</b>                     |               | <i>A61K 39/395</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки                     |               | <i>A61K 47/12</i> (2006.01)  |
| <b>201692242</b>                      |               | <i>A61K 47/26</i> (2006.01)  |
| (22) Дата подачи заявки               |               | <i>A61P 19/08</i> (2006.01)  |
| <b>2011.05.11</b>                     |               |                              |

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ С ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ АНТИТЕЛ**

---

- |                                       |                       |
|---------------------------------------|-----------------------|
| (31) <b>61/334,986</b>                | (56) WO-A2-2006119107 |
| (32) <b>2010.05.14</b>                | US-A1-20020045571     |
| (33) <b>US</b>                        |                       |
| (43) <b>2017.11.30</b>                |                       |
| (62) <b>201291226; 2011.05.11</b>     |                       |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец: |                       |
| <b>ЭМДЖЕН ИНК. (US)</b>               |                       |
| (72) Изобретатель:                    |                       |
| <b>Оссунд Тимоти Д. (US)</b>          |                       |
| (74) Представитель:                   |                       |
| <b>Медведев В.Н. (RU)</b>             |                       |

- 
- (57) Данное изобретение описывает композиции с высокой концентрацией антител, включающие иммуноглобулин к склеростину и ацетатную соль и/или ацетатный буфер, и способы их использования.

**B1**

**037392**

**037392**  
**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка претендует на приоритет предварительной заявки на патент США No. 61/334986, поданной 14 мая 2010 г. и включенной во всей своей полноте в данный документ посредством ссылки.

### Уровень техники

Жидкие композиции с высокой концентрацией антител используют для доставки доз в очень малом объеме. Однако, композиции с высокой концентрацией белка обуславливают определенные проблемы. Одна из проблем заключается в нестабильности по причине образования частиц. Другая проблема заключается в повышенной вязкости как результат многочисленных межмолекулярных взаимодействий, вызванных макромолекулярной природой антител. Композиции с высокой вязкостью трудно производить, забирать в шприцы и вводить. Применение силы в производстве вязких композиций приводит к избыточному образованию пены, что, в свою очередь, ведет к денатурации и инактивации активных био-препаратов.

Патент США No. 6875432 и публикации заявок на патенты США No. 2006/0182740, 2007/0172479 и 2008/0160014 описывают композиции антител и способы их получения. Ни одна из этих публикаций не описывает представленные здесь антитела.

### Сущность изобретения

Данное изобретение основано на том открытии, что добавление кальция ацетата в небольших концентрациях, например, 5-10 мМ, снижает эффективную вязкость композиций, включающих высокую концентрацию выбранного антитела к склеростину. В отличие от этого, такая же концентрация кальция ацетата по существу не снижает вязкость композиций с другими антителами. В одном аспекте изобретения композиция является стерильной и в жидкой или восстановленной жидкой форме включает

(а) антитело к склеростину в концентрации по меньшей мере 70 мг/мл, при этом антитело включает набор из шести CDR, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO:

1-5 (AT-A и AT-1 CDR), 15-20 (AT-B CDR), 25-30 (AT-C CDR), 35-40 (AT-D CDR), 45-50 (AT-2 CDR), 55-60 (AT-3 и AT-15 CDR), 73-78 (AT-4 и AT-5 CDR), 91-96 (AT-6 CDR), 101-106 (AT-7 CDR), 111-116 (AT-8 CDR), 121-126 (AT-9 CDR), 131-136 (AT-10 CDR), 141-146 (AT-11 и AT-16 CDR), 159-164 (AT-12 CDR), 169-174 (AT-13 и AT-14 CDR), 187-192 (AT-17 и Ab-18 CDR), 201-206 (AT-19, AT-20 и Ab-23 CDR), 225-229 (AT-21 и AT-22 CDR) или 239-244 (AT-24 CDR);

и

(б) кальциевую соль в концентрации, варьирующей от примерно 1 мМ до примерно 20 мМ, или от примерно 5 мМ до примерно 10 мМ, при этом абсолютная вязкость композиции составляет примерно 10 сП или менее. В контексте данного изобретения абсолютная вязкость измеряется с использованием вискозиметра с конусом и плоскостью Brookfield LV-DVII со шпинделем CPE-40 с температурой соответствующей пробирки для образцов, которая регулируется циркулирующей водяной баней при постоянном значении 25°C.

В некоторых вариантах воплощения изобретения кальциевую соль выбирают из группы, состоящей из кальция ацетата, кальция карбоната и кальция хлорида. В одном варианте воплощения изобретения кальциевая соль представлена кальцием ацетатом. С другой стороны, в некоторых вариантах воплощения изобретения кальциевая соль присутствует в концентрации, которая снижает вязкость композиции с антителом, по меньшей мере, на 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60% или более в сравнении с такой же композицией антитела, не включающей кальциевую соль.

В родственном аспекте изобретения композиция является стерильной и в жидкой или восстановленной жидкой форме включает

(а) антитело к склеростину в концентрации от примерно 70 мг/мл до примерно 200 мг/мл, при этом антитело включает набор из шести CDR, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO:

1-5 (AT-A и AT-1 CDR), 15-20 (AT-B CDR), 25-30 (AT-C CDR), 35-40 (AT-D CDR), 45-50 (AT-2 CDR), 55-60 (AT-3 и AT-15 CDR), 73-78 (AT-4 и AT-5 CDR), 91-96 (AT-6 CDR), 101-106 (AT-7 CDR), 111-116 (AT-8 CDR), 121-126 (AT-9 CDR), 131-136 (AT-10 CDR), 141-146 (AT-11 и AT-16 CDR), 159-164 (AT-12 CDR), 169-174 (AT-13 и AT-14 CDR), 187-192 (AT-17 и Ab-18 CDR), 201-206 (AT-19, AT-20 и Ab-23 CDR), 225-229 (AT-21 и AT-22 CDR) или 239-244 (AT-24 CDR);

и

(б) кальциевую соль в концентрации, варьирующей от примерно 5 мМ до примерно 15 мМ, или от примерно 5 мМ до примерно 10 мМ, при этом абсолютная вязкость композиции составляет примерно 10 сП или менее. С другой стороны, в некоторых вариантах воплощения изобретения кальция ацетат присутствует в концентрации, которая снижает вязкость композиции с антителом, по меньшей мере, на 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60% или более в сравнении с такой же композицией антитела, не включающей кальция ацетат.

Кроме того, описан способ снижения вязкости белковой композиции, и такой способ включает добавление кальция ацетата в концентрации от примерно 1 мМ до примерно 20 мМ к композиции с иммуноглобулином к склеростину, при этом композиция включает иммуноглобулин в концентрации от примерно 70 мг/мл до примерно 200 мг/мл, и вязкость композиции с кальция ацетатом понижена в сравнении с вязкостью композиции антитела без кальция ацетата.

В другом аспекте изобретения композиция стерильна и имеет значение абсолютной вязкости примерно 10 сП или менее и включает:

- (а) АТ-5 в концентрации по меньшей мере 70 мг/мл до примерно 200 мг/мл;
- (б) кальция ацетат в концентрации, варьирующей от примерно 1 мМ до примерно 20 мМ; и
- (в) полиол, такой как сахароза, например, в количестве, варьирующем от примерно 1% в/о до примерно 12% в/о.

В определенных вариантах воплощения изобретения полиол присутствует в количестве, варьирующем от примерно 4 до 10%. В некоторых вариантах воплощения изобретения иммуноглобулин включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 86 (вариабельный участок тяжелой цепи АТ-5) и/или SEQ ID NO: 84 (вариабельный участок легкой цепи АТ-5).

В другом аспекте изобретения композиция стерильна и имеет значение абсолютной вязкости примерно 10 сП или менее и включает:

- (а) АТ-5 в концентрации по меньшей мере 70 мг/мл до примерно 200 мг/мл;
- (б) кальция ацетат в концентрации, варьирующей от примерно 1 мМ до примерно 20 мМ; и
- (в) полиол, такой как сахароза, например, в количестве, варьирующем от примерно 4% в/о до примерно 6% в/о.

В любом из предшествующих аспектов в некоторых вариантах воплощения изобретения композиция дополнительно включает (в) ацетатный буфер, например, натрия ацетат, в концентрации от примерно 5 мМ до примерно 15 мМ, или от примерно 5 мМ до примерно 10 мМ. В некоторых вариантах воплощения изобретения общая концентрация ацетата составляет от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ, или от примерно 20 мМ до примерно 40 мМ.

В другом аспекте изобретения композиция является стерильной и в жидкой или восстановленной жидкой форме включает:

- (а) антитело к склеростину в концентрации от примерно 70 мг/мл до примерно 200 мг/мл, при этом антитело включает набор из шести CDR, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO:

1-5

(АТ-А и АТ-1 CDR), 15-20 (АТ-В CDR), 25-30 (АТ-С CDR), 35-40 (АТ-Д CDR), 45-50 (АТ-2 CDR), 55-60 (АТ-3 и АТ-15 CDR), 73-78 (АТ-4 и АТ-5 CDR), 91-96 (АТ-6 CDR), 101-106 (АТ-7 CDR), 111-116 (АТ-8 CDR), 121-126 (АТ-9 CDR), 131-136 (АТ-10 CDR), 141-146 (АТ-11 и АТ-16 CDR), 159-164 (АТ-12 CDR), 169-174 (АТ-13 и АТ-14 CDR), 187-192 (АТ-17 и Ab-18 CDR), 201-206 (АТ-19, АТ-20 и Ab-23 CDR), 225-229 (АТ-21 и АТ-22 CDR) или 239-244 (АТ-24 CDR);

и

(б) ацетатную соль и/или ацетатный буфер в концентрации, варьирующей от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ ацетата, или от примерно 20 мМ до примерно 40 мМ ацетата, при этом абсолютная вязкость композиции составляет примерно 10 сП или менее. В некоторых вариантах воплощения изобретения ацетатная соль и/или буфер включает кальция ацетат и/или натрия ацетат. С другой стороны, в некоторых вариантах воплощения изобретения ацетатная соль и/или буфер присутствует в концентрации, которая снижает вязкость композиции с антителом, по меньшей мере, на 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60% или более в сравнении с такой же композицией антитела, не включающей ацетатную соль и/или буфер.

В любом из предшествующих аспектов в некоторых вариантах воплощения изобретения общая концентрация ионов (катионов и анионов) в растворе составляет от примерно 20 мМ до примерно 70 мМ,

или от примерно 30 мМ до примерно 60 мМ. В любом из таких вариантов воплощения изобретения общее значение осмоляльности составляет менее чем примерно 400 мОсм/л или 350 мОсм/л, и преимущественно близко к значению изотоничности, например, 250-350 мОсм/л. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция гипотонична. Например, в таких вариантах воплощения изобретения осмоляльность композиции менее чем примерно 250 мОсм/л. В других вариантах воплощения изобретения композиция гипертонична. Таким образом, в таких вариантах воплощения изобретения осмоляльность композиции более чем примерно 350 мОсм/л.

В любой описанной здесь композиции в некоторых вариантах воплощения изобретения антитело к склеростину в композиции может включать переменные участки тяжелой и/или легкой цепи любого антитела АТ-А, АТ-В, АТ-С, АТ-Д, АТ-2, АТ-3, АТ-4, АТ-5, АТ-6, АТ-7, АТ-8, АТ-9, АТ-10, АТ-11, АТ-12, АТ-15, АТ-16, АТ-17, АТ-19, АТ-21, АТ-23 или АТ-24. Таким образом, в специфических вариантах воплощения изобретения антитело включает аминокислотные последовательности:

SEQ ID NO: 14 (АТ-1 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 12 (АТ-1 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 68 (АТ-15 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 66 (АТ-15 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 86 (АТ-5 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 84 (АТ-5 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 154 (АТ-16 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 152 (АТ-16 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 182 (АТ-14 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 180 (АТ-14 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 208 (АТ-19 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 207 (АТ-19 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 216 (АТ-20 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 214 (АТ-20 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 220 (АТ-23 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 218 (АТ-23 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 238 (АТ-22 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 236 (АТ-22 переменный участок легкой цепи).

В некоторых вариантах воплощения изобретения антитело включает зрелые тяжелые и/или легкие цепи любого антитела АТ-А, АТ-В, АТ-С, АТ-Д, АТ-2, АТ-3, АТ-4, АТ-5, АТ-6, АТ-7, АТ-8, АТ-9, АТ-10, АТ-11, АТ-12, АТ-15, АТ-16, АТ-19, АТ-21, АТ-23 или АТ-24. В некоторых вариантах воплощения изобретения антитело включает аминокислотные последовательности, полученные путем экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих кДНК, кодирующей тяжелую и/или легкую цепь, или, с другой стороны, переменный участок тяжелой и/или легкой цепи любого антитела АТ-А, АТ-В, АТ-С, АТ-Д, АТ-2, АТ-3, АТ-4, АТ-5, АТ-6, АТ-7, АТ-8, АТ-9, АТ-10, АТ-11, АТ-12, АТ-15, АТ-16, АТ-19, АТ-23 или АТ-24, как это описано в тексте данной заявки.

В любой описанной здесь композиции в некоторых вариантах воплощения изобретения антитело к склеростину включает CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи, или зрелые тяжелые и легкие цепи любого антитела АТ-4 или АТ-5; АТ-13 или АТ-14; или АТ-19, АТ-20 или АТ-23. В любой описанной здесь композиции в некоторых вариантах воплощения изобретения антитело связывается со склеростином SEQ ID NO: 1 с  $K_D$   $10^{-7}$  или менее (меньшие значения обозначают высокую аффинность связывания).

