

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043928**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.06

(21) Номер заявки
201990598

(22) Дата подачи заявки
2017.08.30

(51) Int. Cl. *A61K 9/08* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)

**(54) ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫЕ НИЗКОВЯЗКИЕ ПРЕПАРАТЫ
ИНГИБИРУЮЩЕГО MASP-2 АНТИТЕЛА, НАБОРЫ И СПОСОБЫ**

(31) 62/382,156

(32) 2016.08.31

(33) US

(43) 2019.07.31

(86) PCT/US2017/049415

(87) WO 2018/045054 2018.03.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОМЕРОС КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
**Демопулос Грегори А., Фергюсон
Кеннет М., Ламберт Уилльям Джозеф,
Уайтейкер Джон Стивен (US)**

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

(56) US-A1-20140341885
US-A1-20120282263
WO-A1-2016034648
US-A1-20150166676
FITCH et al.: "Arginine: Its pKa value
revisited", Protein Science, 22 March 2015
(22.03.2015), vol. 24, pgs. 752-761, entire document

(57) Изобретение относится к стабильным высококонцентрированным низковязким препаратам ингибирующих MASP-2 антител, наборам, включающим препараты, и терапевтическим способам применения препаратов и наборов для ингибирования неблагоприятных эффектов зависимой от MASP-2 активации комплемента.

B1

043928

043928

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США № 62/382156, поданной 31 августа 2016 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к стабильным высококонцентрированным низковязким препаратам ингибирующих MASP-2 антител, наборам, включающим препараты, и терапевтическим способам применения препаратов и наборов для ингибирования неблагоприятных эффектов зависимой от MASP-2 активации комплемента.

Заявление, относящееся к списку последовательностей

Список последовательностей, связанный с настоящей заявкой, предоставлен в текстовом формате вместо бумажной копии и включен в настоящую заявку посредством ссылки. Текстовый файл, содержащий список последовательностей, имеет название MP_1_0261_PCT_SequenceListing_20170809_ST25. Текстовый файл имеет размер 17 КВ; он был создан 9 августа 2017 г. и подан через EFS-Web при подаче настоящей заявки.

Предпосылки создания изобретения

Терапевтические средства на основе антител, как правило, вводят на регулярной основе, и часто требуется введение инъекцией дозы, составляющей несколько мг/кг. Предпочтительной формой доставки при лечении хронических состояний является амбулаторное введение высокой дозы моноклональных антител (несколько мг на кг массы тела) подкожной (п/к) инъекцией (Stockwin & Holmes, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 3:1133-1152 (2003); Shire et al., *J. Pharm. Sci.*, 93:1390-1402 (2004)). Желательно использовать высококонцентрированные фармацевтические препараты терапевтического антитела, поскольку в этом случае возможно введение в меньшем объеме и/или меньшее количество введений, что, следовательно, означает меньше дискомфорта для пациента. Кроме того, меньшие объемы допускают упаковку терапевтических доз моноклонального антитела в индивидуальные однократные предварительно заполненные шприцы для самостоятельного введения. Применение для п/к доставки предварительно заполненного шприца или автоинъектора позволяет выполнять инъекцию в домашних условиях, что способствует соблюдению пациентом режима введения лекарственного средства.

Однако при разработке препарата с высокой концентрацией белка возникают проблемы, связанные с физической и химической стабильностью белка, а также сложностью производства, хранения и доставки белкового препарата (см., например, Wang et al., *J. of Pharm. Sci.*, vol. 96(1):1-26 (2007)). Одной из проблем при разработке препаратов с высокой концентрацией белка является зависимость от концентрации вязкость раствора. При определенной концентрации белка вязкость резко меняется в зависимости от препарата. В частности, известно, что моноклональные антитела демонстрируют своеобразные и различные профили зависимости вязкости от концентрации, которые отличаются резким экспоненциальным возрастанием вязкости раствора с увеличением концентрации моноклонального антитела (см., например, Connolly B.D. et al., *Biophysical Journal*, vol. 103:69-78 (2012)). Другой проблемой жидких препаратов при высокой концентрации моноклонального антитела является физическая стабильность белка (Alford et al., *J. Pharm. Sci.*, 97:3005-3021 (2008); Salinas et al., *J. Pharm. Sci.*, 99:82-93 (2010); Sukumar et al., *Pharm. Res.*, 21:1087-1093 (2004)). Вследствие этого высокая вязкость фармацевтических препаратов моноклональных антител при высоких концентрациях наряду с потенциальным снижением стабильности может препятствовать их разработке в качестве препаратов, подходящих для подкожной и/или внутривенной доставки.

Система комплемента играет определенную роль в воспалительном ответе и активируется в результате повреждения тканей или микробной инфекции. Активация комплемента должна регулироваться очень четко, чтобы обеспечивать избирательное нацеливание на внедрившиеся микроорганизмы и избегать причинения вреда организму (Ricklin et al., *Nat. Immunol.*, 11:785-797, 2010). В настоящее время известно, что система комплемента может быть активирована по трем разным путям: классическому пути, лектиновому пути и альтернативному пути. Классический путь, как правило, запускается комплексом, состоящим из антител хозяина, связанных с инородной частицей (т.е. антигеном), и обычно требуется предварительное воздействие антигена для выработки специфических антител. Поскольку активация классического пути зависит от предшествующего адаптивного иммунного ответа хозяина, классический путь является частью приобретенного иммунитета. Напротив, как лектиновый, так и альтернативный пути не зависят от адаптивного иммунитета и являются частью врожденного иммунитета.

Показано, что маннансвязывающая лектин-ассоциированная сериновая протеаза-2 (MASP-2) необходима для функционирования лектинового пути, одного из основных путей активации комплемента (Vorup-Jensen et al., *J. Immunol.*, 165:2093-2100, 2000; Ambrus et al., *J. Immunol.*, 170:1374-1382, 2003; Schwaeble et al., *PNAS*, 108:7523-7528, 2011). Важно отметить, что ингибирование MASP-2, судя по всему, не препятствует функционированию зависимого от антител классического пути активации комплемента, который является чрезвычайно важным компонентом приобретенного иммунного ответа на инфекцию. Как описано в патенте США № 9011860 (правообладателем является Omeros Corporation), содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки, было получено полностью человеческое моноклональное антитело, OMS646, нацеленное на MASP-2 человека, которое связывает

MASP-2 человека с высокой аффинностью и блокирует лектиновый путь активации комплемента и, следовательно, является полезным для лечения различных заболеваний и нарушений, связанных с лектиновым путем активации комплемента.

Как также описано в патенте США № 7919094, патенте США № 8840893, патенте США № 8652477, патенте США № 8951522, патенте США № 9011860, патенте США № 9644035, публикациях патентных заявок США № US2013/0344073, US2013/0266560, US 2015/0166675, US2017/0189525 и одновременно находящихся на рассмотрении патентных заявках США с серийными номерами 15/476154, 15/347434, 15/470647, 62/315857, 62/275025 и 62/527926 (правообладателем в каждом случае является Omeros Corporation, правопреемник для настоящей заявки, все указанные документы включены в настоящий документ посредством ссылки), MASP-2-зависимая активация комплемента вносит определенный вклад в патогенез многочисленных острых и хронических болезненных состояний. Таким образом, существует потребность в стабильном высококонцентрированном низковязком препарате моноклонального антитела против MASP-2, подходящем для парентерального (например, подкожного) введения, для лечения субъектов, страдающих заболеваниями и нарушениями, связанными с MASP-2-зависимым путем активации комплемента.

Сущность изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к подходящему для парентерального введения субъекту-млекопитающему стабильному фармацевтическому препарату, содержащему

(a) водный раствор, содержащий буферную систему, имеющую pH 5,0-7,0; и

(b) моноклональное антитело или его фрагмент, которое специфически связывает MASP-2 человека, в концентрации от примерно 50 мг/мл до примерно 250 мг/мл, при этом указанное антитело или его фрагмент содержит

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 в SEQ ID NO: 2, и

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 в SEQ ID NO: 3; или его вариант, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 3;

при этом препарат имеет вязкость от 2 до 50 сантипуаз (сП),

при этом препарат является стабильным при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере одного месяца.

В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела в препарате составляет от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления вязкость препарата составляет менее 25 сП. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит гистидин. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит цитрат. В некоторых вариантах осуществления препарат также содержит эксципиент, такой как модифицирующее тоничность средство, в количестве, достаточном для обеспечения гипертоничности препарата. В некоторых вариантах осуществления препарат также содержит сурфактант. В некоторых вариантах осуществления препарат также содержит фермент гиалуронидазу в количестве, эффективном для увеличения диспергирования и/или абсорбции антитела после подкожного введения.

В другом аспекте препарат содержится в устройстве для подкожного введения, таком как предварительно заполненный шприц.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору, включающему предварительно заполненный контейнер, содержащий препарат.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения в лечении пациента, страдающего от или с риском развития MASP-2-зависимого заболевания или состояния, которая представляет собой стерильную лекарственную форму однократного применения, содержащую от примерно 350 мг до примерно 400 мг (т.е. 350, 360, 370, 380, 390 или 400 мг) ингибирующего MASP-2 антитела, при этом композиция содержит от примерно 1,8 мл до примерно 2,2 мл (т.е. 1,8, 1,9, 2,0, 2,1 или 2,2 мл) препарата антитела с концентрацией 185 мг/мл, такого как раскрытый в настоящем документе, причем указанное антитело или его фрагмент содержит

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; и

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3,

при этом препарат является стабильным при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере шести месяцев.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 заболевание или состояние выбирают из группы, состоящей из агУС, ТГСК-ТМА, IgA-Н и волчаночного нефрита (ВН).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от заболевания или нарушения, которое поддается лечению ингибирующим MASP-2 антителом, включающему введение препарата, содержащего анти-MASP-2 антитело, раскрытого в настоящем документе.

Описание чертежей

Вышеизложенные аспекты и многие дополнительные преимущества настоящего изобретения будут в большей степени оценены и понятны при изучении следующего далее подробного описания в сочетании с прилагаемыми чертежами.

Фиг. 1А графически иллюстрирует степень зависимость от лектинового пути отложения мембраноатакующего комплекса (МАК) в присутствии разных количеств человеческого моноклонального антитела против MASP-2 (OMS646), из чего видно, что OMS646 ингибирует опосредованное лектином отложение МАК с величиной IC_{50} , составляющей примерно 1 нМ, как описано в примере 1.

Фиг. 1В графически иллюстрирует степень зависимость от классического пути отложения МАК в присутствии разных количеств человеческого моноклонального антитела против MASP-2 (OMS646), из чего видно, что OMS646 не ингибирует опосредованное классическим путем отложение МАК, как описано в примере 1.

Фиг. 1С графически иллюстрирует степень зависимость от альтернативного пути отложения МАК в присутствии человеческого моноклонального антитела против MASP-2 (OMS646), из чего видно, что OMS646 не ингибирует опосредованное альтернативным путем отложение МАК, как описано в примере 1.

Фиг. 2А графически иллюстрирует результаты анализа методом динамического рассеяния света (ДРС) для скрининга эксципиентов препарата OMS646, которые показывают наружный диаметр частиц, наблюдаемый в препаратах, содержащих разные потенциальные эксципиенты, как описано в примере 2.

Фиг. 2В графически иллюстрирует результаты анализа методом ДРС для скрининга эксципиентов препарата OMS646, которые показывают общую полидисперсность, наблюдаемую в препаратах, содержащих разные потенциальные эксципиенты, как описано в примере 2.

Фиг. 3 графически иллюстрирует результаты анализа вязкости в диапазоне концентраций OMS646 в разных препаратах при измерении при pH 5,0 и 6,0, как описано в примере 2.

Фиг. 4 графически иллюстрирует извлечение белка в процентах после замены буфера в исследовании растворимости/вязкости OMS646, проведенном с разными потенциальными препаратами, как описано в примере 2.

Фиг. 5 графически иллюстрирует зависимость вязкости (определяемой путем экспоненциального приближения данных по вязкости) от концентрации белка в исследовании растворимости/вязкости OMS646, проведенном с разными потенциальными препаратами, как описано в примере 2.

Фиг. 6 графически иллюстрирует данные по вязкости, нормированные на концентрацию белка, в исследовании вязкости, проведенном с разными потенциальными препаратами OMS646, как описано в примере 2.

Фиг. 7А графически иллюстрирует среднюю нагрузку (фунт-сила) для трех потенциальных препаратов OMS646 в исследованиях возможности введения шприцем с применением 27 GA (1,25"), 25 GA (1") и 25 GA тонкостенных (1") игл, как описано в примере 3.

Фиг. 7В графически иллюстрирует максимальную нагрузку (фунт-сила) для трех потенциальных препаратов OMS646 в исследованиях возможности введения шприцем с применением 27 GA (1,25"), 25 GA (1") и 25 GA тонкостенных (1") игл, как описано в примере 3.

Описание списка последовательностей

SEQ ID NO: 1 белок (зрелый) MASP-2 человека.

SEQ ID NO: 2: полипептид вариабельной области тяжелой цепи (VH) OMS646.

SEQ ID NO: 3: полипептид вариабельной области легкой цепи (VL) OMS646.

SEQ ID NO: 4: полноразмерный полипептид мутантной тяжелой цепи IgG4 OMS646.

SEQ ID NO: 5: полноразмерный полипептид легкой цепи OMS646.

SEQ ID NO: 6: ДНК, кодирующая полноразмерный полипептид тяжелой цепи OMS646.

SEQ ID NO: 7: ДНК, кодирующая полноразмерный полипептид легкой цепи OMS646.

Подробное описание

I. Определения.

Если в настоящем документе специально не указано иначе, все термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. Следующие определения приведены для ясности в отношении терминов, используемых в спецификации и формуле изобретения для описания настоящего изобретения.

Можно использовать стандартные методы для получения рекомбинантных ДНК, олигонуклеотидного синтеза, а также для культивирования и трансформации тканей (например, электропорацию, липофекцию). Ферментативные реакции и методы очистки можно использовать в соответствии с инструкциями производителя, как обычно принято в данной области или как описано в настоящем документе. Эти и связанные методы и процедуры, как правило, могут быть применены общепринятым путем, хорошо известным в данной области, и так, как описано в различных литературных источниках общего или специального характера, которые цитируются и обсуждаются в тексте настоящей спецификации. См., например, сборник Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Current Protocols in Immunology (Edited by:

John E. CollgA-H, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, 2001, John Wiley & Sons, NY, NY); или другие соответствующие публикации Current Protocol и аналогичные литературные источники. Если не приведены конкретные определения, то номенклатура, используемая в связи с описанием лабораторных процедур и методов молекулярной биологии, аналитической химии, химии органического синтеза, а также медицинской и фармацевтической химии, описанных в настоящем документе, является хорошо известной и используемой в данной области. Стандартные методы можно использовать для технологии рекомбинантных ДНК, методов молекулярной биологии, микробиологии, химического синтеза, химических анализов, получения, формулирования и доставки фармацевтических препаратов, а также для лечения пациентов.

Термин "фармацевтический препарат" означает препарат, находящийся в такой форме, которая позволяет использовать биологическую активность активного средства (например, ингибирующего MASP-2 антитела) для эффективного лечения, и не содержащий дополнительные компоненты, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет введен препарат. Такие препараты являются стерильными. В одном варианте осуществления фармацевтический препарат подходит для парентерального введения, например, подкожного введения.

Термин "MASP-2" означает маннансвязывающую лектин-ассоциированную сериновую протеазу-2. Последовательность белка (зрелого) MASP-2 человека приведена в SEQ ID NO: 1.

Термин "MASP-2-зависимая активация комплемента" означает MASP-2-зависимую активацию лектинового пути, которая происходит в физиологических условиях (т.е. в присутствии Ca^{++}), приводя к образованию C3-конвертазы C4b2a лектинового пути и впоследствии, после накопления продукта расщепления C3, C3b, к образованию C5-конвертазы C4b2a(C3b)n.

Термин "лектиновый путь" означает активацию комплемента, которая происходит за счет специфического связывания сывороточных и не сывороточных углевод-связывающих белков, включая маннансвязывающий лектин (MBL), CL-11 и фиколины (Н-фиколин, М-фиколин или L-фиколин).

Термин "классический путь" означает активацию комплемента, которая запускается антителом, связанным с чужеродной частицей, и для которой необходимо связывание молекулы узнавания C1q.

Термин "ингибирующее MASP-2 антитело" означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает MASP-2 и эффективно ингибирует MASP-2-зависимую активацию комплемента (например, OMS646). Ингибирующие MASP-2 антитела, которые могут быть применены в способе по изобретению, могут уменьшать MASP-2-зависимую активацию комплемента на более чем 20%, например более чем 30%, или более чем 40%, или более чем 50%, или более чем 60%, или более чем 70%, или более чем 80%, или более чем 90%, или более чем 95%.

Термин "моноклональное антитело OMS646" означает моноклональное антитело, содержащее CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 варибельной области тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2, и содержащее CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 варибельной области легкой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3. Данное конкретное антитело является примером ингибирующего MASP-2 антитела, которое специфически связывает MASP-2 и ингибирует MASP-2-зависимую активацию комплемента.

Термин "моноклональное антитело" означает гомогенную популяцию антител, в которой моноклональное антитело состоит из аминокислот (природных или не природных), вовлеченных в избирательное связывание эпитопа. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными для антигена-мишени. Термин "моноклональное антитело" охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также и их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные антитела (scFv), их варианты, слитые белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий фрагмент (сайт узнавания эпитопа) с необходимой специфичностью и способностью связываться с эпитопом. Термин не должен быть ограничен в отношении источника антител или способа их получения (например, с применением гибридом, фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т.д.). Термин включает целые иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., указанные выше при определении термина "антитело".

Термин "фрагмент антитела" означает фрагмент, полученный из или производный от полноразмерного антитела, такого как, например, ингибирующее MASP-2 антитело, как правило, содержащий его антигенсвязывающую или варибельную область. Иллюстративные примеры фрагментов антитела включают Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ и Fv-фрагменты, scFv фрагменты, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антитела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемый в настоящем документе термин "одноцепочечный Fv" или "scFv" фрагмент антитела содержит домены V_H и V_L антитела, причем эти домены находятся на одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv также содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, который позволяет scFv принимать нужную структуру для связывания антигена.

Термин "область CDR" или "CDR" означает гиперварибельные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина в соответствии с определением Kabat et al., 1991 (Kabat, E.A. et al. (1991), Sequences of

Proteins of Immunological Interest, 5-е издание и более поздние издания). Антитело, как правило, содержит 3 области CDR тяжелой цепи и 3 области CDR легкой цепи. Термин "CDR" или "области CDR" в настоящем документе используют для обозначения в зависимости от ситуации одной или нескольких из этих областей или даже в целом этих областей, которые содержат большинство аминокислотных остатков, ответственных за связывание с аффинностью антитела для антигена эпитопа, который оно узнает.

Термин "специфическое связывание" означает способность антитела предпочтительно связываться с конкретным анализом, который находится в гомогенной смеси с разными анализами. В конкретных вариантах осуществления взаимодействие специфического связывания позволяет различать желательные и нежелательные анализы в образце в некоторых вариантах осуществления с более чем примерно 10-100-кратным или большим (например, более чем примерно 1000- или 10000-кратным) сродством. В конкретных вариантах осуществления аффинность между захватывающим средством и анализом, когда они специфически связаны в комплексе захватывающее средство/аналит, характеризуется величиной R_D (константа диссоциации), составляющей менее примерно 100 нМ, или менее примерно 50 нМ, или менее примерно 25 нМ, или менее примерно 10 нМ, или менее примерно 5 нМ, или менее примерно 1 нМ.

Термин "выделенное антитело" означает антитело, которое было идентифицировано и отделено, и/или извлечено, и/или очищено от компонентов его естественного окружения или системы экспрессии в культуре клеток. В предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено

(1) до более чем 95% по массе антитела и наиболее предпочтительно более чем 99% по массе; при определении концентрации белка соответствующим методом измерения, таким как, например, метод Лоури или поглощение при OD_{280} ;

(2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности при применении секвенатора с вращающимся стаканом; или

(3) до гомогенности при SDS-ПААГ в восстанавливающих или не восстанавливающих условиях с окрашиванием Кумасси синим или предпочтительно серебром.

Как правило, выделенное антитело, используемое в препаратах, раскрытых в настоящем документе, будет получено с применением по меньшей мере одной стадии очистки.

В настоящем документе аминокислотные остатки имеют следующие обозначения: аланин (Ala; A), аспарагин (Asn; N), аспарагиновая кислота (Asp; D), аргинин (Arg; R), цистеин (Cys; C), глутаминовая кислота (Glu; E), глутамин (Gln; Q), глицин (Gly; G), гистидин (His), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V).

В широком смысле природные аминокислоты могут быть разделены на группы на основании химических характеристик боковых цепей соответствующих аминокислот. "Гидрофобной" аминокислотой является Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys или Pro. "Гидрофильной" аминокислотой является Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg или His. Эти группы аминокислот могут быть дополнительно подразделены на подклассы следующим образом. "Незаряженной гидрофильной" аминокислотой является Ser, Thr, Asn или Gln. "Кислой" аминокислотой является Glu или Asp. "Основной" аминокислотой является Lys, Arg или His.

Используемый в настоящем документе термин "консервативная аминокислотная замена" означает замену между аминокислотами в пределах каждой из следующих групп:

- (1) глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин;
- (2) фенилаланин, тирозин и триптофан;
- (3) серин и треонин;
- (4) аспаргат и глутамат;
- (5) глутамин и аспарагин; и
- (6) лизин, аргинин и гистидин.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" включает всех млекопитающих, в том числе без ограничения людей, приматов, не являющихся людьми, собак, кошек, лошадей, овец, коз, коров, кроликов, свиней и грызунов.

Термин "фармацевтически приемлемый" применительно к эксципиенту в фармацевтическом препарате означает, что эксципиент подходит для введения субъекту-человеку.

Термин "подкожное введение" означает введение препарата под все слои кожи субъекта.

Термин "буфер" означает буферный раствор, который устойчив к изменениям pH за счет действия его связанных кислотно-основных компонентов. Буфер по данному изобретению имеет значение pH в диапазоне от примерно 4 до примерно 8, предпочтительно от примерно 5 до примерно 7 и наиболее предпочтительно имеет значение pH в диапазоне от примерно 5,5 до примерно 6,5. Примеры буферов, которые будут контролировать pH в данном диапазоне, включают ацетат (например, ацетат натрия), сукцинат (например, сукцинат натрия), глюконат, гистидин, цитрат и другие буферы на основе органических кислот. "Буферное средство" представляет собой соединение, которое используют для получения буферных растворов.

Термин "гистидин" конкретно означает L-гистидин, если не указано иначе.

Термин "изотонический" относится к препарату, который имеет практически такое же осмотиче-

ское давление, что и человеческая кровь. Изотонические препараты, как правило, будут иметь осмотическое давление от примерно 250 мОсмоль/кг до примерно 350 мОсмоль/кг H₂O. Изотоничность можно определять с применением парофазного осмометра или осмометра, измеряющего снижение температуры замерзания, например.

Термин "гипертонический" относится к препарату с осмотическим давлением выше, чем в организме человека (т.е. выше чем 350 мОсмоль/кг H₂O).

Термин "модифицирующее тоничность средство" означает фармацевтически приемлемое средство, подходящее для получения изотонического или в некоторых вариантах осуществления гипертонического препарата.

Термин "стерильный" относится к фармацевтическому препарату, который является асептическим или не содержит жизнеспособные бактерии, грибки или другие микроорганизмы, что может быть достигнуто любым подходящим способом, таким как, например, асептическая обработка препарата и внесение его в емкость или фильтрование через мембраны для стерилизации фильтрованием до или после получения препарата и внесение его в емкость.

Термин "стабильный препарат" означает препарат, у которого исходный уровень чистоты сохраняется в течение некоторого периода времени. Иными словами, если препарат имеет чистоту по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, с точки зрения конкретного вида антитела (например, ингибирующего MASP-2 антитела) в момент времени 0, стабильность является показателем того, насколько хорошо и насколько долго препарат сохраняет практически данный уровень чистоты (например, без образования других соединений, таких как фрагментированные части (НММ) или агрегаты из чистых молекул (ВММ)). Препарат является стабильным, если уровень чистоты практически не снижается при хранении при температуре примерно 2-8°C в течение конкретного периода времени, например по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев. Выражение "практически не снижается" означает, что уровень чистоты препарата изменяется менее чем на 5%, например менее чем на 4%, или менее чем на 3%, или менее чем на 2%, или менее чем на 1%, в течение некоторого периода времени (например, в течение 6 месяцев, в течение 9 месяцев, или в течение 12 месяцев, или в течение 24 месяцев). В одном варианте осуществления стабильный препарат является стабильным при температуре 2-8°C в течение периода времени по меньшей мере шесть месяцев. В предпочтительном варианте осуществления стабильный препарат является стабильным при температуре 2-8°C в течение периода времени по меньшей мере один год или в течение периода времени по меньшей мере два года. В одном варианте осуществления препарат является стабильным, если ингибирующее MASP-2 антитело остается по меньшей мере на 95% мономерным при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере одного месяца или в течение по меньшей мере шести месяцев или в течение по меньшей мере 12 месяцев при определении методом ЭХ-ВЭЖХ.

Термин "консервант" означает соединение, которое может быть включено в препарат для значительного уменьшения бактериального роста или загрязнения. Неограничивающие примеры потенциальных консервантов включают октадецилдиметилбензил аммония хлорид, гексаметэтония хлорид, бензалкония хлорид (смесь алкилбензилдиметиламмония хлоридов, в которых алкильные группы представляют собой длинноцепочечные соединения) и бензэтония хлорид. Другие виды консервантов включают ароматические спирты, такие как фенол, бутил и бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцинол, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол.

Термин "эксципиент" означает инертное вещество в препарате, которое придает полезное физическое свойство препарату, например повышенную стабильность белка и/или уменьшенную вязкость. Примеры подходящих эксципиентов включают, но без ограничения белки (например, сывороточный альбумин), аминокислоты (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, глицин и гистидин), сахараиды (например, глюкозу, сахарозу, мальтозу и трегалозу), полиолы (например, маннит и сорбит), жирные кислоты и фосфолипиды (например, алкилсульфонаты и каприлат).

Термин "практически отсутствует" означает, что вещество либо отсутствует, либо присутствует лишь в минимальных, следовых количествах, которые не оказывают значимого эффекта на свойства композиции. Если указано, что вещество отсутствует, следует понимать, что отсутствует "поддающееся обнаружению количество".

Термин "вязкость" означает меру сопротивления жидкости, которую деформируют либо за счет напряжения сдвига, либо за счет напряжения растяжения; ее можно оценивать с применением вискозиметра (например, вискозиметра с катящимся шариком) или реометра. Если нет иных указаний, измерение вязкости (сантипуазы, сП) производят при примерно 25°C со скоростью сдвига в диапазоне от 100000 до 250000 1/с.

Термин "парентеральное введение" означает путь введения, отличный от введения через систему пищеварения, и включает инъекцию лекарственной формы в тело при помощи шприца или другого механического устройства, такого как инфузионный насос. Парентеральные пути введения могут включать внутривенный, внутримышечный, подкожный и внутрибрюшинный пути введения. Подкожная инъекция

является предпочтительным путем введения.

Термин "лечение" означает терапевтическое лечение и/или профилактические или превентивные меры. Те, кто нуждаются в лечении, включают субъектов, уже имеющих заболевание, а также тех, у кого заболевание должно быть предотвращено. Таким образом, в настоящем документе пациент, который будет получать лечение, может быть пациентом, у которого заболевание уже было диагностировано, или который может быть предрасположен или подвержен заболеванию.

Термин "эффективное количество" означает количество вещества, которое обеспечивает желаемый эффект. В случае фармацевтической лекарственной субстанции, оно представляет собой количество активного ингредиента, эффективное для лечения заболевания у пациента. В случае ингредиента препарата, например, фермента гиалуронидазы, эффективное количество представляет собой количество, необходимое для увеличения диспергирования или абсорбции совместно введенного ингибирующего MASP-2 антитела таким образом, что ингибирующее MASP-2 антитело может действовать терапевтически эффективным образом, как указано выше.

