

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292611** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.06.23

(22) Дата подачи заявки
2021.03.30

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) **СОСТАВ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА**

(31) **63/005,755**

(32) **2020.04.06**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/024937**

(87) **WO 2021/206965 2021.10.14**

(71) Заявитель:
**ЗЕ БОРД ОФ ТРАСТИС ОФ ЗЕ
ЛЕЛАНД СТЭНФОРД ДЖУНИОР
ЮНИВЕРСИТИ; ФОТИ СЕВЕН,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Маджети Равиндра, Вайссман
Ирвинг Л., Нгуйен Фуонг (US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены составы антител к CD47, имеющие фармакологически приемлемую концентрацию и стабильный срок хранения.

A1

202292611

202292611

A1

СОСТАВ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

- [0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/005755, поданной 6 апреля 2020 года, полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

- [0002] Белки иммуноглобулина представляют собой многофункциональные компоненты иммунной системы, которые облегчают клеточные и гуморальные реакции на различные антигены. Одна из форм иммунотерапии использует возможности врожденной иммунной системы. Белок клеточной поверхности CD47 посредством взаимодействия с фагоцитарным рецептором, SIRP α , обеспечивает ключевой сигнал «не ешь меня (don't eat-me)», который может отключить фагоцитоз клеток, экспрессирующих CD47. Блокирование опосредованного CD47 взаимодействия SIRP α с фагоцитом может усилить фагоцитарное удаление клетки-мишени. Также было показано, что лечение антителом к CD47 способствует макрофагальному фагоцитозу раковых клеток.
- [0003] Предоставление стабильных терапевтических составов антител к CD47 является важным этапом в разработке клинически значимой терапии. Однако CD47 представляет собой широко экспрессированное антитело, которое находится на некоторых уровнях на большинстве клеток человека. Связывание антитела к CD47 с мишенями на клеточных поверхностях может инициировать интернализацию комплекса в клетки с последующим лизосомальной деградацией комплекса. Как правило, клиренс mAb, которое связывается с мембранным антигеном происходит быстрее при низких дозах, поскольку несвязанные мишени будут «впитывать» антитело, выступая в качестве поглотителя (это явление называется «поглощение антигеном»). В результате может потребоваться относительно высокие дозы антитела.
- [0004] Кроме того, поскольку антитела представляют собой большие и сложные молекулы, их состав создает особые проблемы. Чтобы белок оставался биологически активным, состав должен сохранять интактной конформационную целостность по меньшей мере основной последовательности аминокислот белка, в то же время защищая многочисленные функциональные группы белка от деградации. Пути деградации белков могут включать химическую нестабильность, например, в результате дезамидирования, рацемизации, гидролиза, окисления, бета-элиминации или дисульфидного обмена; или физической нестабильности от денатурации, агрегации, осаждения или адсорбции.
- [0005] Процесс создания терапевтического антитела требует, прежде всего, понимания того, как белок справляется с воздействием стрессовых условий, которые могут возникнуть во время изготовления или хранения, таких как замораживание/оттаивание, перемешивание/сдвиг, термическая стабильность. Антитела имеют склонность к агрегации при высоких концентрациях, что затрудняет

оптимизацию состава, и существует относительно короткий перечень буферов и вспомогательных веществ, которые в настоящее время одобрены FDA для составления композиций антител, что может ограничить пространство для оптимизации высокой концентрации.

[0006] Конкретные составы, обеспечивающие стабильное хранение антител для клинического применения, остаются проблемой.

[0007] Родственные публикации включают в себя патенты США № 8562997; 9399682; 9017675; 9382320; 9151760; 8758750; 8361736; 8709429; 9193955; и 7514229 и международной патентной заявки US2016/049016; US2016/030997; US2016/036520; US2015/046976; US2015/044304; US2015/057233; US2015/026491; US2015/019954; US2015/010650; US2014/035167; US2014/018743; US2014/038485; US2013/021937; и US2011/066580, каждая из которых специально включена в данный документ посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Предложены составы антител к CD47 и, в частности, водные и лиофилизированные составы антител к CD47, имеющие фармакологически приемлемую концентрацию и стабильный срок хранения.