В любой описанной здесь композиции в некоторых вариантах воплощения изобретения антитело в композиции присутствует в концентрации по меньшей мере 120 мг/мл или по меньшей мере 140 мг/мл. В любой описанной здесь композиции в некоторых вариантах воплощения изобретения абсолютная вязкость композиции составляет от примерно 8 сП или менее, или примерно 6 сП или менее. В альтернативных вариантах воплощения изобретения антитело в композиции присутствует в концентрации от примерно 70 мг/мл до примерно 130 мг/мл, при этом абсолютная вязкость композиции составляет примерно 10 сП или менее.

В некоторых вариантах воплощения изобретения любая описанная здесь композиция дополнительно включает полиол, такой как сахароза, например, в количестве, варьирующем от примерно 4% в/о до примерно 6%. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция включает примерно 9% сахарозы. В некоторых вариантах воплощения изобретения любая описанная здесь композиция в некоторых случаях включает другие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, например, соль, буфер, аминокислоту, стабилизатор, полиол, другой регулирующий тоничность агент, сурфактант, наполнитель, криопротектор, лиопротектор, антиоксидант, ион металла, хелатный агент и/или консервант. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция включает сурфактант в количестве менее 0,05% по весу.

В любой описанной здесь композиции в некоторых вариантах воплощения изобретения композиция имеет значение pH, варьирующее от примерно 4,5 до 6, или от примерно 5 до примерно 6, или от при-

мерно 5 до примерно 5,5. В некоторых вариантах воплощения изобретения рН композиции составляет 5,2.

Данное изобретение также описывает способы использования описанных здесь композиций в лечении любого нарушения, ассоциированного с пониженной плотностью кости, включая, но не ограничиваясь, следующие: ахондроплазия, клейдокраниальный дизостоз, энхондроматоз, фиброзная дисплазия, болезнь Гоше, гипофосфатемический рахит, синдром Марфана, множественный наследственный экзостоз, нейрофиброматоз, незавершенный остеогенез, остеопетроз, остеопоицилоз, склеротические поражения, псевдоартрит, пиогенный остеомиелит, периодонтальная болезнь, потеря кости, вызванная противосудорожными препаратами, первичный или вторичный гиперпаратирозидизм, синдром наследственного гиперпаратирозидизма, потеря кости, вызванная состоянием невесомости, остеопороз у мужчин, постменопаузальная потеря кости, остеоартрит, почечная остеодистрофия, инфильтративные нарушения кости, потеря кости в ротовой полости, остеонекроз челюсти, ювенильная болезнь Паджета, мелореостоз, метаболическая болезнь кости, мастоцитоз, серповидноклеточная анемия/болезнь, потеря кости, вызванная трансплантацией органов, потеря кости, вызванная трансплантацией почки, системная красная волчанка, анкилозирующий спондилит, эпилепсия, ювенильный артрит, талассемия, мукополисахаридоз, болезнь Фабри, синдром Тернера, синдром Дауна, синдром Клайнфельтера, лепра, болезнь Пертеса, подростковый идиопатический сколиоз, мультисистемное воспалительное заболевание младенцев, синдром Уинчестера, болезнь Менкеса, болезнь Уилсона, ишемическая костная болезнь (такая как болезнь Легг-Кальве-Пертеса или региональный мигрирующий остеопороз), состояния анемии, состояния, вызванные стероидами, потеря кости, вызванная глюкокортикоидами, потеря кости, вызванная гепарином, нарушения костного мозга, цинга, нарушение питания, дефицит кальция, остеопороз, остеопения, алкоголизм, хроническое заболевание печени, постменопаузальное состояние, хронические воспалительные состояния, ревматоидный артрит, воспалительная болезнь кишечника, язвенный колит, воспалительный колит, болезнь Крона, олигоменорея, аменорея, беременность, сахарный диабет, гипертириозидизм, нарушения щитовидной железы, нарушения паращитовидной железы, болезнь Кушинга, акромегалия, гипогонадия, иммобилизация или дисфункция, синдром симпатической рефлексорной дистрофии, региональный остеопороз, размягчение костей, потеря кости, связанная с заменой сустава, ВИЧ-ассоциированная потеря кости, потеря кости, вызванная недостатком гормона роста, потеря кости, вызванная кистозным фиброзом, потеря кости, вызванная химиотерапией, потеря кости, вызванная опухолью, потеря кости, вызванная раком, потеря кости, вызванная абляционной терапией гормонами, множественная миелома, потеря кости, вызванная препаратами, нервная анорексия, потеря лицевых костей, вызванная заболеванием, потеря кости черепа, вызванная заболеванием, потеря кости челюсти, вызванная заболеванием, потеря кости свода черепа, вызванная заболеванием, потеря кости, вызванная старением, потеря костей лица, вызванная старением, потеря кости черепа, вызванная старением, потеря кости челюсти, вызванная старением, потеря кости свода черепа, вызванная старением, или потеря кости, вызванная полетом в космос.

Описанные здесь композиции в некоторых вариантах воплощения изобретения используют для улучшения результатов ортопедических процедур, стоматологических процедур, имплантации, замены сустава, забора кости, косметической операции на кости и восстановления кости, такого как заживление перелома, заживление без сращения, замедленное заживление со сращением и реконструкция костей лица. Одна или несколько композиций могут вводиться до, во время и/или после процедуры, замены, отбора, операции или восстановления.

Такие способы могут включать введение композиции в терапевтически эффективном количестве, т.е. количестве, эффективном для улучшения плотности кости, и могут дополнительно включать введение второго терапевтического агента.

Кроме того, данное изобретение описывает ампулу, набор или контейнер, например, предварительно наполненный шприц или устройство для введения, включающее описанную здесь композицию, и, в некоторых случаях, этикетку, включающую инструкции по использованию соответствующего объема или количества композиции, необходимого для получения дозы примерно 0,5-20 мг/кг или 0,5-10 мг/кг на массу тела пациента.

Следует понимать, что в то время как различные варианты воплощения изобретения описывают с использованием слова "включать", в других обстоятельствах также могут быть описаны родственные варианты воплощения изобретения с использованием выражения "состоять из" или "состоять по существу из". Следует отметить, что термины в единственном числе обозначают единственное или множественное количество, например, термин "молекула иммуноглобулина" обозначает одну или более молекул иммуноглобулина. Таким образом, термины единственного числа, а также термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться взаимозаменяемым образом.

Следует также понимать, что при описании диапазонов значений, представленное значение может быть индивидуальным значением в указанном диапазоне. Например, "рН от примерно рН 4 до примерно рН 6" обозначает, не ограничиваясь, рН 4; 4,2; 4,6; 5,1; 5,5 и т.д. и любое значение между данными значениями. Кроме того, "рН от примерно рН 4 до примерно рН 6" не должен рассматриваться только как рН композиции в рамках 2 единиц рН в диапазоне от рН 4 до рН 6 во время хранения, это может обозначать значение, включенное в данной диапазон рН раствора, и значение рН остается буферным при

примерном значении рН. В некоторых вариантах воплощения изобретения использование термина "примерно" обозначает указанное значение плюс или минус 5, 10, 15% или более от указанного значения. Фактическая вариация значения должна определяться из контекста.

В любом описанном здесь диапазоне конечные точки диапазона включены в диапазон. Однако описание также предусматривает одинаковые диапазоны, в которых исключены нижняя и/или верхняя конечная точка. Дополнительные детали и вариации изобретения будут очевидны специалистам в данной области из всей заявки, включая графические материалы и детальное описание, и все такие детали и вариации являются аспектами данного изобретения. Подобным образом, описанные здесь характеристики изобретения могут быть рекомбинированы в дополнительные варианты воплощения изобретения, которые также рассматриваются как аспекты изобретения, независимо от того, указана ли такая комбинация характеристик в качестве аспекта или варианта воплощения изобретения в заявке. Кроме того, только те ограничения, которые описаны в тексте данной заявки как критические для изобретения, должны рассматриваться таковыми; варианты изобретения без ограничений, который не были описаны в данной заявке как критические, относятся к аспектам изобретения.

#### Детальное описание изобретения

Данное изобретение описывает композиции, включающие высокие концентрации антитела, содержащего кальциевые соли и/или ацетаты или буферы для снижения вязкости, способы использования таких композиций и контейнеры или наборы, включающие такие композиции.

##### I. Антитела по изобретению.

В некоторых вариантах воплощения изобретения антитело к склеростину в композиции присутствует в концентрации по меньшей мере примерно 70 мг/мл, примерно 71 мг/мл, примерно 72 мг/мл, примерно 73 мг/мл, примерно 74 мг/мл, примерно 75 мг/мл, примерно 76 мг/мл, примерно 77 мг/мл, примерно 78 мг/мл, примерно 79 мг/мл, примерно 80 мг/мл, примерно 81 мг/мл, примерно 82 мг/мл, примерно 83 мг/мл, примерно 84 мг/мл, примерно 85 мг/мл, примерно 86 мг/мл, примерно 87 мг/мл, примерно 88 мг/мл, примерно 89 мг/мл, примерно 90 мг/мл, примерно 91 мг/мл, примерно 92 мг/мл, примерно 93 мг/мл, примерно 94 мг/мл, примерно 95 мг/мл, примерно 96 мг/мл, примерно 97 мг/мл, примерно 98 мг/мл, примерно 99 мг/мл, примерно 100 мг/мл, примерно 101 мг/мл, примерно 102 мг/мл, примерно 103 мг/мл, примерно 104 мг/мл, примерно 105 мг/мл, примерно 106 мг/мл, примерно 107 мг/мл, примерно 108 мг/мл, примерно 109 мг/мл, примерно 110 мг/мл, примерно 111 мг/мл, примерно 112 мг/мл, примерно 113 мг/мл, примерно 114 мг/мл, примерно 115 мг/мл, примерно 116 мг/мл, примерно 117 мг/мл, примерно 118 мг/мл, примерно 119 мг/мл, примерно 120 мг/мл, примерно 121 мг/мл, примерно 122 мг/мл, примерно 123 мг/мл, примерно 124 мг/мл, примерно 125 мг/мл, примерно 126 мг/мл, примерно 127 мг/мл, примерно 128 мг/мл, примерно 129 мг/мл, примерно 130 мг/мл, примерно 131 мг/мл, примерно 132 мг/мл, примерно 132 мг/мл, примерно 133 мг/мл, примерно 134 мг/мл, примерно 135 мг/мл, примерно 136 мг/мл, примерно 137 мг/мл, примерно 138 мг/мл, примерно 139 мг/мл, примерно 140 мг/мл, примерно 141 мг/мл, примерно 142 мг/мл, примерно 143 мг/мл, примерно 144 мг/мл, примерно 145 мг/мл, примерно 146 мг/мл, примерно 147 мг/мл, примерно 148 мг/мл, примерно 149 мг/мл, примерно 150 мг/мл, примерно 151 мг/мл, примерно 152 мг/мл, примерно 153 мг/мл, примерно 154 мг/мл, примерно 155 мг/мл, примерно 156 мг/мл, примерно 157 мг/мл, примерно 158 мг/мл, примерно 159 мг/мл или примерно 160 мг/мл, и может находиться в диапазоне, например, до примерно 300 мг/мл, примерно 290 мг/мл, примерно 280 мг/мл, примерно 270 мг/мл, примерно 260 мг/мл, примерно 250 мг/мл, примерно 240 мг/мл, примерно 230 мг/мл, примерно 220 мг/мл, примерно 210 мг/мл, примерно 200 мг/мл, примерно 190 мг/мл, примерно 180 мг/мл или примерно 170 мг/мл. Любой диапазон с комбинацией указанных выше конечных точек предусмотрен, включая, но не ограничиваясь: от примерно 70 мг/мл до примерно 250 мг/мл, от примерно 70 мг/мл до примерно 200 мг/мл, от примерно 70 мг/мл до примерно 160 мг/мл, от примерно 100 мг/мл до примерно 250 мг/мл, от примерно 100 мг/л до примерно 200 мг/мл, или от примерно 100 мг/мл до примерно 180 мг/мл.

Антитела АТ-А, АТ-В, АТ-С, АТ-Д, АТ-1, АТ-2, АТ-3, АТ-4, АТ-5, АТ-6, АТ-7, АТ-8, АТ-9, АТ-10, АТ-11, АТ-12, АТ-13, АТ-14, АТ-15, АТ-16, АТ-17, АТ-18, АТ-19, АТ-20, АТ-21, АТ-22, АТ-23 и АТ-24 были описаны ранее в публикации заявки на патент США 2007/0110747, содержание которой, включая список последовательностей, включено сюда во всей своей полноте посредством ссылки.

Описанные здесь антитела к склеростину связываются со склеростином с  $SEQ ID NO: 1$  и  $K_D$   $10^{-6}$  или менее, или  $10^{-7}$  или менее, или  $10^{-8}$  или менее, или  $10^{-9}$  или менее (чем ниже значение, тем больше аффинность связывания). Аффинность может быть определена любым известным в науке способом, включая анализ *Viacore*.

В некоторых типичных вариантах воплощения изобретения антитело включает тяжелые и/или легкие цепи любого антитела АТ-А, АТ-В, АТ-С, АТ-Д, АТ-2, АТ-3, АТ-4, АТ-5, АТ-6, АТ-7, АТ-8, АТ-9, АТ-10, АТ-11, АТ-12, АТ-15, АТ-16, АТ-19, АТ-21, АТ-23 или АТ-24. Аминокислотные последовательности зрелых легких цепей антител полной длины АТ-А, АТ-В, АТ-С, АТ-Д, АТ-2, АТ-3, АТ-4, АТ-5, АТ-6, АТ-7, АТ-8, АТ-9, АТ-10, АТ-11, АТ-12, АТ-15, АТ-16, АТ-17, АТ-19, АТ-2 3 и АТ-2 4, включая константный участок, представлены  $SEQ ID NO: 8, 22, 32, 42, 52, 62, 80, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 166, 176, 184, 70, 210, 222$  и  $246$ , соответственно. Аминокислотные последовательности зрелых тяжелых

цепей антител полной длины AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-15, AT-16, AT-19, AT-23 и AT-24, включая константный участок, представлены SEQ ID NO: 10, 24, 34, 44, 54, 64, 82, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 168, 178, 186, 72, 224 и 248, соответственно.