Используемый в настоящем документе термин "примерно" должен указывать на то, что конкретное приведенное значение может варьироваться в некоторой степени, например, вариации в пределах $\pm 10\%$, предпочтительно $\pm 5\%$, наиболее предпочтительно $\pm 2\%$ включены в конкретное значение. Например, выражение "фармацевтический препарат, содержащий примерно 200 мг/мл ингибирующего MASP-2 антитела" следует понимать так, что препарат может содержать примерно от 180 до 220 мг/мл ингибирующего MASP-2 антитела (например, OMS646). Там, где диапазоны указаны, конечные значения включены в диапазон, если нет иных указаний или иное явно не следует из контекста.

В настоящем документе термины в единственном числе включают соответствующие термины во множественном числе, если из контекста явно не следует иначе. Таким образом, например, в настоящем документе "эксципиент" также включает множество таких эксципиентов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, "средство" включает одно средство, а также два или более средств; "антитело" включает множество таких антител и "каркасная область" означает одну или более каркасных областей и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и т.д.

Каждый вариант осуществления в данной спецификации следует применять, с учетом необходимых изменений, к любому другому варианту осуществления, если специально не указано иначе. Предусмотрено, что любой вариант осуществления, описанный в данной спецификации, может быть осуществлен применительно к любому способу, набору, реагенту или композиции по изобретению, и наоборот. Более того, композиции по изобретению могут быть применены для осуществления способов по изобретению.

II. Обзор изобретения.

Настоящее изобретение относится к стабильным высококонцентрированным низковязким фармацевтическим препаратам ингибирующего MASP-2 антитела, подходящим для парентерального введения (например, подкожного введения) и также подходящим для разбавления перед внутривенным введением. Высококонцентрированные фармацевтические препараты терапевтического антитела использовать желательно, поскольку в этом случае возможно введение в меньшем объеме и/или меньшее количество введений, что, следовательно, означает меньше дискомфорта для пациента. Кроме того, меньшие объемы допускают упаковку терапевтических доз ингибирующего MASP-2 антитела в индивидуальные однодозовые предварительно заполненные шприцы или флаконы для самостоятельного введения. Высококонцентрированные низковязкие препараты по настоящему изобретению представляют собой водный раствор, содержащий буферную систему, имеющую pH 4,0-8,0, более предпочтительно, имеющую pH от примерно 5,0 до примерно 7,0, и ингибирующее MASP-2 моноклональное антитело (например, OMS646), или его антигенсвязывающий фрагмент, в концентрации от примерно 50 мг/мл до примерно 250 мг/мл. В предпочтительных вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело (например, OMS646) присутствует в высококонцентрированных препаратах, подходящих для подкожного введения, в концентрации от примерно 100 мг/мл до примерно 250 мг/мл. В конкретных вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело (например, OMS646) присутствует в высококонцентрированных препаратах в концентрации от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл, например от примерно 175 мг/мл до примерно 195 мг/мл, например примерно 185 мг/мл.

В различных вариантах осуществления фармацевтические препараты также содержат, помимо ингибирующего MASP-2 антитела в высокой концентрации и буферной системы, один или более эксципиентов, таких как модифицирующее тоничность средство (например, аминокислота с заряженной боковой цепью) и необязательно неионный сурфактант. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические препараты по данному изобретению также содержат фермент гиалуронидазу.

Значительным преимуществом высококонцентрированных фармацевтических препаратов ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению является их низкая вязкость при высоких концентрациях белка. Как известно специалистам в данной области, высокая вязкость фармацевтических препаратов моноклонального антитела в концентрациях ≥ 100 мг/мл может препятствовать их разработке в качестве препаратов, подходящих для подкожной и/или внутривенной доставки. Таким образом, фармацевтические препараты, имеющие более низкую вязкость, крайне желательны вследствие легкости их

производства, например, но без ограничения, обработки, фильтрования и разливания в емкости. Как описано в примерах 2 и 3 настоящего документа, препараты по настоящему изобретению, содержащие ингибирующее MASP-2 антитело OMS646 в концентрации от 100 до 200 мг/мл, имеют удивительно низкую вязкость, например вязкость менее примерно 50 сП, например от 2 до 50 сП, например от 2 до 40 сП, например от 2 до 30 сП, или от 2 до 25 сП, или от 2 до 20 сП, или от 2 до 18 сП.

Кроме того, низковязкие высококонцентрированные фармацевтические препараты ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению допускают их введение с применением стандартных шприцев и игл, автоматических инъекционных устройств и микроинфузионных устройств, известных в данной области. Как описано в примере 3, показано, что высококонцентрированные низковязкие фармацевтические препараты ингибирующего MASP-2 антитела, раскрытые в настоящем документе, обладают свойствами возможности введения шприцем и проходимости через иглу, что делает их подходящими для подкожного введения. Способность быть введенными шприцем и способность проходить через иглу являются ключевыми параметрами пригодности фармацевтического препарата для любого парентерального введения, например, внутримышечного или подкожного, и допускают введение таких препаратов внутримышечной или подкожной инъекцией через иглы малого диаметра, как правило, используемые для таких инъекций, например 29 GA, обычные или тонкостенные, 27 GA (1,25"), обычные или тонкостенные, или 25 GA (1"), обычные или тонкостенные иглы. В некоторых случаях низкая вязкость фармацевтических препаратов ингибирующего MASP-2 антитела, раскрытых в настоящем документе, допускает введение приемлемого (например, 1-3 см³) инъекцируемого объема, при этом достигается доставка эффективного количества ингибирующего MASP-2 антитела OMS646 одной инъекцией в один участок инъекции.

Дополнительным важным преимуществом препаратов по настоящему изобретению является то, что высококонцентрированные низковязкие препараты ингибирующего MASP-2 антитела (т.е. в концентрации от ≥ 100 до 200 мг/мл) являются стабильными при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере 30 дней, вплоть до по меньшей мере 9 месяцев или вплоть до по меньшей мере 12 месяцев, или дольше, как определено в исследованиях стабильности, описанных в примерах 2 и 4.

Настоящее изобретение также относится к способу получения высококонцентрированных низковязких препаратов ингибирующего MASP-2 антитела, контейнерам, содержащим указанные препараты, терапевтическим наборам, включающим препараты, а также к терапевтическим способам применения такого препарата, контейнерам и наборам для лечения субъекта, страдающего от или имеющего риск развития, заболевания или состояния, связанного с MASP-2-зависимой активацией комплемента.

Ингибирующее MASP-2 антитело.

Как подробно описано в настоящем документе, настоящее изобретение относится к препаратам, содержащим моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают MASP-2 и ингибируют MASP-2-зависимую активацию комплемента. В конкретных вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в заявленных препаратах представляет собой ингибирующее MASP-2 антитело, называемое "OMS646", описанное в WO2012/151481 (содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки), которое содержит полипептид тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и полипептид легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. Как описано в WO2012/151481 и описано в примере 1, OMS646 специфически связывает MASP-2 человека с высокой аффинностью и обладает способностью блокировать лектиновый путь активации комплемента. В конкретных вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в заявленных препаратах представляет собой ингибирующее MASP-2 антитело, содержащее

- (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую
 - (i) CDR-H1, содержащую последовательность аминокислот 31-35 в SEQ ID NO: 2,
 - (ii) CDR-H2, содержащую последовательность аминокислот 50-65 в SEQ ID NO: 2, и
 - (iii) CDR-H3, содержащую последовательность аминокислот 95-107 в SEQ ID NO: 2; и
- (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую
 - i) CDR-L1, содержащую последовательность аминокислот 24-34 в SEQ ID NO: 3,
 - ii) CDR-L2, содержащую последовательность аминокислот 50-56 в SEQ ID NO: 3, и
 - iii) CDR-L3, содержащую последовательность аминокислот 89-97 в SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело для применения в заявленных препаратах представляет собой вариант OMS646, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2, и содержащий вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело для применения в заявленных препаратах представляет собой

(a) вариант OMS646, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2, при этом остаток 31 представляет собой R, остаток 32 представляет собой G, остаток 33 представляет собой K, остаток 34 представляет собой M, остаток 35 представляет

собой G, остаток 36 представляет собой V, остаток 37 представляет собой S, остаток 50 представляет собой L, остаток 51 представляет собой A, остаток 52 представляет собой H, остаток 53 представляет собой I, остаток 54 представляет собой F, остаток 55 представляет собой S, остаток 56 представляет собой S, остаток 57 представляет собой D, остаток 58 представляет собой E, остаток 59 представляет собой K, остаток 60 представляет собой S, остаток 61 представляет собой Y, остаток 62 представляет собой R, остаток 63 представляет собой T, остаток 64 представляет собой S, остаток 65 представляет собой L, остаток 66 представляет собой K, остаток 67 представляет собой S, остаток 95 представляет собой Y, остаток 96 представляет собой Y, остаток 97 представляет собой C, остаток 98 представляет собой A, остаток 99 представляет собой R, остаток 100 представляет собой I, остаток 101 представляет собой R, остаток 102 представляет собой R или A, остаток 103 представляет собой G, остаток 104 представляет собой G, остаток 105 представляет собой I, остаток 106 представляет собой D и остаток 107 представляет собой Y;

и

b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 3, при этом остаток 23 представляет собой S, остаток 24 представляет собой G, остаток 25 представляет собой E или D, остаток 26 представляет собой K, остаток 27 представляет собой L, остаток 28 представляет собой G, остаток 29 представляет собой D, остаток 30 представляет собой K, остаток 31 представляет собой Y или F, остаток 32 представляет собой A, остаток 33 представляет собой Y, остаток 49 представляет собой Q, остаток 50 представляет собой D, остаток 51 представляет собой K или N, остаток 52 представляет собой Q или K, остаток 53 представляет собой R, остаток 54 представляет собой P, остаток 55 представляет собой S, остаток 56 представляет собой G, остаток 88 представляет собой Q, остаток 89 представляет собой A, остаток 90 представляет собой W, остаток 91 представляет собой D, остаток 92 представляет собой S, остаток 93 представляет собой S, остаток 94 представляет собой T, остаток 95 представляет собой A, остаток 96 представляет собой V и остаток 97 представляет собой F.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное ингибирующее MASP-2 антитело (например, OMS646 или его вариант) для применения в заявленных препаратах представляет собой полноразмерное моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой человеческое полноразмерное IgG4 антитело. В некоторых вариантах осуществления IgG4 имеет точечную мутацию в шарнирной области для повышения стабильности антитела.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело (например, OMS646 или его вариант) состоит из вариабельных областей, происходящих из антитела человека, слитых с константными областями тяжелой цепи и легкой цепи лямбда IgG4 человека, при этом тяжелая цепь имеет точечную мутацию в шарнирной области (например, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P) для повышения стабильности антитела. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой тетрамер, состоящий из двух идентичных тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, и двух идентичных легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления концентрация ингибирующего MASP-2 антитела в препарате составляет от примерно 100 мг/мл до примерно 250 мг/мл, например от примерно 150 мг/мл до примерно 220 мг/мл, например от примерно 175 мг/мл до примерно 200 мг/мл или от примерно 175 мг/мл до примерно 195 мг/мл. В конкретных вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело присутствует в препарате в концентрации от примерно 175 мг/мл до примерно 195 мг/мл, например от примерно 180 мг/мл до примерно 190 мг/мл, например примерно 175 мг/мл, например примерно 180 мг/мл, примерно 181 мг/мл, примерно 182 мг/мл, примерно 183 мг/мл, примерно 184 мг/мл, примерно 185 мг/мл, примерно 186 мг/мл, примерно 187 мг/мл, примерно 188 мг/мл, примерно 189 мг/мл или, например, примерно 190 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрено, что небольшие вариации в аминокислотных последовательностях ингибирующих MASP-2 антител или их фрагментов также являются частью заявленных препаратов при условии, что при данных вариациях аминокислотная последовательность сохраняет по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ингибирующими MASP-2 антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, описанными в настоящем документе (т.е. по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и/или по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3), и сохраняет способность ингибировать MASP-2-зависимую активацию комплемента.

Понятно, что ингибирующие MASP-2 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, сформулированные в контексте настоящего изобретения, могут быть получены с применением методов, хорошо известных в данной области (например, технологий рекомбинантных ДНК, технологий фагового дисплея, технологий синтеза, либо сочетаний таких технологий или других технологий, известных в данной

области). Способы получения и очистки антител и антигенсвязывающих фрагментов хорошо известны в данной области и описаны, например, в сборнике Harlow & Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, главы 5-8 и 15.

Например, ингибирующие MASP-2 антитела, такие как OMS646, могут быть экспрессированы в соответствующих линиях клеток млекопитающих. Последовательности, кодирующие переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи конкретного интересующего антитела, такого как OMS646 (например, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7), можно использовать для трансформации подходящей клетки-хозяина млекопитающего. Методы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают опосредованную декстраном трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра.

Линии клеток млекопитающих, подходящие в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области и включают множество иммортализованных линий клеток, доступных от Американской коллекции типовых культур (ATCC), включая, но без ограничения клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки печеночно-клеточной карциномы человека (например, HepG2), клетки 293 эмбриональной почки человека (HEK293) и множество других линий клеток.

После фазы продуцирования белка процесса культивирования клеток ингибирующие MASP-2 антитела извлекают из среды для культивирования клеток с применением методов, известных специалистам в данной области. В частности, в некоторых вариантах осуществления полипептиды тяжелой и легкой цепей ингибирующего MASP-2 антитела извлекают из культуральной среды в виде секретированных полипептидов.

Ингибирующие MASP-2 антитела можно очищать с применением, например, хроматографии на гидроксипатите, электрофореза в геле, диализа и аффинной хроматографии, а также любого сочетания известных или разработанных в будущем методов очистки, включая, но без ограничения хроматографию с белком А, фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовую ВЭЖХ, хроматографию на силикагеле, хроматографию на колонке с гепарином SEPHAROSE[®], хроматографию на анионообменной или катионообменной смоле (например, колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-ПААГ и осаждение сульфатом аммония. Способ очистки также может включать дополнительные стадии, приводящие к инактивации и/или удалению вирусов и/или ретровирусов, которые потенциально могут присутствовать в среде для культивирования линейных клеток млекопитающих. Можно использовать множество разных стадий для очистки от вирусов, включая, но без ограничения обработку разбавляющими реагентами, такими как мочевины или гуанидин, детергентами, дополнительные стадии ультрафильтрации/диализации, общепринятые методы разделения, такие как ионообменная или эксклюзионная хроматография, воздействие крайних значений pH, нагревание, применение протеаз, органических растворителей или любое сочетание перечисленного.

Для очищенных ингибирующих MASP-2 антител, как правило, требуется изменение концентрации и замена буфера перед хранением или дальнейшей обработкой. В качестве неограничивающего примера, можно использовать систему проточной фильтрации вдоль потока (TFF) для концентрирования и замены элюирующего буфера с используемой ранее очищающей колонки конечным буфером, разработанным для лекарственной субстанции.

Моноклональное ингибирующее MASP-2 антитело, сформулированное в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно, является практически чистым и желательным практически гомогенным (т.е. свободным от примесных белков и т.д.). Термин "практически чистое" антитело означает композицию, содержащую по меньшей мере 90% по массе антитела от общей массы композиции, предпочтительно по меньшей мере 95% по массе. Термин "практически гомогенное" антитело означает композицию, содержащую по меньшей мере примерно 99% по массе антитела от общей массы композиции.

Водные растворы.

Высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению представляет собой водный раствор, содержащий буферную систему, имеющую pH от 4,0 до 8,0 (например, имеющую pH от примерно 5,0 до примерно 7,0 или имеющую pH от примерно 5,5 до примерно 6,5), и ингибирующее MASP-2 антитело (например, OMS646 или его вариант) или его антигенсвязывающий фрагмент в концентрации от примерно 50 мг/мл до примерно 250 мг/мл (например, от примерно 100 мг/мл до примерно 250 мг/мл). Водный раствор для применения в препаратах по настоящему изобретению представляет собой фармацевтически приемлемый раствор (безопасный и нетоксичный для при введении человеку), который используют для получения жидкого препарата. В некоторых вариантах осуществления водный раствор представляет собой воду, такую как стерильная вода для инъекций (WFI), которая представляет собой стерильную, не содержащую растворенные вещества дистиллированную воду. Альтернативно можно использовать другие водные растворы, которые подходят для терапевтического введения и которые не будут неблагоприятно влиять на стабильность препарата, например деионизированную воду. Другие подходящие водные растворы включают бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или другие аналогичные вод-

ные растворы, используемые для получения фармацевтических растворов.

Буферные системы.

У высококонцентрированного низковязкого препарата ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению корректируют pH до значения 4,0-8,0, предпочтительно до pH 5,0-7,0. Нужное значение pH поддерживают за счет применения буферной системы. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое буферное средство с константой кислотной диссоциации в пределах 2 единиц pH от значения pH препарата. Буферная система, используемая в препаратах по настоящему изобретению, имеет pH в диапазоне от примерно 4,0 до примерно 8,0. Различные буферные средства известны специалистам в данной области. Примеры буферных средств, которые будут контролировать pH в данном диапазоне, включают ацетат, сукцинат, глюконат, гистидин, цитрат и другие буферы на основе органических кислот. В некоторых вариантах осуществления буферное средство выбирают из группы, состоящей из сукцината, гистидина и цитрата. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические препараты содержат буферную систему с буферным средством в концентрации от 1 до 50 мМ, например 10-40 мМ, или, например, 10-30 мМ, или 20-30 мМ, или примерно 20 мМ.

В некоторых вариантах осуществления буферное средство представляет собой гистидиновый буфер. "Гистидиновый буфер" представляет собой буфер, содержащий аминокислоту гистидин. Примеры гистидиновых буферов включают буферы, содержащие гистидин или любые соли гистидина, включая гидрохлорид гистидина, ацетат гистидина, фосфат гистидина и сульфат гистидина, в том числе, сочетания любых из этих солей с гистидином или без него. В одном варианте осуществления буферная система представляет собой буферный раствор гидрохлорида гистидина (L-гистидин/HCl). Такой буферный раствор гидрохлорида гистидина можно получать путем титрования L-гистидина (свободное основание, твердое вещество) разбавленной соляной кислотой или используя соответствующую смесь гистидина и гидрохлорида гистидина. В некоторых вариантах осуществления pH буфера L-гистидин/HCl составляет от примерно 5,0 до примерно 7,0, например от примерно 5,5 до примерно 6,0, например примерно 5,8 или примерно 5,9.

В некоторых вариантах осуществления буферное средство представляет собой цитратный буфер. Такой цитратный буфер можно получать путем титрования лимонной кислоты, моновалентной соли лимонной кислоты и/или дивалентной соли лимонной кислоты разбавленным раствором гидроксида натрия до соответствующего значения pH, или используя соответствующую смесь лимонной кислоты и соли(ей) до достижения того же значения pH. В другом варианте осуществления цитратный буфер можно получать путем титрования раствора цитрата тринатрия разбавленным раствором соляной кислоты до соответствующего значения pH. В этом случае ионная сила может быть немного выше, чем в случае лимонной кислоты, из-за образования дополнительных ионов натрия и хлорида в растворе. В конкретных вариантах осуществления pH цитратного буфера составляет от примерно 5,0 до примерно 7,0, например от примерно 5,5 до примерно 6,0, например примерно 5,8 или примерно 5,9. В некоторых вариантах осуществления буферное средство представляет собой сукцинатный буфер. В конкретных вариантах осуществления pH сукцинатного буфера составляет от примерно 5,5 до примерно 6,0, например примерно 5,8 или примерно 5,9.

В некоторых вариантах осуществления буферное средство представляет собой буферный раствор цитрата натрия, при этом цитрат натрия присутствует в препарате в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ, например от примерно 10 мМ до примерно 25 мМ, например примерно 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления буферное средство представляет собой L-гистидиновый буфер, при этом L-гистидин присутствует в препарате в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ, например от примерно 10 мМ до примерно 25 мМ, например примерно 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит примерно 20 мМ цитрат натрия и имеет pH от примерно 5,0 до примерно 7,0. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит примерно 20 мМ L-гистидин и имеет pH от примерно 5,0 до примерно 7,0.

Экципиенты.

В некоторых вариантах осуществления высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению также содержит по меньшей мере один эксципиент. Примеры подходящих эксципиентов включают, но без ограничения белки (например, сывороточный альбумин), аминокислоты (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, глицин и гистидин), сахара (например, глюкозу, сахарозу, мальтозу и трегалозу), полиолы (например, маннит и сорбит), жирные кислоты и фосфолипиды (например, алкилсульфонаты и каприлат).

В некоторых вариантах осуществления препарат содержит эксципиент, выбранный из группы, состоящей из аминокислоты с заряженной боковой цепью, сахара или другого полиола и соли. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит сахар или другой полиол, такой как, например, сахароза, трегалоза, маннит или сорбит. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит соль, такую как, например, NaCl или соль аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления препарат содержит эксципиент, который представляет собой модифицирующее тоничность средство. В некоторых вариантах осуществления модифицирующее

тоничность средство включено в препарат в концентрации, подходящей для получения изотонического препарата. В некоторых вариантах осуществления модифицирующее тоничность средство включено в препарат в концентрации, подходящей для получения гипертонического препарата. В некоторых вариантах осуществления модифицирующее тоничность средство для применения в препарате выбирают из группы, состоящей из аминокислоты с заряженной боковой цепью, сахара или другого полиола и соли. В некоторых вариантах осуществления модифицирующее тоничность средство представляет собой аминокислоту с заряженной боковой цепью (т.е. отрицательно заряженной боковой цепью или положительно заряженной боковой цепью) в концентрации от примерно 50 мМ до примерно 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления модифицирующее тоничность средство представляет собой аминокислоту с отрицательно заряженной боковой цепью, такую как глутамат. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит глутамат в концентрации от примерно 50 мМ до примерно 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления модифицирующее тоничность средство представляет собой аминокислоту с положительно заряженной боковой цепью, такую как аргинин. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит аргинин (например, аргинин/HCl) в концентрации от примерно 50 мМ до примерно 300 мМ, например от примерно 150 мМ до примерно 225 мМ.

Предпочтительно, фармацевтические препараты, раскрытые в настоящем документе, являются гипертоническими (т.е. имеют более высокое осмотическое давление, чем человеческая кровь). Как описано в настоящем документе, неожиданно установлено, что гипертоничность приводит к снижению вязкости образца, что было достигнуто, например, при умеренном увеличении концентрации аргинина. Как описано в примере 2, неожиданно было установлено, что низкая вязкость (например, менее 25 сП) может быть достигнута для высококонцентрированных препаратов ингибирующего MASP-2 антитела в растворе цитрата/аргинина и гистидина/аргинина, содержащем аргинин в концентрации 200 мМ, или выше, в отсутствие CaCl₂. Соответственно в некоторых вариантах осуществления препарат содержит аргинин (например, аргинин-HCl) на гипертоническом уровне от примерно 200 мМ до примерно 300 мМ.

Как дополнительно описано в примере 2, также установлено, что препараты, содержащие двухвалентные катионы (CaCl₂ или MgCl₂), имеют повышенное содержание высокомолекулярного материала в сравнении с препаратами, которые не содержат добавки CaCl₂ или MgCl₂. Соответственно в одном варианте осуществления высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению практически не содержит добавку CaCl₂. В одном варианте осуществления высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению практически не содержит добавку MgCl₂.

Как дополнительно описано в примере 2, было установлено для высококонцентрированных препаратов антител против MASP-2, что включение сахарозы было связано с повышенной полидисперсностью во всех протестированных буферных системах. Соответственно в одном варианте осуществления высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению практически не содержит сахарозу.

Как описано в примере 2, также было установлено для высококонцентрированных препаратов антител против MASP-2, что включение сорбита было связано с повышенной полидисперсностью во всех протестированных буферных системах. Соответственно в одном варианте осуществления высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению практически не содержит сорбит.

Сурфактанты.

Необязательно в некоторых вариантах осуществления высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению также содержит фармацевтически приемлемый сурфактант. Неограничивающие примеры подходящих фармацевтически приемлемых сурфактантов включают сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (например, Tween), полиэтилен-полипропиленгликоли, полиоксиэтилен стеараты, полиоксиэтилен алкиловые эфиры (например, полиоксиэтилен монолауриловый эфир), эфиры алкилфенилполиоксиэтилена (например, Triton-X), сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилена (например, поллоксамер и плуроник) и додецилсульфат натрия (SDS). В конкретных вариантах осуществления фармацевтически приемлемый сурфактант представляет собой сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана и жирной кислоты (полисорбат), такой как полисорбат 20 (продаваемый под торговым названием Tween 20™) и полисорбат 80 (продаваемый под торговым названием Tween 80™). В некоторых вариантах осуществления высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению содержит неионный сурфактант. Неионный сурфактант может представлять собой полисорбат (например, выбранный из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 80 и сополимера полиэтилен-полипропилена). В некоторых вариантах осуществления концентрация сурфактанта составляет примерно от 0,001 до 0,1% (мас./об.) или от 0,005 до 0,1% (мас./об.), или 0,01-0,1% (мас./об.), или 0,01-0,08% (мас./об.), или 0,025-0,075% (мас./об.), или более конкретно примерно 0,01% (мас./об.), примерно 0,02% (мас./об.), примерно 0,04% (мас./об.) или примерно 0,06% (мас./об.), или примерно 0,08% (мас./об.), или примерно 0,10% (мас./об.). В некоторых вариантах осуществления препарат содержит неионный сурфактант (например, полисорбат 80) в

концентрации примерно 0,001-0,1% (мас./об.), или от 0,005 до 0,1% (мас./об.), или 0,01-0,1% (мас./об.), или 0,01-0,08% (мас./об.), или 0,025- 0,075% (мас./об.), или более конкретно примерно 0,01% (мас./об.), примерно 0,02% (мас./об.), примерно 0,04% (мас./об.), или примерно 0,06% (мас./об.), или примерно 0,08% (мас./об.), или примерно 0,10% (мас./об.). Как описано в примере 2, неожиданно было установлено, что включение неионного сурфактанта полисорбата 80 (PS-80) приводит к дальнейшему снижению вязкости, с сохранением при этом выхода белка, что позволяет использовать высокую концентрацию антитела OMS646, в то же время сохраняя низкую вязкость, подходящую для применения в инъекционном устройстве, таком как автоинъектор.

Стабилизаторы.

Необязательно в некоторых вариантах осуществления высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению также содержит стабилизатор. Стабилизатор (термин является синонимом термина "стабилизирующее средство", используемого в настоящем документе) может представлять собой углевод, или сахарид, или сахар, признаваемый регулируемыми органами в качестве подходящей добавки или эксципиента в фармацевтических препаратах, например, трегалоза или сахароза. Типичная концентрация стабилизатора составляет 15-250 или 150-250 мМ или примерно 210 мМ. Препараты могут содержать вторичный стабилизатор, такой как метионин, например, в концентрации 5-25 мМ или в концентрации 5-15 мМ (например, метионин в концентрации примерно 5 мМ, примерно 10 мМ или примерно 15 мМ).

Консерванты.

Необязательно в некоторых вариантах осуществления высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению также содержит консервант (например, противомикробное средство). Противомикробные средства, как правило, необходимы для парентеральных препаратов, предназначенных для многократного применения. Аналогично консерванты добавляют в фармацевтические препараты, асептически упакованные в однодозовые флаконы, если активный ингредиент(ы) не обладает бактерицидными или бактериостатическими свойствами либо стимулирует рост микроорганизмов. Некоторыми типичными используемыми консервантами являются бензиловый спирт (от 0,9 до 1,5%), метилпарабен (от 0,18 до 0,2%), пропилпарабен (0,02%), бензалкония хлорид (от 0,01 до 0,02%) и тимеросал (от 0,001 до 0,01%).