[0009] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело к CD47 в составе не подвергается предварительной лиофилизации, например, в жидком составе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело к CD47 в составе представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело к CD47 в составе представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело к CD47 в составе представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело к CD47 в составе представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело содержит константную цепь IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой маглолимаб.

[0010] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело к CD47 содержит участок HCDR1, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 1), участок HCDR2, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 2), участок HCDR3, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 3), участок LCDR1, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 4), участок LCDR2, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 5), и участок LCDR3, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такое антитело содержит последовательность константной области IgG4 человека.

[0011] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный состав представляет собой жидкий состав, содержащий: 10-160 мг/мл, *например*, 10-100 мг/мл, *например*, 10-80 мг/мл антитела к CD47; фармацевтически приемлемый буфер в концентрации 5-20 mM; стабилизатор и

поверхностно-активное вещество, при этом указанный состав имеет рН от около рН 4-6,5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело к CD47 представляет собой магролимаб.

- [0012] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный состав представляет собой жидкий состав, содержащий 10-20 мг/мл магролимаба; 10 мМ ацетатного буфера; 5% мас./об. сорбита; 0,01% - 0,04% полисорбата 20, *например*, 0,01%-0,02% полисорбата 20; при этом указанный состав имеет рН от 4,5 до 5,5.
- [0013] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный состав представляет собой жидкий состав, содержащий 10-20 мг/мл магролимаба; 10 мМ ацетатного буфера; 2 –12% мас./об. сахарозы, *например*, 9% мас./об. сахарозы; 0,01% - 0,04% полисорбата 20, *например*, 0,01%-0,02% полисорбата 20; при этом указанный состав имеет рН от 4,5 до 5,5.
- [0014] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный состав представляет собой жидкий состав, содержащий 10-20 мг/мл магролимаба; 10 мМ ацетатного буфера; 2-12 % мас./об. трегалозы, *например*, 9% мас./об. трегалозы; 0,01% - 0,04% полисорбата 20, *например*, 0,01%-0,02% полисорбата 20; при этом указанный состав имеет рН от 4,5 до 5,5.
- [0015] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный состав обеспечивает стабильность антитела при хранении, *например*, поддержание по меньшей мере 50% активности, по меньшей мере 75% активности, по меньшей мере 95% активности после хранения при температуре 2–8 °С, в течение периода времени, составляющего более 8 недель, более 16 недель, более 24 недель, более 48 недель, более 12 месяцев, более 2 лет, более 3 лет, более 4 лет, более 5 лет. Стабильность через 12 месяцев, 2 года, 3 года, 4 года или 5 лет может составлять $100 \pm 50\%$.
- [0016] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ применения, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной дозы состава антитела, содержащего 10-80 мг/мл, *например*, 20-50 мг/мл магролимаба; 10 мМ ацетатного буфера; 5% мас./об. сорбита; 0,01% - 0,04% полисорбата 20, *например*, 0,01%-0,02% полисорбата 20; при этом указанный состав имеет рН от 4,0 до 5,5, *например*, от 4,0 до 5,3, *например*, от 4,0 до 5,0.
- [0017] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ применения, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной дозы состава антитела, содержащего 10-80 мг/мл, *например*, 20-50 мг/мл магролимаба; 10 мМ ацетатного буфера; 9% мас./об. сахарозы; 0,01% - 0,04% полисорбата 20, *например*, 0,01%-0,02% полисорбата 20; при этом указанный состав имеет рН от 4,0 до 5,5, *например*, от 4,0 до 5,3, *например*, от 4,0 до 5,0.
- [0018] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ применения, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной дозы состава антитела, содержащего 10-80 мг/мл, *например*, 20-50 мг/мл магролимаба; 10 мМ ацетатного буфера; 9% мас./об. трегалозы; 0,01%-0,04% полисорбата 20, *например*, 0,01%-0,02% полисорбата 20, при рН от 4,0 до 5,5, *например*, 4,0-5,3, *например*, 4,0-5,0.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