Соответствующие последовательности кДНК, кодирующие легкие цепи антител полной длины AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-15, AT-16, AT-19, AT-23 и AT-24, включая константный участок, представлены SEQ ID NO: 7, 21, 31, 41, 51, 61, 79, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 165, 175, 183, 69, 209, 221 и 245, соответственно. Соответствующие последовательности кДНК, кодирующие тяжелые цепи антител полной длины, включая константный участок антител AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-15, AT-16, AT-19, AT-23 и AT-24, представлены SEQ ID NO: 9, 23, 33, 43, 53, 63, 81, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 167, 177, 185, 71, 211, 223 и 247, соответственно.

В других типичных вариантах воплощения изобретения антитело включает переменный участок тяжелой и/или легкой цепи любого антитела AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-15, AT-16, AT-17, AT-19, AT-21, AT-23 или AT-24. Например, антитело включает:

SEQ ID NO: 14 (AT-1 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 12 (AT-1 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 68 (AT-15 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 66 (AT-15 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 86 (AT-5 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 84 (AT-5 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 154 (AT-16 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 152 (AT-16 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 182 (AT-14 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 180 (AT-14 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 208 (AT-19 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 207 (AT-19 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 216 (AT-20 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 214 (AT-20 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 220 (AT-23 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 218 (AT-23 переменный участок легкой цепи); или

SEQ ID NO: 238 (AT-22 переменный участок тяжелой цепи) и/или SEQ ID NO: 236 (AT-22 переменный участок легкой цепи).

В некоторых вариантах воплощения изобретения антитело включает CDR с последовательностями SEQ ID NO:

1-5

(AT-A и AT-1 CDR), или 15-20 (AT-B CDR), или 25-30 (AT-C CDR), или 35-40 (AT-D CDR), или 45-50 (AT-2 CDR), или 55-60 (AT-3 и AT-15 CDR), или 73-78 (AT-4 и AT-5 CDR), или 91-96 (AT-6 CDR), или 101-106 (AT-7 CDR), или 111-116 (AT-8 CDR), или 121-126 (AT-9 CDR), или 131-136 (AT-10 CDR), или 141-146 (AT-11 и AT-16 CDR), или 159-164 (AT-12 CDR), или 169-174 (AT-13 и AT-14 CDR), или 187-192 (AT-17 и AT-18 CDR), или 201-206 (AT-19, AT-20 и AT-23 CDR), или 225-229 (AT-21 и AT-22 CDR), или 239-244 (AT-24 CDR).

В некоторых вариантах воплощения изобретения антитело включает аминокислотные последовательности, полученные путем экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих кДНК, кодирующей тяжелую и/или легкую цепь, или, с другой стороны, переменный участок тяжелой и/или легкой цепи любого антитела AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-15, AT-16, AT-19, AT-23 или AT-24, как это описано в тексте данной заявки. В любой описанной здесь композиции в некоторых вариантах воплощения изобретения антитело представлено тетрамерным иммуноглобулином, состоящим из двух тяжелых цепей и двух легких цепей.

В некоторых вариантах воплощения изобретения антитело включает CDR любого антитела AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-15, AT-16, AT-19, AT-23 или AT-24, и включает тяжелую и/или легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична тяжелой и/или легкой цепи антитела AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6,

AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-15, AT-16, AT-19, AT-23 или AT-24, соответственно. В некоторых вариантах воплощения изобретения антитело включает CDR любого антитела AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-15, AT-16, AT-19, AT-23 или AT-2 4, и включает тяжелую и/или легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична тяжелой и/или легкой цепи антитела AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-15, AT-16, AT-19, AT-23 или AT-24, соответственно.

В некоторых вариантах воплощения изобретения антитело:

1) сохраняет любой один, два, три, четыре, пять или шесть CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и/или CDRL3 любого антитела AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-1, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-13, AT-14, AT-15, AT-16, AT-17, AT-18, AT-19, AT-20, AT-21, AT-22, AT-23 или AT-2 4, в некоторых случаях включая одну или две мутации в таких CDR,

2) сохраняет все CDRH1, CDRH2, CDRH3, или варибельный участок тяжелой цепи любого антитела AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-1, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-13, AT-14, AT-15, AT-16, AT-17, AT-18, AT-19, AT-20, AT-21, AT-22, AT-23 или AT-24, в некоторых случаях включая одну или две мутации в таких CDR,

3) сохраняет все CDRL1, CDRL2, CDRL3, или варибельный участок легкой цепи любого антитела AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-1, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-13, AT-14, AT-15, AT-16, AT-17, AT-18, AT-19, AT-20, AT-21, AT-22, AT-23 или AT-24, в некоторых случаях включая одну или две мутации в таких CDR,

4) связывается с одной и той же самой антигенной детерминантой склеростина, что и антитело AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-1, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-13, AT-14, AT-15, AT-16, AT-17, AT-18, AT-19, AT-20, AT-21, AT-22, AT-23 или AT-24, например, как это определено с помощью рентгеновской кристаллографии, или аминокислотой с петлей, образованной аминокислотами 86-111 последовательности SEQ ID NO: 249; и/или

5) конкурирует с антителом AT-A, AT-B, AT-C, AT-D, AT-1, AT-2, AT-3, AT-4, AT-5, AT-6, AT-7, AT-8, AT-9, AT-10, AT-11, AT-12, AT-13, AT-14, AT-15, AT-16, AT-17, AT-18, AT-19, AT-20, AT-21, AT-22, AT-23 или AT-24 за связывание со склеростином более чем примерно на 75%, более чем примерно на 80% или более чем примерно на 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95%.

В некоторых вариантах воплощения изобретения антитело включает все три CDR легкой цепи, варибельный участок зрелой легкой цепи, все три CDR тяжелой цепи, варибельный участок зрелой тяжелой цепи, все шесть CDR, или варибельный участок зрелой легкой цепи и зрелой тяжелой цепи. В некоторых типичных вариантах воплощения изобретения два CDR легкой цепи из антитела могут быть скомбинированы с третьим CDR легкой цепи из другого антитела. С другой стороны, CDRL1 из одного антитела может быть скомбинирован с CDRL2 из другого антитела и CDRL3 из третьего антитела, в частности, в случаях с высокой степенью гомологичности CDR. Подобным образом, два CDR тяжелой цепи из антитела могут быть скомбинированы с третьим CDR тяжелой цепи из другого антитела, или CDRH1 из одного антитела может быть скомбинирован с CDRH2 из другого антитела и CDRH3 из третьего антитела, в частности, в случаях с высокой степенью гомологичности CDR.

Термин "антитело" обозначает интактное антитело или его связующийся фрагмент. Антитело может включать полную молекулу антитела (включая поликлональные, моноклональные, химерные, гуманизированные легкие и/или тяжелые цепи полной длины цепи или версии цепей человека), или включать ее антигенсвязующий фрагмент. Фрагменты антитела включают фрагменты F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fab', Fv, Fc и Fd, и могут быть включены в однодоменные антитела, одноцепочечные антитела, макситела, минитела, интратела, диатела, триатела, тетратела, v-NAR и bis-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology, 23(9): 1126-1136 (2005)).

"Выделенное" антитело в контексте данной заявки обозначает антитело, которое было идентифицировано и сепарировано от компонента в своей естественной среде. Загрязняющие (примесные) компоненты в естественной среде представляют собой материалы, которые могут помешать диагностическому или терапевтическому использованию антитела, и такие материалы могут включать ферменты, гормоны и другие белковые и небелковые растворенные вещества. В определенных вариантах воплощения изобретения антитело будет очищаться (1) до значения более 95% по весу антитела, и наиболее преимущественно более чем 99% по весу; (2) до степени, достаточной для получения, по меньшей мере, 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности; или (3) до достижения однородности, определяемой способом электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с использованием Кумасси синего или, преимущественно, серебрянки. Изолированное и встречающееся в природе антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, при этом, по меньшей мере, один компонент естественной среды антитела будет отсутствовать. Как правило, изолированное антитело будет получать, по меньшей мере, с одним этапом очистки.

"Иммуноглобулин" или "нативное антитело" представлено тетрамерным гликопротеином. Во встречающемся в природе иммуноглобулине каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипеп-



тидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" (примерно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (примерно 50-70 кДа). Аминотерминальный участок каждой цепи включает "вариабельный" ("V") участок с примерно 100-110 или более аминокислотами, которые преимущественно ответственны за распознавание антигена. Карбоксильный терминальный участок каждой цепи определяет константный участок, преимущественно ответственный за эффекторную функцию. Иммуноглобулины могут принадлежать к различным классам в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей. Тяжелые цепи классифицируют как мю ( $\mu$ ), дельта ( $\Delta$ ), гамма ( $\gamma$ ), альфа ( $\alpha$ ) и эпсилон ( $\epsilon$ ), и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Многие из них могут быть разделены на подклассы или изотипы, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Различные изотипы обладают различными эффекторными функциями, например, изотипы IgG1 и IgG3 обладают антителозависимой клеточной цитотоксичной активностью (АЗКЦ). Легкие цепи человека классифицируют как каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ) легкие цепи. В легких и тяжелых цепях вариабельные и константные участки соединены "J" участком, содержащим примерно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает "D" участок, включающий примерно 10 или более аминокислот. См. в целом, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

Аллотипы являются вариациями последовательности антитела, часто в константном участке, и могут быть иммуногенными и кодироваться специфическими аллелями у человека. Аллотипы были идентифицированы для пяти генов IGHC человека, а именноIGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHA2 и IGHE, и обозначены как G1m, G2m, G3m, A2m и Em, соответственно. Известно, по меньшей мере, 18 Gm аллотипов: nG1m(1), nG1m(2), G1m (1, 2, 3, 17) или G1m (a, x, f, z), G2m (23) или G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) или G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5). Существует два аллотипа A2m: A2m(1) и A2m(2).

Термин "гипервариабельный участок" обозначает аминокислотные остатки из определяющего комплементарности участка или CDR (т.е. остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи, как это описано в Rabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Даже отдельный CDR может распознать и связать антиген, но с меньшей аффинностью, чем полный антигенсвязывающий сайт, содержащий все CDR.

Альтернативное определение остатков из гипервариабельной "петли" описано в Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987) как остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи.

Остатки "каркасного" участка или FR представлены остатками вариабельного домена в отличие от остатков гипервариабельного участка.

"Фрагменты антитела" включают участок интактного иммуноглобулина, преимущественно антигенсвязывающего или вариабельного участка интактного антитела, и включают мультиспецифические (биспецифические, триспецифические и т.д.) антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты иммуноглобулинов могут быть получены с использованием рекомбинантных способов ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител.

Неограничивающие примеры фрагментов антитела включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv (вариабельный участок), доменные антитела (дАТ, содержащие домен V<sub>H</sub>) (Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989), фрагменты определяющих комплементарности участков (CDR), одноцепочечные антитела (scFv, содержащий домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> на одной полипептидной цепи) (Bird et al., *Science* 242:423-426, 1988, и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, 1988, в некоторых случаях включая полипептидный линкер; и в некоторых случаях мультиспецифический, Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994)), фрагменты одноцепочечного антитела, диател (домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> на одной полипептидной цепи, которая сопрягается комплементарно с доменами V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> другой цепи) (EP 404097; WO 93/11161; и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)), триател, тетрател, минител (scFv, слитого с CH3 посредством пептидного линкера (без шарнирного участка) или посредством шарнирного участка IgG) (Olafsen, et al., *Protein Eng Des Sel.* 2004 Apr; 17(4):315-23), линейных антител (тандемные сегменты Fd (V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1) (Zapata et al., *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995)); хелатных рекомбинантных антител (сrAb, который может связываться с двумя прилегающими антигенными детерминантами на одном и том же антигене) (Neri et al., *J Mol Biol.* 246:367-73, 1995), бител (биспецифический Fab-scFv) или трител (триспецифический Fab-(scFv)(2)) (Schoonjans et al., *J Immunol.* 165:7050-57, 2000; Willems et al., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 786:161-76, 2003), интрател (Biocca, et al., *EMBO J.* 9:101-108, 1990; Colby et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:17616-21, 2004), которые также могут включать последовательности для клеточной сигнализации, сохраняющие или направляющие антитело внутрь клетки (Mhashilkar et al., *EMBO J* 14:1542-51, 1995; Wheeler et al., *FASEB J.* 17:1733-5, 2003), транстел (проникающие через клетку антитела, содержащие домен белковой трансдукции (PTD), слитый с scFv (Heng et al., *Med Hypotheses.* 64:1105-8, 2005), нанотел (вариабельный домен тяжелой цепи примерно 15 кДа) (Cortez-Retamozo et al., *Cancer Research* 64:2853-57, 2004), небольших модульных иммунопрепаратов (SMIP) (WO03/041600, публикация патента США 20030133939 и публикация патента США 20030118592), белка, слитого с анти-

генсвязующим доменом иммуноглобулина, антитела верблюдовых (в которых  $V_H$  рекомбинируется с константным участком, который содержит шарнирный участок, домены CH1, CH2 и CH3) (Desmyter et al., *J. Biol. Chem.* 276:26285-90, 2001; Ewert et al., *Biochemistry* 41:3628-36, 2002; публикация патентов США No. 20050136049 и 20050037421), антитела, содержащего  $V_{HH}$ , тяжелой цепи антитела (HCAb, гомодимеров двух тяжелых цепей со структурой  $H_2L_2$ ), или вариантов или их производных, и полипептидов, содержащих, по меньшей мере, участок иммуноглобулина, достаточного для придания надлежащего связывания антигена полипептиду, таким как последовательность CDR, с сохранением требуемой биологической активности антителом.