Возможность введения шприцем.

Для подкожного введения необходимо выполнять инъекции с применением инъекционных устройств, таких как шприцы, автоинъекторы, носимые насосы или другие устройства, которые налагают ограничения на препарат с точки зрения инъектируемого объема и вязкости раствора. Кроме того, препарат должен быть подходящим для применения в инъекционном устройстве с точки зрения усилия при инъекции, времени, необходимого для осуществления инъекции. Используемый в настоящем документе термин "возможность введения шприцем" означает способность инъекционного терапевтического средства легко проходить через иглу для подкожных инъекций при набирании препарата из флакона перед инъекцией. Используемый в настоящем документе термин "проходимость через иглу" относится к характеристикам препарата в процессе инъекции (см., например, Cilurzo F., Selmin F., Minghetti P. et al., *Injectability Evaluation: An Open Issue*, AAPS PharmSciTech, 2011, 12(2):604-609). Возможность введения шприцем включает такие факторы, как легкость отбора из емкости, тенденция к засорению иглы и пенообразованию, а также точность измерения дозы. Прочность через иглу включает прикладываемое давление (или силу), необходимое для осуществления инъекции, равномерность потока и отсутствие засорения (т.е. отсутствие забивания иглы шприца). Возможность введения шприцем и проходимость через иглу могут зависеть от геометрических параметров иглы, т.е. внутреннего диаметра, длины, формы отверстия, а также от отделки поверхности шприца, особенно в устройствах для самостоятельного выполнения инъекций, таких как шприц-ручки и автоинъекторы (например, оснащенные иглами 29-31 GA), и в предварительно заполненных шприцах для подкожного дозирования (например, оснащенных иглами 24-27 GA). Усилие при инъекции (или сила трения скольжения) является комплексным фактором, зависимым от вязкости раствора, размера иглы (т.е. калибра иглы) и поверхностного натяжения контейнера/упорки. Иглы меньшего размера, например, меньшего калибра, будут вызывать меньше болевых ощущений у пациентов. Overcashier с соавторами установили, что отношение вязкости-силы трения скольжения зависит от калибра иглы в соответствии с уравнением Hagen-Poiseuille (Overcashier et al., *Am. Pharm. Rev.*, 9(6):77-83 (2006)). Например, в случае тонкостенной иглы 27 калибра вязкость жидкости должна поддерживаться на уровне или ниже 20 сП, чтобы не была превышена сила трения скольжения 25 ньютон (Н).

В конкретных вариантах осуществления фармацевтические препараты по изобретению имеют силу трения скольжения при инъекции, составляющую примерно 25 Н или менее, в случае инъекции через иглу 27 GA (1,25") при комнатной температуре.

В конкретных вариантах осуществления фармацевтические препараты по изобретению имеют силу трения скольжения при инъекции, составляющую примерно 20 Н или менее, в случае инъекции через иглу 25 GA (1") при комнатной температуре.

Как описано в примере 3, высококонцентрированные низковязкие препараты ингибирующего MASP-2 антитела (например, OMS646) по настоящему изобретению характеризуются неожиданно хоро-

шей возможностью введения шприцем и проходимость через иглу. Высококцентрированные низковязкие препараты ингибирующего MASP-2 антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть введены внутримышечной или подкожной инъекцией через иглы малого диаметра, как правило, используемые для таких инъекций, например, иглы 27 G (1,25"), 27 G тонкостенные, 25 G тонкостенные (1") или 25 G (1"). В некоторых случаях низкая вязкость препаратов ингибирующего MASP-2 антитела, раскрытых в настоящем документе, позволяет вводить переносимый инъецируемый объем (например, 1-3 см³) с доставкой эффективного количества ингибирующего MASP-2 антитела одной инъекцией в один участок инъекции.

Стабильность.

Для любого из вышеизложенных аспектов следует отметить, что ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в препарате сохраняет способность ингибировать MASP-2-зависимую активацию комплемента. Например, ингибирующее MASP-2 антитело сохраняет способность связывать MASP-2 и ингибировать лектиновый путь активации, как описано в примере 1, или в другом анализе лектинового пути активации комплемента, например, как описано в WO 2012/151481. В дополнение к анализам на эффективность можно использовать различные другие физико-химические анализы для оценки стабильности, включая изоэлектрическое фокусирование, электрофорез в полиакриламидном геле, эксклюзионную хроматографию, а также оценку видимых и невидимых глазом частиц.

В конкретных вариантах осуществления препараты по настоящему изобретению демонстрируют стабильность в диапазоне температур от -20 до 8°C в течение по меньшей мере 30 дней, вплоть до по меньшей мере 9 месяцев или дольше или вплоть до по меньшей мере 12 месяцев или дольше, о чем свидетельствуют результаты изучения стабильности в примерах 2 и 4. Дополнительно или альтернативно в конкретных вариантах осуществления препараты являются стабильными при температуре от -20 до 8°C, например от 2 до 8°C, в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 1 года, или по меньшей мере 2 лет, или дольше. В конкретных вариантах осуществления стабильность можно оценивать, например, по сохранению уровня чистоты с течением времени. Например, в конкретных вариантах осуществления препараты по настоящему изобретению характеризуются снижением на менее чем 5%, например снижением на менее чем 4%, например снижением на менее чем 3%, например на менее чем 2%, например на менее чем 1%, чистоты через месяц, 6 месяцев, 9 месяцев или 1 год при хранении при температуре от 2 до 8°C, что определяют методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ), которая позволяет обнаруживать присутствие или отсутствие фрагментов (НММ) и/или агрегатов (ВММ) молекул.

В конкретных вариантах осуществления препараты по настоящему изобретению характеризуются низкими или не поддающимися определению уровнями агрегации и/или фрагментации и сохраняют активность после хранения в течение определенного периода времени. Иными словами, препараты, раскрытые в настоящем документе, способны сохранять структурную целостность ингибирующего MASP-2 антитела OMS646, присутствующего в высоких концентрациях в растворе, например, в концентрациях, превышающих 150 мг/мл, или превышающих 175 мг/мл, или по меньшей мере 185 мг/мл, так что ингибирующее MASP-2 антитело может оставаться преимущественно мономерным (т.е. по меньшей мере на 95% или более) после хранения в течение определенного периода времени при температуре примерно от 2 до 8°C. Предпочтительно не более 5%, не более 4%, не более 3%, не более 2%, не более 1% и наиболее предпочтительно не более 0,5% антител образуют фрагментированные (НММ) или агрегированные (ВММ) формы, что определяют методом ЭХ после хранения в течение определенного периода времени при температуре примерно от 2 до 8°C.

Как описано в примере 4 в настоящем документе, авторами изобретения предложены препараты, подходящие для сохранения ингибирующего MASP-2 антитела, OMS646, в концентрации примерно 185 мг/мл в преимущественно мономерной форме в течение по меньшей мере 12 месяцев при температуре примерно от 2 до 8°C.

Модификатор проницаемости тканей.

В другом варианте осуществления высококонцентрированные низковязкие препараты ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению также содержат модификатор проницаемости тканей, который способствует увеличению абсорбции или диспергирования ингибирующего MASP-2 антитела после парентерального введения (например, подкожной инъекции). В некоторых вариантах осуществления модификатор проницаемости тканей представляет собой фермент гиалуронидазу, которая действует в качестве модификатора проницаемости тканей и способствует увеличению диспергирования и абсорбции инъецированного ингибирующего MASP-2 антитела. Особенно полезным модификатором проницаемости тканей является гиалуронидаза (например, рекомбинантная человеческая гиалуронидаза). Гиалуронидазы действуют в качестве модификаторов проницаемости тканей, временно разрушая гиалуроновый барьер и открывая доступ к лимфатическим и капиллярным сосудам, что позволяет инъецируемым лекарственным средствам и жидкостям быстро абсорбироваться в систему кровообращения. Гиалуронан восстанавливается естественным образом, и барьер полностью восстанавливается, например, в течение 48 ч. Добавление гиалуронидазы в инъекционные фармацевтические препараты способствует увеличению биодоступности ингибирующего MASP-2 антитела после парентерального введения, в част-

ности, подкожного введения. Это также позволяет вводить в участок инъекции большие объемы (т.е. более 1 мл) с причинением меньшей боли и дискомфорта, а также сводит к минимуму частоту возникновения реакций в участке инъекции (например, уменьшает припухлость в участке инъекции).

В некоторых вариантах осуществления высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела (например, OMS646) по настоящему изобретению содержит от примерно 100 ед/мл до примерно 20000 ед/мл фермента гиалуронидазы. Фактическая концентрация фермента гиалуронидазы зависит от типа фермента гиалуронидазы, используемого в получении препаратов ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению. Эффективное количество гиалуронидазы может определять специалист в данной области. Фермент должен быть предоставлен в достаточном количестве, чтобы стало возможным увеличение диспергирования и абсорбции введенного совместно или последовательно ингибирующего MASP-2 антитела. Минимальное количество фермента гиалуронидазы превышает 100 ед/мл. Более конкретно, эффективное количество фермента гиалуронидазы составляет от примерно 150 ед/мл до примерно 20000 ед/мл, при этом указанное количество соответствует от примерно 0,01 мг до примерно 0,16 мг белка исходя из предполагаемой удельной активности 100000 ед/мг. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические препараты содержат гиалуронидазу в концентрации от примерно 1000 до примерно 20000 ед/мл, например от примерно 1000 до примерно 16000 ед/мл. Альтернативно концентрация гиалуронидазы составляет от примерно 1500 до примерно 12000 ед/мл или более конкретно от примерно 2000 ед/мл до примерно 12000 ед/мл. Указанные в настоящем документе количества соответствуют количеству гиалуронидазы, исходно добавляемому в фармацевтический препарат. В некоторых вариантах осуществления соотношение (по массе) гиалуронидазы и ингибирующего MASP-2 антитела находится в диапазоне от 1:1000 до 1:8000, или в диапазоне от 1:4000 до 1:6000, или в диапазоне примерно от 1:4000 до 1:5000.

Гиалуронидаза может присутствовать в качестве компонента высококонцентрированного низковязкого препарата ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению или она может быть предоставлена в виде отдельного раствора в комплекте. Таким образом, в одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело совместно сформулировано с гиалуронидазой. В другом варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело и гиалуронидазу формулируют отдельно и смешивают непосредственно перед подкожным введением. В другом варианте осуществления и ингибирующее MASP-2 антитело и гиалуронидазу формулируют и вводят отдельно, например гиалуронидазу вводят отдельной инъекцией непосредственно до или после введения препарата, содержащего ингибирующее MASP-2 антитело. В некоторых случаях гиалуронидазу вводят подкожно раньше, на срок от примерно 5 с до примерно 30 мин, чем вводят инъекцией фармацевтический препарат, содержащий ингибирующее MASP-2 антитело по настоящему изобретению, в ту же самую зону инъекции. В конкретных вариантах осуществления фармацевтический препарат ингибирующего MASP-2 антитела и раствор гиалуронидазы находятся в разных камерах фармацевтического устройства, которое автоматически производит доставку либо одновременно (например, с применением двустольного шприца), либо последовательно.

Предварительно заполненные контейнеры.

В следующем аспекте настоящего изобретения высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела, раскрытый в настоящем документе, содержится в предварительно заполненном герметичном контейнере в количестве, достаточном для введения субъекту-млекопитающему. Таким образом, достаточное количество композиции лекарственного средства, сформулированной в соответствии с настоящим изобретением, которое равно или слегка превышает (т.е. с избытком не более чем 25%, например с избытком не более 10%) количество в расчете на ингибирующее MASP-2 антитело, которое должно быть введено субъекту-млекопитающему, содержится в предварительно заполненном контейнере, облегчающем распределение препарата антитела для парентерального введения (т.е. инъекции или инфузии). В некоторых вариантах осуществления предварительно заполненный контейнер содержит по меньшей мере одну фармацевтическую стандартную лекарственную форму ингибирующего MASP-2 антитела.

Например, нужное для одноразового применения количество высококонцентрированного низковязкого препарата ингибирующего MASP-2 антитела может быть упаковано в предварительно заполненном контейнере, таком как, например, стеклянный флакон, закрытый пробкой, или другой крышкой, содержащей перегородку, сквозь которую можно вводить иглу для подкожных инъекций для отбора препарата, или может быть упаковано в предварительно заполненный шприц или другой предварительно заполненный контейнер, подходящий для инъекции (например, подкожной инъекции) или инфузии. Примеры таких контейнеров включают без ограничения флаконы, шприцы, ампулы, бутылки, картриджи и мешки. Предпочтительно контейнеры представляют собой отдельные предварительно заполненные шприцы одноразового применения, которые предпочтительно могут быть выполнены из стекла или полимерного материала, такого как циклоолефиновые полимеры или акрилонитрилбутадиенстирол (ABS), поликарбонат (PC), полиоксиметилен (POM), полистирол (PS), полибутилентерефталат (PBT), полипропилен (PP), полиэтилен (PE), полиамид (PA), термопластичный эластомер (TPE), а также их сочетания. В цилиндре шприца находится эластомерный поршень, который может двигаться вдоль цилиндра, выталкивая жидкое содержимое через присоединенную к цилиндру иглу. В некоторых вариантах осуществления изобре-

тения каждый шприц имеет прочно прикрепленную иглу.

В некоторых вариантах осуществления высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего MASP-2 антитела, раскрытый в настоящем документе, содержится в предварительно заполненном контейнере, выбранном из группы, состоящей из шприца (например, одноствольного или двухствольного шприца), шприц-ручки, герметичного флакона (например, двухкамерного флакона), автоинъектора, кассеты и насосного устройства (например, нательного прикрепленного на пластыре насоса, привязанного насоса или осмотического насоса). Для подкожной доставки препарат может содержаться в предварительно заполненном устройстве, подходящем для подкожной доставки, таком как, например, предварительно заполненный шприц, автоинъектор, инъекционное устройство (например, устройство INJECT-EASE™ или GENJECT™), шприц-ручка (такая как GENPEN™) или другое устройство, подходящее для подкожного введения.

Препараты по настоящему изобретению могут быть изготовлены в виде стандартных лекарственных форм в предварительно заполненном контейнере, который может быть особенно подходящим для самостоятельного введения. Например, стандартная доза на флакон, картридж или другой предварительно заполненный контейнер (например, предварительно заполненный шприц или шприц-ручку одноразового применения) может содержать примерно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 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, 9,5 мл, или примерно 10,0 мл, или больший объем высококонцентрированного препарата, содержащего ингибирующее MASP-2 антитело (например, OMS646) в разных концентрациях, находящихся в диапазоне от примерно 100 мг/мл до примерно 250 мг/мл, от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл, от примерно 175 мг/мл до примерно 200 мг/мл, например примерно 185 мг/мл, что соответствует общей стандартной дозе OMS646 на контейнер в диапазоне от примерно 20 мг до примерно 1000 мг или выше.

В некоторых вариантах осуществления препарат по настоящему изобретению изготавливают в виде стандартной лекарственной формы в предварительно заполненном контейнере, таком как флакон или шприц, со стандартной дозой примерно от 350 мг до 400 мг, например примерно 350 мг, примерно 360 мг, примерно 370 мг, примерно 380 мг, примерно 390 мг или примерно 400 мг.

В некоторых вариантах осуществления препараты по настоящему изобретению изготавливают в виде стандартной лекарственной формы в предварительно заполненном шприце с объемом от 0,1 до 3,0 мл, например примерно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 мл или примерно 3,0 мл, содержащей примерно от 20 до 750 мг ингибирующего MASP-2 антитела (например, OMS646). Как описано в настоящем документе, стабильные препараты, изготовленные в виде стандартных доз, можно вводить субъекту непосредственно (например, подкожной инъекцией) или альтернативно их готовят для разведения перед внутривенным введением.

Препараты по настоящему изобретению можно стерилизовать различными методами стерилизации, подходящими для препаратов антител, например стерилизацией фильтрованием. В конкретных вариантах осуществления препарат антитела стерилизуют пропусканием через фильтр, например предварительно стерилизованный фильтр с диаметром пор 0,2 микрона. Стерилизованные препараты по настоящему изобретению можно вводить субъекту для предотвращения, лечения или облегчения заболевания или нарушения, связанного с MASP-2-зависимой активацией компонента.

В связанном аспекте настоящее изобретение относится к способу изготовления изделия, включающему заполнение контейнера высококонцентрированным препаратом ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения в лечении пациента, страдающего от или с риском развития MASP-2-зависимого заболевания или состояния, представляющей собой стерильную лекарственную форму одноразового применения, содержащую от примерно 350 мг до примерно 400 мг (т.е. 350, 360, 370, 380, 390 или 400 мг) ингибирующего MASP-2 антитела, при этом композиция содержит от примерно 1,8 мл до примерно 2,2 мл (т.е. 1,8, 1,9, 2,0, 2,1 или 2,2 мл) препарата антитела с концентрацией 185 мг/мл, раскрытого в настоящем документе, причем указанное антитело или его фрагмент, содержит

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; и

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3,

при этом препарат является стабильным при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере шести месяцев.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 заболевание или состояние выбирают из группы, состоящей из агУС, ТГСК-ТМА, IgA-Н и волчаночного нефрита (ВН).

Наборы, содержащие высококонцентрированные низковязкие препараты ингибирующего MASP-2 антитела.

Настоящее изобретение также относится к терапевтическим наборам, включающим по меньшей мере один контейнер, содержащий высококонцентрированный низковязкий препарат ингибирующего

MASP-2 антитела, раскрытый в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к набору, включающему

(i) контейнер, содержащий любой из препаратов, содержащих ингибирующее MASP-2 антитело, описанных в настоящем документе; и

(ii) подходящее средство для доставки препарата в организм пациента, который нуждается в этом.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем документе, средство подходит для подкожной доставки препарата в организм пациента.

Разные виды контейнеров подходят для содержания фармацевтических препаратов ингибирующего MASP-2 антитела, включенного в наборы по настоящему изобретению. В конкретных вариантах осуществления наборов по настоящему изобретению контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц (например, одноствольный или двухствольный шприц) или предварительно заполненный герметичный флакон.

В некоторых вариантах осуществления контейнер, содержащий препарат, содержащий ингибирующее MASP-2 антитело, представляет собой предварительно заполненный контейнер, выбранный из группы, состоящей из шприца (например, одноствольного или двухствольного шприца), шприц-ручки, герметичного флакона (например, двухкамерного флакона), автоинъектора, кассеты и насосного устройства (например, нательного прикрепленного на пластыре насоса, привязанного насоса или осмотического насоса). Для подкожной доставки препарат может содержаться в предварительно заполненном устройстве, подходящем для подкожной доставки, таком как, например, предварительно заполненный шприц, автоинъектор, инъекционное устройство (например, устройство INJECT-EASE™ или GENJECT™), шприц-ручка (такая как GENPEN™) или другое устройство, подходящее для подкожного введения.

Помимо контейнера, предварительно заполненного одной дозой фармацевтического препарата, набор по настоящему изобретению также может включать внешний контейнер, в который помещен предварительно заполненный контейнер. Например, внешний контейнер может включать пластиковый или картонный лоток со сформированным углублением, в которое предварительно заполненный контейнер помещен и находится неподвижно во время транспортировки и обращения перед применением. В некоторых вариантах осуществления внешний контейнер предпочтительно является непрозрачным и защищает предварительно заполненный контейнер от света, предотвращая вызываемую светом деградацию компонентов фармацевтического препарата. Например, пластиковый или картонный лоток, в котором находится предварительно заполненный контейнер, может быть дополнительно упакован в картонную коробку, которая обеспечивает защиту от света. Набор по настоящему изобретению также может включать набор инструкций по введению и применению препаратов ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению, которые могут быть напечатаны на внешнем контейнере или напечатаны на листе бумаги, находящемся внутри внешнего контейнера.

В некоторых вариантах осуществления наборы включают второй контейнер (например, предварительно заполненный шприц), содержащий эффективную дозу гиалуронидазы.

Набор также может включать другие материалы, необходимые с коммерческой и пользовательской точки зрения, в том числе иглы, шприцы, вкладыши в упаковку и т.п.

Иллюстративные препараты.

Как описано выше, стабильные высококонцентрированные низковязкие препараты ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению содержат ингибирующее MASP-2 антитело в концентрации от 50 до 250 мг/мл в водном растворе, содержащем буферное средство с pH 4,0-8,0.

Буферная система, такая как гистидиновая, цитратная или сукцинатная, предпочтительно включена в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ и предпочтительно примерно 20 мМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления препарат также содержит аминокислоту с заряженной боковой цепью в концентрации от 50 до 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит аминокислоту с положительно заряженной боковой цепью, такую как аргинин, в концентрации от 50 до 300 мМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления препарат также содержит неионный сурфактант, такой как полисорбат 80, в количестве от 0,001 до 0,1% (мас./об.), например от примерно 0,05% (мас./об.) до примерно 0,1% (мас./об.). В некоторых вариантах осуществления препарат также содержит фермент гиалуронидазу в количестве, эффективном для увеличения диспергирования и/или абсорбции ингибирующего MASP-2 антитела после подкожного введения.

В некоторых вариантах осуществления стабильные высококонцентрированные низковязкие препараты ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению содержат, состоят из или состоят в основном из следующих композиций:

а) 100-200 мг/мл ингибирующего MASP-2 антитела, 10-50 мМ гистидиновый буфер с pH от примерно 5,0 до примерно 7,0, 100-225 мМ аргинин и необязательно 100-20000 ед/мл гиалуронидазы;

б) 100-200 мг/мл ингибирующего MASP-2 антитела, 10-50 мМ гистидиновый буфер с pH от примерно 5,0 до примерно 7,0; 100-225 мМ аргинин, примерно от 0,01 до 0,08% (мас./об.) неионного сурфактанта и необязательно 100-20000 ед/мл гиалуронидазы;

с) 100-200 мг/мл ингибирующего MASP-2 антитела, 10-50 мМ цитратный буфер с pH от примерно

5,0 до примерно 7,0, 100-225 мМ аргинин и необязательно 100-20000 ед/мл гиалуронидазы;

d) 100-200 мг/мл ингибирующего MASP-2 антитела, 10-50 мМ цитратный буфер с pH от примерно 5,0 до примерно 7,0, 100-225 мМ аргинин, примерно от 0,01 до 0,08% (мас./об.) неионного сурфактанта и необязательно 100-20000 ед/мл гиалуронидазы;

e) 100-200 мг/мл ингибирующего MASP-2 антитела, 10-50 мМ сукцинатный буфер с pH от примерно 5,0 до примерно 7,0, 100-225 мМ аргинин и необязательно 100-20000 ед/мл гиалуронидазы;

f) 100-200 мг/мл ингибирующего MASP-2 антитела, 10-50 мМ сукцинатный буфер с pH от примерно 5,0 до примерно 7,0, 100-225 мМ аргинин, примерно от 0,01 до 0,08% (мас./об.) неионного сурфактанта и необязательно 100-20000 ед/мл гиалуронидазы.

В некоторых вариантах осуществления стабильные высококонцентрированные низковязкие препараты ингибирующего MASP-2 антитела по настоящему изобретению содержат, состоят из или состоят в основном из следующих композиций:

g) 185±18,5 мг/мл ингибирующего MASP-2 антитела, 20±2 мМ цитратный буфер с pH примерно 5,8, 200±20 мМ аргинин и необязательно 100-20000 ед/мл гиалуронидазы;

h) 185±18,5 мг/мл ингибирующего MASP-2 антитела, 20±2 мМ цитратный буфер с pH примерно 5,8, 200±20 мМ аргинин, примерно 0,01% (мас./об.) полисорбата 80 и необязательно 100-20000 ед/мл гиалуронидазы;

i) 185±18,5 мг/мл ингибирующего MASP-2 антитела, 20±2 мМ гистидиновый буфер с pH примерно 5,9, 200±20 мМ аргинин и необязательно 100-20000 ед/мл гиалуронидазы;

j) 185±18,5 мг/мл ингибирующего MASP-2 антитела, 20±2 мМ гистидиновый буфер с pH примерно 5,9, 200±20 мМ аргинин, примерно 0,01% полисорбата 80 и необязательно 100-20000 ед/мл гиалуронидазы.

Способы получения высококонцентрированных низковязких препаратов ингибирующего MASP-2 антитела

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения препарата, содержащего 100 мг/мл или более ингибирующего MASP-2 антитела, включающему

(a) получение первого фармацевтического препарата, содержащего очищенное OMS646, при этом первый фармацевтический препарат имеет первый состав и содержит не более 50 мг/мл белка OMS646;

(b) фильтрование первого фармацевтического препарата, с получением второго фармацевтического препарата, при этом второй фармацевтический препарат имеет второй состав в результате фильтрования; и

(c) концентрирование второго фармацевтического препарата с получением концентрированного раствора антитела, содержащего 100 мг/мл или более OMS646.

Сформулированный нефасованный раствор, как правило, имеет фиксированную концентрацию белка для того, чтобы нужный разливаемый в емкости объем оставался постоянным. Способ производства жидкого препарата лекарственного средства, как правило, включает смешивание ингибирующего MASP-2 антитела с буферной системой, эксципиентами и необязательно сурфактантом с последующим асептическим фильтрованием и разливанием во флаконы (или другие контейнеры, такие как шприцы) и герметизацией (например, укупориванием пробкой или крышкой или т.п.).

Таблица 1

Иллюстративный препарат 1

Компонент (USP), добавляемый в воду для инъекций	Концентрация
OMS646 антитело	185 мг/мл
Цитрат натрия	20 мМ
L-аргинин-HCl	200 мМ
Полисорбат 80	0,01%

Таблица 2

Иллюстративный препарат 2

Компонент (USP), добавляемый в воду для инъекций	Концентрация
OMS646 антитело	185 мг/мл
L-Гистидин	20 мМ
L-аргинин-HCl	200 мМ
Полисорбат 80	0,01%

Способы лечения.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от или с риском развития зависимого от MASP-2 связанного с комплементом заболевания или нарушения,

включающему введение высококонцентрированного низковязкого препарата, содержащего ингибирующее MASP-2 антитело (например, OMS646), раскрытого в настоящем документе.

Как описано в патенте США № 7919094, патенте США № 8840893, патенте США № 8652477, патенте США № 8951522, патенте США № 9011860, патенте США № 9644035, публикациях патентных заявок США № US2013/0344073, US2013/0266560, US2015/0166675, US2017/0137537, US2017/0189525 и одновременно находящихся на рассмотрении патентных заявках США с серийными номерами 15/476154, 15/347434, 15/470647, 62/315857, 62/275025 и 62/527926 (правообладателем в каждом случае является Omeros Corporation, правопреемник для настоящей заявки, все указанные документы включены в настоящий документ посредством ссылки), MASP-2-зависимая активация комплемента вносит определенный вклад в патогенез многочисленных острых и хронических болезненных состояний. Например, как описано в патенте США № 8951522, основная функция системы комплемента, части врожденной иммунной системы, заключается в защите хозяина от инфекционных агентов, однако неадекватная или избыточная активация системы комплемента может приводить к серьезному заболеванию, такому как тромботические микроангиопатии (ТМА, включая аГУС, ТТП и ГУС), при котором повреждение эндотелия, а также богатые фибрином и тромбоцитами тромбы в микроциркуляторном русле приводят к повреждению органов. Лектиновый путь играет доминирующую роль в активации комплемента в условиях стресса или повреждения эндотелиальных клеток, и предотвращение активации MASP-2 и лектинового пути останавливает последовательность ферментативных реакций, приводящих к образованию мембраноатакующего комплекса, активации тромбоцитом и рекрутингу лимфоцитов. Как описано в патенте США № 8652477, помимо инициации лектинового пути, MASP-2 также может активировать систему свертывания крови и может расщеплять протромбин до тромбина.

Как описано в примере 1 и патенте США № 9011860, OMS646 является сильным ингибитором лектинзависимой активации комплемента. Данное антитело существенно не связывается (по меньшей мере с 5000-кратно меньшей аффинностью) с другими сериновыми протеазами пути активации комплемента, C1r, C1s, MASP-1 и MASP-3 и не ингибирует классический путь активации комплемента.