В контексте данного изобретения термин "вариант" обозначает полипептидную последовательность антитела, содержащую, по меньшей мере, одну замену, делецию или вставку аминокислоты в вариабельном участке или фрагменте, эквивалентном вариабельному участку, при условии, что такой вариант сохраняет требуемую аффинность связывания или биологическую активность. Кроме того, антитела, как это описано в тексте данной заявки, могут иметь модификации аминокислот в константном участке для модификации эффекторной функции антитела, включая время полужизни или выведение, АЗКЦ и/или КЗЦ. Такие модификации могут улучшать фармакокинетику или повышать эффективность антитела в лечении, например, рака. См. Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 276(9):6591-6604 (2001) (включено в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки). В случае IgG1 модификации в константном участке, в частности, в шарнирном участке или CH2, могут повышать или снижать эффекторную функцию, включая АЗКЦ и/или КЗЦ. В других вариантах воплощения изобретения константный участок IgG2 модифицирован для снижения образования агрегата антитело-антиген. В случае IgG4 модификации в константном участке, в частности, в шарнирном участке, могут снижать образование полуантител.

Термин "модификация" при использовании к антителам или описанным здесь полипептидам, включает, но не ограничивается, изменения одной или более аминокислот (включая замены, вставки или делеции); химические модификации, которые не влияют на активность связывания гепсидина; ковалентную модификацию путем конъюгации с терапевтическими или диагностическими агентами; мечение (например, радионуклидами или различными ферментами); ковалентное присоединение полимера, такое как пэгилирование (дериватизация с полиэтиленгликолем) и вставку или замещение путем химического синтеза не встречающихся в природе аминокислот. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированные полипептиды (включая антитела) по изобретению сохраняют связующие свойства немодифицированных молекул по изобретению.

Термин "производное" при использовании в контексте антител или полипептидов по изобретению обозначает антитела или полипептиды, модифицированные ковалентно путем конъюгации с терапевтическими или диагностическими агентами, мечения (например, радионуклидами или различными ферментами), ковалентным присоединением полимера, таким как пэгилирование (дериватизация полиэтиленгликолем), и вставкой или замещением путем химического синтеза не встречающихся в природе аминокислот. В некоторых вариантах воплощения изобретения производные по изобретению сохраняют связующие свойства недериватизированных молекул по изобретению.

Способы получения биспецифических или других мультиспецифических антител известны в науке и включают химическое перекрестное связывание, использование лейциновых молний [Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553, 1992]; способ диатела [Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48, 1993]; димеры scFv [Gruber et al., *J. Immunol.* 152: 5368, 1994], линейные антитела [Zapata et al., *Protein Eng.* 8:1057-62, 1995]; и хелатные рекомбинантные антитела [Neri et al., *J Mol Biol.* 246:367-73, 1995].

Белки и небелковые агенты могут быть конъюгированы с антителами с использованием известных в науке способов. Способы конъюгации включают прямое связывание, связывание посредством ковалентно присоединенных линкеров и связывание со специфическими связующимися парами (например, авидин-биотин). Такие способы включают, например, способы, описанные в Greenfield et al., *Cancer Research* 50, 6600-6607 (1990) для конъюгации доксорубина и способы, описанные в Arnon et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 303, 79-90 (1991) и Kiseleva et al., *Mol. Biol. (USSR)* 25, 508-514 (1991) для конъюгации соединений платины.

В некоторых вариантах воплощения изобретения описанные здесь антитела и фрагменты антител получают, например, из встречающихся в природе антител, или библиотек фаговых дисплеев Fab или scFv. Фраза "гуманизованное антитело" обозначает антитело, полученное из последовательности антитела, не принадлежащего человеку, как правило, моноклонального антитела грызунов, и включает модификации, придающие последовательности свойства последовательности человека. С другой стороны, гуманизованное антитело может быть получено из химерного антитела.

Фрагменты антитела включают фрагмент доменного антитела (дАТ) (Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989), состоящий из домена  $V_H$ , "линейные антитела" включают пару тандемных сегментов Fd ( $V_H$ -CH1- $V_H$ -CH1), образующих пару антигенсвязующих участков. Линейные антитела могут быть биспецифическими или моноспецифическими (Zapata et al., *Protein Eng.* 8:1057-62 (1995)); "минитело", состоящее из scFv, слитого с CH3 посредством пептидного линкера (без шарнирного участка) или посредством шарнирного участка IgG, было описано в Olafsen, et al., *Protein Eng Des Sel.* 2004 Apr; 17(4):315-23; "макситело" обозначает двухвалентные scFv, ковалентно присоединенные к участку Fc иммуноглобулина,

см., например, Fredericks et al., *Protein Engineering, Design & Selection*, 17:95-106 (2004) и Powers et al., *Journal of Immunological Methods*, 251:123-135 (2001); антитела с тяжелой цепью, например, домен V<sub>H1</sub> или H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> (обозначаются как "антитела с тяжелой цепью" или "HCAb"); или V<sub>H1</sub> верблюдовых (см., например, Reichman, et al., *J Immunol Methods* 1999, 231:25-38, Desmyter et al., *J. Biol Chem.* 276:26285-90, 2001, Ewert et al., *Biochemistry* 41:3628-36, 2002; нанотело (Cortez-Retamozo et al., *Cancer Research* 64:2853-57, 2004); интратела являются одноцепочечными антителами, демонстрирующими внутриклеточную экспрессию, которые могут манипулировать выработкой белка внутри клетки (Biocca, et al., *EMBO J.* 9:101-108, 1990; Colby et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:17616-21, 2004, Mhashilkar et al., *EMBO J* 14:1542-51, 1995, Wheeler et al. (*FASEB J.* 17:1733-5, 2003); транстела являются антителами, проникающими через клетку, в которых домены трансдукции белка (PTD) слиты с одноцепочечным варибельным фрагментом (scFv) антител Heng et al., (*Med Hypotheses.* 64:1105-8, 2005); SMIP или белки, слитые со связующим доменом иммуноглобулина, специфичные относительно белка-мишени, представлены одноцепочечными полипептидами, включающими антигенсвязующий домен, слитый с доменами иммуноглобулина, необходимыми для выполнения антителом его эффекторных функций. См., например, WO03/041600, публикацию патента США 20030133939 и публикацию патента США 20030118592. II. Соли кальция и ацетаты или буфера Было выявлено, что добавление относительно низких концентраций кальция ацетата к композициям с выбранным антителом снижает вязкость композиции. Термин "вязкость" в контексте данного изобретения обозначает "абсолютную вязкость". Абсолютная вязкость, называемая иногда динамической или простой вязкостью, является продуктом кинематической вязкости и плотности жидкости: Абсолютная вязкость=Кинематическая вязкость×Плотность. Единицы кинематической вязкости представлены L<sup>2</sup>/T, где L - длина, а T - время. В целом кинематическая вязкость выражается в сантистоксах (сСт). Единица СИ кинематической вязкости представлена мм<sup>2</sup>/с, что составляет 1 сСт. Абсолютная вязкость выражается в единице сантипуаз (сП). Единица СИ абсолютной вязкости представлена как миллипаскаль в секунду (мПа·с), при этом 1 сП = 1 мПа·с.

Подобные измерения вязкости могут проводиться ежедневно (например, в течение 1-23 ч), ежедневно (например, в течение 1-10 дней), еженедельно (например, в течение 1-5 недель) или ежемесячно (например, в течение 1-12 месяцев) или ежегодно (например, в течение 1-2 лет, 1-3 лет) после добавления агента, снижающего вязкость, в композицию антитела. Измерения вязкости могут проводиться при хранении при температуре введения, например, 2-8°C или 25°C (комнатная температура). В некоторых вариантах воплощения изобретения абсолютная вязкость жидкости или восстановленной жидкой композиции при температуре хранения и/или введении составляет 15 сП или менее, или 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 сП или менее.

В некоторых вариантах воплощения изобретения вязкость белковой композиции измеряют до и после добавления кальциевой соли и/или ацетатной соли (и/или буфера). Способы измерения вязкости хорошо известны в науке и включают, например, использование капиллярного вискозиметра или вискозиметра с конусом и плитой. Могут использоваться любые способы при условии использования одного и того же способа для сравнения исследуемой и эталонной композиций.

Вязкость композиции антитела может быть снижена путем добавления кальциевой соли и/или ацетатной соли (и/или буфера) в композицию. Вязкость композиции с антителом может быть снижена примерно на 5%, примерно на 10%, примерно на 15%, примерно на 20%, примерно на 25%, примерно на 30%, примерно на 35%, примерно на 40%, примерно на 45%, примерно на 50%, примерно на 55%, примерно на 60%, примерно на 65%, примерно на 70%, примерно на 75%, примерно на 80%, примерно на 85% и примерно на 90% в сравнении с вязкостью сопоставимой композиции с антителом при отсутствии кальциевой соли и/или ацетатной соли (и/или буфера).

Типичные кальциевые соли включают, не ограничиваясь, кальция ацетат, кальция карбонат и кальция хлорид. В некоторых вариантах воплощения изобретения кальциевая соль находится в концентрации, по меньшей мере, 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ или 10 мМ. В определенных вариантах воплощения изобретения концентрация кальциевой соли не превышает 11 мМ, 12 мМ, 13 мМ, 14 мМ, 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ, 20 мМ, 21 мМ, 22 мМ, 23 мМ, 24 мМ или 25 мМ. Любой диапазон, включающий комбинацию указанных выше конечных точек, предусмотрен, включая, но не ограничиваясь, от примерно 0,5 мМ до примерно 10 мМ, от примерно 5 мМ до примерно 10 мМ, или от примерно 5 мМ до примерно 15 мМ. В некоторых вариантах воплощения изобретения кальциевая соль присутствует в концентрации, снижающей вязкость композиции антитела, по меньшей мере, на 30%, 40%, 50%, 60% или более в сравнении с этой же композицией антитела без ацетатной соли и/или буфера, или достигается вязкость 10 сП или менее, или 9, 8, 7, 6 или 5 сП или менее. В определенных вариантах воплощения изобретения кальциевую соль добавляют при низких концентрациях, чтобы не повлиять отрицательным образом на белковую композицию. Например, при концентрациях кальция хлорида или магния хлорида 20 мМ или более, белки могут образовывать гель при низких температурах хранения (например, 2-8°C). В соответствии с этим, концентрация кальциевой соли обычно выбирается таковой, чтобы снижать вязкость при указанной температуре хранения отдельной композиции.

Во всех представленных здесь диапазонах концентрация катиона, аниона или соли представлена

финальной концентрацией жидкости или восстановленной жидкой композиции, предназначенной для введения. В любом описанном здесь диапазоне конечные точки диапазона включены в диапазон. Однако описание также предусматривает одинаковые диапазоны, в которых исключены нижняя и/или верхняя конечная точка.

В некоторых вариантах воплощения изобретения описанная здесь композиция включает, кроме добавления кальциевой соли, ацетатный буфер в концентрации, по меньшей мере, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ или 15 мМ. В некоторых вариантах воплощения изобретения концентрация не превышает 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ или 50 мМ. Любой диапазон, включающий комбинацию указанных выше конечных точек, предусмотрен, включая, но не ограничиваясь, от примерно 5 мМ до примерно 15 мМ, или от примерно 5 мМ до примерно 10 мМ. Буфер преимущественно добавляют в концентрации с поддержанием pH примерно 5-6 или 5-5,5 или 4,5-5,5. Если кальциевая соль в композиции представлена кальцием ацетатом, в некоторых вариантах воплощения изобретения общая концентрация ацетата составляет от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ, или от примерно 20 мМ до примерно 40 мМ.

В некоторых аспектах композиция включает общую концентрацию ацетатной соли, составляющей, по меньшей мере, примерно 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ или 50 мМ. В некоторых вариантах воплощения изобретения концентрация ацетата не превышает примерно 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ или 90 мМ. Любой диапазон, включающий комбинацию указанных выше конечных точек, предусмотрен, включая, но не ограничиваясь, от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ, от примерно 20 мМ до примерно 50 мМ, от примерно 20 мМ до примерно 40 мМ, от примерно 30 мМ до примерно 50 мМ, или от примерно 30 мМ до примерно 75 мМ. В некоторых вариантах воплощения изобретения ацетатная соль или буфер включает кальцием ацетат и/или натрия ацетат. С другой стороны, в некоторых вариантах воплощения изобретения ацетатная соль присутствует в концентрации, снижающей вязкость композиции антигена, по меньшей мере, на 30%, 40%, 50%, 60% или более в сравнении с этой же композицией антигена без ацетатной соли и/или буфера, или достигается вязкость 10 сП или менее, или 9, 8, 7, 6 или 5 сП или менее. Например, раствор, содержащий 10 мМ кальцием ацетата, будет содержать 20 мМ ацетатного аниона и 10 мМ кальциевого катиона, по причине двухвалентной природы катиона кальция, в то время как раствор, содержащий 10 мМ натрия ацетата, будет содержать 10 мМ натриевого катиона и 10 мМ ацетатного аниона.

В некоторых вариантах воплощения изобретения общая концентрация ионов (катионов и анионов) в растворе составляет, по меньшей мере, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ или 85 мМ. В некоторых вариантах воплощения изобретения общая концентрация ионов не превышает примерно 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ, 95 мМ, 100 мМ, 110 мМ, 120 мМ, 130 мМ, 140 мМ, 150 мМ, 160 мМ, 170 мМ, 180 мМ, 190 мМ или 200 мМ. Любой диапазон, включающий комбинацию указанных выше конечных точек, предусмотрен, включая, но не ограничиваясь: от примерно 30 мМ до примерно 60 мМ, или от примерно 30 мМ до примерно 70 мМ, или от примерно 30 мМ до примерно 80 мМ, или от примерно 40 мМ до примерно 150 мМ, или от примерно 50 мМ до примерно 150 мМ. Например, раствор 10 мМ кальцием ацетата будет содержать 30 мМ общей концентрации ионов (10 мМ катионов и 20 мМ анионов).

В любой из описанных выше композиций в некоторых вариантах воплощения изобретения общая осмоляльность не превышает 500 мОсм/л, 450 мОсм/л, 400 мОсм/л или 350 мОсм/л, и преимущественно значение близко к изотоничности, например, 250-350 мОсм/л.

В композицию могут быть дополнительно включены другие вспомогательные вещества, известные в науке или описанные в тексте данной заявки.

### III. Вспомогательные вещества в композиции.

Белковые композиции обычно вводят парентерально. При парентеральном введении композиции должны быть стерильными. Стерильные разбавители включают жидкости, являющиеся фармацевтически приемлемыми (безопасными и нетоксичными для введения человеку) и использоваться для приготовления жидкой композиции, такой как восстановленная композиция после лиофилизации. Типичные разбавители включают стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекции (BWFI), pH забуференный раствор (например, фосфатный забуференный физиологический раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. Разбавители могут включать водные растворы солей и/или буферы.

Вспомогательные вещества являются добавками, которые включают в композицию для улучшения или повышения стабильности, доставки и возможности производства лекарственного препарата. Независимо от причины включения, вспомогательные вещества являются интегральным компонентом лекарственного препарата и, следовательно, должны быть безопасны и хорошо переноситься пациентами. Для белковых препаратов выбор вспомогательных веществ особенно важен, т.к. они могут влиять на эффективность и иммуногенность препарата. Таким образом, белковые композиции должны быть разработаны с соответствующим выбором вспомогательных веществ, предоставляющих подходящую стабильность, безопасность и возможность производства.

Описанные здесь вспомогательные вещества организованы по химическому типу или их функциональной роли в композициях. При обсуждении вспомогательного вещества каждого типа приведено краткое описание способа стабилизации. Учитывая приведенные здесь руководства и принципы, специалист в данной области легко сможет изменять количество вспомогательного вещества без повышения вязкости до нежелательного уровня. Вспомогательные вещества могут быть выбраны для достижения требуемой осмоляльности (т.е. изотоничности, гипотоничности или гипертоничности) финального раствора, pH, требуемой стабильности, устойчивости к агрегации или деградации, или образованию осадка, защите от условий замораживания, лиофилизации или высоких температур, или других свойств. В науке известен целый ряд вспомогательных веществ. Типичные вспомогательные вещества включают соли, аминокислоты, другие агенты, изменяющие тоничность, сурфактанты, стабилизаторы, наполнители, криопротекторы, лиопротекторы, антиоксиданты, ионы металлов, хелатные агенты и/или консерванты.

Кроме того, если отдельное вспомогательное вещество указано в композиции, например, в виде процентов (%) в/о, специалистам в данной области будет очевидно, что также предусмотрен эквивалент молярной концентрации данного вспомогательного вещества.

#### А. Буферы.

Диапазон pH для оптимальной стабильности должен быть идентифицирован заранее до исследования разработки состава. Было показано, что могут использоваться несколько способов, такой как изучение повышенной стабильности и калориметрический скрининг (Remmele R.L. Jr., et al., *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999)). Как только закончена разработка состава, лекарственный препарат должен быть произведен и содержаться в соответствии с ранее определенной спецификацией в течение срока хранения. Таким образом, буферные агенты практически всегда используют для контроля pH в композиции.

Органические кислоты, фосфаты и Трис часто использовали в композициях белков (табл. 1). Буферная способность буферных агентов максимальна при pH, равном  $pK_a$ , и снижается при увеличении pH или снижении от данного значения. Девяносто процентов буферной способности существует в пределах одного значения pH, равного  $pK_a$ . Буферная способность также повышается пропорционально повышению концентрации буфера.

При выборе буфера следует учитывать несколько факторов. Первый и самый важный: вид буфера и его концентрация должны быть определены на основе значения  $pK_a$  и требуемого pH композиции. Важным является и обеспечение совместимости буфера с белковым препаратом, другими вспомогательными веществами композиции, а также отсутствие катализации любых реакций распада. Недавно было показано, что полианионные карбоксилатные буферы, такие как цитрат и сукцинат, образуют ковалентные аддукты с остатками боковых цепей белков. Третий важный аспект, который следует учитывать, заключается в ощущении покалывания и раздражении, которые может вызывать буфер. Например, известно, что цитрат вызывает чувство покалывания при введении (Laurson T, et al., *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 98(2): 218-21 (2006)). Потенциал стягивания и раздражения больше у препаратов, вводимых подкожно и внутримышечно, при этом раствор препарата остается на месте в течение относительно длительного времени, чем при внутривенном введении, когда препарат быстро растворяется в крови при введении. Для композиций, вводимых напрямую внутривенной инфузией, общее количество буфера (и любого другого компонента композиции) необходимо мониторить. Например, сообщалось, что ионы калия, введенные в форме буфера калия фосфата, могут индуцировать явления со стороны сердечнососудистой системы у пациента (Hollander-Rodriguez JC, et al., *Am. Fam. Physician.*, 73(2): 283-90 (2006)).

Таблица 1. Часто используемые буферные агенты и их значения  $pK_a$

Буфер	$pK_a$	Пример лекарственного препарата
Ацетат	4, 8	Неупоген, Неуласта
Сукцинат	$pK_{a1} = 4,8$ , $pK_{a2} = 5,5$	Актиммун
Цитрат	$pK_{a1} = 3,1$ , $pK_{a2} = 4,8$ , $pK_{a3} = 6,4$	Хумира
Гистидин (имидазол)	6, 0	Ксолаир
Фосфат	$pK_{a1} = 2,15$ , $pK_{a2} = 7,2$ , $pK_{a3} = 12,3$	Энбрел (жидкая композиция)
Трис	8, 1	Лейкин

Буферная система, присутствующая в композиции, выбирается таким образом, чтобы она была физиологически совместимой и поддерживала необходимый pH.

pH буферное соединение может присутствовать в любом количестве, подходящем для поддержания pH композиции на предустановленном уровне. pH буферный агент, например, ацетат, может находиться в концентрации от 0,1 мМ до 1000 мМ (1 М). В одном варианте воплощения изобретения pH буферный агент находится в количестве по меньшей мере 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700 или 900 мМ. В другом варианте воплощения изобретения концентрация рН буферного агента составляет от 1, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 мМ до 100 мМ. В еще одном варианте воплощения изобретения концентрация рН буферного агента составляет от 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30 или 40 до 50 мМ. В еще одном варианте воплощения изобретения концентрация рН буферного агента составляет 10 мМ.

Другие типичные рН буферные агенты, используемые для забуференизации композиции, включают, не ограничиваясь, глицин, глутамат, сукцинат, фосфат, ацетат и аспарат. В качестве буферных агентов могут использоваться такие аминокислоты, как гистидин и глутаминовая кислота.

В. Стабилизаторы и наполнители.

Стабилизаторы включают класс соединений, которые могут служить в качестве криопротекторов, лиопротекторов и стеклообразующих агентов. Криопротекторы действуют для стабилизации белков во время замораживания или когда белки находятся в замороженном состоянии при низких температурах. Лيوпротекторы стабилизируют белки в лиофилизированной твердой лекарственной форме путем сохранения естественных конформационных свойств белка во время стадий дегидратации при лиофилизации. Свойства стекловидного состояния были классифицированы как "прочный" или "хрупкий", в зависимости от релаксационных свойств как функции от температуры. Важно, чтобы криопротекторы, лиопротекторы и стеклообразующие агенты оставались в той же самой фазе, что белок, для оказания влияния на стабильность. Сахара, полимеры и полиолы попадают в эту категорию и иногда играют все три роли.

Полиолы охватывают класс вспомогательных веществ, который включает сахара (например, маннитол, сахарозу, сорбитол) и другие полигидридные спирты (например, глицерин и пропиленгликоль). Полимер полиэтиленгликоль (ПЭГ) включен в эту категорию. Полиолы обычно используют как стабилизирующие вспомогательные вещества и/или агенты для улучшения изотоничности в жидких и лиофилизированных белковых композициях для парентерального введения. Полиолы могут защищать белки от физического и химического распада.

Типичные полиолы C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> включают пропиленгликоль, глицерин, треозу, трейтолу, эритрозу, эритритол, рибозу, арабинозу, арабитол, ликозу, мальтитол, сорбитол, сорбозу, глюкозу, маннозу, маннитол, левулозу, декстрозу, мальтозу, трегалозу, фруктозу, ксилитол, инозитол, галактозу, ксилозу, фруктозу, сахарозу, 1,2,6-гексантриол и т.п. Сахара высших порядков включают декстран, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Восстанавливающие сахара, такие как фруктоза, мальтоза или галактоза, окисляются легче, чем невосстанавливающие сахара. Дополнительные примеры сахароспиртов включают глюцитол, мальтитол, лактитол или изо-мальтулозу. Дополнительные типичные лиопротекторы включают глицерин и желатин, и сахара меллибиозу, мелезитозу, раффинозу, маннотриозу и стахиозу. Примеры восстанавливающих Сахаров включают глюкозу, мальтозу, лактозу, мальтулозу, изо-мальтулозу и лактулозу. Примеры невосстанавливающих Сахаров включают невосстанавливающие гликозиды полигидроксильных соединений, выбираемых из сахароспиртов и других полиспиртов с неразветвленной цепью. Моногликозиды включают соединения, полученные путем снижения дисахаридов, таких как лактоза, мальтоза, лактулоза и мальтулоза.

В некоторых вариантах воплощения изобретения описанные здесь композиции также включают стабилизатор (или комбинацию стабилизаторов), который добавляется в композицию. Термин "стабилизатор" обозначает вспомогательное вещество, способное предотвращать агрегацию или иную физическую деградацию (например, автолиз, дезамидирование, окисление и т.д.) в водном растворе и твердом состоянии. Стабилизаторы, обычно используемые в фармацевтических композициях, включают, но не ограничиваются, сахарозу, трегалозу, маннозу, мальтозу, лактозу, глюкозу, раффинозу, целлобиозу, гентиобиозу, изомальтозу, арабинозу, глюкозамин, фруктозу, маннитол, сорбитол, глицин, аргинин HCl, полигидроксильные соединения, включая такие полисахариды, как декстран, крахмал, гидроксипропиловый крахмал, циклодекстрины, N-метилпирролидин, целлюлозу и гиалуроновую кислоту, натрия хлорид [Carpenter et al., Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)]. В одном варианте воплощения изобретения стабилизатор вводят в концентрации от примерно 0% до примерно 40% в/о. В другом варианте воплощения изобретения стабилизатор вводят в концентрации, по меньшей мере, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30 или 40% в/о. В другом варианте воплощения изобретения стабилизатор вводят в концентрации примерно от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9% до примерно 10% в/о. В еще одном варианте воплощения изобретения стабилизатор вводят в концентрации от примерно 2% до примерно 6% в/о. В еще одном варианте воплощения изобретения стабилизатор вводят в концентрации примерно 4% в/о. В еще одном варианте воплощения изобретения стабилизатор вводят в концентрации примерно 6% в/о.

При необходимости, композиции также включают соответствующие количества агентов, регулирующих объем и осмоляльность, подходящих для формирования лиофилизированной "лепешки". Наполнители могут быть кристаллическими (например, маннитол, глицин) или аморфными (например, сахароза, полимеры, такие как декстран, поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлоза). Другие типичные наполнители включают лактозу, сорбитол, трегалозу или ксилитол. В дополнительном варианте воплощения изобретения наполнитель вводят в концентрации от примерно 0% до примерно 10% в/о. В другом

варианте воплощения изобретения наполнитель вводят в концентрации по меньшей мере 0,2, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 или 9,5% в/о. В еще одном варианте воплощения изобретения наполнитель находится в концентрации примерно 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5% до 5,0% в/о для получения механически и фармацевтически стабильной лепешки.

### С. Сурфактанты.

Белковым молекулам свойственно взаимодействовать с поверхностями, делая их восприимчивыми к адсорбции и денатурации на поверхностях воздух-жидкость, пробирка-жидкость и жидкость-жидкость (силиконовое масло). Такой путь деградации, как отмечалось, был обратнозависим от концентрации белка и приводил к образованию растворимого и нерастворимого белкового агрегата или потери белка из раствора посредством адсорбции на поверхностях. Кроме адсорбции поверхностью контейнера, поверхностно-индуцированная деградация усиливается при физическом воздействии, что может ожидать в время транспортировки и обращения с продуктом.