Соответственно в некоторых вариантах осуществления способ включает введение пациенту, страдающему от или с риском развития зависимого от MASP-2 связанного с комплементом заболевания или нарушения, любого из высококонцентрированных низковязких препаратов ингибирующего MASP-2 антитела, раскрытых в настоящем документе, в количестве, достаточном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента у указанного субъекта-млекопитающего и, таким образом, лечения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления в способах можно использовать любой из наборов или предварительно заполненных контейнеров (например, предварительно заполненных шприцов или флаконов), описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ может дополнительно включать до введения препарата пациенту определение того, что пациент имеет заболевание или нарушение, связанное с лектиновым путем активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение модификатора проницаемости тканей (например, гиалуронидазы), который способствует увеличению абсорбции или диспергирования ингибирующего MASP-2 антитела после парентерального введения. Модификатор проницаемости тканей можно вводить совместно с препаратом ингибирующего MASP-2 антитела или вводить последовательно (например, в пределах 5 мин после введения препарата ингибирующего MASP-2 антитела в тот же участок или рядом с участком введения).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, который нуждается в этом, инъекции из первого предварительно заполненного шприца, содержащего высококонцентрированный низковязкий препарат, содержащий ингибирующее MASP-2 антитело (например, OMS646), для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту инъекции из второго предварительно заполненного шприца, содержащего модификатор проницаемости тканей, при этом инъекцию выполняют в участок или рядом с участком, в который было инъецировано ингибирующее MASP-2 антитело.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой тромботическую микроангиопатию (ТМА), включая тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), рефрактерную ТТП, синдром Апшоу-Шульмана (САШ), гемолитический уремический синдром (ГУС), атипичный гемолитический уремический синдром (аГУС), не зависимый от фактора H атипичный гемолитический уремический синдром, аГУС, вызванный инфекцией, устойчивый к плазмотерапии аГУС, ТМА, вызванную раком, ТМА, вызванную химиотерапией, ТМА, вызванную трансплантацией, или ТМА, связанную с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой заболевание почек, включая, но без ограничения мезангиопролиферативный гломерулонефрит, мембранозный гломерулонефрит, мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (мезангио-капиллярный гломерулонефрит), острый постинфекционный гломерулонефрит (постстрептококковый гломерулонефрит), С3-гломерулопатию, криоглобулинемический гломерулонефрит, слабоиммунный некротизирующий серповидный гломерулонефрит, волчаночный нефрит, пурпуру

Геноха-Шенлейна и IgA-нефропатию.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой фиброз почек (например, тубулоинтерстициальный фиброз) и/или протеинурию у субъекта, страдающего от или с риском развития хронической почечной недостаточности, хроническую почечную недостаточность, гломерулярное заболевание (например, фокальный сегментный гломерулосклероз), заболевание, связанное с иммунными комплексами (например, IgA-нефропатию, мембранозную нефропатию), волчаночный нефрит, нефротический синдром, диабетическую нефропатию, тубулоинтерстициальное повреждение и гломерулонефрит (например, С3-гломерулопатию), либо заболевание или состояние, связанное с протеинурией, включая, но без ограничения нефротический синдром, предэклампсию, эклампсию, токсическое поражение почек, амилоидоз, коллагеноз сосудов (например, системную красную волчанку), обезвоживание, гломерулярные заболевания (например, мембранозный гломерулонефрит, фокальный сегментный гломерулонефрит, С3-гломерулопатию, болезнь минимальных изменений, липоидный нефроз), состояние при интенсивной физической нагрузке, стрессе, доброкачественную ортостатическую (постуральную) протеинурию, фокальный сегментный гломерулосклероз, IgA-нефропатию (т.е. болезнь Бергера), IgM-нефропатию, мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит, мембранозную нефропатию, болезнь минимальных изменений, саркоидоз, синдром Альпорта, сахарный диабет (диабетическую нефропатию), лекарственную токсичность (например, вызываемую НПВС, никотином, пеницилламином, карбонатом лития, золотом и другими тяжелыми металлами, ингибиторами АПФ, антибиотиками (например, адриамицином) или опиатами (например, героином), или другими нефротоксинами); болезнь Фабри, инфекции (например, ВИЧ, сифилис, гепатит А, В или С, постстрептококковую инфекцию, мочеполовой шистозоматоз); аминокацидурию, синдром Фанкони, гипертонический нефросклероз, интерстициальный нефрит, серповидноклеточную анемию, гемоглобинурию, множественную миелому, миоглобинурию, отторжение органа (например, отторжение трансплантата почки), геморрагическую лихорадку Эбола, синдром ногтей-надколенника, семейную средиземноморскую лихорадку, HELLP-синдром, системную красную волчанку, гранулематоз Вегенера, ревматоидный артрит, болезнь накопления гликогена 1 типа, синдром Гудпасчера, пурпуру Геноха-Шенлейна, инфекцию мочевых путей, распространившуюся на почки, синдром Шегрена и постинфекционный гломерулонефрит.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой воспалительную реакцию в результате трансплантации ткани или органа, включая, но без ограничения аллотрансплантацию или ксенотрансплантацию целых органов (например, почки, сердца, печени, поджелудочной железы, легкого, роговицы и т.п.) или пересадку тканей (например, клапанов, сухожилий, костного мозга и т.п.).

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание представляет собой ишемическое и реперфузионное повреждение (И/Р), включая, но без ограничения И/Р миокарда, И/Р желудочно-кишечного тракта, И/Р почки и И/Р после устранения аневризмы аорты, И/Р, связанное с применением искусственного кровообращения, И/Р мозга после инсульта, после трансплантации органа или повторного присоединения отделенных или травмированных конечностей или пальцев; вследствие ревааскуляризации трансплантатов и/или реплантатов, а также восстановления гемодинамики после шока и/или хирургических процедур.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой осложнение, связанное с диабетом без ожирения (диабетом 1 типа или инсулинозависимым сахарным диабетом), и/или осложнения, связанные с диабетом 1 типа или 2 типа (развивающимся у взрослых), включая, но без ограничения диабетическую ангиопатию, диабетическую невропатию, диабетическую ретинопатию или диабетический макулярный отек.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой сердечно-сосудистое заболевание или нарушение, включая, но без ограничения, пурпуру Геноха-Шенлейна, васкулит, связанный с системной красной волчанкой, васкулит, связанный с ревматоидным артритом (также называемым злокачественным ревматоидным артритом), геморрагический васкулит и синдром Такаясу; дилатационную кардиомиопатию; диабетическую ангиопатию; болезнь Кавасаки (артериит); венозную газовую эмболию (ВГЭ) и подавление рестеноза после установления стента, ротационной атерэктомии и/или чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (ЧТКА).

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой воспалительное желудочно-кишечное заболевание, включая, но без ограничения панкреатит, дивертикулит и заболевания кишечника, включая болезнь Крона, язвенный колит, синдром раздраженной кишки и воспалительное заболевание кишечника (ВЗК).

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой легочное заболевание, включая, но без ограничения острый респираторный дистресс-синдром, связанное с переливанием крови острое повреждение легких, ишемическое/реперфузионное острое повреждение легких, хроническое обструктивное заболевание легких, астму, гранулематоз Вегенера, заболевание с образованием антител к базальной мембране клубочков (синдром Гудпасчера), синдром мекониевой аспирации, аспирационную пневмонию, облитерирующий брон-

хиолит, идиопатический пульмонарный фиброз, острое повреждение легких после ожога, некардиогенный отек легких, связанные с переливанием крови угнетение дыхания и эмфизему.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с компонентом заболевания или нарушение представляет собой инициированную экстракорпоральной процедурой воспалительную реакцию и способ включает лечение субъекта, подвергаемого процедуре экстракорпорального кровообращения, включая, но без ограничения гемодиализ, плазмаферез, лейкоферез, экстракорпоральную мембранную оксигенацию (ЭКМО), гепарин-индуцированную экстракорпоральную ЛНП-преципитацию (ГЭЛП) и сердечно-легочное шунтирование (СЛШ).

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с компонентом заболевания или нарушение представляет собой воспалительные или не воспалительные артритиды и другие скелетно-мышечные заболевания, включая, но без ограничения остеоартрит, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, подагру, невропатическую артропатию, псориазический артрит, анкилозирующий спондилит или другие спондилоартропатии и кристаллические артропатии, мышечную дистрофию и системную красную волчанку (СКВ).

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с компонентом заболевания или нарушение представляет собой кожное заболевание, включая, но без ограничения псориаз, аутоиммунные буллезные дерматозы, эозинофильный спонгиоз, буллезный пемфигоид, приобретенный буллезный эпидермолиз, атопический дерматит, герпес беременных и другие кожные заболевания, а также термические и химические ожоги, включая вызываемый ими синдром капиллярной утечки.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с компонентом заболевания или нарушение представляет собой заболевание или травму периферической нервной системы (ПНС) и/или центральной нервной системы (ЦНС), включая, но без ограничения рассеянный склероз (РС), миастению гравис (МГ), болезнь Гентингтона (БГ), боковой амиотрофический склероз (БАС), синдром Гийена-Барре, реперфузию после инсульта, остеохондроз, травму головного мозга, болезнь Паркинсона (БП), болезнь Альцгеймера (БА), синдром Миллера-Фишера, травму и/или кровотечение в головном мозге, травматическое повреждение мозга, демиелинизацию и менингит.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с компонентом заболевания или нарушение представляет собой сепсис или состояние, возникающее в результате сепсиса, включая, без ограничения тяжелый сепсис, септический шок, острый респираторный дистресс-синдром в результате сепсиса, гемолитическую анемию, синдром системной воспалительной реакции или геморрагический шок.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с компонентом заболевания или нарушение представляет собой заболевание мочеполовой системы, включая, но без ограничения синдром болезненного мочевого пузыря, синдром гиперактивного мочевого пузыря, хронический небактериальный цистит и интерстициальный цистит, мужское и женское бесплодие, дисфункцию плаценты, а также самопроизвольный аборт и преэклампсию.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с компонентом заболевания или нарушение представляет собой воспалительную реакцию у субъекта, получающего химиотерапевтические средства и/или лучевую терапию, в том числе, без ограничения, для лечения раковых состояний.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с компонентом заболевания или нарушение представляет собой зависимый от ангиогенеза рак, включая, но без ограничения, солидную опухоль(и), гемопоэтическую опухоль(и), карциноидные опухоли с высоким потенциалом злокачественности и опухолевые метастазы.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с компонентом заболевания или нарушение представляет собой зависимую от ангиогенеза доброкачественную опухоль, включая, но без ограничения, гемангиомы, невриномы слухового нерва, нейрофибромы, трахомы, карциноидные опухоли и пиогенные гранулемы.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с компонентом заболевания или нарушение представляет собой эндокринное заболевание, включая, но без ограничения тиреоидит Хашимото, стресс, тревожность и другие потенциальные гормональные нарушения, включающие регулируемое высвобождение пролактина, фактора роста или инсулиноподобного фактора роста, а также адренокортикотропина из гипофиза.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с компонентом заболевания или нарушение представляет собой офтальмическое заболевание или нарушение, включая, но без ограничения возрастную макулярную дегенерацию, глаукому и эндофтальмит.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с компонентом заболевания или нарушение представляет собой ангиогенное заболевание или состояние глаз, включая, но без ограничения возрастную макулярную дегенерацию, увеит, меланому глаз, неоваскуляризацию роговицы, первичный птеригий, стромальный герпетический кератит, HSV-1-индуцированный лимфангиогенез роговицы, пролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, ретинопатию недоношенных, окклюзию вены сетчатки, отторжение трансплантата роговицы, неоваскулярную

глаукому, кровоизлияние в стекловидное тело вследствие пролиферативной диабетической ретинопатии, нейромиелит зрительного нерва и покраснение радужки.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой диссеминированную внутрисосудистую коагуляцию (ДВК) или другое опосредованное комплементом нарушение свертываемости крови, включая ДВК вследствие сепсиса, тяжелой травмы, в том числе, неврологической травмы (например, острой травмы головы, см. Kumura et al., *Acta Neurochirurgica*, 85:23-28 (1987), инфекции (бактериальной, вирусной, грибковой, паразитарной), рака, осложнений при родовспоможении, заболевания печени, тяжелой токсической реакции (например, укуса змеи, укуса насекомого, реакции на переливание крови), шока, теплового удара, отторжения трансплантата, аневризмы сосудов, печеночной недостаточности, химиотерапии или лучевой терапии рака, ожога или случайного облучения.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение выбирают из группы, состоящей из острого лучевого синдрома, болезни плотного осадка, болезни Дегоса, катастрофического антифосфолипидного синдрома (КАФС), болезни Бехчета, криоглобулинемии, пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ) и болезни холодовых агглютининов.

В некоторых вариантах осуществления зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение выбирают из группы, состоящей из аГУС, ТГСК-ТМА, IgA-Н и волчаночного нефрита (ВН).

Атипичный гемолитический уремический синдром (аГУС).

Атипичный гемолитический уремический синдром (аГУС) относится к группе состояний, называемых "тромботическими микроангиопатиями". При атипичной форме ГУС (аГУС) заболевание связано с дефектной регуляцией комплемента и может быть либо спорадическим, либо семейным. Семейные случаи аГУС связаны с мутациями в генах, кодирующих белки активации комплемента или регуляции комплемента, в том числе белки фактора Н, фактора I, фактора В, мембранного кофактора CD46 комплемента, а также связанного с фактором Н комплемента белка 1 (CFHR1) и связанного с фактором Н комплемента белка 3 (CFHR3) (Zipfel, P.F. et al., *PLoS Genetics*, 3(3):e41 (2007)). Объединяющей чертой этого разнообразного множества генетических мутаций, связанных с аГУС, является предрасположенность к повышенной активации комплемента на поверхностях клеток или тканей. Субъект имеет риск развития аГУС после появления по меньшей мере одного или более симптомов, характерных для аГУС (например, анемии, тромбоцитопении и/или почечной недостаточности), и/или наличия тромботической микроангиопатии в биопсийном образце, полученном от субъекта. Определение того, имеет ли субъект риск развития аГУС, включает определение того, имеет ли субъект генетическую предрасположенность к развитию аГУС, что можно определять путем оценки генетической информации (например, из базы данных, содержащей информацию о генотипе субъекта) или проведения по меньшей мере одного генетического скрининг-теста для субъекта с целью определения наличия или отсутствия генетического маркера, связанного с аГУС (т.е. определения наличия или отсутствия генетической мутации, связанной с аГУС, в генах, кодирующих фактор Н (CFH), фактор I (CFI), фактор В (CFB), мембранный кофактор CD46, компонент С3 комплемента, связанный с фактором Н комплемента белок 1 (CFHR1), или гене THBD (кодирующем антикоагулянтный белок тромбомодулин), или генах, кодирующих связанный с фактором Н комплемента белок 3 (CFHR3), или связанный с фактором Н комплемента белок 4 (CFHR4)), либо путем секвенирования генома, либо путем специфического для гена анализа (например, анализа методом ПЦР), и/или определения того, имеет ли субъект в семейном анамнезе аГУС. Методы генетического скрининга на присутствие или отсутствие генетической мутации, связанной с аГУС, хорошо известны, например, см. Noris M. et al., "Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome", 2007 Nov 16 [доработано 2011 Mar 10]; В: Pagon R.A., Bird T.D., Dolan C.R. et al., editors. *GeneReviews™*, Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Как описано в U S2015/0166675, в разработанной для человека *ex vivo* экспериментальной модели тромботической микроангиопатии (ТМА) антитело OMS646 ингибировало активацию комплемента и образование тромба на эндотелиальных клетках микрососудов, подвергнутых воздействию образцов сыворотки от пациентов с аГУС, как в острой фазе, так и во время ремиссии. Как дополнительно описано в US 2017/0137537, данные, полученные в фазе 2 открытого клинического испытания (в/в введение дозы 2-4 мг/кг ингибирующего MASP-2 антитела OMS646 один раз в неделю в течение 4 последовательных недель), показали, что лечение с применением OMS646 было эффективным у пациентов с аГУС. Число тромбоцитов у всех трех пациентов с аГУС в группах средней и высокой дозы (двое в группе средней дозы и один в группе высокой дозы) вернулось к норме со статистически значимым средним увеличением относительно исходных значений, составляющим примерно 68000 тромбоцитов/мл ($p=0,0055$).

Связанная с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток ТМА (ТГСК-ТМА).

Связанная с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток ТМА (ТГСК-ТМА) является опасным для жизни осложнением, вызываемым повреждением эндотелия. Почка является наиболее часто поражаемым органом, хотя ТГСК-ТМА может быть мультисистемным заболеванием, также затрагивающим легкие, кишечник, сердце и головной мозг. Развитие даже умеренной ТМА связано с долговременной почечной недостаточностью. Частота развития ТМА, связанной с аллогенной ТГСК, бывает разной в зависимости от варьирующих диагностических критериев и процедуры подготовки к трансплантации, а

также схем профилактики реакции "трансплантат против хозяина", с наиболее часто используемыми препаратами ингибиторов кальциневрина (Ho V.T. et al., *Biol. Blood Marrow Transplant*, 11(8):571-5, 2005).

Как описано в US 2017/0137537, в фазе 2 клинического испытания (в/в введение дозы 4 мг/кг ингибирующего MASP-2 антитела OMS646 один раз в неделю в течение 4-8 последовательных недель) введение OMS646 приводило к улучшению показателей ТМА у пациентов, страдающих от ТГСК-ТМА, включая статистически значимое улучшение уровней ЛДГ и гаптоглобина. Пациенты с ТГСК-ТМА, получавшие OMS646, относятся к категории наиболее трудно поддающихся лечению, т.е. было получено клиническое доказательство терапевтического эффекта OMS646 у пациентов с ТГСК-ТМА.

Иммуноглобулин А - нефропатия (IgA-N).

Иммуноглобулин А - нефропатия (IgA-N) представляет собой аутоиммунное заболевание почек, приводящее к внутривисочечному воспалению и повреждению почек. IgA-N является наиболее распространенной в мире первичной гломерулопатией. С ежегодным показателем заболеваемости 2,5 на 100000, прогнозируемое число заболевших IgA-N в США составляет 1 из 1400 человек. У примерно 40% пациентов с IgA-N развивается конечная стадия почечной недостаточности (КСПН). Пациенты, как правило, имеют микроскопическую гематурию со слабой или умеренной протеинурией и разной степенью почечной недостаточности (Wyatt R.J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 368(25):2402-14, 2013). Такие клинические показатели, как нарушение функции почек, устойчивая гипертензия и тяжелая протеинурия (более 1 г в сутки), связаны с неблагоприятным прогнозом (Goto M. et al., *Nephrol. Dial. Transplant*, 24(10):3068-74, 2009; Berthoux F. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 22(4):752-61, 2011). Протеинурия является сильнейшим прогностическим фактором, независимым от других факторов риска, в многочисленных крупных обсервационных исследованиях и проспективных исследованиях (Coppo R. et al., *J. Nephrol.*, 18(5):503-12, 2005; Reich H.N. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18(12):3177-83, 2007). По оценкам 15-20% пациентов достигают КСПН в течение 10 лет после начала заболевания, если не применять лечение (D'Amico G., *Am. J. Kidney Dis.*, 36(2):227-37, 2000). Диагностическим признаком IgA-N являются обильные отложения IgA отдельно либо с IgG, IgM или обоими в мезангии клубочков.

Как описано в US2017/0189525, в фазе 2 открытого клинического испытания для заболевания почек (в/в введение дозы 4 мг/кг ингибирующего MASP-2 антитела OMS646 один раз в неделю в течение 12 последовательных недель), у пациентов с IgA-нефропатией, получавших OMS646, было обнаружено клинически значимое и статистически достоверное снижение соотношения альбумин/креатинин в моче (uACR) на всем протяжении испытания и уменьшение уровней белка в моче, собранной за 24 ч, относительно исходного уровня до конца лечения.

Волчаночный нефрит (ВН).

Основным осложнением системной красной волчанки (СКВ) является нефрит, также известный как волчаночный нефрит, который классифицируют, как вторичную форму гломерулонефрита. Вплоть до 60% взрослых с СКВ на более поздних стадиях развития заболевания в той или иной степени страдают заболеванием почек (Koda-Kimble et al., *Koda-Kimble & Young's Applied Therapeutics: the clinical use of drugs*, 10th ed, Lippincott Williams & Wilkins, p. 792-9, 2012) с частотой случаев заболевания 20-70 на 100000 человек в США. Волчаночный нефрит часто имеет место у пациентов с другими симптомами активной СКВ, включая утомляемость, лихорадку, сыпь, артрит, серозит или заболевание центральной нервной системы (Pisetsky D.S. et al., *Med. Clin. North. Am.*, 81(1):113-28, 1997). Некоторые пациенты имеют бессимптомный волчаночный нефрит; однако при регулярном обследовании такие аномалии лабораторных результатов, как повышенные сывороточные уровни креатинина, низкие уровни альбумина, либо белок или осадок в моче, свидетельствуют об активном волчаночном нефрите.

Как описано в патентной заявке США № 15/470647, в фазе 2 открытого клинического испытания для заболевания почек (в/в введение дозы 4 мг/кг ингибирующего MASP-2 антитела OMS646 один раз в неделю в течение 12 последовательных недель) у 4 из 5 пациентов с волчаночным нефритом (ВН), получавших анти-MASP-2 антитело, было обнаружено клинически значимое уменьшение уровней белка в моче, собранной за 24 ч, относительно исходного уровня до конца лечения.

Введение.

Высококонцентрированные низковязкие препараты ингибирующего MASP-2 антитела, описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту, который нуждается в лечении, способами, известными в данной области, такими как однократная или многократные инъекции или инфузии, в течение определенного периода времени, выполняемые соответствующим образом, например подкожной, внутривенной, внутривисочечной, внутримышечной инъекцией или инфузией. Как описано в настоящем документе, парентеральные препараты могут быть получены в виде стандартной лекарственной формы для легкости введения и однородности дозировки. Используемый в настоящем документе термин "стандартная лекарственная форма" означает физически дискретные единицы, подходящие в качестве единичных доз для субъекта, которого предстоит лечить, при этом каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для оказания желательного терапевтического эффекта, в сочетании с выбранным фармацевтическим водным раствором.

Для предотвращения или лечения заболеваний соответствующая доза ингибирующего MASP-2 антитела будет зависеть от типа заболевания, которое подвергают лечению, степени тяжести и течения за-

болевания. Антитело предпочтительно вводят пациенту один раз или серией введений. В зависимости от типа и степени тяжести заболевания, ингибирующее MASP-2 антитело можно вводить в фиксированной дозе или в дозе, рассчитанной в миллиграммах на килограмм массы тела (мг/кг). Иллюстративные дозы ингибирующего MASP-2 антитела, содержащегося в препаратах, описанных в настоящем документе, включают, например, от примерно 0,05 мг/кг до примерно 20 мг/кг, например примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/кг, их можно вводить ежедневно, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц.

Иллюстративные фиксированные дозы ингибирующего MASP-2 антитела, например препаратов, описанных в настоящем документе, включают, например, от примерно 10 мг до примерно 1000 мг, например от примерно 50 мг до примерно 750 мг, например от примерно 100 мг до примерно 500 мг, например от примерно 200 мг до примерно 400 мг, например примерно 200 мг, примерно 225 мг, примерно 250 мг, примерно 275 мг, примерно 300 мг, примерно 325 мг, примерно 350 мг, примерно 375 мг или примерно 400 мг, их можно вводить ежедневно, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц.

Что касается объема доставки для препаратов, концентрацию антитела в препарате, используемом терапевтически, определяют с учетом предоставления антитела в такой дозе и объеме, которые переносимы и приносят терапевтическую пользу пациенту. В случае терапевтического препарата антитела, вводимого инъекцией, концентрация антитела будет зависеть от объема инъекции (как правило, от 0,5 до 3 мл). Для терапии на основе антител может потребоваться введение доз, составляющих несколько мг/кг, один раз в сутки, в неделю, в месяц или в несколько месяцев. Соответственно, если ингибирующее MASP-2 антитело следует вводить в дозе от 1 до 5 мг/кг (например, 1, 2, 3, 4 или 5 мг/кг) массы тела пациента, и масса тела среднего пациента составляет 75 кг, тогда от 75 до 375 мг антитела нужно будет вводить в инъекционном объеме от 0,5 до 3,0 мл. Альтернативно препарат вводят в концентрации, подходящей для доставки, в более чем один участок инъекции при каждой процедуре.

В предпочтительном варианте осуществления, в котором концентрация антитела OMS646 в препарате составляет примерно 185 мг/мл, для достижения дозы от 1 до 5 мг/кг массы тела пациента (предположительно, 75 кг), препарат должен быть доставлен подкожно в инъекционном объеме от примерно 0,40 мл до примерно 2,0 мл.

Как описано в настоящем документе, препараты по настоящему изобретению подходят как для внутривенного (в/в) введения, так и для подкожного (п/к) введения.

В зависимости от типа и степени тяжести заболевания, ингибирующее MASP-2 антитело можно вводить внутривенно в фиксированной дозе или в дозе "миллиграмм на килограмм" (мг/кг). Иллюстративные дозы ингибирующего MASP-2 антитела, содержащегося в препаратах, описанных в настоящем документе, можно доставлять внутривенно путем разбавления соответствующего количества высококонцентрированного препарата, описанного в настоящем документе, фармацевтически приемлемым разбавителем перед введением так, что ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту-человеку в дозе, например, от примерно 0,05 мг/кг до примерно 20 мг/кг, например примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/кг, которую можно вводить ежедневно, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц.

Ингибирующее MASP-2 антитело также можно вводить внутривенно в фиксированной дозе путем разбавления соответствующего количества высококонцентрированного препарата, описанного в настоящем документе, фармацевтически приемлемым разбавителем перед введением так, что ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту-человеку в дозе, например, от примерно 10 мг до примерно 1000 мг, например от примерно 50 мг до примерно 750 мг, например от примерно 100 мг до примерно 500 мг, например от примерно 200 мг до примерно 400 мг, например примерно 200 мг, примерно 225 мг, примерно 250 мг, примерно 275 мг, примерно 300 мг, например от примерно 300 мг до примерно 400 мг, например примерно 310 мг, примерно 320 мг, примерно 325 мг, примерно 330 мг, примерно 340 мг, примерно 350 мг, примерно 360 мг, примерно 370 мг, примерно 375 мг, примерно 380 мг, примерно 390 мг или примерно 400 мг, которую можно вводить ежедневно, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц.

В некоторых вариантах осуществления препарат, содержащий ингибирующее MASP-2 антитело, разбавляют в фармацевтически приемлемом разбавителе перед системным (например, внутривенным) введением. Иллюстративные разбавители, которые можно использовать, включают воду для инъекций, 5% раствор декстрозы, 0,9% солевой раствор, раствор Рингера и другие фармацевтически приемлемые разбавители, подходящие для внутривенного введения. Без какого-либо ограничения, иллюстративные дозы ингибирующего MASP-2 антитела, вводимые внутривенно для лечения субъекта, страдающего от MASP-2-зависимого связанного с комплементом заболевания или нарушения, включают, например, от примерно 0,05 мг/кг до примерно 20 мг/кг, например примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/кг, их можно вводить ежедневно, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц. Иллюстративные фиксированные дозы ингибирующего MASP-2 антитела, вводимые внутривенно для лечения субъекта, страдающего от MASP-2-зависимого связанного с комплементом заболевания или нарушения, включают, например, от примерно 10 мг до примерно

1000 мг, например, от примерно 50 мг до примерно 750 мг, например от примерно 100 мг до примерно 500 мг, например от примерно 200 мг до примерно 400 мг, например примерно 200 мг, примерно 225 мг, примерно 250 мг, примерно 275 мг, примерно 300 мг, примерно 325 мг, примерно 350 мг, примерно 375 мг или примерно 400 мг, их можно вводить ежедневно, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц.