Сурфактанты обычно используют в белковых композициях для предотвращения поверхностно-индуцированной деградации. Сурфактанты являются амфипатическими молекулами со способностью конкурирующих белков для прилегающих поверхностей. Гидрофобные участки молекул сурфактантов оккупируют положения соприкосновения (например, воздух/жидкость), в то время как гидрофобные участки молекул остаются ориентированными к растворителю. При достаточных концентрациях (обычно в диапазоне критической мицеллярной концентрации детергента) поверхностный слой молекул сурфактанта служит для предотвращения адсорбции белковых молекул на поверхности. Таким образом, сводится к минимуму поверхностно-индуцированная деградация. Наиболее часто используемые сурфактанты представлены эфирами жирных кислот, полиэтоксилатами сорбитана, т.е. полисорбатом 20 и полисорбатом 80 (например, Авонекс®, Нейпоген®, Неуласта®). Последние отличаются только в длине алифатической цепи, придающей молекулам С-12 и С-18 гидрофобный характер, соответственно. Согласно этому, полисорбат-80 более поверхностно активен и имеет меньшую критическую мицеллярную концентрацию, чем полисорбат-20. Сурфактант полоксамер 188 использовали в нескольких представленных на рынках продуктах, таких как Гонал-F®, Нордитропин® и Овидрел®.

Детергенты также могут влиять на термодинамическую конформационную стабильность белков. Опять-таки, эффекты отдельного вспомогательного вещества будут специфичны для отдельных белков. Например, было показано, что полисорбаты снижают стабильность некоторых белков и повышают стабильность других. Дестабилизация детергентом белков может быть рационализирована относительно гидрофобных хвостов молекул детергента, которые могут участвовать в специфическом связывании с частично или полностью нескрученными белками. Такие типы взаимодействий могут вызвать смещение в конформационном равновесии относительно одного отдельного белкового состояния (т.е. повышение воздействия гидрофобных участков белковой молекулы в комплементе для связывания полисорбата). С другой стороны, если нативное состояние белка обладает несколькими гидрофобными поверхностями, связывание детергента с белком в нативном состоянии может стабилизировать конформацию.

Другой аспект полисорбатов состоит в том, что они восприимчивы к окислительной деградации. Часто, в качестве сырьевых материалов, они содержат достаточное количество пероксидов для окисления остатков боковых цепей белка, особенно метионина. Потенциал окислительного повреждения, возникающий при добавлении стабилизатора, указывает на то, что в композициях следует использовать наименьшие эффективные концентрации вспомогательных веществ. Для сурфактантов эффективная концентрация для отдельного белка будет зависеть от механизма стабилизации. Было постулировано, что если механизм стабилизации сурфактантом включает предотвращение поверхностной денатурации, эффективная концентрация будет примерно равна критической мицеллярной концентрации детергента. И наоборот, если механизм стабилизации обусловлен специфическими взаимодействиями белок-детергент, эффективная концентрация сурфактанта будет примерно равна концентрации белка и стехиометрии взаимодействия (Randolph T.W., et al., Pharm Biotechnol., 13:159-75 (2002)).

Кроме того, сурфактанты могут быть добавлены в соответствующих количествах для предотвращения поверхностно-обусловленной агрегации во время замораживания и высушивания [Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)]. Типичные сурфактанты включают анионные, катионные, неионные, цвиттер-ионные и амфотерные сурфактанты, включая сурфактанты, полученные из представленных в природе аминокислот. Анионные сурфактанты включают, не ограничиваясь, натрия лаурилсульфат, диоктил натрия сульфосукцинат и диоктил натрия сульфонат, хенодезоксихолевою кислоту, N-лауроилсаркозин натриевую соль, лития додецилсульфат, 1-октансульфоновой кислоты натриевую соль, натрия холат гидрат, натрия дезоксихолат и гликодезоксихолевою кислоты натриевую соль. Катионные сурфактанты включают, не ограничиваясь, бензалкония хлорид или бензетония хлорид, цетилпиридиния хлорида моногидрат и гексадецилтриметиламмония бромид. Цвиттер-ионные сурфактанты включают, не ограничиваясь, CHAPS, CHAPSO, SB3-10 и SB3-12.

Неионные сурфактанты включают, не ограничиваясь, дигитонин, Тритон X-100, Тритон X-114, Твин-20 и Твин-80. В другом варианте воплощения изобретения сурфактанты включают лауромакрогол 400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтилен гидрогенированное касторовое масло 10, 40, 50 и 60, глице-

рина моностеарат, полисорбат 40, 60, 65 и 80, соевый лецитин и другие фосфолипиды, такие как DOPC, DMPG, DMPC и DOPG; эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу.

Описанные здесь композиции могут дополнительно включать такие сурфактанты, отдельным образом или в смеси в различных соотношениях. В одном варианте воплощения изобретения сурфактант вводят в концентрации от примерно 0% до примерно 5% в/о. В другом варианте воплощения изобретения сурфактант вводят в концентрации, по меньшей мере, 0,001, 0,002, 0,005, 0,007, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 0,7, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 или 4,5% в/о. В другом варианте воплощения изобретения сурфактант вводят в концентрации от примерно 0,001% до примерно 0,5% в/о. В еще одном варианте воплощения изобретения сурфактант вводят в концентрации от примерно 0,004, 0,005, 0,007, 0,01, 0,05 или 0,1% в/о до примерно 0,2% в/о. В еще одном варианте воплощения изобретения сурфактант вводят в концентрации от примерно 0,01% до примерно 0,1% в/о.

В других вариантах воплощения изобретения снижение вязкости достигается при относительно небольшом количестве сурфактанта или его отсутствии, например, 0,1% или менее общего количества сурфактанта, или 0,05% или менее, или 0,01% или менее.

#### D. Аминокислоты.

Аминокислоты используют в белковых композициях в качестве буферов, наполнителей, стабилизаторов и антиоксидантов. Гистидин и глутаминовая кислота используются для буферизации белковых композиций при диапазоне pH 5,5-6,5 и 4,0-5,5 соответственно. Группа имидазола гистидина имеет  $pK_a = 6,0$  и карбоксильная группа боковой цепи глутаминовой кислоты имеет  $pK_a 4,3$ , что делает их подходящими для буферизации в соответствующих диапазонах pH. Глутаминовая кислота присутствует в некоторых композициях (например, Стемген®). Гистидин обычно присутствует в представленных на рынке белковых композициях (например, Ксолаир®, Герцептин®, Рекомбинате®). Он представляет хорошую альтернативу цитрату, буферу, известному как вызывающий чувство покалывания после инъекции. Интересным является тот факт, что гистидин, как сообщалось, обладает стабилизирующим эффектом при использовании в высоких концентрациях в жидкой и лиофилизированной композиции (Chen B, et al., *Pharm Res.*, 20(12): 1952-60 (2003)). Отмечается, что гистидин (до 60 мМ) снижает вязкость композиции с высокой концентрацией такого антитела. Однако в этом же исследовании авторы отмечали повышенную агрегацию и обесцвечивание в композициях, содержащих гистидин, во время исследований замораживания-оттаивания антитела в контейнерах из нержавеющей стали. Авторы связали это с эффектом ионов железа, высвобождаемых при коррозии стальных контейнеров. Другой факт, который следует учитывать, представлен тем, что гистидин подвергается фотоокислению в присутствии ионов металлов (Tomita M, et al., *Biochemistry*, 8(12): 5149-60 (1969)). Использование метионина в качестве антиоксиданта в композициях оказывается многообещающим; отмечалась его эффективность относительно целого ряда окислительных стрессов (Lam XM, et al., *J Pharm Sci.*, 86(11): 1250-5 (1997)).

Аминокислоты глицин, пролин, серин и аланин стабилизируют белки. Глицин обычно используют как наполнитель в лиофилизированных композициях (например, Неумег®®, Генотропин®, Хуматроп®®). Была показана эффективность аргинина как эффективного агента в ингибировании агрегации, а также использовании его в жидкой и лиофилизированной композициях (например, Активаз®®, Авонекс®®, Энбрел®® раствор).

#### E. Антиоксиданты.

Окисление белковых остатков возникает в результате различных причин. В отсутствие добавления специфических антиоксидантов, предотвращение окислительного повреждения белка включает тщательный контроль целого ряда факторов в ходе процесса производства и хранения продукта, такого как атмосферный кислород, температура, воздействие света и химическое загрязнение. Наиболее часто используемые фармацевтические антиоксиданты являются восстанавливающими агентами, кислородными/не содержащими радикалы сквенжерами или хелатными агентами. Антиоксиданты в терапевтических белковых композициях должны быть растворимы в воде и оставаться активными в течение периода хранения продукта.

Восстанавливающие агенты и кислородные/не содержащие радикалы сквенжеры действуют путем абляции активного кислорода в растворе. Хелатные агенты, такие как ЭДТА, могут быть эффективными при связывании следовых загрязнителей-металлов, способствующих образованию свободного радикала. Например, ЭДТА использовали в жидкой композиции кислого фактора роста фибробластов для ингибирования каталитического окисления металлического иона в остатках цистеина. ЭДТА использовали в представленных на рынке продуктах, таких как Кинерет®® и Онтак®®. Однако сами по себе антиоксиданты могут индуцировать другие ковалентные или физические изменения в белке. В литературе сообщен целый ряд таких случаев. Восстанавливающие агенты (такие как глутатион) могут вызвать разрушение межмолекулярных дисульфидных связей, что может привести к перемещению дисульфида. В присутствии ионов переходных металлов, аскорбиновая кислота и ЭДТА способствовали окислению метионина в целом ряде белков и пептидов (Akers MJ, and Defelippis MR. *Peptides and Proteins as Parenteral Solutions*. In: *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, editors. Pharmaceutical Science. Taylor and Francis, UK (1999)); Fransson J.R., *J. Pharm. Sci.* 86(9): 4046-1050 (1997);



Yin J, et al., *Pharm Res.*, 21(12): 2377-83 (2004). Сообщалось, что натрия тиосульфат снижает уровни окисления метионина, вызванного светом и температурой в rhuMab HER2; однако в этом исследовании также сообщалось об образовании аддукта тиосульфат-белок (Lam XM, Yang JY, et al., *J Pharm Sci.* 86(11):1250-5 (1997)). Выбор соответствующего антиоксиданта производится на основе специфического стресса и чувствительности белка.

#### Ф. Ионы металлов.

В целом, ионы переходных металлов нежелательны в белковых композициях, поскольку они могут катализировать реакции физического и химического распада в белках. Однако отдельные ионы металлов включены в композиции, т.к. они являются кофакторами для белков и в суспензиях композиций белков, где они образуют координационные комплексы (например, цинк в суспензии инсулина). Недавно было показано, что использование ионов кальция (10-120 мМ) ингибировало изомеризацию аспартагной кислоты в изоаспартагную кислоту (WO 2004/039337).

Два примера, в которых ионы металлов придают стабильность или повышают активность в белках, представлены дезоксирибонуклеазой человека (рчДНКазы, Пулмозим®) и Фактором VIII. В случае с рчДНКазой, ионы  $\text{Ca}^{+2}$  (до 100 мМ) повышали стабильность фермента посредством специфического сайта связывания (Chen B, et al., *J Pharm Sci.*, 88(4): 477-82 (1999)). По сути, удаление ионов кальция из растворов с использованием ЭДТА вызвало повышение дезамидации и агрегации. Однако данный эффект отмечался только для ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ; другие двухвалентные катионы  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  и  $\text{Zn}^{+2}$  дестабилизировали рчДНКазу. Подобные эффекты отмечались для Фактора VIII. Ионы  $\text{Ca}^{+2}$  и  $\text{Sr}^{+2}$  стабилизировали белок, в то время как другие ионы  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  и  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  и  $\text{Fe}^{+2}$  дестабилизировали фермент (Fatouros, A., et al., *Int. J. Pharm.*, 155, 121-131 (1997)). В отдельном исследовании с Фактором VIII существенное повышение в скорости агрегации отмечалось в присутствии ионов  $\text{Al}^{+3}$  (Derrick TS, et al., *J. Pharm. Sci.*, 93(10): 2549-57 (2004)). Авторы отмечают, что другие вспомогательные вещества, такие как буферные соли, часто загрязнены ионами  $\text{Al}^{+3}$ , и указывают на необходимость использования вспомогательного вещества надлежащего качества в композициях.

#### Г. Консерванты.

Консерванты необходимы при разработке парентеральных композиций множественного применения, которые подразумевают более одного извлечения из одного и того же контейнера. Первичная функция их заключается в ингибировании роста микроорганизмов и обеспечения стерильности продукта во время периода хранения или соблюдения условий использования лекарственного препарата. Часто используемые консерванты включают фенол, бензиловый спирт, мета-крезол, алкил парабены, такие как метилпарабен или пропилпарабен, бензалкония хлорид и бензетония хлорид. Другие примеры соединений с антибактериальной активностью консерванта включают октадецилдиметилбензил аммония хлорид, гексаметония хлорид. Другие типы консервантов включают ароматические спирты, такие как бутиловый спирт, фенол, бензиловый спирт; атохол, резорцинол, циклогексанол, 3-пентанол. Несмотря на то, что консерванты используют давно, разработка белковых композиций, включающих консерванты, может быть проблематичной. Консерванты практически всегда обладают дестабилизирующим эффектом (агрегацией) на белки, и это стало основным фактором в ограничении их использования в белковых композициях с множественными дозами (Roy S, et al., *J Pharm Sci.*, 94(2): 382-96 (2005)).

Шприц для введения с множественными дозами включает композиции с консервантами. Например, композиции чГР представлены на рынке в данный момент. Нордитропин® (жидкость, Novo Nordisk), Нутропин AQ® (жидкость, Genentech) и Генотропин (лиофилизированный - картридж с двойной камерой, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как Соматроп® (Eli Lilly) включает м-крезол.

Во время разработки дозировки композиции с консервантами следует учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в препарате должна быть оптимизирована. Это требует тестирования отдельного консерванта в лекарственной форме с диапазонами концентраций, которые придают противобактериальную эффективность без нарушения стабильности белка. Например, три консерванта были подвергнуты успешному скринингу в разработке жидкой композиции для рецептора интерлейкина-1 (Тип I) с использованием дифференциально сканирующей калориметрии (ДСК). Консерванты были ранжированы на основе их влияния на стабильность при концентрациях, обычно используемых в представленных на рынке продуктах (Remmele RL Jr., et al., *Pharm Res.*, 15(2): 200-8 (1998)).

Некоторые консерванты могут вызвать реакции в месте введения, что является другим фактором, требующим учета при выборе консерванта. В клинических исследованиях, направленных на оценку консервантов и буферов в Нордитропине, ощущение боли было ниже в композициях, содержащих фенол и бензиловый спирт в сравнении с композицией с т-крезолом (Kappelgaard A.M., *Horm Res.* 62 Suppl 3:98-103 (2004)). Интересным является то, что среди обычно используемых консервантов бензиловый спирт обладает анестезирующими свойствами (Minogue SC, and Sun DA., *Anesth Analg.*, 100(3): 683-6 (2005)).

#### IV. Наборы.

Как дополнительный аспект, изобретение описывает наборы, включающие одну или более описанных здесь композиций, упакованных таким образом, что это облегчает их использование для введения субъектам. В одном варианте воплощения изобретения такой набор включает описанную здесь компози-

цию (например, композицию, включающую любое описанное здесь антители), упакованную в контейнер, такой как герметично закрытый флакон, сосуд, ампула однократного или многократного использования, предварительно заполненный шприц или предварительно наполненное устройство для инъекций, в некоторых случаях с этикеткой, размещенной на контейнере или включенной в упаковку с описанием соединения или композиции и способа использования. В одном аспекте, соединение или композиция упакованы в виде дозированной лекарственной формы. Набор может дополнительно включать устройства, подходящие для введения композиции специфическим путем введения. Преимущественно, набор включает этикетку с описанием использования описанного здесь антитела или описанной здесь композиции.

#### V. Дозы.

Режим введения доз, используемый в способе лечения описанного здесь состояния, будет определен лечащим доктором с учетом различных факторов, модифицирующих действие препаратов, например, возраста, массы тела, состояния, пола и диеты пациента, степени тяжести инфекции, времени введения и других клинических факторов. В различных аспектах ежедневный режим заключается в диапазоне 0,1-50 мг препарата антитела на кг массы тела (рассчитывается как масса белка, без химической модификации). В некоторых вариантах воплощения изобретения доза составляет от примерно 0,5 мг/кг до 20 мг/кг, или примерно 0,5-10 мг/кг.

Композиции обычно вводят парентерально, например, внутривенно, подкожно, внутримышечно, посредством аэрозоля (интрапульмонально или ингаляционно), или посредством депо для долгосрочного высвобождения. В некоторых вариантах воплощения изобретения композицию вводят внутривенно, сначала болюсно, потом путем продолжительной инфузии для поддержания терапевтических циркулирующих уровней лекарственного препарата. В других вариантах воплощения изобретения композицию вводят в виде однократной дозы. Специалист в данной области легко сможет оптимизировать эффективные дозы и режимы введения с помощью надлежащей медицинской практики и с учетом клинического состояния отдельного пациента. Частота введения дозы будет зависеть от фармакокинетических параметров агентов и пути введения. Оптимальная фармацевтическая композиция будет определена специалистом в данной области в зависимости от путей введения и требуемой дозы. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) страницы 1435-1712, содержание которой включено сюда посредством ссылки. Такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, степень высвобождения *in vivo*, скорости клиренса *in vivo* введенных агентов. В зависимости от пути введения, подходящая доза может быть рассчитана в соответствии с массой тела, площадью поверхности тела или размера органа. Необходимы дополнительные расчеты для определения соответствующей дозы для лечения, включающей каждую из указанных выше композиций, такие расчеты могут использоваться специалистом в данной области без неоправданных экспериментов, особенно в свете информации о дозе и описанных здесь анализов, а также фармакокинетических данных, отмеченных в ходе клинических исследований человека, описанных выше. Соответствующая доза может быть установлена посредством общепринятых анализов для определения уровней доз в крови в сочетании с соответствующими данными ответа на дозу. Финальный режим приема доз будет определен лечащим врачом с учетом различных факторов, модифицирующих действие препаратов, например, специфической активности препаратов, степени тяжести повреждения и реакции пациента, возраста, состояния, массы тела, пола и диеты пациента, степени тяжести инъекции, времени введения и других клинических факторов. Поскольку исследования проводятся в данный момент, возникнет дополнительная информация о соответствующих уровнях дозы и продолжительности лечения для различных заболеваний и состояний.

#### VI. Терапевтическое использование композиции.

Описанные здесь композиции используют для лечения или профилактики связанных с костью нарушений, таких как связанные с костью нарушения, ассоциированные с аномальной активностью остеобластов или остеокластов. В некоторых вариантах воплощения изобретения композицию вводят субъекту, страдающему от связанного с костью нарушения, выбираемого из группы, состоящей из следующих заболеваний: ахондроплазия, клейдокраниальный дизостоз, энхондроматоз, фиброзная дисплазия, болезнь Гоше, гипофосфатемический рахит, синдром Марфана, множественный наследственный экзостоз, нейрофиброматоз, незавершенный остеогенез, остеопетроз, остеопойкилоз, склеротические поражения, псевдоартрит, пиогенный остеомиелит, периодонтальная болезнь, потеря кости, вызванная противопищевыми препаратами, первичный или вторичный гиперпаратирозидизм, синдром наследственного гиперпаратирозидизма, потеря кости, вызванная состоянием невесомости, остеопороз у мужчин, постменопаузальная потеря кости, остеоартрит, почечная остеодистрофия, инфильтративные нарушения кости, потеря кости в ротовой полости, остеонекроз челюсти, ювенильная болезнь Паджета, мелореостоз, метаболическая болезнь кости, мастоцитоз, серповидноклеточная анемия/болезнь, потеря кости, вызванная трансплантацией органов, потеря кости, вызванная трансплантацией почки, системная красная волчанка, анкилозирующий спондилит, эпилепсия, ювенильный артрит, талассемия, мукополисахаридоз, болезнь Фабри, синдром Тернера, синдром Дауна, синдром Клайнфельтера, лепра, болезнь Пертеса, подростковый идиопатический сколиоз, мультисистемное воспалительное заболевание младенцев, синдром Уинчестера, болезнь Менкеса, болезнь Уилсона, ишемическая костная болезнь (такая как болезнь Легг-Кальве-

Пертеса или региональные мигрирующий остеопороз), состояния анемии, состояния, вызванные стероидами, потеря кости, вызванная глюкокортикоидами, потеря кости, вызванная гепарином, нарушения костного мозга, цинга, нарушение питания, дефицит кальция, остеопороз, остеопения, алкоголизм, хроническое заболевание печени, постменопаузальное состояние, хронические воспалительные состояния, ревматоидный артрит, воспалительная болезнь кишечника, язвенный колит, воспалительный колит, болезнь Крона, олигоменорея, аменорея, беременность, сахарный диабет, гипертириозидизм, нарушения щитовидной железы, нарушения паращитовидной железы, болезнь Кушинга, акромегалия, гипогонадия, иммобилизация или дисфункция, синдром симпатической рефлексорной дистрофии, региональный остеопороз, размягчение костей, потеря кости, связанная с заменой сустава, ВИЧ-ассоциированная потеря кости, потеря кости, вызванная недостатком гормона роста, потеря кости, вызванная кистозным фиброзом, потеря кости, вызванная химиотерапией, потеря кости, вызванная опухолью, потеря кости, вызванная раком, потеря кости, вызванная абляционной терапией гормонами, множественная миелома, потеря кости, вызванная препаратами, нервная анорексия, потеря кости лица, вызванная заболеванием, потеря кости черепа, вызванная заболеванием, потеря кости челюсти, вызванная заболеванием, потеря кости свода черепа, вызванная заболеванием, потеря кости, вызванная старением, потеря кости лица, вызванная старением, потеря кости черепа, вызванная старением, потеря кости челюсти, вызванная старением, потеря кости свода черепа, вызванная старением, или потеря кости, вызванная полетом в космос.

В некоторых вариантах воплощения изобретения описанные здесь композиции используют для улучшения результатов ортопедических процедур, стоматологических процедур, имплантации, замены сустава, забора кости, косметической операции на кости и восстановления кости, такого как заживление перелома, заживление без сращения, замедленное заживление со сращением и реконструкция костей лица. Одна или несколько композиций могут вводиться до, во время и/или после процедуры, замены, отбора, операции или восстановления.

Композиция не обязательно должна лечить пациента от нарушения или полностью защищать от возникновения связанного с костью нарушения для достижения преимущественного биологического ответа. Композиция может использоваться профилактически, обозначая защиту, в целом или частично, от связанного с костью нарушения или его симптома. Композиция также может использоваться терапевтически для снижения, в целом или частично, связанного с костью нарушения или его симптома, или для защиты, в целом или частично, от дальнейшего прогрессирования связанного с костью нарушения или его симптома. На самом деле, материалы и способы по изобретению особенно используют для повышения минеральной плотности кости и поддержания повышенной минеральной плотности кости в течение периода времени.

Одно или несколько введений описанной здесь композиции может проводиться в течение периода лечения, например, от примерно 1 месяца до примерно 12 месяцев (например, примерно 2 месяца, примерно 3 месяца, примерно 4 месяца, примерно 5 месяцев, примерно 6 месяцев, примерно 7 месяцев, примерно 8 месяцев, примерно 9 месяцев, примерно 10 месяцев или примерно 11 месяцев). В некоторых вариантах воплощения изобретения субъекту вводят одну или более доз композиции для поддержания минеральной плотности кости. Термин "поддержание минеральной плотности кости" в контексте данного изобретения обозначает, что повышенная минеральная плотность кости после первичной дозы композиции не падает ниже примерно 1% до примерно 5% в ходе примерно 6 месяцев, примерно 9 месяцев, примерно 1 года, примерно 18 месяцев, примерно 2 лет или в течение жизни пациента. Очевидно, что пациент может потребовать другие фазы лечения для повышения плотности кости и поддержания плотности кости.

Кроме того, может быть преимущественным введение множественных доз в композиции или отдельных введений доз, в зависимости от режима лечения, выбранного для отдельного пациента. Композиция может быть введена периодически в течение периода времени одного года или менее (например, 9 месяцев или менее, 6 месяцев или менее, или 3 месяцев или менее). В этом отношении композиция может быть введена человеку каждые примерно 7 дней, или 2 недель, или 3 недель, или 1 месяца, или 5 недель, или 6 недель, или 7 недель, или 2 месяцев, или 9 недель, или 10 недель, или 11 недель, или 3 месяцев, или 13 недель, или 14 недель, или 15 недель, или 4 месяцев, или 17 недель, или 18 недель, или 19 недель, или 5 месяцев, или 21 недель, или 22 недель, или 23 недель, или 6 месяцев, или 12 месяцев.

#### VII. Комбинированная терапия.

Лечение патологии путем комбинации двух или более агентов, поражающих один и тот же патоген или биохимический путь иногда приводит к большей эффективности и снижает побочные эффекты при использовании терапевтически релевантной дозы каждого агента поодиночке. В некоторых случаях эффективность комбинации препаратов аддитивна (эффективность комбинации примерно равна сумме эффектов каждого препарата отдельно), но в некоторых случаях эффект может быть синергичным (эффект комбинации больше, чем сумма эффектов каждого препарата отдельно). В контексте данного изобретения термин "комбинированная терапия" обозначает два соединения, которые могут быть доставлены одним способом, например, одновременно, или если одно из соединений вводят вначале с последующим введением второго агента, т.е. последовательно. Необходимый результат может быть предоставлен субъективным снижением одного или более симптомов или объективным идентифицируемым улучшением у

реципиента после введения дозы.

В некоторых вариантах воплощения изобретения композицию вводят вместе со стандартными препаратами для лечения пониженной минеральной плотности кости. В контексте данного изобретения термин "стандартные препараты" обозначает лечение, являющееся общепринятым докторами для определенного типа пациента с диагностированным типом заболевания. В некоторых вариантах воплощения изобретения стандартные препараты выбирают из группы, состоящей из антирезорбтивных препаратов, костеобразующего агента, антагониста рецептора эстрогена (включая, не ограничиваясь, ралоксифен, базедоксифен и лазофоксифен) и препарат со стимулирующим эффектом на остеокласты. В некоторых вариантах воплощения изобретения антирезорбтивный препарат включает, не ограничиваясь, бифосфонат (включая, не ограничиваясь, алендронат, ризендронат, ибадронат и золендронат), эстроген или аналог эстрогена, селективный модулятор рецептора эстрогена (SERM) и источник кальция, Тиболон, кальцитонин, кальцитриол и гормонозаместительную терапию. В некоторых вариантах воплощения изобретения костнообразующий агент включает, не ограничиваясь, паратиреоидный гормон (ПТГ) или его пептидный фрагмент, ПТГ-родственный белок (ПТГ-рб), костный морфогенетический белок, остеоенин, NaF, агонист PGE<sub>2</sub>, статины и лиганд RANK (RANKL). В некоторых вариантах воплощения изобретения препарат со стимулирующим эффектом на остеокласты включает, не ограничиваясь, витамин D или производное витамина D, или его миметик.

В некоторых вариантах воплощения изобретения композицию вводят субъекту при противопоказании описанного здесь лечения стандартными препаратами.

### Примеры

Пример 1. Кальция ацетат снижает эффективную вязкость композиций с антителом к склеростину.