В некоторых вариантах осуществления препарат разбавляют в фармацевтически приемлемом разбавителе и вводят субъекту, который нуждается в этом, в начальной в/в нагрузочной дозе (например, от примерно 300 мг до примерно 750 мг, например от примерно 400 мг до примерно 750 мг, например от примерно 300 мг до примерно 500 мг, например от примерно 300 мг до примерно 400 мг, например примерно 300 мг, примерно 310 мг, примерно 320 мг, примерно 330 мг, примерно 340 мг, примерно 350 мг, примерно 360 мг, примерно 370 мг, примерно 380 мг, примерно 390 мг или примерно 400 мг) с последующими одной или более подкожными инъекциями препарата в дозе от 1 до 5 мг/кг массы тела или в фиксированной дозе от примерно 100 мг до примерно 400 мг, например примерно 100 мг, примерно 150 мг, примерно 200 мг, примерно 250 мг, примерно 300 мг, примерно 350 мг или примерно 400 мг. Например, в/в введение начальной нагрузочной дозы может быть предпочтительным в особых случаях, например, когда пациент находится в больнице или в клинике и страдает от острого состояния (например, аГУС), при котором необходимо вводить начальную нагрузочную дозу, с последующим введением поддерживающих доз препарата подкожной инъекцией.

Примеры

Далее изобретение проиллюстрировано в следующих примерах, которые не следует рассматривать, как ограничивающие. Все литературные источники, цитированные в настоящем документе, специально включены посредством ссылки.

Пример 1.

Данный пример показывает, что OMS646, моноклональное антитело, нацеленное на MASP-2 человека, связывает MASP-2 человека с высокой аффинностью и блокирует лектиновый путь активации комплемента.

Введение.

Полностью человеческое моноклональное антитело, нацеленное на MASP-2 человека (с последовательностью SEQ ID NO: 1), называемое "OMS646", было получено, как описано в WO 2012/151481, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Моноклональное антитело OMS646 содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи (VL) с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3. OMS646 состоит из переменных областей из человеческого антитела, слитых с константными областями тяжелой цепи и легкой цепи лямбда IgG4 человека, и секретируется в виде связанного дисульфидными связями гликозилированного тетрамера, состоящего из двух идентичных тяжелых цепей (имеющих аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4) и двух идентичных легких цепей лямбда (имеющих аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5). Остаток аспарагина (N) в положении 295 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 4) гликозилирован и выделен жирным шрифтом и подчеркиванием в последовательности.

Переменная область тяжелой цепи.

Ниже приведена последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) OMS646. Области CDR по Kabat (31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-107 (H3)) выделены жирным шрифтом; и области CDR по Chothia (26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-101 (H3)) подчеркнуты.

Переменная область тяжелой цепи (VH) QMS646 (SEQ ID NO: 2).

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEK

SYRTSLKSRLLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCARIRRGIDYWGQGLVTVSS

Переменная область легкой цепи.

Ниже приведена последовательность переменной области легкой цепи (VL) OMS646. Области CDR по Kabat (24-34 (L1); 50-56 (L2) и 89-97 (L3)) подчеркнуты. Эти области являются одинаковыми при нумерации как по системе Kabat, так и по системе Chothia.

Переменная область легкой цепи (VL) OMS646 (SEQ ID NO: 3).

QPVLTPPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMIYQDKORPSGIPE

RFGSGNSNGNTATLTLISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVL

Полноразмерный полипептид (445 ак) мутантной тяжелой цепи IqG4 в качестве тяжелой цепи OMS646 (SEQ ID NO: 4).

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEK
 SYRTSLKSRLLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYCARIRRGIDYWGQGLTVTVSSASTKG
 PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHNTFPAVLQSSGLYSLSSVV
 TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPREVTQVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNNHTQKLSLSL
 GK

Полноразмерный полипептид (212 ак) легкой цепи QMS646 (SEQ ID NO: 5).

QPVLTPPPLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVLMYQDKQRPSPGIPE
 RFGSNGSNGTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE
 ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS
 HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Как описано в WO 2012/151481, OMS646 связывает MASP-2 и избирательно ингибирует лектиновый путь, практически не ингибируя классический путь (т.е. ингибирует лектиновый путь, при этом оставляя классический путь без изменений), и также проявляет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает MASP-2 человека с величиной K_D , составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в *in vitro* анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50} , составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50} , составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂, антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, причем молекула IgG4 имеет мутацию S228P.

Как описано в WO 2012/151481, установлено, что OMS646 avidно связывает MASP-2 человека (SEQ ID NO: 1) с >5000-кратной избирательностью в сравнении с C1s, C1r, MASP-1 или MASP-3. Как показано в данном примере, OMS646 избирательно связывает MASP-2 человека с высокой аффинностью и обладает способностью блокировать лектиновый путь активации комплемента.

Как показано выше, OMS646 содержит

- (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую
 - i) CDR-H1, содержащую последовательность аминокислот 31-35 в SEQ ID NO: 2,
 - ii) CDR-H2, содержащую последовательность аминокислот 50-65 в SEQ ID NO: 2, и
 - iii) CDR-H3, содержащую последовательность аминокислот 95-107 в SEQ ID NO: 2; и
- (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую
 - i) CDR-L1, содержащую последовательность аминокислот 24-34 в SEQ ID NO: 3,
 - ii) CDR-L2, содержащую последовательность аминокислот 50-56 в SEQ ID NO: 3, и
 - iii) CDR-L3, содержащую последовательность аминокислот 89-97 в SEQ ID NO: 3.

Как дополнительно описано в WO2012/151481, показано, что вариант OMS646, имеющий вариабельную область тяжелой цепи с по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 2 и вариабельную область легкой цепи с по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 3, обладает функциональной активностью, аналогичной активности OMS646. Вариант OMS646, описанный в WO 2012/151481, содержит

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: SEQ ID NO: 2 или ее вариант, представляющий собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2, при этом остаток 31 представляет собой R, остаток 32 представляет собой G, остаток 33 представляет собой K, остаток 34 представляет собой M, остаток 35 представляет собой G, остаток 36 представляет собой V, остаток 37 представляет собой S, остаток 50 представляет собой I, остаток 51 представляет собой A, остаток 52 представляет собой H, остаток 53 представляет собой L, остаток 54 представляет собой F, остаток 55 представляет собой S, остаток 56 представляет собой S, остаток 57 представляет собой D, остаток 58 представляет собой E, остаток 59 представляет собой K, остаток 60 представляет собой S, остаток 61 представляет собой Y, остаток 62 представляет собой R, остаток 63 представляет собой T, остаток 64 представляет собой S, остаток 65 представляет собой L, остаток 66 представляет собой K, остаток 67 представляет собой S, остаток 95 представляет собой Y, остаток 96 представляет собой Y, остаток 97 представляет собой C, остаток 98 представляет собой A, остаток 99 представляет собой R, остаток 100 представляет собой I, остаток 101 представляет собой R, остаток 102 представляет собой R или A, остаток 103 представляет собой G, остаток 104 представляет собой G, оста-

ток 105 представляет собой I, остаток 106 представляет собой D и остаток 107 представляет собой Y; и

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: SEQ ID NO: 3 или ее вариант, представляющий собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 3, при этом остаток 23 представляет собой S, остаток 24 представляет собой G, остаток 25 представляет собой E или D, остаток 26 представляет собой K, остаток 27 представляет собой L, остаток 28 представляет собой G, остаток 29 представляет собой D, остаток 30 представляет собой K, остаток 31 представляет собой Y или F, остаток 32 представляет собой A, остаток 33 представляет собой Y, остаток 49 представляет собой Q, остаток 50 представляет собой D, остаток 51 представляет собой K или N, остаток 52 представляет собой Q или K, остаток 53 представляет собой R, остаток 54 представляет собой P, остаток 55 представляет собой S, остаток 56 представляет собой G, остаток 88 представляет собой Q, остаток 89 представляет собой A, остаток 90 представляет собой W, остаток 91 представляет собой D, остаток 92 представляет собой S, остаток 93 представляет собой S, остаток 94 представляет собой T, остаток 95 представляет собой A, остаток 96 представляет собой V и остаток 97 представляет собой F.

1. OMS646 специфически блокирует лектинзависимую активацию терминальных компонентов комплемента..

Методы.

Эффект OMS646 на отложение мембраноатакующего комплекса (МАК) анализировали с применением специфических для пути активации комплемента условий в случае лектинового пути, классического пути и альтернативного пути. Для этой цели использовали набор Wieslab Comp300 для скрининга комплемента (Wieslab, Lund, Sweden) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты.

Фиг. 1А графически иллюстрирует степень зависимость от лектинового пути отложения МАК в присутствии разных количеств ингибирующего антитела против MASP-2 человека (OMS646). Фиг. 1В графически иллюстрирует степень зависимость от классического пути отложения МАК в присутствии ингибирующего антитела против MASP-2 человека (OMS646). Фиг. 1С графически иллюстрирует степень зависимость от альтернативного пути отложения МАК в присутствии разных количеств ингибирующего антитела против MASP-2 человека (OMS646). Как видно на фиг. 1А, OMS646 блокирует опосредованное лектиновым путем активации отложение МАК с величиной IC_{50} , составляющий примерно 1 нМ. Однако OMS646 не оказывает влияние на отложение МАК, возникающее вследствие классического пути активации (фиг. 1В) или вследствие альтернативного пути активации (фиг. 1С).

Пример 2.

Исследования, предшествующие формулированию OMS646.

Введение/обоснование.

При создании белкового препарата с пониженной вязкостью следует учитывать несколько факторов, включая без ограничения природу белка, концентрацию белка, желательный диапазон pH, температуру, при которой белковый препарат будет храниться, период времени, в течение которого белковый препарат будет храниться, а также каким образом препарат будет введен пациенту. При введении инъекций препарата с пониженной вязкостью концентрация белка зависит от инъецируемого объема (как правило, от 1,0 до 2,25 мл). Если белок будет введен в дозе 2-4 мг/кг массы тела пациента и масса тела среднего пациента составляет 75 кг, тогда 150-300 мг белка нужно будет вводить в инъецируемом объеме от 1,0 до 1,62 мл. Вязкость в идеале поддерживают ниже 25 сП для обеспечения реалистичной возможности введения шприцем для подкожного введения терапевтического препарата. В некоторых вариантах осуществления вязкость поддерживают ниже примерно 20 сП, чтобы сделать возможной доставку терапевтического препарата при помощи инъекционного устройства, а также для возможности применения разных видов биологической обработки, таких как проточная фильтрация вдоль потока.

Основная цель данных исследований заключалась в идентификации компонентов препарата, которые позволили бы добиться оптимальной химической, физической и структурной стабильности антитела OMS646 в жидком препарате, для получения стабильного препарата с вязкостью менее 25 сП, например менее 20 сП, с высокой концентрацией OMS646 (100 мг/мл или выше), подходящего для подкожной инъекции субъекту-человеку.

Аналитические методы.

Для тестирования различных сочетаний буфера и эксципиентов очищенный препарат антитела OMS646 (102 мг/мл в 20 мМ растворе ацетата натрия, 50 мг/мл сорбита, pH 5,0) разбавляли до концентрации ~1 мг/мл в выбранных растворах препарата и 4-мл образцы помещали в концентраторы, предварительно промытые соответствующим буфером. Каждый образец концентрировали центрифугированием при 3200×g до объема ~1 мл. Эта процедура включала в общей сложности три раунда замены буфера.

Внешний вид препарата оценивали с применением смотровой лампы от компании Eisai Machinery, модель MIN-DX, против воды с применением белого и черного фона. Каждый образец препарата тестировали на цвет, прозрачность (опалесценцию) и наличие мелких частиц.

Содержание белка в препаратах OMS646 определяли, используя коэффициент экстинкции 1,49 мл/мг×см. Измерение поглощения при 280 нм с поправкой на поглощение при 320 нм производили с

применением кювет одноразового применения UVette и длины пути 0,2 см. Образцы готовили в двойном повторе путем разведения 1× фосфатно-солевым буфером Дульбекко (DPBS) до конечной концентрации ~2 мг/мл. Для высококонцентрированных образцов неразбавленные растворы сначала разводили 1:1 в буфере препарата, а затем разводили до концентрации ~2 мг/мл в 1× DPBS. Результаты дублированных измерений для каждого образца усредняли и рассчитывали относительное стандартное отклонение (ОСО) в процентах. Для любых дублированных образцов, имеющих >5% ОСО, готовили дополнительный набор разведенных образцов и проводили измерения.

Концентрацию белка рассчитывали следующим образом:

$$\text{Скорректированное } A_{280} = A_{280} - A_{320}$$

Концентрация белка (мг/мл) = (скорректированное A_{280} × коэффициент разведения) / 1,49 мл/мг × см

Для оценки мутности/рассеяния света образца проводили измерения для 100 мкл неразбавленного образца при 320 нм в кювете одноразового применения UVette с длиной пути 1 см. Для каждого образца на спектрофотометре измеряли пустую пробу с соответствующим буфером замены без содержания белка. После измерения образцы отбирали и использовали для анализа pH. Для нормирования показателей мутности на концентрацию образца показатель A_{320} также делили на концентрацию в мг/мл и регистрировали полученное значение в мЕОП × мл/мг.

Измерения pH всех препаратов и растворов проводили при комнатной температуре с применением калиброванного прибора SevenMulti Meter (Mettler Toledo) с электродом автоматической температурной компенсации.

Термостабильность препаратов OMS646 контролировали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Данные по температуре плавления (T_m) для мАТ получали с применением капиллярного ДСК MicroCal. Образцы белка разбавляли до конечной концентрации ~2 мг/мл в соответствующем растворе сменного буфера. Оценку образцов методом ДСК проводили путем сканирования при 20-110°C со скоростью 1 или 2°C/мин. Термостат перед сканированием был установлен на 10 мин, термостат после сканирования на 0 мин и термостат после цикла установлен на 25°C. Для анализа данных T_m скан "буфер-буфер" вычитали из скана "буфер-образец", и затем термограмму нормировали на концентрацию белка (молярную) с применением оценочной молекулярной массы 150 кДа. Получали прогрессивную базовую линию и вычитали ее из данных для облегчения определения T_m . Температуру плавления определяли с применением функции выбора пиков соответствующей программы для обработки научных данных Origin®.

Метод динамического рассеяния света (ДРС) позволяет измерять зависимость от времени флуктуации интенсивности рассеяния света от частиц в образце, при этом использовали уравнение Стокса-Эйнштейна для расчета гидродинамического радиуса частицы(частиц) в растворе. Эксперименты методом ДРС для препаратов OMS646 проводили с дублированными неразбавленными образцами (30-40 мкл) на приборе DynaPro™ Plate Reader II (Wyatt). В общей сложности получали 10 индивидуальных сканов при 25°C со временем экспозиции 5 с. Вязкость устанавливали на уровень фосфатно-солевого буфера 1,019 сП. Полученные графики распределения интенсивности сравнивали для оценки эффектов различных компонентов препарата на средний размер частиц по интенсивности (наружный диаметр), параметру общей ширины распределения частиц по размеру (общий процент полидисперсности, или % Пд), среднему диаметру пика мономера OMS646 (диаметр пика 2) и параметру ширины этого пика (% Пд пика 2). Процент полидисперсности (общий или пика 2) представляет собой параметр ширины, который отражает гетерогенность, обнаруженную на графике распределения интенсивности, где % Пд < 20% является показателем почти монодисперсного раствора и/или конформации молекул.

Стабильность в отношении химической денатурации оценивали с применением системы изотермической химической денатурации AVIA (модель 2304), которая позволяет тестировать химическую стабильность в условиях окружающей среды в автоматическом режиме за счет создания градиента денатурирующего вещества путем смешивания постоянных объемов белка, сформулированного в буфере препарата, и буфера препарата, содержащего мочевины. Вкратце сформулированный белок разводили до концентрации 0,33 мг/мл в буфере препарата. Для конкретного препарата также готовили второй буфер препарата, содержащий 10 М мочевины. Вследствие проблем с растворимостью, для препаратов, содержащих сахарозу и сорбит, готовили 9 М растворы мочевины. После стандартного времени инкубации (~30 мин) измеряли собственную флуоресценцию белка (т.е. флуоресценцию триптофана) для каждой точки данных, при этом химическое разворачивание белка приводило к экспонированию для растворителя скрытых остатков триптофана, с соответствующим красным смещением сигнала флуоресценции. Для каждого препарата данные получали в общей сложности с 24 концентрациями мочевины (0-9,0 М для маточных 10 М растворов мочевины и 0-8,1 М для маточных 9 М растворов мочевины), отношение A_{350}/A_{330} использовали для базового вычитания изменений фона флуоресценции, и использовали нелинейную аппроксимацию методом наименьших квадратов для данных конформационного перехода с разворачиванием с применением модели либо 2, либо 3 состояний.

Вязкость препаратов определяли с применением либо вискозиметра с катящимся шариком, либо реометра. Все измерения вязкости проводили при 25°C со скоростью сдвига в диапазоне от 0,5 с⁻¹ до

1000 с⁻¹. Для измерений методом катящегося шарика использовали вискозиметр Anton Paar AMVn. Для измерений вязкости при помощи катящегося шарика измеряли время, которое требовалось золотому шару для прохождения дистанции в капилляре, заполненном образцом, после наклонения капилляра на заданный угол (80°). Капилляры наклоняли в общей сложности три раза и результаты усредняли для определения конечной динамической вязкости, величины, которая не зависит от плотности образца. Для измерений методом катящегося шарика капилляр сначала прочищали с применением д/и воды и метанола. Калибровку прибора/капилляра подтверждали путем измерения стандартов вязкости 10, 50 и/или 100 сП по Брукфилду. Капилляр повторно очищали д/и водой и метанолом предварительно и между измерениями всех образцов.

Измерения вязкости при помощи реометра проводили с применением программируемого реометра DV-III Ultra, который был откалиброван с применением жидкостей со стандартной вязкостью № 10 и 50 по Брукфилду. Проводили измерения для 0,5 мл каждого образца при разных скоростях шпинделя (скоростях сдвига). Образцы, демонстрирующие показатели вязкости (сП) с <10% ОСО для всех скоростей сдвига, считали ньютоновскими в данном диапазоне, а образцы, вязкость которых зависела от скорости сдвига, считали неньютоновскими.

Измерения плотности проводили с применением денситометра Anton Paar DMA 4500M. Вкратце прибор промывали несколько раз д/и водой, а затем метанолом. Прибор калибровали для воздуха и воды перед измерением плотности воды в качестве образца. Прибор вновь промывали водой и метанолом, и проводили измерение для одного образца на материале с концентрацией ~175 мг/мл, объединенном из нескольких препаратов. Полученную величину использовали в качестве достаточно точной аппроксимации плотности высококонцентрированных препаратов OMS646 для применения в измерениях гравиметрической емкости.

Измерения осмоляльности проводили с применением осмометра, измеряющего снижение точки замерзания (осмометр Multi-Osmette, Precision Systems, модель 2430), который измеряет снижение точки замерзания раствора при увеличении концентрации растворенного вещества.

Систему подсчета количества частиц в жидкости (Nach Model 9703, модель сенсора: HRLD-150) использовали для определения размера и содержания частиц в образцах препарата OMS646. Данные для образцов были получены с применением одного 500-мкл отобранного образца (200 мкл объем тары). Вкратце прибор оставляли для нагревания на ~30 мин и как шприц (1 мл), так и систему, промывали деионизированной водой, используя по меньшей мере 10 циклов, перед применением. Пригодность окружающей среды проверяли, демонстрируя, что в 25 мл деионизированной воды содержится не более 25 частиц размером ≥10 мкм. Пригодность системы подтверждали путем анализа одного 500-мкл отобранного образца из 2, 5, 10 и 15-мкм стандартов, используя соответствующие размеры каналов. Если определенное кумулятивное число/мл соответствовало спецификации для конкретного стандарта, систему считали подходящей для тестирования образцов. Перед измерением первого образца систему промывали один раз 1× фосфатно-солевым буфером (PBS) для гарантии того, что образцы не будут осаждаться при контакте с деионизированной водой. Образцы анализировали с применением одного 500-мкл отобранного образца, и кумулятивное число/мл для 2-, 5-, 10- и 25-мкм каналов определяли до ближайшего целого числа.

Эксклюзионную хроматографию (ЭХ) использовали для оценки количества агрегатов и продуктов деградации, присутствующих в препаратах OMS646. Вкратце использовали систему Agilent 1100 для ВЭЖХ, оборудованную колонкой G3000SWx1 для ЭХ (Tosoh, 7,8×300 мм, размер частиц 5 мкм). Образцы препарата OMS646 разбавляли до концентрации 2,5 мг/мл в подвижной фазе ЭХ (140 мМ фосфат калия, 75 мМ хлорид калия, рН 7,0), и 20 мкл образца инжесктировали на колонку для ВЭЖХ. Хроматографию проводили со скоростью потока 0,4 мл/мин, и элюированный белок определяли по поглощению при 280 нм (ширина полосы 4 нм) без поправки на эталон. Для оценки пригодности системы инъекцию всех образцов производили между инъекциями пустой пробы подвижной фазы и стандарта для гель-фильтрации, и эталонный материал инжесктировали в двойном повторе в начале последовательности операций. Определяли процентное содержание, отдельно и суммарно, высокомолекулярных (ВММ) молекул и низкомолекулярных (НММ) молекул в дополнение к процентному содержанию мономера и общей интегрированной площади пика.

Анализ методом капиллярного электрофореза в SDS-геле (SDS-КЭ) в восстанавливающих условиях проводили с применением системы капиллярного электрофореза Beckman Coulter PA 800 Plus и детекторного модуля на основе ФДМ, с применением набора для анализа SDS-MW Analysis Kit. Образцы и эталон разбавляли до концентрации 1,0 мг/мл в SDS-MW буфере для образцов. К 95 мкл этого рабочего раствора добавляли 5 мкл β-меркаптоэтанол и 2 мкл внутреннего стандарта (10 кДа). Все образцы центрифугировали при 300×g в течение 1 мин, нагревали при 70±2°C в течение ~10 мин, переносили в пробирку для ПЦР и хранили при 25°C до проведения анализа. Разделение выполняли, прикладывая к капилляру 15 кВ (обратная полярность) в течение 30 мин и используя давление 20,0 фунтов на квадратный дюйм на входе и выходе. Данные получали при 220 нм с частотой обновления 4 Гц.

Эталон (необработанный OMS646) инжесктировали дважды в начале каждой последовательности

операций. Регистрировали данные для LC, HC и IgG.

Капиллярный электрофорез в SDS-геле в не восстанавливающих условиях проводили, как описано для КЭ-SDS в восстанавливающих условиях, за исключением того, что вместо восстанавливающего агента использовали свежеприготовленный 250 мМ раствор иодацетамида, и разделение проводили в течение 35 мин. Регистрировали общую площадь электрофореграммы и % IgG.

Очищенный препарат антитела OMS646 (102 мг/мл) получали рекомбинантными методами, как описано в WO 2012/151481, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Вкратце антитело OMS646 получали в клетках CHO, содержащих экспрессионные конструкты, кодирующие полипептиды тяжелой цепи и легкой цепи OMS646, и очищали стандартными методами.

1. Сравнение потенциальных буферных систем.

Методы.

В исследованиях, предшествующих формулированию препарата, стабильность ингибирующего MASP-2 антитела OMS646 сначала оценивали с применением панели потенциальных буферов, включая те, которые обычно используют в терапевтических препаратах антител (цитрат, гистидин, фосфат), а также менее распространенные буферы (ацетат, сукцинат) для охвата широкого диапазона pH (pH 4,0-8,0). Для данного исследования белок переводили в 20 мМ сукцинатный (pH 4,0, 5,0 и 5,5), ацетатный (pH 4,0, 5,0 и 5,5), цитратный (pH 5,0, 6,0 и 7,0), гистидиновый (pH 6,0 и 7,0) и фосфатный (pH 6,0, 7,0 и 8,0) буферы, используя концентраторы Amicon Ultra-4 (10 кДа НОММ). Очищенный препарат антитела OMS646 (102 мг/мл в 20 мМ растворе ацетата натрия, 50 мг/мл сорбита, pH 5,0) разбавляли до концентрации ~1 мг/мл в каждом из 14 растворов для препарата и 4,0-мл образцы помещали в концентраторы, предварительно промытые соответствующим буфером. Каждый образец концентрировали центрифугированием при 3200×g до объема ~1 мл. Эта процедура включала в общей сложности три раунда замены буфера. Во время последнего раунда концентрирования белок избыточно концентрировали до объема <1 мл. Приблизительный объем и время центрифугирования для каждого раствора регистрировали после каждого цикла.

Результаты.

В целом данные, полученные для пяти типов буфера, были сопоставимы с точки зрения скорости замены буфера, содержания извлеченного белка, данных дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), динамического рассеяния света (ДРС) и химической стабильности (данные не представлены). Ацетат, цитрат и гистидин были выбраны для дальнейшей оценки на основании наблюдаемых, в целом оптимальных термических и конформационных свойств OMS646 в диапазоне pH 5,5-6,0. Ацетату было отдано предпочтение перед сукцинатом при pH 5,5, главным образом, вследствие более высокой термостабильности, в то время как гистидину и цитрату было отдано предпочтение перед фосфатом при pH 6,0 на основании данных ДРС.

2. Скрининг эксципиентов.

Стабильность OMS646 оценивали в присутствии различных эксципиентов с известными стабилизирующими антитела свойствами, используя буферные системы, выбранные в процессе исходного скрининга буферов (20 мМ ацетатный, pH 5,5; цитратный, pH 6,0 и гистидиновый, pH 6,0). Для данного исследования OMS646 переводили в каждый из потенциальных буферов, содержащий либо 150 мМ NaCl, 250 мМ сорбит, 250 мМ сахарозу, 150 мМ L-аргинин, 150 мМ L-глутамат либо 250 мМ L-пролин, используя концентраторы Amicon Ultra-4 (10 кДа НОММ). Образцы готовили, как описано для процедуры сравнения буферных систем, при этом целевая концентрация белка составляла 2,0 мг/мл.

Результаты.

С точки зрения извлечения белка по оценкам показатели извлечения белка находились в диапазоне ~72-106%, что являлось небольшим улучшением в сравнении с извлечением в отсутствие эксципиента. Гистидиновый буфер, судя по всему, являлся предпочтительным для большинства эксципиентов, а для ацетатного и цитратного буферов были получены смешанные результаты.

По результатам ДСК было отмечено, что цитратный буфер приводил к термической стабилизации OMS646 в случае всех протестированных эксципиентов. Фиг. 2А графически иллюстрирует результаты анализа методом динамического рассеяния света (ДРС) для скрининга эксципиентов препарата OMS646, которые показывают наружный диаметр частиц, наблюдаемый в препаратах, содержащих разные потенциальные эксципиенты. Фиг. 2В графически иллюстрирует результаты анализа методом ДРС для скрининга эксципиентов препарата OMS646, которые показывают общую полидисперсность, наблюдаемую в препаратах, содержащих разные потенциальные эксципиенты. Как видно на фиг. 2А и 2В, при анализе методом ДРС большинство препаратов показали сопоставимые результаты. Однако во всех буферных системах присутствие сахарозы было связано с повышенной полидисперсностью и наибольшими наружными диаметрами и диаметрами мономеров. После сахарозы сорбит был наименее предпочтительным, согласно результатам ДРС, в этом случае наблюдали более крупные средние размеры частиц и повышенную полидисперсность. Остальные препараты были, в целом, сопоставимы при оценке методом ДРС, с диаметром мономеров 10-12 нм (см. фиг. 2А) и полидисперсностью <20%, указывающей на монодисперсные популяции (см. фиг. 2В). Что касается стабильности в условиях химической денатурации, при оценке с применением системы изотермической химической денатурации AVIA четко наблюдалась за-

висимость от буфера/pH, при этом препараты в ацетатном буфере с pH 5,5 денатурировали при концентрациях мочевины, на ~0,5 М ниже, чем препараты в цитратном и гистидиновом буферах с pH 6,0, в случае всех протестированных эксципиентов. Результаты для цитратного и гистидинового буферов были сопоставимы в случае всех эксципиентов.