10 мл выбранного антитела к склеростину (75,7 мг/мл) было диализировано относительно 2 л 10 мМ Na(OAc) и 9% сахарозы при 4°C в течение 2 ч. Выбранное антитело к склеростину (75,7 мг/мл) было сконцентрировано до примерно 160 мг/мл и разбавлено водой до примерно 140 мг/мл и 120 мг/мл. Определенное поглощение разведенных образцов составило 120, 142 и 157 мг/мл, соответственно.

10 мкл 1,0 М Ca(OAc)<sub>2</sub> было добавлено до 1 мл 120 мг/мл, 140 мг/мл и 160 мг/мл образцов. Абсолютная вязкость, pH и осмоляльность образцов была определена (см. табл. 2). Абсолютная вязкость образцов (500 мкл) измеряется с использованием вискозиметра с конусом и плоскостью Brookfield LV-DVII со шпинделем CPE-40 с температурой соответствующей пробирки для образцов, которая регулируется циркулирующей водяной баней при постоянном значении 25°C.

Таблица 2

Образец	Вязкость (сП)	pH	Осмоляльность
120 мг/мл (контроль)	18	5,3	375
120 мг/мл + 10 мМ Ca(OAc) <sub>2</sub>	8,4	5,4	398
142 мг/мл + 10 мМ Ca(OAc) <sub>2</sub>	17	5,4	450
157 мг/мл + 10 мМ Ca(OAc) <sub>2</sub>	36	5,4	610

Результаты показали, что 10 мМ Ca(OAc)<sub>2</sub>, введенные в жидкую композицию выбранного антитела, снижали вязкость примерно на половину. Данный эксперимент проводился для каждого антитела AT-4, AT-5, AT-13, AT-14, AT-19, AT-20 и AT-23.

Пример 2. Коррекция композиции.

10 мл выбранного антитела к склеростину (75,7 мг/мл) было диализировано относительно 2 л 10 мМ Na(OAc) и 6% сахарозы или 4% сахарозы при 4°C в течение 2 ч. Затем каждая композиция с сахарозой была сконцентрирована с использованием фильтров Amicon примерно до 140 мг/мл, затем разведена водой до указанных концентраций (т.е. 120 мг/мл, 140 мг/мл и 160 мг/мл). Значения поглощения разведенных образцов были определены и составили 124 мг/мл (4% сахарозы), 119,5 мг/мл (6% сахарозы), 137,5 мг/мл (4% сахарозы) и 142 мг/мл (6% сахарозы), соответственно. 10 мкл 1,0М Ca(OAc)<sub>2</sub> было добавлено к 1 мл образцов. Вязкость, pH и осмоляльность образцов была определена (см. табл. 3).

Таблица 3

Образец	мМ	мг/мл	pH	Осмоляльность	Вязкость (сП)
120 мг/мл + 10 мМ CaOAc + 4% сахарозы	10	124	5,285	214	6,2
120 мг/мл + 10 мМ CaOAc + 6% сахарозы	10	119,5	5,25	282	5,7
140 мг/мл + 10 мМ CaOAc + 4% сахарозы	10	137,5	5,303	231	9,5
140 мг/мл + 10 мМ CaOAc + 6% сахарозы	10	142	5,307	294	11

Анализ был повторен следующим образом: 10 мл выбранного антитела к склеростину (75,7 мг/мл) было диализировано относительно 2 л 10 мМ Na(OAc), 6% сахарозы или 4% сахарозы при 4°C в течение

2 ч. Каждая композиция с сахарозой была сконцентрирована с использованием фильтра Amicon примерно до 140 мг/мл, затем разведена водой до указанных концентрацией (т.е. 70 мг/мл, 100 мг/мл и 120 мг/мл). Определенные значения поглощения разведенных образцов составили 71 мг/мл (4% сахароза), 68,2 мг/мл (6% сахарозы), 99,4 мг/мл (4% сахарозы), 100,5 мг/мл (6% сахарозы), 122 мг/мл (4% сахарозы) и 113 мг/мл (6% сахарозы), соответственно. pH, осмоляльность и вязкость образцов были определены. См. табл. 4.

Таблица 4

Образец	мМ	мг/мл	pH	Осмоляль- ность	Вязкость (сП)
70 мг/мл + 4% сахарозы	10	71	5,205	154	3,5
70 мг/мл + 10 мМ СаОАС + 4% сахарозы	10	71	5,233	183	2,2
70 мг/мл 6% сахарозы	10	68,2	5,201	231	3,4
70 мг/мл + 10 мМ СаОАС + 6% сахарозы	10	68,2	5,279	256	2,4
100 мг/мл + 4% сахарозы	10	99,4	5,265	165	8,1
100 мг/мл + 10 мМ СаОАС +4% сахарозы	10	99,4	5,288	191	4,1
100 мг/мл + 6% сахарозы	10	100,5	5,273	241	8,4
100 мг/мл + 10 мМ СаОАС +6% сахарозы	10	100,5	5,303	270	4,3
120 мг/мл + 4% сахарозы	10	122	5,295	177	15,6
120 мг/мл + 10 мМ СаОАС +4% сахарозы	10	122	5,306	202	6,9
120 мг/мл + 6% сахарозы	10	113	5,3	249	15,4
120 мг/мл + 10 мМ СаОАС + 6% сахарозы	10	113	5,311	274	6,6

Понижение pH буфера Са(ОАС)<sub>2</sub> до 5,2 поддерживало все значения pH финальной композиции между 5,25 и 5,307.

Композиции с 4% сахарозой были ниже диапазона изотоничности (250-350 мОсм/кг), однако композиции с 6% сахарозой были около диапазона изотоничности.

Для дальнейшей оценки эффекта 6% сахарозы с 10 мМ Са(ОАС)<sub>2</sub> в снижении вязкости, был повторен указанный выше анализ с дополнительными концентрациями антитела к склеростину до 160 мг/мл. Образцы были приготовлены, как это описано выше, со следующими концентрациями: 120 мг/мл, 140 мг/мл и 160 мг/мл. 10 мкл 1,0М Са(ОАС)<sub>2</sub>, pH 5,2, было добавлено к каждому образцу. pH, осмоляльность и вязкость образцов были определены. См. табл. 5.

Таблица 5

Образец	мМ	мг/мл	pH	Осмоляльность	Вязкость (сП)
100 мг/мл + 10 мМ СаОАС +6% сахарозы	10	107	5,285	271	4,3
100 мг/мл + 10 мМ СаОАС +6% сахарозы	10	107	5,285	277	4,3
120 мг/мл + 10 мМ СаОАС +6% сахарозы	10	120	5,311	279	6,1
120 мг/мл + 10 мМ СаОАС +6% сахарозы	10	120	5,311	278	6
140 мг/мл + 10 мМ СаОАС +6% сахарозы	10	145	5,329	X	12
140 мг/мл + 10 мМ СаОАС +6% сахарозы	10	145	5,329	309	11,7
160 мг/мл + 10 мМ СаОАС +6% сахарозы	10	168,7	5,343	X	18,8
160 мг/мл + 10 мМ СаОАС +6% сахарозы	10	168,7	5,343	X	18,8

Данный эксперимент проводился для каждого антитела АТ-4, АТ-5, АТ-13, АТ-14, АТ-19, АТ-20 и АТ-23.

Пример 3. Эффект кальция ацетата в других композициях с высоким содержанием белка.

В примере ниже определяли снижения кальция ацетатом вязкости композиций, содержащих высокую концентрацию белка, кроме антитела к склеростину.

Антитела, не являющиеся антителами к склеростину, #1-#5, как было определено, имели концентрацию 131,6 мг/мл, 94 мг/мл, 113,2 мг/мл, 50 мг/мл и 106,3 мг/мл, соответственно. Термин "антитело, не являющееся антителом к склеростину" в контексте данного изобретения обозначает антитело, отличное от описанного здесь антитела к склеростину. 10 мкл 1,0М Ca(OAc)<sub>2</sub> было добавлено к 1 мл 5 образцов, указанных выше. Вязкость, pH и осмоляльность образцов была определена (см. табл. 6).

Таблица 6

Образец	мг/мл	Вязкость (сП)
Антитело, не являющееся антителом к склеростину #1	94	6,8
Антитело, не являющееся антителом к склеростину #1 + 10 мМ Ca(OAc) <sub>2</sub>	94	5,10
Антитело, не являющееся антителом к склеростину #2	135	9,8
Антитело, не являющееся антителом к склеростину #2 + 10 мМ Ca(OAc) <sub>2</sub>	135	8,3
Белок #1	50	3,3
Белок #1 + 10 мМ Ca(OAc) <sub>2</sub>	50	3,2
Белок #1	106,3	16,6
Белок #1 + 10 мМ Ca(OAc) <sub>2</sub>	106,3	15,6

Кальция ацетат не существенно снижал вязкость любого из образцов.

Пример 4. Эффект некальциевых солей на вязкость композиции с высоким содержанием антитела к склеростину.

Представленный ниже эксперимент проводили для определения способности некальциевых солей снижать вязкость композиции с антителом к склеростину. Выбранное антитело к склеростину (такое же, как в примерах 1-2 выше) было сконцентрировано до ~130 мг/мл. 10 мкл 1,0М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> или 1,0М MgSO<sub>4</sub> было добавлено к 1 мл образца антитела. Вязкость контроля была определена как 30сП. Было определено, что MgSO<sub>4</sub> по существу снижал вязкость образца (MgSO<sub>4</sub>+образец = 16 сП). (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> незначительно снижал вязкость образца.

Пример 5. Эффект других кальциевых солей на вязкость композиции с высоким содержанием антитела к склеростину.

Представленный ниже эксперимент проводили для определения способности других кальциевых солей, кроме кальция ацетата, снижать вязкость композиции с антителом к склеростину. Выбранное антитело к склеростину (такое же, как в примерах 1-2 выше) было сконцентрировано до ~125 мг/мл. 10 мкл 25 мМ CaCl<sub>2</sub> или 25 мМ MgCl<sub>2</sub> было добавлено 1 мл образца антитела. Вязкость контроля была определена как 18,5 сП. Было определено, что CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> по существу снижают вязкость образца (CaCl<sub>2</sub> + образец = 9 сП и MgCl<sub>2</sub> + образец = 8).

Пример 6. Эффект кальция ацетата на другое антитело к склеростину.

Данный эксперимент проводили для определения способности кальция ацетата снижать вязкость композиции с антителом к склеростину, включающей другое антитело к склеростину, чем в примерах 1-2 выше.

Выбранное антитело к склеростину было сконцентрировано до ~131 мг/мл. 10 мкл 1,0М Ca(OAc)<sub>2</sub> было добавлено к 1 мл образца антитела. Вязкость контроля была определена как 17,3 сП. Было выявлено, что Ca(OAc)<sub>2</sub> незначительно снижает вязкость образца (15,3 сП).

Многочисленные модификации и вариации при использовании изобретения станут очевидными для специалиста в данной области с учетом представленных здесь вариантов воплощения изобретения. Вследствие этого, единственное ограничение, которое применимо к изобретению, представлено в прилагаемой формуле изобретения.

Все патенты США, публикации заявок на патенты США, заявки на патенты США, иностранные патенты, заявки на иностранные патенты и непатентные заявки, указанные в тексте данной заявки и/или перечисленные в Инструкции по применению, включены сюда во всей своей полноте посредством ссылок.

Исходя из вышеизложенного, станет очевидно, что, несмотря на то, что специфические варианты воплощения изобретения были описаны здесь только в иллюстративных целях, различные модификации могут быть произведены без отклонения от сущности и объема изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стерильная жидкая композиция с абсолютной вязкостью около 10 сП или менее, содержащая:
  - (а) иммуноглобулин против склеростина в концентрации от 70 до 120 мг/мл, где иммуноглобулин против склеростина содержит определяющие комплементарность участки (CDR) с SEQ ID NO: 73-78;
  - (b) кальция ацетат в концентрации, где концентрация катиона кальция составляет по меньшей мере 5 мМ и не превышает 15 мМ и концентрация аниона ацетата составляет от около 10 до 90 мМ; и
  - (с) сахарозу в количестве от 4 до 6 мас./об. %.
2. Композиция по п.1, где композиция содержит общую концентрацию ацетата от 30 до 90 мМ или от 30 до 75 мМ.
3. Композиция по п.1 или 2, где концентрация ацетата составляет от 50 до 90 мМ.
4. Композиция по любому из пп.1-3, где общая осмоляльность составляет менее чем около 350 мОсм/л.
5. Композиция по любому из пп.1-4, где иммуноглобулин присутствует в концентрации 90 мг/мл.
6. Композиция по любому из пп.1-5, где абсолютная вязкость композиции составляет 8 сП или менее.
7. Композиция по п.6, где вязкость такой композиции составляет 6 сП или менее.
8. Композиция по любому из пп.1-7, где такая композиция имеет значение рН, составляющее от 4,5 до 6.
9. Композиция по п.8, где такая композиция имеет значение рН, составляющее от 5 до 5,5.
10. Стерильная жидкая композиция для доставки высокой концентрации иммуноглобулина против склеростина, имеющая абсолютную вязкость 10 сП или менее, содержащая:
  - (а) иммуноглобулин против склеростина с тяжелой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и с легкой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 в концентрации 90 мг/мл;
  - (b) кальция ацетат, где концентрация катиона кальция составляет по меньшей мере 5 мМ и не превышает 15 мМ и концентрация аниона ацетата составляет от 10 до 90 мМ; и
  - (с) сахарозу в количестве от 4 до 6 мас./об. %.
11. Применение терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп.1-10 для получения лекарственного препарата для лечения остеопороза у пациента.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2

---