Подводя итоги, данные свидетельствовали в пользу того, что цитрат с pH примерно 6,0 является оптимальным сочетанием буфера/pH, которое использовали далее в исследованиях растворимости. Учитывая неудовлетворительные данные ДРС для буферов всех типов, сахараза была исключена из дальнейшего рассмотрения.

3. Скрининг растворимости/вязкости.

Первое исследование вязкости.

Методы.

Для установления условий для максимальной растворимости OMS646 использовали 20 мМ цитрат (pH 5,0 и 6,0) и 20 мМ сукцинат (pH 4,0) в присутствии нескольких изотонических сочетаний NaCl, сорбита, аргинина, глутамата и пролина. Производили замену буфера для OMS646 с применением концентрационных ячеек Amicon 15 на протяжении нескольких циклов, и в последнем цикле объем каждого раствора уменьшали до ~1 мл. Скорости замены буфера для всех препаратов и количество циклов замены регистрировали и анализировали. После замены буфера измеряли содержание белка, рассчитывали процент извлечения и образцы хранили в течение ночи при 5°C. Было обнаружено, что при хранении препарата в сукцинате/глутамате выпадал осадок и такие препараты далее не анализировали. Остальные препараты добавляли в концентрационные ячейки Amicon 4 и концентрировали до достижения целевой концентрации ~200 мг/мл или до того момента, когда центрифугирование переставало приводить к уменьшению объема и/или была признана невозможность изменения вязкости образца (путем манипуляций с образцом).

Результаты.

Что касается скоростей замены буфера, наивысшие скорости замены буфера отчетливо наблюдали в образцах с pH 4,0, при этом наибольшие из всех скорости замены имели место в системе сукцинат/сорбит. Скорости замены при pH 5,0 и 6,0 были сопоставимыми, при этом препараты, содержащие только заряженные аминокислотные эксципиенты, демонстрировали более высокие скорости, чем другие препараты. Наименьшую скорость замены наблюдали в случае препарата в системе цитрат/сорбит при pH 6,0. Этот препарат представлял собой одиночный образец с pH ≥ 5,0 и незаряженным компонентом эксципиента. Если допустить, что скорость замены является суррогатным показателем самосборки OMS646, похоже, что заряженные молекулы важны для ослабления этого явления при более нейтральном значении pH. Согласно результатам ДРС, все высококонцентрированные препараты характеризовались сопоставимыми наружными диаметрами ~12 нм за исключением системы сукцинат/аргинин с pH 4,0, в случае которой наблюдали распределение с увеличенным общим размером >18 нм.

Образцы в сменном буфере концентрировали до того момента, когда возникали сложности при манипуляциях с образцами вследствие их высокой вязкости. Максимальные концентрации, превышающие 225 мг/мл, были достигнуты для обоих препаратов с pH 4,0. Для препаратов с более высокими значениями pH максимальные концентрации белка OMS646 находились в диапазоне от 160,5 до 207,6 мг/мл. Вязкость для большинства препаратов оценивали при помощи вискозиметра с катящимся шариком при скорости сдвига от 0,5 до 1000 с⁻¹, как описано выше. Фиг. 3 графически иллюстрирует результаты анализа вязкости для проверки растворимости OMS646 в диапазоне концентраций белка в разных препаратах при pH 5,0 и 6,0. Как показано на фиг. 3, в графиках зависимости от концентрации белка наблюдали экспоненциальное увеличение вязкости в препаратах, при этом самая высокая вязкость была зарегистрирована для системы цитрат/аргинин/глутамат с pH 5,0 (161,1 сП для раствора с концентрацией 196,6 мг/мл). При pH 6,0 и сопоставимой концентрации белка OMS646 препарат в системе цитрат/сорбит имел значительно более высокую вязкость, чем препарат в системе сорбит/глутамат или пролин/глутамат. Препарат в системе цитрат/аргинин/глутамат с pH 6,0 (95,3 мг/мл) имел примерно половинную вязкость (5,8 против 9,3 сП) в сравнении с образцом в системе цитрат/NaCl с pH 6,0 (87,5 мг/мл) при более высоком содержании белка, что указывало на большую важность заряженных аминокислот в сравнении с ионными эксципиентами.

Важно отметить, что при конкретной концентрации (т.е. 125 мг/мл) вязкость резко варьируется в зависимости от препарата. Вязкость, в идеале, поддерживают ниже ~25 сП для гарантии реалистичной возможности введения шприцем терапевтического препарата для подкожного введения. В некоторых вариантах осуществления препарата OMS646 вязкость поддерживают ниже примерно 20 сП, чтобы терапевтический препарат можно было доставлять при помощи инъекционного устройства и, кроме того, чтобы его можно было подвергать различной биологической обработке, например, проточной фильтрации вдоль потока.

Второе исследование вязкости.

В попытке уменьшить вязкость препарата OMS646 и таким образом максимально увеличить концентрацию OMS646 в конкретном препарате проводили дополнительное исследование. На основании начальных результатов были выбраны препараты, которые с наибольшей вероятностью имели бы низ-

кую вязкость при высокой концентрации, а именно препараты, содержащие сукцинат/сорбит с pH 4,0, и препараты, содержащие глутамат и аргинин в цитратном буфере с pH 6,0. Результаты предыдущих исследований показали, что заряженные аминокислоты придают некоторые полезные свойства препарату при нейтральном значении pH, включая повышенную скорость замены буфера, повышенное извлечение образца при обработке и сниженную вязкость. Влияние аминокислот с положительно заряженной боковой цепью (например, аргинина) или аминокислот с отрицательно заряженной боковой цепью (например, глутамата) оценивали в диапазоне концентраций (от 50 до 150 мМ), чтобы для обоих эксципиентов изучить влияние заряда и концентрации на вязкость. И наконец, CaCl₂ использовали в качестве добавки как в изотоническом, так и в гипертоническом растворах цитрата/глутамата из-за его потенциальной способности уменьшать вязкость, как описано в патенте США № 7390786.

Для образцов производили замену буфера и концентрирование, как описано выше. После замены буфера рассчитывали содержание белка для всех препаратов. Исключением явился препарат, содержащий 50 мМ глутамат и 50 мМ CaCl₂, в котором выпадал осадок после замены буфера, его в дальнейшем не оценивали. Очевидно, это происходило частично вследствие ограниченной растворимости цитрата и двухвалентных катионов, таких как Ca²⁺.

Результаты.

Фиг. 4 графически иллюстрирует извлечение белка в процентах после замены буфера в исследовании растворимости/вязкости OMS646, проводимом с разными потенциальными препаратами. Как видно на фиг. 4, наблюдалась тенденция к увеличению извлечения с возрастанием концентрации аргинина, при этом в случае 150 мМ аргинина для препарата наблюдали наибольшее извлечение белка, составляющее 85%. Показатели извлечения для остальных препаратов были сопоставимы и находились в диапазоне 64-75%. Затем образцы концентрировали, как описано ниже, до того момента, когда возникали сложности при манипуляциях с ними вручную. Оценивали вязкость всех препаратов, как описано выше, и результаты приведены ниже в табл. 3.

Таблица 3

Сводные данные по вязкости из предварительных исследований препарата

Образец	Буфер	Эксципиент	Добавка	pH	Конц. (мг/мл)	Вязкость (сП)
100 сП стандарт (97,2 сП заявлено)					-	97,1
50 сП стандарт (49,2 заявлено)					-	49,1
S1	20 мМ сукцинат	250 мМ сорбит	-	4,0	209,3	109,6
S2	20 мМ цитрат	150 мМ аргинин	-	6,0	181,2	70,5
S3	20 мМ цитрат	100 мМ аргинин	-	6,0	170,8	102,8
S4	20 мМ цитрат	50 мМ аргинин	-	6,0	158,3	140,1
S5	20 мМ цитрат	150 мМ глутамат	-	6,0	180,3	71,2
S6	20 мМ цитрат	100 мМ глутамат	-	6,0	170,7	74,6
S7	20 мМ цитрат	50 мМ глутамат	-	6,0	152,7	137,0
S8	20 мМ цитрат	150 мМ глутамат	50 мМ CaCl ₂	6,0	202,8	73,4

Как показано выше в табл. 3, вязкость у всех препаратов составляла >70 сП, и несмотря на широкий диапазон конечных концентраций наблюдались отчетливые тенденции. Из этих предварительных данных очевидно, что увеличение концентрации аргинина или глутамата приводит к уменьшению вязкости. Вязкость препарата в системе сукцинат/сорбит казалась сопоставимой с вязкостью препаратов с 150 мМ аминокислотой. Включение CaCl₂ приводило к уменьшению вязкости, при этом вязкость у данного препарата была сопоставима с образцами, имеющими на 10% меньше содержания белка.

Четыре препарата (S1, S2, S5 и S8, приведенные в табл. 3) были выбраны для более подробного анализа вязкости, при этом извлеченные неразбавленные образцы были поэтапно разбавлены в буфере препарата до 25 мг/мл. Фиг. 5 графически иллюстрирует зависимость вязкости (определяемой путем экспоненциального приближения данных по вязкости) от концентрации белка в исследовании растворимости/вязкости OMS646, проводимом с разными потенциальными препаратами. Экспоненциальное приближение данных по вязкости проводили методами, описанными в Connolly B. et al., Biophysical Journal vol. 103:69-78, 2012. Как показано на фиг. 5, кривые для препаратов, содержащих 150 мМ глутамат и аргинин, были почти идентичны, демонстрируя наибольшую вязкость на единицу концентрации - вязкость 25 сП соответствовала концентрации ~150 мг/мл OMS646. Показатели для препарата с сукцинатом и сорбитом были несколько лучше, при этом вязкость 5 сП по оценкам соответствовала концентрации

OMS646 ~160 мг/мл. В целом самую низкую вязкость наблюдали в случае CaCl₂-содержащего препарата, в котором, по оценкам, вязкости 25 сП соответствовала концентрация ~175 мг/мл. Наиболее интригующим результатом этого анализа было то, что в гипертоническом препарате, содержащем 150 мМ глутамат и 50 мМ CaCl₂, вязкость была резко снижена. С намерением получить жидкий препарат с максимально возможно концентрацией применение двухвалентных катионов и гипертоничности для уменьшения вязкости далее использовали в дополнительном анализе вязкости.

Третье исследование вязкости.

Взяв за основу результаты начальных исследований вязкости, описанных выше, проводили дополнительное исследование для определения того, связана ли очевидная способность CaCl₂ к уменьшению вязкости с двухвалентными ионами Ca²⁺ или с гипертоничностью. Замену преобладающего эксципиента с глутамата на аргинин проводили, исходя из повышенных скоростей замены буфера, наблюдаемых у содержащих аргинин препаратов. Гистидин включали из-за потенциального хелатирования Ca²⁺ цитратом, что могло бы привести к выпадению осадка. Набор образцов также использовали для оценки влияния pH и сурфактанта на вязкость образца, а также влияния CaCl₂ и гипертоничности на препарат в системе сукцинат/сорбит с pH 4,0. Для образцов производили замену буфера и центрирование, как описано для предшествующих исследований вязкости. Вязкость всех препаратов измеряли при помощи прибора с катящимся шариком, как описано выше. Данные по вязкости нормировали на концентрацию белка 170 мг/мл в образце. Это осуществляли, рассчитывая сначала теоретическую вязкость на основании измеренного содержания белка, применяя экспоненциальную регрессию к ранее рассчитанным данным вязкости/растворимости для препарата в системе цитрат/аргинин с pH 6,0 ($y=0,0917^{e^{0,0361x}}$). Нормированную вязкость рассчитывали путем умножения значения теоретической вязкости для системы цитрат/аргинин с pH 6,0 при концентрации белка 170 мг/мл (42,4 сП) на значение отношения измеренная вязкость/теоретическая вязкость (см. табл. 4, примечание b). Полученные значения нормированной вязкости более четко показывают тенденцию за счет сглаживания связанной с концентрацией вариабельности (см. табл. 4 и фиг. 6).

Таблица 4

Сводные данные по вязкости для препаратов OMS646 (170 мг/мл)

Форма #	Буфер/ pH	Эксципиент	Добавка	PS-80	Вязкость (сП)	Среднее норм. конц. (мг/мл)	Теор. вязкость (сП) ^a	Примерн. норм. вязкость при 170 мг/мл (сП) ^b
100 сП стандарт (97,2 сП заявлено)					96,9	-		
1A	20 мМ цитрат pH 6,0	112,5 мМ аргинин	25 мМ CaCl ₂	-	38,8	165,5	36,0	45,7
1B		112,5 мМ аргинин	25 мМ CaCl ₂	0,05%	41,7	168,5	40,2	44,0
2		150 мМ аргинин	-	-	20,8	155,7	25,3	34,9
3		150 мМ аргинин	25 мМ CaCl ₂	-	20,1	157,0	26,5	32,2
4		200 мМ аргинин	-	-	22,3	169,1	41,0	23,1
5		225 мМ аргинин	-	-	20,2	169,0	40,9	20,9
6A	20 мМ	112,5	25 мМ	-	34,1	165,4	35,9	40,4

	цитрат pH 5,0	мМ аргинин	CaCl ₂					
6В		112,5 мМ аргинин	25 мМ CaCl ₂	0,05%	31,0	170,0	42,4	31,1
7		150 мМ аргинин	-	-	22,1	158,9	28,4	33,0
8		150 мМ аргинин	25 мМ CaCl ₂	-	17,4	153,9	23,7	31,1
9	20 мМ гистидин pH 6,0	75 мМ аргинин	50 мМ CaCl ₂	-	19,9	174,5	49,9	16,9
10А		112,5 мМ аргинин	25 мМ CaCl ₂	-	27,9	169,6	41,8	28,4
10В		112,5 мМ аргинин	25 мМ CaCl ₂	0,05%	28,1	184,6	71,8	16,6
11		135 мМ аргинин	10 мМ CaCl ₂	-	34,1	167,1	38,2	37,9
12		150 мМ аргинин	-	-	35,5	156,6	26,1	57,7
13		200 мМ аргинин	-	-	20,2	167,2	38,3	22,3
14		225 мМ аргинин	-	-	16,4	161,9	31,6	22,0
15		150 мМ аргинин	50 мМ CaCl ₂	-	15,9	164,9	35,2	19,1
16А	20 мМ сукцинат pH 4,0	125 мМ сорбит	50 мМ CaCl ₂	-	19,5	172,7	46,7	17,7
16В		125 мМ сорбит	50 мМ CaCl ₂	0,05%	18,1	168,7	40,4	19,0
17		250 мМ сорбит	50 мМ CaCl ₂	-	15,5	157,2	26,8	24,6
18		250 мМ сорбит		-	16,8	161,3	31,0	23,0

^a Теоретическую вязкость рассчитывали, используя регрессию для кривой измеренных значений вязкости в системе цитрат/аргинин с pH 6,0 ($y=0,0917^{e^{0,0361x}}$).

^b Теоретическая вязкость при концентрации белка 170 мг/мл в системе цитрат/аргинин с pH 6,0 (42,4 сП) × (измеренная вязкость/теоретическая вязкость).

Фиг. 6 графически иллюстрирует данные по вязкости, нормированные на концентрацию белка, в исследовании вязкости, проводимом с разными потенциальными препаратами OMS646, на основании данных из табл. 4. Как показано на фиг. 6 и в табл. 4, для препаратов с цитратом и гистидином набор нормированных данных отчетливо показывает, что гипертоничность приводит к уменьшению вязкости образца, при этом основное влияние наблюдается при лишь небольшом увеличении концентрации аргинина. Например, нормированная вязкость препарата 12 (20 мМ гистидин и 150 мМ аргинин) составляет 57,7 сП, в сравнении с показателями вязкости 22,3 и 22,0 сП для препаратов с гистидином, содержащих 200 и 225 мМ аргинин соответственно. Аналогичную тенденцию наблюдали для препаратов в системе цитрат/аргинин. Очевидные преимущества включения CaCl₂ отсутствовали. Скорее, было неожиданным установление того, что в отсутствие CaCl₂ были достигнуты низкие показатели вязкости (например, менее 25 сП) для препаратов в системе цитрат/аргинин и гистидин/аргинин, с концентрацией аргинина, составляющей 200 мМ или более. Включение 0,05% PS-80 приводило к значительному уменьшению вязкости в двух из трех препаратов, оцениваемых при pH ≥ 5,0. И наконец, похоже, что показатели вязкости

при pH 5,0 были немного ниже, чем показатели для сопоставимых препаратов при pH 6,0.

С учетом результатов, полученных в исследованиях вязкости, гипертоничность за счет аргинина, влияние присутствия или отсутствия двухвалентных катионов, а также препараты в системе сукцинат/сорбит с pH 4,0 изучали далее в исследованиях, проводимых для скрининга сурфактанта, с целью дальнейшей оценки влияния на физическую, конформационную и химическую стабильность OMS646.

1. Скрининг сурфактанта.

Влияние сурфактанта на стабильность OMS646 оценивали для потенциальных препаратов, выбранных в предыдущих исследованиях, описанных в настоящем документе. В исследованиях для скрининга сурфактанта анализировали следующие шесть препаратов:

- 20 мМ цитрат, 200 мМ аргинин с pH 5,0;
- 20 мМ цитрат, 200 мМ аргинин с pH 6,0;
- 20 мМ сукцинат, 250 мМ сорбит с pH 4,0;
- 20 мМ гистидин, 200 мМ аргинин с pH 6,0;
- 20 мМ гистидин, 75 мМ аргинин/50 мМ CaCl₂ с pH 6,0;
- 20 мМ гистидин, 75 мМ аргинин/50 мМ MgCl₂ с pH 6,0.

Каждый из шести препаратов, перечисленных выше, оценивали либо без сурфактанта, либо в присутствии 0,01% PS-80, в общей сложности двенадцать уникальных вариантов препаратов. Для каждого препарата OMS646 переводили в растворы буферов замены (без PS-80), концентрировали, содержание количественно определяли, и образцы нормировали на концентрацию белка 175 мг/мл. Затем каждый препарат разделяли и в соответствующие образцы добавляли PS-80 до конечной концентрации 0,01% (мас./об.).

Каждый из сформулированных образцов подвергали механическому стрессу путем перемешивания, а также циклам замораживания/размораживания. Для тестирования обоих видов стресса 0,5 мл образца переносили в четыре флакона типа 1 из боросиликатного стекла (2,0 мл) и флаконы герметично закрывали пробками FlugoTec®. Для стресса путем перемешивания образцы помещали в микропланшетный шейкер при скорости 600 об/мин на ~60 ч при комнатной температуре. Образцы, контрольные для перемешиваемых образцов, находились рядом с шейкером на протяжении всего периода стресса. Для циклов замораживания/размораживания образцы замораживали при -80°C в течение ≥60 мин, а затем оставляли для размораживания при комнатной температуре, всего 5 циклов замораживания/размораживания. Подвергнутые стрессу образцы хранили при 2-8°C до проведения анализа. Оставшийся образец хранили при 2-8°C в качестве не подвергнутого стрессу контроля. Проводили внешний осмотр, измерения поглощения при A₂₈₀/ ДРС и ЭХ для оценки влияния сурфактанта на агрегацию и стабильность OMS646.

Результаты.

После того как шесть препаратов OMS646 были подвергнуты стрессу, ни в одном из образцов не были обнаружены частицы, связанные с препаратом. Содержание белка было практически постоянным во всех образцах конкретного препарата. Анализ данных ДРС для образцов, подвергнутых замораживанию/размораживанию и перемешиванию, выявил лишь незначительные различия между препаратами и результатами при разных видах стресса без каких-либо четких общих тенденций, связанных с включением PS-80. Единственным исключением был препарат в системе сукцинат/сорбит с pH 4,0, в котором включение PS-80 привело к высокой общей полидисперсности (т.е. мультимодальный препарат) в случае замороженных/размороженных и хранящихся при 5°C контрольных образцов. В этом кислом препарате также были обнаружены методом ДРС признаки агрегации/самосборки в отсутствие PS-80 при перемешивании.

Проводили анализ данных ЭХ для оценки любых продуктов агрегации и/или дегградации, возникающих в подвергаемых стрессу препаратах. Сводные результаты приведены в табл. 5A-5D.

Таблица 5А

Сводные данные ЭХ для препарата OMS646 при скрининге сурфактанта (2-8°C)

Форма	Буфер	Экспциен т	Добавк а	pH	PS- 80 (%)	Сред. общее кол-во ВММ (%)	Сред. кол-во мономер а (%)	Сред. общее кол-во НММ (%)
Необработанный эталонный образец, среднее						3,7	96,3	-
1	20 мМ	200 мМ	-	5,	-	3,0	96,3	-
2	цитрат	аргинин	-	0	0,01	3,1	96,9	-
3	20 мМ	200 мМ	-	6,	-	3,2	96,8	-
4	цитрат	аргинин	-	0	0,01	3,3	96,7	-
5	20 мМ	200 мМ	-	6,	-	3,3	96,7	-
6	гистидин	аргинин	-	0	0,01	3,4	96,6	-
7	20 мМ	250 мМ	-	4,	-	3,2	96,6	0,2
8	сукцинат	сорбит	-	0	0,01	3,2	96,5	0,2
9	20 мМ	75 мМ	50 мМ	6,	-	3,3	96,7	-
10	гистидин	аргинин	CaCl ₂	0	0,01	3,4	96,6	-
11	20 мМ	75 мМ	50 мМ	6,	-	3,4	96,6	-
12	гистидин	аргинин	MgCl ₂	0	0,01	3,5	96,5	-

Таблица 5В

Сводные данные ЭХ для препарата OMS646
при скрининге сурфактанта (замораживание/размораживание)

Форма	Буфер	Экспципиент	Добавка	pH	PS-80 (%)	Сред. общее кол-во ВММ (%)	Сред. кол-во мономера а (%)	Сред. общее кол-во НММ (%)
Необработанный эталонный образец, среднее						3,7	96,3	-
1	20 мМ	200 мМ	-	5,	-	3,1	96,9	-
2	цитрат	аргинин		0	0,01	3,2	96,8	-
3	20 мМ	200 мМ	-	6,	-	3,3	96,7	-
4	цитрат	аргинин		0	0,01	3,3	96,7	-
5	20 мМ	200 мМ	-	6,	-	3,3	96,7	-
6	гистидин	аргинин		0	0,01	3,4	96,6	-
7	20 мМ	250 мМ	-	4,	-	3,2	96,6	0,2
8	сукцинат	сорбит		0	0,01	3,2	96,6	0,2
9	20 мМ	75 мМ	50 мМ	6,	-	3,4	96,6	-
10	гистидин	аргинин	CaCl ₂	0	0,01	3,4	96,6	-
11	20 мМ	75 мМ	50 мМ	6,	-	3,5	96,6	-
12	гистидин	аргинин	MgCl ₂	0	0,01	3,5	96,6	-

Таблица 5С

Сводные данные ЭХ для препарата OMS646 при скрининге сурфактанта (25°C)

Форма	Буфер	Экспципиент	Добавка	pH	PS-80 (%)	Сред. общее кол-во ВММ (%)	Сред. кол-во мономера (%)	Сред. общее кол-во НММ (%)
Необработанный эталонный образец, среднее						3,7	96,3	-
1	20 мМ	200 мМ	-	5,	-	3,1	96,9	-
2	цитрат	аргинин		0	0,01	3,2	96,8	-
3	20 мМ	200 мМ	-	6,	-	3,3	96,7	-
4	цитрат	аргинин		0	0,01	3,4	96,6	-
5	20 мМ	200 мМ	-	6,	-	3,3	96,7	-
6	гистидин	аргинин		0	0,01	3,4	96,6	-
	ин							
7	20 мМ	250 мМ	-	4,	-	3,3	96,5	0,2
8	сукцинат	сорбит		0	0,01	3,3	96,5	0,2
9	20 мМ	75 мМ	50 мМ	6,	-	3,4	96,6	-
10	гистидин	аргинин	CaCl ₂	0	0,01	3,5	96,5	-
	ин							
11	20 мМ	75 мМ	50 мМ	6,	-	3,5	96,5	-
12	гистидин	аргинин	MgCl ₂	0	0,01	3,5	96,5	-
	ин							

Таблица 5D

Сводные данные ЭХ для препарата OMS646 при скрининге сурфактанта (перемешивание)

Форма	Буфер	Экспципент	Добавка	pH	PS-80 (%)	Сред. общее кол-во ВММ (%)	Сред. кол-во мономера (%)	Сред. общее кол-во НММ (%)
Необработанный эталонный образец, среднее						3,7	96,3	-
1	20 мМ	200 мМ	-	5,0	-	3,0	97,0	-
2	цитрат	аргинин	-	5,0	0,01	3,2	96,8	-
3	20 мМ	200 мМ	-	6,0	-	3,3	96,7	-
4	цитрат	аргинин	-	6,0	0,01	3,4	96,6	-
5	20 мМ	200 мМ	-	6,0	-	3,3	96,7	-
6	гистидин	аргинин	-	6,0	0,01	3,4	96,6	-
7	20 мМ	250 мМ	-	4,0	-	2,8	97,0	0,2
8	сукцинат	сорбит	-	4,0	0,01	3,3	96,5	0,2
9	20 мМ	75 мМ	50 мМ	6,0	-	3,4	96,3	0,3
10	гистидин	аргинин	CaCl ₂	6,0	0,01	3,5	96,5	-
11	20 мМ	75 мМ	50 мМ	6,0	-	3,4	96,6	-
12	гистидин	аргинин	MgCl ₂	6,0	0,01	3,6	96,5	-

Как видно из табл. 5A-5D, в целом данные ЭХ свидетельствуют, что молекула OMS646, как правило, не реагирует на включение PS-80, а также на стресс в виде замораживания/размораживания (табл. 5B) и перемешивания (табл. 5D), независимо от наличия сурфактанта. Было установлено, что препаратами OMS646 с худшими показателями являлись те, которые содержали добавки двухвалентных катионов (CaCl₂ и MgCl₂), при этом содержание высокомолекулярного (ВММ) материала в этих образцах было отчетливо повышено в сравнении с другими образцами и наблюдались наименьшие уровни мономера.

2. Анализ стабильности в условиях стресса и отсутствия стресса в течение 28 дней.

После сужения диапазонов сочетаний потенциального буфера, экспципента и сурфактанта в предварительных исследованиях препарата, описанных выше, были сформулированы препараты на основе цитратного и гистидинового буферов, содержащие 200 мМ аргинин, с диапазоном pH 5,5-6,5, при высоких концентрациях 175 и 200 мг/мл OMS646 для выявления наиболее подходящего препарата как в условиях стресса (40°C), так и в отсутствие стресса (5°C). Аргинин включали на гипертоническом уровне (200 мМ) из-за его снижающих вязкость свойств при такой повышенной концентрации. Исходя из результатов статистической числовой оптимизации данных для предварительного препарата было установлено, что наиболее подходящим препаратом OMS646 являлся препарат в системе 20 мМ цитрат и 200 мМ аргинин. Также готовили панель образцов для оценки влияния 0,01% PS-80 на препараты с цитратом и гистидином.

Замену буфера производили, как описано выше, образцы концентрировали и разбавляли для достижения целевых концентраций 175 или 200 мг/мл OMS646. В процессе этого последнего нормирования в соответствующие препараты добавляли PS-80 до 0,01%. Препараты стерилизовали фильтрованием с применением 0,22-мкм стерильных концентраторов Millipore Ultrafree-CL GV. Один флакон каждого препарата хранили при 5°C и один при 40°C в течение 28-дневного инкубационного периода. Образцы анализировали в моменты времени T₀ и 28 дней в отношении концентрации, внешнего вида, мутности, осмоляльности, pH, данных ДРС, ДСК и вязкости. После 28-дневной инкубации было установлено, что оба препарата OMS646 с концентрациями 175 и 200 мг/мл в системе сукцинат/сорбит, хранящиеся при 40°C, приобрели гелеобразную консистенцию и, следовательно, были исключены из анализа.

Результаты.

Что касается анализа стабильности, значения pH оставались стабильными на всем протяжении ис-

следования, независимо от препарата и условий хранения. Через 28 дней анализ как методом ЭХ, так и методом SDS-КЭ, показал значительное увеличение содержания НММ в кислых препаратах с рН 5,0 и 4,0, вследствие чего эти препараты были исключены из дальнейшего рассмотрения. В случае препаратов с рН 6,0 в системе цитрат/аргинин и гистидин/аргинин, сформулированных с 0,01% PS-80, большинство показателей были почти неотличимы от показателей соответствующих не содержащих сурфактант образцов. Однако результаты ЭХ показали уменьшение содержания ВММ на 0,2-0,6% в сравнении с не содержащими сурфактант аналогичными препаратами. С учетом очевидных уменьшающих вязкость свойств сурфактанта было принято решение о включении полисорбата-80 (PS-80) в препараты для дальнейшего изучения.

Показатели концентрации и вязкости в общей сложности 10 препаратов тестировали после 28-дневного хранения при 5°C. Репрезентативные результаты приведены в табл. 6.

Таблица 6

Вязкость препаратов после 28 дней хранения при 5°C

Образец	Препарат	Концентрация, 28 дней при 5°C (мг/мл)	Вязкость (сП)
1	20 мМ цитрат, 200 мМ аргинин, рН 6,0, 175 мг/мл OMS646	153,4	10,6
2	20 мМ гистидин, 200 мМ аргинин, рН 6,0, 175 мг/мл OMS646	151,3	12,7
3	20 мМ цитрат, 200 мМ аргинин, рН 6,0, 200 мг/мл OMS646	170,5	27,4
4	20 мМ гистидин, 200 мМ аргинин, рН 6,0, 200 мг/мл OMS646	184,2	18,1
5	20 мМ цитрат, 200 мМ аргинин, 0,01% PS-80, рН 6,0, 175 мг/мл OMS646	159,2	9,0
6	20 мМ гистидин, 200 мМ аргинин, 0,01% PS-80, рН 6,0, 175 мг/мл OMS646	156,0	7,8
7	20 мМ цитрат, 200 мМ аргинин, рН 5,0, 175 мг/мл OMS646	143,2	9,8
8	20 мМ гистидин, 200 мМ аргинин, рН 5,0, 200 мг/мл OMS646	182,4	15,9
9	20 мМ сукцинат, 250 мМ сорбит, рН 4,0, 175 мг/мл OMS646	150,6	14,5
10	20 мМ сукцинат, 250 мМ сорбит, рН 4,0, 200 мг/мл	184,3	18,0

Как видно из приведенной выше табл. 6, у препаратов с более высокой концентрацией имела место более высокая вязкость. Особого интереса заслуживало то наблюдение, что включение PS-80 приводило к уменьшению вязкости препаратов как в цитратном (10,6 против 9,0 сП), так и в гистидиновом (12,7 против 7,8 сП) буферах, при этом также сохранялось извлечение белка. Такое уменьшение вязкости при включении PS-80 было полезным, позволяя достигать более высокой концентрации OMS646 и при этом сохранять низкую вязкость, что обеспечивает возможность введения шприцем в клинических условиях и также подходит для применения в автоинъекторе и других инъекционных устройствах.

Краткое изложение результатов.

Основная цель данных исследований заключалась в идентификации компонентов препарата, которые приводили бы к оптимальной химической, физической и структурной стабильности высококонцентрированного антитела OMS646 в жидких препаратах. Кроме того, были проведены некоторые эксперименты по изучению вязкости с целью получения конечного препарата с максимальной концентрацией антитела OMS646, который можно было бы доставлять подкожной инъекцией.

Оценивали несколько видов буферов, условия рН, концентрации эксципиентов и сурфактанта итеративным образом в ходе исследований, направленных на оценку буферных систем, эксципиентов, растворимости, вязкости, а также тестирования сурфактанта. В начальном исследовании базовой оценки буферов тестировали буферы пяти разных видов (ацетат, цитрат, сукцинат, гистидин и фосфат) в диапазоне рН 4,0-8,0. Анализ методами ДСК, ДРС, а также при помощи системы химической денатурации

AVIA показал, что более кислые и основные условия в меньшей степени подходят для стабильности антитела OMS646. На основании этих результатов ацетатная, цитратная и гистидиновая буферные системы были выбраны для дальнейшей оценки.

Скрининг эксципиентов позволил оценить эффект NaCl, L-аргинина, L-глутамата, L-пролина, сахарозы и сорбита на стабильность антитела OMS646 в каждой из трех выбранных буферных систем. Лишь цитрат (pH 6,0) был выбран для последующих исследований, чтобы максимально расширить возможности для дополнительной оценки эксципиентов. Только сахароза была исключена в качестве потенциального эксципиента вследствие неудовлетворительных данных рассеяния света. Изучение растворимости выявило способность препаратов в цитратном буфере (pH 5,0 и 6,0), содержащих изотоническое сочетание NaCl, сорбита, аргинина, глутамата и пролина, поддерживать высокие концентрации в растворе антитела OMS646. Все препараты были сконцентрированы до содержания более 150 мг/мл OMS646 без признаков агрегации. Однако препараты в системе сукцинат/аргинин и сукцинат/глутамат демонстрировали признаки осаждения/агрегации после кратковременного хранения и были исключены из последующих исследований. Биофизический анализ препаратов в цитратном буфере показал лишь незначительные различия в случае разных эксципиентов при pH 6,0 и лишь небольшое уменьшение содержания ВММ в аналогичных препаратах с pH 5,0.

Интересные данные были получены при измерении вязкости в данной подгруппе образцов, которые свидетельствовали о том, что системы цитрат/глутамат и сукцинат/сорбит обеспечивали самую низкую вязкость. Учитывая сходную биофизическую стабильность, наблюдаемую в случае разных эксципиентов, и важность получения препарата с максимальным содержанием OMS646, проводили дополнительные исследования вязкости. Эти исследования вязкости позволили идентифицировать двухвалентные катионы и/или умеренную гипертоничность в качестве важного фактора для снижения вязкости препарата антитела OMS646 при более нейтральном значении pH. Как цитрат (pH 5,0 и 6,0), так и гистидин (pH 6,0) оценивали в присутствии 200 мМ аргинина. Гистидин с pH 6,0 также оценивали в присутствии 75 мМ аргинина и либо 50 мМ CaCl₂, либо 50 мМ MgCl₂.

И наконец, тестировали систему сукцинат/сорбит с pH 4,0. Все сочетания буфер/эксципиент тестировали либо в отсутствие, либо в присутствии 0,01% PS-80 для определения того, способствует ли сурфактант стабильности антитела OMS646 в условиях перемешивания и замораживания/размораживания. Все препараты казались стабильными в используемых стрессовых условиях независимо от сурфактанта. Одним из поразительных результатов было увеличение содержания ВММ OMS646, наблюдаемое методом ЭХ, в препаратах, содержащих двухвалентные катионы. Вследствие этого CaCl₂ и MgCl₂ были исключены из дальнейшего рассмотрения в качестве эксципиентов. В системе сукцинат/сорбит также наблюдали снижение чистоты антитела OMS646, что в основном связано с очевидным увеличением ВММ примесей. При том что различия между препаратом, содержащим и не содержащим 0,01% PS-80, были незначительными, в образцах, содержащих сурфактант, похоже, было несколько увеличено содержание ВММ (~0,1%) в сравнении с не содержащими сурфактант аналогами.

Пример 3.

В данном примере описано исследование, в котором три потенциальных высококонцентрированных низковязких препарата OMS646, выбранные на основании результатов предварительных исследований препаратов, описанных в примере 2, сравнивали с точки зрения возможности введения шприцем.

Введение/обоснование.

Время и силы, необходимые для выполнения инъекции вручную (или время, необходимое для инъекции с применением автоинъектора), являются важными факторами и могут влиять на легкость применения препарата конечными пользователями и, как следствие, на соблюдение ими режима лечения. Силу, необходимую для инъекции раствора с конкретной скоростью введения через иглу заранее определенного калибра и длины, называют "возможностью введения шприцем" (см., например, Burckbuchler, V. et al., Eur. J. Pharm. Biopharm., 76(3), 351-356, 2010. Что касается возможности введения шприцем, в случае введения субъекту-человеку, как правило, нежелательно превышать силу 25 Н (хотя на рынке существуют препараты с большей вязкостью). Иглу 27 GA или тонкостенную иглу 27 GA, как правило, считают стандартными иглами для подкожной инъекции моноклональных антител. Тонкостенная игла 27 GA имеет ВД примерно такой же, как у иглы 25 GA (меньшее число G соответствует большему диаметру).

Проводили следующее исследование для определения возможности введения шприцем трех потенциальных высококонцентрированных низковязких препаратов OMS646.

Методы.

На основании результатов предварительных исследований препаратов, описанных в примере 2, следующие три потенциальных высококонцентрированных препарата OMS646 были выбраны и дополнительно изучены, как показано в табл. 7. В данном примере препараты готовили с применением гидрохлорида аргинина, полисорбата 80, если указано, а также либо цитрата тринатрия, либо гистидина с pH, доведенным до примерно 5,8-6,0 при помощи соляной кислоты.

Таблица 7

Потенциальные высококонцентрированные препараты OMS646

Препарат	Буфер/Экципиенты/Сурфактант/ рН	Концентрация OMS 646	Содержание белка
1	20 мМ цитрат, 200 мМ аргинин, 0,01% PS-80, рН 5,8	185 мг/мл	187,1
2	20 мМ гистидин, 200 мМ аргинин, 0,01% PS-80, рН 5,9	185 мг/мл	188,2
3	20 мМ цитрат, 200 мМ аргинин, рН 5,8	185 мг/мл	193,3

1. Осмоляльность и вязкость потенциальных препаратов OMS646.

Осмоляльность и вязкость трех потенциальных препаратов, полученных, как показано в табл. 7, определяли методами, описанными в примере 2. Жидкость препарата считали неньютоновской в случае % ОСО > 10 при протестированных скоростях сдвига. Результаты приведены в табл. 8.

Таблица 8

Осмоляльность и вязкость

Препарат	Буфер/Экципиенты /Сурфактант/рН	Концентрация	Осмоляльность (мОсоль/кг)	Вязкость (сП)	Характер жидкости
1	20 мМ цитрат, 200 мМ аргинин, 0,01%	185 мг/мл	473	16,1	ньютонов ская
	PS-80, рН 5,8				
2	20 мМ гистидин, 200 мМ аргинин, 0,01% PS-80, рН 5,9	185 мг/мл	440	15,9	ньютонов ская
3	20 мМ цитрат, 200 мМ аргинин, рН 5,8	185 мг/мл	468	21,3	ньютонов ская

2. Возможность введения шприцем потенциальных препаратов OMS 646.

Методы.

Анализ возможности введения шприцем трех препаратов OMS646 проводили в отношении средней нагрузки и максимальной нагрузки с применением 27 GA (1,25"), 25 GA (1") и 25 GA тонкостенных (1") игл. Каждую из трех реплик каждого препарата вводили один раз. Результаты оценки возможности введения шприцем образцов являются средними значениями для трех реплик.

Результаты.

Три препарата, приведенные в табл. 7 (содержащие OMS646 в концентрации 185 мг/мл), оценивали на возможность введения их шприцем с применением 27 GA (1,25"), 25 GA тонкостенных (1") и 25 GA (1") игл. Приведенные результаты являются средними значениями для трех реплик. Результаты приведены в табл. 9 и графически проиллюстрированы на фиг. 7А и 7В. Фиг. 7А графически иллюстрирует среднюю нагрузку (фунт-сила) для трех потенциальных препаратов OMS646 при применении 27 GA, 25 GA и 25 GA тонкостенных игл. Фиг. 7В графически иллюстрирует максимальную нагрузку (фунт-сила) для трех потенциальных препаратов OMS646 при применении 27 GA, 25 GA и 25 GA тонкостенных игл.

Таблица 9

Возможность введения шприцем потенциальных высококонцентрированных препаратов OMS646

Препарат	Условие	Средняя нагрузка (фунт-сила)	Максимальная нагрузка (фунт-сила)	Средняя нагрузка (Н)	Максимальная нагрузка (Н)
1	27 GA	4,72	5,07	20,99	22,55
	25 GA	1,88	2,03	8,36	9,03
	25 GA (тонкостенная)	1,27	1,36	5,65	6,05
2	27 GA	4,51	4,85	20,06	21,57
	25 GA	1,84	1,99	8,18	8,85
	25 GA (тонкостенная)	1,26	1,32	5,60	5,80
3	27 GA	5,58	5,83	24,82	25,93
	25 GA	2,29	2,51	10,18	11,16
	25 GA (тонкостенная)	1,50	1,60	6,67	7,11

Как описано выше, что касается возможности введения шприцем, в случае введения субъекту-человеку, как правило, нежелательно превышать силу 25 Н. Как видно из приведенной выше табл. 9, все три потенциальных высококонцентрированных препарата OMS646 имели приемлемую возможность введения шприцем (т.е. сила не превышала 25 Н) при введении через 25 GA или 25 GA тонкостенные иглы. Препарат №2 также имел приемлемую возможность введения шприцем при введении через 27 G иглу. Добавление PS-80 в концентрации 0,01% приводило к неожиданному улучшению возможности введения шприцем.

3. Анализ методом ЭХ потенциальных препаратов QMS646 после инъекции.

Эксклюзионную хроматографию (ЭХ) использовали для оценки количества агрегатов и продуктов деградации, присутствующих в трех потенциальных препаратах OMS646 после инъекции. Вкратце использовали систему Agilent 1100 для ВЭЖХ, оборудованную колонкой G3000SWxl для ЭХ (Tosoh, 7,8×300 мм, размер частиц 5 мкм). Образцы OMS646 разбавляли до концентрации 2,5 мг/мл в подвижной фазе ЭХ (140 мМ фосфат калия, 75 мМ хлорид калия, pH 7,0), и 20 мкл образца инжектировали на колонку для ВЭЖХ. Хроматографию проводили со скоростью потока 0,4 мл/мин, и элюированный белок определяли по поглощению при 280 нм (ширина полосы 4 нм) без поправки на эталон. Для оценки пригодности системы инъекцию всех образцов производили между инъекциями пустой пробы подвижной фазы и стандарта для гель-фильтрации, и эталонный материал инжектировали в двойном повторе в начале последовательности операций. Определяли процентное содержание, отдельно и суммарно, высокомолекулярных (ВММ) молекул и низкомолекулярных (НММ) молекул, в дополнение к процентному содержанию мономера и общей интегрированной площади пика.

Результаты.

Результаты ЭХ анализа высококонцентрированных потенциальных препаратов OMS646 после инъекции приведены в табл. 10.

Таблица 10

Анализ методом ЭХ высококонцентрированных препаратов OMS646 после инъекции

Препарат	Условие	% Чистоты	% ВММ	% НММ
1	Контроль	96,5	3,3	0,1
	27 GA	96,4	3,5	0,2
	25 GA	96,4	3,4	0,2
	25 GA (тонкостенная)	96,4	3,4	0,2
2	Контроль	96,6	3,4	Не обнаружено
	27 GA	96,5	3,5	Не обнаружено
	25 GA	96,5	3,5	Не обнаружено
	25 GA (тонкостенная)	96,5	3,5	Не обнаружено
3	Контроль	96,5	3,4	0,2
	27 GA	96,3	3,5	0,2
	25 GA	96,4	3,5	0,2
	25 GA (тонкостенная)	96,3	3,5	0,2

Данные результаты показывают небольшое изменение чистоты или его отсутствие, определенное методом ЭХ после выталкивания препарата через иглу.

Краткое изложение результатов.

Результаты изучения возможности введения шприцем показали, что все три потенциальных высококонцентрированных препарата OMS646 имеют приемлемую возможность введения шприцем при тестировании с применением игл, подходящих для подкожного введения, и имеет место небольшое изменение чистоты, или его отсутствие, у препарата OMS646 после выталкивания его через иглу. Добавление PS-80 в концентрации 0,01% приводило к неожиданному улучшению возможности введения шприцем препарата, содержащего цитрат и аргинин.

Пример 4.

В данном примере описано исследование, которое проводили для оценки стабильности потенциальных высококонцентрированных низковязких препаратов антитела OMS646 при долгосрочном хранении.

Методы.

Данное исследование проводили для оценки стабильности высококонцентрированных препаратов антитела OMS646 для подкожной инъекции после долгосрочного хранения.

Оценивали следующие два потенциальных препарата:

а) 20 мМ цитрат, 200 мМ аргинин, 0,01% PS-80, pH 5,8 (185 мг/мл OMS646);

б) 20 мМ гистидин, 200 мМ аргинин, 0,01% PS-80, pH 5,9 (185 мг/мл OMS646).

Образцы помещали в 13-мм, 2-мл стеклянные пробирки USP типа I Schott (West Pharmaceuticals), наливая 1,0 мл образца, герметично закрывали 13-мм пробками Fluorotec (West Pharmaceuticals) и запечатывали алюминиевыми колпачками с кнопками 13FO (West Pharmaceuticals) или эквивалент). Пробирки с образцами хранили при контролируемой температуре в холодильных камерах для определения стабильности при -75 ± 10 , -20 ± 5 , $5\pm 3^\circ\text{C}$, $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\% \text{RH}$ и $40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\% \text{RH}$. Целевое количество, по меньшей мере 40 пробирок с образцами для каждого препарата, хранили для настоящего исследования. Образцы, хранящиеся в виде жидкости, хранились в перевернутом состоянии, в то время как замороженные образцы хранились в вертикальном положении. Необходимое число пробирок отбирали в соответствующие временные точки из соответствующих условий, и образцы характеризовали по следующим параметрам: внешний вид при визуальной инспекции, содержание белка по показателю A_{280} , осмоляльность, ЭХ-ВЭЖХ, pH и результаты ELISA для MASP-2. Иллюстративные данные ЭХ-ВЭЖХ приведены в табл. 11 и показывают, что антитело OMS646 сохраняло целостность после хранения при 5°C в течение 6, 9 и 12 месяцев. Данные ELISA подтвердили, что антитело сохранило свои функциональные свойства после хранения при 5°C в течение 6, 9 и 12 месяцев.

Результаты.

Результаты данного исследования приведены в табл. 11 ниже.

Таблица 11

Стабильность препаратов при анализе методом ЭХ

Препарат	Временная точка	Условие	Всего ВММ (олигомер) (%)	Основной пик (мономер) (%)	Всего НММ (%)
185 мг/мл ОМС646 20 мМ цитрат 200 мМ аргинин 0,01% полисорбата 80 рН 5,8	T ₀	н/п	3,9	96,1	-
	1 месяц	-20°C	2,5	97,5	-
		5°C	2,6	97,4	-
		25°C/60% RH	2,7	97,3	-
	2 месяца	-20°C	2,9	97,1	-
		5°C	3,1	96,9	-
		25°C/60% RH	3,4	96,6	-
	3 месяца	-20°C	2,8	97,2	-
		5°C	2,9	97,1	-
		25°C/60% RH	3,3	96,0	0,7
	6 месяцев	-20°C	1,7	98,3	-
		5°C	1,9	98,1	-
		25°C/60% RH	2,0	98,0	-
	9 месяцев	5°C	3,4	96,6	-
		25°C/60% RH	4,0	95,7	0,2
	12 месяцев	5°C	3,4	96,6	-
185 мг/мл ОМС646 20 мМ гистидин 200 мМ аргинин 0,01% полисорбата 80	T ₀	н/п	3,8	96,2	-
	1 месяц	-20°C	2,7	97,3	-
		5°C	2,7	97,3	-
		25°C/60% RH	2,9	97,1	-
	2 месяца	-20°C	2,9	97,1	-

pH 5,9		5°C	3,3	96,7	-
		25°C/60%	3,3	96,7	-
		RH			
	3 месяца	-20°C	2,8	97,1	0,1
		5°C	3,0	96,9	0,1
		25°C/60%	3,1	96,1	0,8
	6 месяцев	-20°C	1,8	98,2	-
		5°C	1,9	98,1	-
		25°C/60%	2,0	98,0	-
	RH				

Как видно из табл. 11, небольшое изменение степени чистоты, или его отсутствие, наблюдали в образцах, хранившихся вплоть до 9 месяцев при -20°C или хранившихся вплоть до 12 месяцев при 5°C, запланированной температуре хранения. Чистота образцов, хранившихся при 25°C, также сохранялась на протяжении 2 месяцев, однако небольшие изменения степени чистоты при 25°C наблюдались в случае хранения свыше 9 месяцев.

Пример 5.

Иллюстративный препарат, содержащий ингибирующее MASP-2 антитело OMS646 при pH 5,8, готовили путем объединения OMS646 (185 мг/мл) с цитратом (20 мМ), аргинином (200 мМ) и полисорбатом 80 (0,01%). Цитрат натрия дигидрат (4,89 мг/мл) и лимонной кислоты моногидрат (0,71 мг/мл) использовали для получения цитратного буфера, при этом по мере необходимости использовали соляную кислоту и/или гидроксид натрия для корректировки pH.

Вязкость данного препарата измеряли при помощи капиллярного вискозиметра, и результаты приведены в табл. 12. Имеет место небольшое уменьшение вязкости при более высоких скоростях сдвига, при этом все значения составляют менее 13 сП.

Таблица 12

Вязкость иллюстративного препарата OMS646, измеренная при разных скоростях сдвига

Препарат	Температура (°C)	Скорость сдвига (1/с)	Вязкость (сП)
185 мг/мл OMS646	25,0	103000	12,2
20 мМ цитрат	25,0	156000	11,5
200 мМ аргинин	25,0	211000	11,0
0,01% полисорбат 80			
pH 5,8			

Было установлено, что введение субъектам-людям иллюстративного препарата OMS646 с концентрацией 185 мг/мл, описанного в данном примере (как подкожной инъекцией, так и внутривенным введением после разбавления), приводило к устойчивому и сильному ингибированию лектинового пути.

При том, что предпочтительные варианты осуществления изобретения были проиллюстрированы и описаны, следует понимать, что различные изменения в раскрытых препаратах и способах могут быть произведены без отклонения от сущности и объема изобретения. Таким образом, объем выдаваемого патента должен быть ограничен только определениями прилагаемой формулы изобретения.

В соответствии с вышеизложенным, изобретение охватывает следующие варианты осуществления.

1. Стабильный фармацевтический препарат, подходящий для парентерального введения субъекту-млекопитающему, содержащий

(a) водный раствор, содержащий буферную систему, имеющую pH 5,0-7,0; и

(b) моноклональное антитело или его фрагмент, которое специфически связывает MASP-2 человека, в концентрации от примерно 50 мг/мл до примерно 250 мг/мл, при этом указанное антитело или его фрагмент, содержит

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 в SEQ ID NO: 2, и

(ii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 в SEQ ID NO: 3; или его вариант, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 3,

при этом препарат имеет вязкость от 2 до 50 сантипуаз (сП),

при этом препарат является стабильным при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере одного месяца.

2. Фармацевтический препарат по п.1, в котором концентрация антитела составляет от примерно 100 мг/мл до примерно 225 мг/мл.

3. Фармацевтический препарат по п.1, в котором концентрация антитела составляет от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл.

4. Фармацевтический препарат по п.1, в котором концентрация антитела составляет от примерно 175 мг/мл до примерно 195 мг/мл.

5. Фармацевтический препарат по п.1 или 2, вязкость которого составляет от примерно 2 сП до примерно 40 сП.

6. Фармацевтический препарат по п.1 или 2, вязкость которого составляет от примерно 2 сП до примерно 30 сП.

7. Фармацевтический препарат по п.1 или 2, вязкость которого составляет от примерно 2 сП до примерно 25 сП.

8. Фармацевтический препарат по п.1 или 2, вязкость которого составляет от примерно 2 сП до примерно 20 сП.

9. Фармацевтический препарат по п.1 или 2, вязкость которого составляет от примерно 2 сП до примерно 18 сП.

10. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-9, в котором буферная система содержит по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое буферное средство, имеющее константу диссоциации кислоты в пределах 2 единиц рН от значения рН препарата.

11. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-10, в котором буферная система содержит по меньшей мере одно буферное средство, выбранное из группы, состоящей из сукцината, гистидина и цитрата.

12. Фармацевтический препарат по п.11, в котором по меньшей мере одно буферное средство представляет собой гистидин или цитрат.

13. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-12, в котором по меньшей мере одно буферное средство представляет собой цитрат.

14. Фармацевтический препарат по п.13, в котором по меньшей мере одно буферное средство представляет собой цитрат натрия.

15. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-12, в котором по меньшей мере одно буферное средство представляет собой гистидин.

16. Фармацевтический препарат по п.15, в котором по меньшей мере одно буферное средство представляет собой L-гистидин.

17. Фармацевтический препарат по п.13, в котором цитрат присутствует в растворе в концентрации от 10 до 50 мМ.

18. Фармацевтический препарат по п.15, в котором гистидин присутствует в растворе в концентрации от 10 до 50 мМ.

19. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-18, который также содержит по меньшей мере один эксципиент, выбранный из группы, состоящей из белка, аминокислоты, сахара, полиола, соли, жирной кислоты и фосфолипида.

20. Фармацевтический препарат по п.19, в котором по меньшей мере один эксципиент представляет собой модифицирующее тоничность средство в количестве, достаточном, чтобы препарат был гипертоническим.

21. Фармацевтический препарат по п.20, в котором модифицирующее тоничность средство выбирают из группы, состоящей из аминокислоты с заряженной боковой цепью, сахара или другого полиола и соли.

22. Фармацевтический препарат по п.21, в котором модифицирующее тоничность средство представляет собой сахар или другой полиол и выбрано из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, маннита и сорбита.

23. Фармацевтический препарат по п.21, в котором модифицирующее тоничность средство представляет собой соль, выбранную из группы, состоящей из NaCl или соли аминокислоты.

24. Фармацевтический препарат по п.21, в котором модифицирующее тоничность средство представляет собой аминокислоту с заряженной боковой цепью.

25. Фармацевтический препарат по п.24, в котором аминокислота с заряженной боковой цепью присутствует в концентрации от примерно 150 мМ до примерно 300 мМ.

26. Фармацевтический препарат по п.24 или 25, в котором модифицирующее тоничность средство представляет собой аминокислоту с отрицательно заряженной боковой цепью.

27. Фармацевтический препарат по п.24 или 25, в котором эксципиент, модифицирующее тоничность средство, представляет собой аминокислоту с положительно заряженной боковой цепью.

28. Фармацевтический препарат по п.26, в котором модифицирующее тоничность средство представляет собой глутамат.

29. Фармацевтический препарат по п.27, в котором модифицирующее тоничность средство представляет собой аргинин.
30. Фармацевтический препарат по п.29, в котором модифицирующее тоничность средство представляет собой L-аргинин-HCl.
31. Фармацевтический препарат по п.29, в котором аргинин присутствует в растворе на гипертоническом уровне от 200 до 300 мМ.
32. Фармацевтический препарат по п.17, в котором раствор содержит примерно 20 мМ цитрат и имеет рН от примерно 5,5 до примерно 6,5.
33. Фармацевтический препарат по п.32, в котором раствор также содержит аргинин в концентрации примерно 200 мМ.
34. Фармацевтический препарат по п.18, в котором раствор содержит примерно 20 мМ гистидин и имеет рН от примерно 5,5 до примерно 6,5.
35. Фармацевтический препарат по п.34, в котором раствор также содержит аргинин в концентрации примерно 200 мМ.
36. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-35, в котором раствор также содержит сурфактант в концентрации от примерно 0,001% (мас./об.) до примерно 0,1% (мас./об.).
37. Фармацевтический препарат по п.36, в котором сурфактант представляет собой неионный сурфактант.
38. Фармацевтический препарат по п.37, в котором сурфактант представляет собой полисорбат или полоксамер.
39. Фармацевтический препарат по п.38, в котором сурфактант представляет собой полисорбат 80.
40. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-39, который является стабильным при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере 6 месяцев.
41. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-39, который является стабильным при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере 12 месяцев.
42. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-39, вязкость которого составляет менее примерно 25 сП.
43. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-39, вязкость которого составляет менее примерно 20 сП.
44. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-39, вязкость которого составляет менее примерно 18 сП.
45. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-39, сила трения скольжения которого при инъекции составляет примерно 25 ньютон или менее в случае введения через 27 GA 1,25" иглу при комнатной температуре.
46. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-39, сила трения скольжения которого при инъекции составляет примерно 20 ньютон или менее в случае введения через 25 GA 1" иглу при комнатной температуре.
47. Фармацевтический препарат по п.1, содержащий примерно 20 мМ цитрат натрия, примерно 200 мМ L-аргинин-HCl, при этом концентрация антигена в препарате составляет от примерно 175 мг/мл до примерно 195 мг/мл и при этом вязкость составляет менее примерно 25 сП.
48. Фармацевтический препарат по п.47, также содержащий от 0,001 до 0,05% мас./об. полисорбата 80.
49. Фармацевтический препарат по п.1, содержащий примерно 20 мМ L-гистидин, примерно 200 мМ L-аргинин-HCl, при этом концентрация антигена в препарате составляет от примерно 175 мг/мл до примерно 195 мг/мл и при этом вязкость составляет менее примерно 25 сП.
50. Фармацевтический препарат по п.49, также содержащий от 0,001 до 0,05% мас./об. полисорбата 80.
51. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-50, который является стерильным.
52. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-50, в котором моноклональное антитело представляет собой полноразмерное моноклональное антитело.
53. Фармацевтический препарат по п.52, в котором антитело представляет собой полноразмерное IgG4 антитело человека.
54. Фармацевтический препарат по п.53, при этом IgG4 имеет мутацию в шарнирной области.
55. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-54, не содержащий сахарозу или сорбит.
56. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-54, не содержащий CaCl₂.
57. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-54, не содержащий MgCl₂.
58. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-54, не содержащий CaCl₂ и не содержащий MgCl₂.
59. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-54, не содержащий добавку в виде двухвалентных катионов.
60. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-59, в котором концентрация антигена составляет примерно 185 мг/мл.
61. Фармацевтический препарат по любому из пп.1-60, также содержащий фермент гиалуронидазу в

количестве, эффективном для увеличения диспергирования и/или абсорбции антитела после подкожного введения.

62. Фармацевтический препарат по п.61, содержащий от примерно 100 ед/мл до примерно 20000 ед/мл указанного фермента гиалуронидазы.

63. Фармацевтический препарат по п.1, содержащий

- (a) полисорбат 80 в концентрации от примерно 0,01% мас./об. до примерно 0,08% мас./об.;
- (b) L-аргинин-HCl в концентрации от примерно 150 мМ до примерно 200 мМ;
- (c) цитрат натрия в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ; и
- (d) антитело в концентрации от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл.

64. Фармацевтический препарат по п.1, содержащий

- (a) полисорбат 80 в концентрации от примерно 0,01% мас./об. до примерно 0,08% мас./об.;
- (b) L-аргинин-HCl в концентрации от примерно 150 мМ до примерно 200 мМ;
- (c) L-гистидин в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ; и
- (d) антитело в концентрации от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл.

65. Фармацевтический препарат по п.1, содержащий

- (a) полисорбат 80 в концентрации примерно 0,01% мас./об.;
- (b) L-аргинин-HCl в концентрации примерно 200 мМ;
- (c) цитрат натрия в концентрации примерно 20 мМ; и
- (d) антитело в концентрации от примерно 175 мг/мл до примерно 195 мг/мл.

66. Фармацевтический препарат по п.1, содержащий

- (a) полисорбат 80 в концентрации примерно 0,01% мас./об.;
- (b) L-аргинин-HCl в концентрации примерно 200 мМ;
- (c) L-гистидин в концентрации примерно 20 мМ; и
- (d) антитело в концентрации от примерно 175 мг/мл до примерно 195 мг/мл.

67. Фармацевтический препарат по п.1, содержащий

- (a) полисорбат 80 в концентрации примерно 0,01% мас./об.;
- (b) L-аргинин-HCl в концентрации примерно 200 мМ;
- (c) цитрат натрия в концентрации примерно 20 мМ; и
- (d) антитело в концентрации от примерно 175 мг/мл до примерно 195 мг/мл.

68. Фармацевтический препарат по п.1, содержащий

- (a) полисорбат 80 в концентрации примерно 0,01% мас./об.;
- (b) L-аргинин-HCl в концентрации примерно 200 мМ;
- (c) L-гистидин в концентрации примерно 20 мМ; и
- (d) антитело в концентрации от примерно 175 мг/мл до примерно 195 мг/мл.

69. Фармацевтический препарат по любому из пунктов 63-68, также содержащий от примерно 100 ед/мл до примерно 20000 ед/мл фермента гиалуронидазы для эффективного увеличения диспергирования и/или абсорбции антитела после подкожного введения.

70. Стабильный водный фармацевтический препарат, подходящий для парентерального введения субъекту-млекопитающему, состоящий в основном из

- (a) полисорбата 80 в концентрации от примерно 0,01% мас./об. до примерно 0,08% мас./об.;
- (b) L-аргинина-HCl в концентрации от примерно 150 мМ до примерно 200 мМ;
- (c) цитрата натрия в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ; и
- (d) моноклонального антитела, или его фрагмента, которое специфически связывает MASP-2 человека, в концентрации от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл, при этом указанное антитело или его фрагмент, содержит
 - (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 в SEQ ID NO: 2, и
 - (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 в SEQ ID NO: 3; или его варианта, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 3,

при этом препарат имеет pH от примерно 5,0 до примерно 7,0, вязкость от 2 до 50 сантипуаз (сП), и при этом препарат является стабильным при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере одного месяца.

71. Стабильный водный фармацевтический препарат, подходящий для парентерального введения субъекту-млекопитающему, состоящий в основном из

- (a) полисорбата 80 в концентрации от примерно 0,01% мас./об. до примерно 0,08% мас./об.;
- (b) L-аргинина-HCl в концентрации от примерно 150 мМ до примерно 200 мМ;
- (c) L-гистидина в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ; и
- (d) моноклонального антитела, или его фрагмента, которое специфически связывает MASP-2 человека, в концентрации от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл, при этом указанное антитело или его фрагмент, содержит
 - (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 в SEQ ID NO: 2, и

(ii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 в SEQ ID NO: 3; или его вариант, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 3,

при этом препарат имеет pH от примерно 5,0 до примерно 7,0, вязкость от 2 до 50 сантипуаз (сП), и при этом препарат является стабильным при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере одного месяца.

72. Препарат по любому из пп.1-71, при этом антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3.

73. Герметичный контейнер, содержащий препарат по любому из пп.1-72.

74. Устройство для подкожного введения, содержащее препарат по любому из пп.1-72.

75. Набор, включающий предварительно заполненный контейнер, содержащий фармацевтический препарат, содержащий антитело против MASP-2 по любому из пп.1-72, и инструкции по применению препарата.

76. Набор по п.75, в котором предварительно заполненный контейнер выбирают из группы, состоящей из шприца, шприц-ручки, герметичного флакона, автоинъектора и насосного устройства (например, нательного прикрепленного на пластыре насоса или привязанного насоса).

77. Набор, включающий

(a) первый предварительно заполненный контейнер, содержащий фармацевтический препарат, содержащий антитело против MASP-2 по любому из пп.1-60 или 63-72;

(b) второй предварительно заполненный контейнер, содержащий фермент гиалуронидазу в количестве, эффективном для увеличения диспергирования и/или абсорбции антитела против MASP-2 после подкожного введения; и

(c) инструкции по применению.

78. Набор по п.77, в котором по меньшей мере один из первого и второго предварительно заполненных контейнеров выбирают из группы, состоящей из шприца, шприц-ручки, герметичного флакона, автоинъектора и насосного устройства (например, нательного прикрепленного на пластыре насоса или привязанного насоса).

79. Фармацевтическая стандартная лекарственная форма, подходящая для парентерального введения человеку, содержащая препарат по любому из пп.1-72, в соответствующем контейнере.

80. Способ лечения субъекта, страдающего от заболевания или нарушения, которое поддается лечению ингибирующим MASP-2 антителом, включающий введение препарата по любому из пп.1-72 субъекту, который нуждается в этом.

81. Способ по п.80, в котором препарат вводят субъекту подкожно.

82. Способ по п.80, дополнительно включающий введение субъекту фермента гиалуронидазы в количестве, эффективном для увеличения диспергирования и/или абсорбции антитела.

83. Способ по п.82, в котором фермент гиалуронидазу вводят одновременно с препаратом, содержащим ингибирующее MASP-2 антитело.

84. Способ по п.82 или 83, при этом препарат содержит ингибирующее MASP-2 антитело и фермент гиалуронидазу.

85. Способ по п.82, в котором фермент гиалуронидазу вводят субъекту до введения препарата, содержащего ингибирующее MASP-2 антитело.

86. Способ по п.82, в котором фермент гиалуронидазу вводят субъекту после введения препарата, содержащего ингибирующее MASP-2 антитело.

87. Способ по п.80, в котором препарат вводят при помощи предварительно заполненного шприца, содержащего препарат.

88. Способ ингибирования зависимой от MASP-2 активации комплемента у субъекта, страдающего от или с риском развития связанного с комплементом заболевания или нарушения, включающий введение препарата по любому из пп.1-72 субъекту, который нуждается в этом.

89. Способ по п.88, в котором препарат вводят субъекту подкожно.

90. Способ по п.89, в котором препарат вводят при помощи предварительно заполненного шприца, содержащего препарат.

91. Способ по п.88, при этом субъект страдает от или имеет риск развития связанного с комплементом заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из тромботической микроангиопатии (ТМА), заболевания почек, воспалительной реакции в результате трансплантации ткани или органа, ишемического и реперфузионного повреждения, осложнения, связанного с диабетом, сердечно-сосудистого заболевания или нарушения, воспалительного желудочно-кишечного заболевания, легочного заболевания, офтальмического заболевания или нарушения и диссеминированной внутрисосудистой коагуляции.

92. Способ по п.91, при этом тромботическая микроангиопатия представляет собой атипичный ге-

молитический уремиический синдром (аГУС).

93. Способ по п.91, при этом тромботическая микроангиопатия связана с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

94. Способ по п.91, при этом заболевание почек представляет собой IgA-нефропатию.

95. Способ по п.91, при этом заболевание почек представляет собой волчаночный нефрит.

96. Способ ингибирования зависимой от MASP-2 активации комплемента у субъекта, страдающего от или с риском развития связанного с комплементом заболевания или нарушения, включающий разбавление препарата по любому из пп.1-72 фармацевтически приемлемым разбавителем и введение разбавленного препарата системно субъекту, который нуждается в этом.

97. Способ по п.96, в котором разбавленный препарат вводят субъекту внутривенно.

98. Способ по п.96, при этом субъект страдает от, или имеет риск развития, связанного с комплементом заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из тромботической микроангиопатии (ТМА), заболевания почек, воспалительной реакции в результате трансплантации ткани или органа, ишемического и реперфузионного повреждения, осложнения, связанного с диабетом, сердечно-сосудистого заболевания или нарушения, воспалительного желудочно-кишечного заболевания, легочного заболевания, офтальмического заболевания или нарушения и диссеминированной внутрисосудистой коагуляции.

99. Способ по п.98, при этом тромботическая микроангиопатия представляет собой атипичный гемолитический уремиический синдром (аГУС).

100. Способ по п.98, при этом тромботическая микроангиопатия связана с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

101. Способ по п.98, при этом заболевание почек представляет собой IgA-нефропатию.

102. Способ по п.98, при этом заболевание почек представляет собой волчаночный нефрит.

103. Фармацевтическая композиция для применения в лечении пациента, страдающего от или с риском развития зависимого от MASP-2 связанного с комплементом заболевания или нарушения, которая представляет собой стерильную, одноразового применения, лекарственную форму, содержащую от примерно 350 мг до примерно 400 мг ингибирующего MASP-2 антитела, при этом композиция содержит от примерно 1,8 мл до примерно 2,2 мл препарата антитела с концентрацией 185 мг/мл, причем антитело содержит

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3,

при этом композиция является стабильной при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере шести месяцев.

104. Композиция по п.103, содержащая буферную систему, имеющую pH от 5,0 до 7,0.

105. Композиция по п.104, в которой буферная система содержит по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое буферное средство, выбранное из группы, состоящей из сукцината, гистидина и цитрата.

106. Композиция по п.103, содержащая от 1,8 до 2,2 мл препарата ингибирующего MASP-2 антитела по любому из пп.1-72 в концентрации 185 мг/мл.

107. Композиция по любому из пп.103-106, при этом зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой аГУС.

108. Композиция по любому из пп.103-107, при этом зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой ТГСК-ТМА.

109. Композиция по любому из пп.103-107, при этом зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой IgA-Н.

110. Композиция по любому из пп.103-107, при этом зависимое от MASP-2 связанное с комплементом заболевание или нарушение представляет собой волчаночный нефрит (ВН).

При том что предпочтительные варианты осуществления изобретения были проиллюстрированы и описаны, следует понимать, что различные изменения в раскрытых препаратах и способах могут быть произведены без отклонения от сущности и объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стабильный водный фармацевтический препарат, подходящий для парентерального введения субъекту-млекопитающему, состоящий из

(a) буферной системы, имеющей pH 5,0-7,0, при этом буферная система содержит буферное средство, выбранное из группы, состоящей из цитрата в концентрации от 10 до 50 мМ или гистидина в концентрации от 10 до 50 мМ;

(b) человеческого IgG4 моноклонального антитела, которое специфически связывает MASP-2 человека в концентрации от 50 до 200 мг/мл, при этом указанное антитело содержит

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3;

(c) модифицирующего тоничность средства, где модифицирующее тоничность средство представляет собой аргинин или L-аргинин-HCl в концентрации от 200 до 300 мМ в количестве, достаточном для того, чтобы состав был гипертоническим; и

(d) полисорбата 80 в концентрации от 0,01 до 0,1% (мас./об.),

при этом препарат имеет вязкость от 2 до 50 сП при измерении при примерно 25°C со скоростью сдвига в диапазоне от 100000 до 250000 1/с, и

при этом препарат является стабильным при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере шести месяцев.

2. Фармацевтический препарат по п.1, к которому применимо по меньшей мере одно или более из следующего:

(a) концентрация антитела в препарате составляет от 100 до 225 мг/мл, или от 150 до 200 мг/мл, или от 175 до 195 мг/мл;

(b) вязкость препарата составляет от 2 до 40 сП, или от 2 до 30 сП, или от 2 до 25 сП, или от 2 до 20 сП, или от 2 до 18 сП;

(c) вязкость составляет менее 25 сП, или, например, менее 20 сП, или, например, менее 18 сП;

(d) концентрация антитела составляет 185 мг/мл;

(e) препарат является стабильным при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере 12 месяцев;

(f) сила трения скольжения препарата при инъекции составляет 25 ньютон или менее в случае введения через 27 GA 1,25" иглу при комнатной температуре; и/или

(g) сила трения скольжения препарата при инъекции составляет 20 ньютон или менее в случае введения через 25 GA 1" иглу при комнатной температуре.

3. Фармацевтический препарат по п.1, в котором буферное средство представляет собой цитрат натрия.

4. Фармацевтический препарат по п.1, в котором модифицирующее тоничность средство представляет собой L-аргинин-HCl.

5. Фармацевтический препарат по п.3, в котором раствор содержит 20 мМ цитрат и имеет рН от 5,5 до 6,5, необязательно при этом раствор также содержит аргинин в концентрации 200 мМ.

6. Фармацевтический препарат по п.1, содержащий 20 мМ цитрат натрия, 200 мМ L-аргинин-HCl,

при этом концентрация антитела в препарате составляет от 175 до 195 мг/мл,

при этом вязкость составляет менее 25 сП, и

при этом препарат также содержит от 0,001 до 0,05% мас./об. полисорбата 80.

7. Фармацевтический препарат по п.1, который является стерильным.

8. Фармацевтический препарат по п.1, в котором моноклональное антитело представляет собой полноразмерное моноклональное антитело, включающее мутацию в шарнирной области.

9. Фармацевтический препарат по п.1, к которому применимо по меньшей мере одно или более из следующего:

(a) препарат не содержит сахарозу или сорбит;

(b) препарат не содержит CaCl₂;

(c) препарат не содержит MgCl₂;

(d) препарат не содержит CaCl₂ и при этом не содержит MgCl₂; и/или

(e) препарат не содержит добавку в виде двухвалентных катионов.

10. Фармацевтический препарат по п.1, выбранный из группы, состоящей из

(i) препарата, состоящего из

(a) полисорбата 80 в концентрации от 0,01 до 0,08% мас./об.,

(b) L-аргинин-HCl в концентрации от 150 до 200 мМ,

(c) буферной системы с цитратом натрия в концентрации от 10 до 25 мМ, и

(d) антитела в концентрации от 150 до 200 мг/мл; и

(ii) препарата, состоящего из

(a) полисорбата 80 в концентрации 0,01% мас./об.,

(b) L-аргинин-HCl в концентрации 200 мМ,

(c) буферной системы с цитратом натрия в концентрации 20 мМ, и

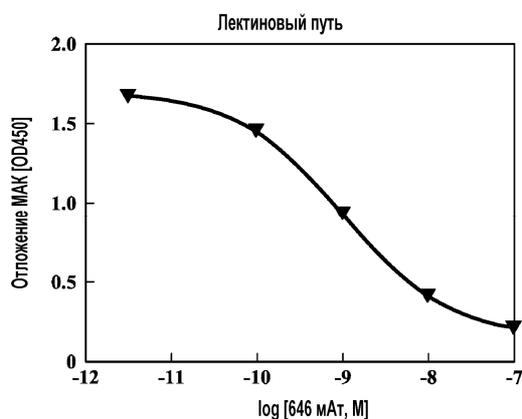
(d) антитела в концентрации от 175 до 195 мг/мл.

11. Стабильный водный фармацевтический препарат, подходящий для парентерального введения субъекту-млекопитающему, состоящий в основном из

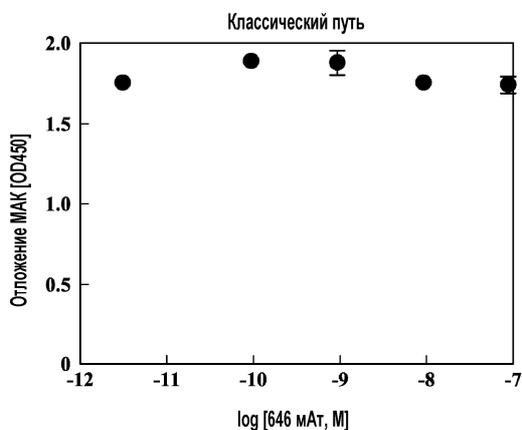
(a) полисорбата 80 в концентрации от 0,01 до 0,08% мас./об.;

(b) L-аргинина-HCl в концентрации от 150 до 200 мМ;

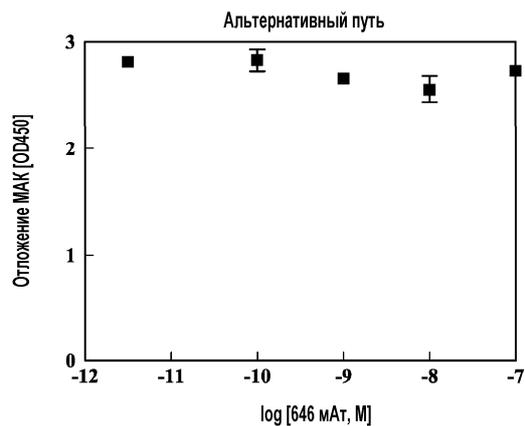
- (с) цитрата натрия в концентрации от 10 до 50 мМ; и
- (d) человеческого IgG4 моноклонального антитела, которое специфически связывает MASP-2 человека, в концентрации от 150 до 200 мг/мл, при этом указанное антитело или его фрагмент содержит
- (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и
- (ii) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3,
- при этом препарат имеет рН от 5,0 до 7,0, вязкость от 2 до 50 сП, и
- при этом препарат является стабильным при хранении при температуре от 2 до 8°C в течение по меньшей мере шести месяцев.
12. Герметичный контейнер, содержащий препарат по п.1 или 11.
13. Предварительно заполненный шприц, содержащий препарат по п.1 или 11.
14. Набор для лечения субъекта, страдающего от зависимого от MASP-2 связанного с компонентом заболевания или нарушения, включающий предварительно заполненный контейнер, содержащий фармацевтический препарат, содержащий антитело против MASP-2 по п.1 или 11, и инструкции по применению препарата, при этом предварительно заполненный контейнер выбирают из группы, состоящей из шприца, шприц-ручки, герметичного флакона, автоинъектора и насосного устройства.
15. Фармацевтическая единичная лекарственная форма, подходящая для парентерального введения человеку, содержащая препарат по п.1 или 11, в соответствующем контейнере.
16. Применение препарата по п.1 или 11 для получения лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего от зависимого от MASP-2 связанного с компонентом заболевания или нарушения.
17. Применение по п.16, при этом препарат подходит для подкожного введения.
18. Применение по п.17, при этом препарат содержится в предварительно заполненном шприце.
19. Фармацевтический препарат по п.1 или 11, где моноклональное антитело представляет собой тетрамер, состоящий из двух идентичных тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4, и двух идентичных легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5.



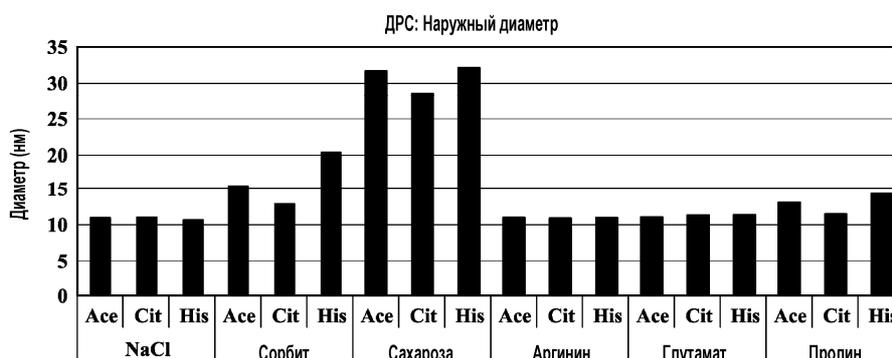
Фиг. 1А



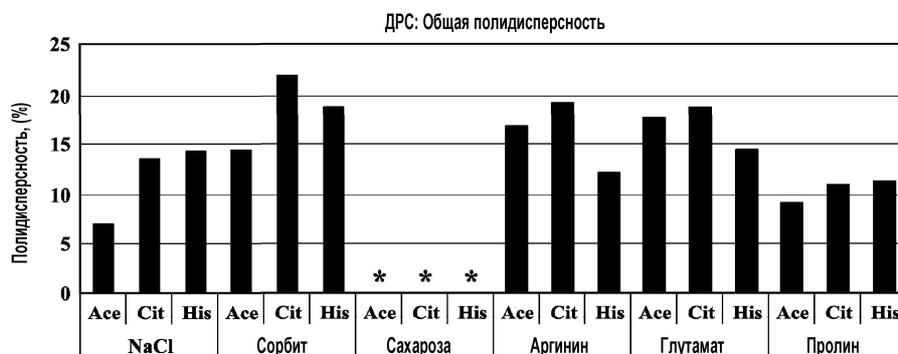
Фиг. 1В



Фиг. 1С

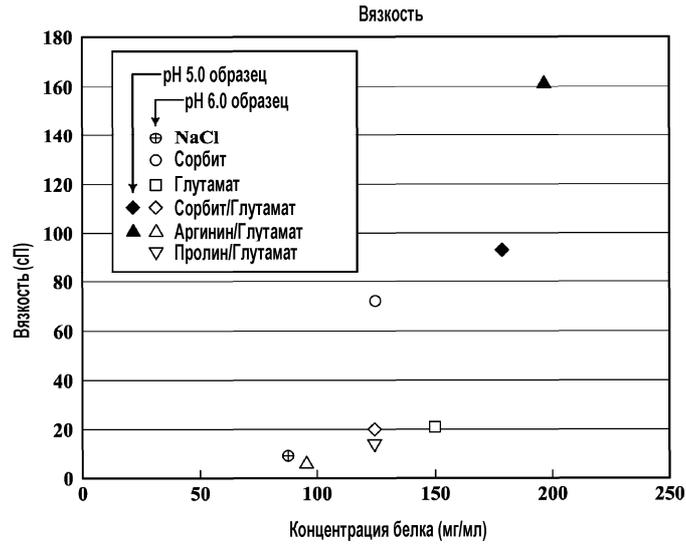


Фиг. 2А

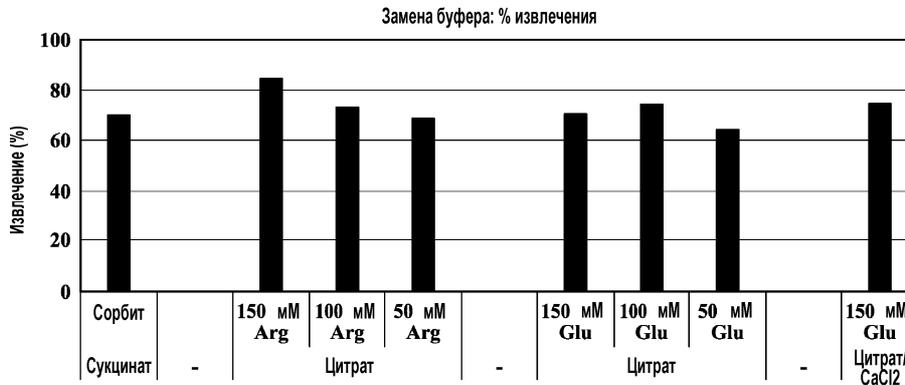


* Мультимодальный

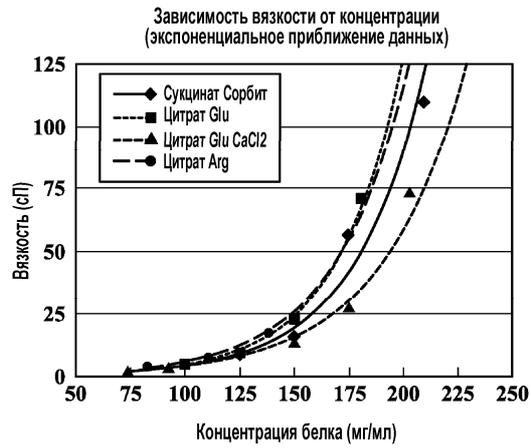
Фиг. 2В



Фиг. 3



Фиг. 4



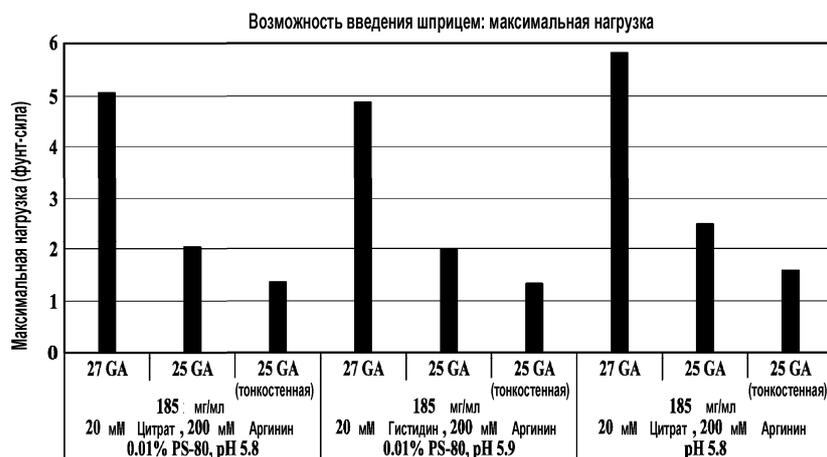
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В