- [0019] ФИГ. 1 Поверхностное натяжение состава магролимаба в зависимости от добавленного полисорбата 20.
- [0020] ФИГ. 2А-2D. Результаты основного пика WCX-HPLC
- [0021] ФИГ. 3А-3D. Результаты пре-пика WCX-HPLC
- [0022] ФИГ. 4А-4D. Результаты мономеров SE-HPLC
- [0023] ФИГ. 5А-5D. Агрегаты SE-HPLC/результаты пре-пика
- [0024] ФИГ. 6 Вязкость магролимаба, измеренная как функция концентрации
- [0025] ФИГ. 7 Различные стабилизирующие вспомогательные вещества, изученные с магролимабом

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- [0026] Перед описанием настоящих способов и композиций следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретным описанным способом или композицией, поскольку они, как известно, могут варьироваться. Следует также понимать, что терминология, применяемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.
- [0027] Когда указан диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение с точностью до десятой доли единицы нижнего предела, если контекст явно не указывает иное, между верхним и нижним пределами этого диапазона также конкретно описано. Каждый меньший диапазон между любым установленным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим установленным или промежуточным значением в указанном диапазоне охватывается настоящим изобретением. Верхний и нижний предел этих меньших диапазонов могут независимо быть включены или исключены в диапазоне, и каждый диапазон, в котором либо один, либо оба предела включены в меньшие диапазоны, также охватываются настоящим изобретением, причем субъект имеет любой конкретный исключенный предел в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в настоящее изобретение.
- [0028] Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть применены на практике или в испытании настоящего изобретения, в настоящее время описаны некоторые потенциальные и предпочтительные способы и материалы. Все упомянутые в настоящем документе публикации включены в настоящий документ в качестве ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми приведены публикации. Следует понимать, что настоящее

изобретение заменяет любое описание включенной публикации в той степени, в которой существует противоречие.

[0029] Следует отметить, что применяемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «клетку» включает множество таких клеток, а ссылка на «пептид» включает ссылку на один или более пептидов и их эквивалентов, например полипептиды, известные специалистам в данной области техники, и так далее.

[0030] Публикации, описанные в настоящем документе, приведены исключительно для их описания до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как допущение того, что настоящее изобретение не может быть датировано ранее такой публикации в силу предшествующего изобретения. Кроме того, указанные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут потребовать независимого подтверждения.

[0031] Под термином «содержащий» подразумевается, что перечисленные элементы требуются для композиции/способа/набора, однако для формирования композиции/способа/набора и тому подобного в рамках формулы изобретения могут быть включены и другие элементы. Например, композиция может содержать агенты, которые способствуют стабильности, агенты, которые способствуют растворимости, адъюванты и т. д., что будет четко понятно специалисту в данной области техники, за исключением элементов, которые охватываются любыми отрицательными оговорками.

[0032] Под термином «состоящий по существу из» подразумевается ограничение рамок описанной композиции или способа указанными материалами или поэтапными действиями, не оказывающими существенного влияния на основную и новую характеристику(-и) объекта изобретения. Например, антитело «состоящее по существу из» описанной последовательности имеет аминокислотную последовательность описанной последовательности плюс или минус около 5 аминокислотных остатков на границах последовательности на основе последовательности, из которой она была получена, например, на около 5 остатков, 4 остатка, 3 остатка, 2 остатка или около 1 остатка менее, чем указанный граничный аминокислотный остаток, или на около 1 остаток, 2 остатка, 3 остатка, 4 остатка или 5 остатка больше, чем указанный граничный аминокислотный остаток,

[0033] Под термином «состоящий из» подразумевается исключение любого элемента, поэтапного действия или ингредиента, не указанного в формуле изобретения, из композиции, способа или набора.

[0034] Общие методы молекулярной и клеточной биохимии можно найти в таких стандартных руководствах как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. (Sambrook et al., CSH Laboratory Press 2001); *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); *Protein Methods* (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); *Nonviral Vectors for Gene Therapy* (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); *Viral Vectors* (Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995); *Immunology Methods Manual* (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); а также *Cell and Tissue Culture: Laboratory Process in Biotechnology* (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998), содержание которых включено в настоящий

документ путем ссылки. Реагенты, клонирующие векторы и наборы для генетических манипуляций, упомянутые в данном описании, доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich и ClonTech.

[0035] Используемый в настоящем документе термин «антитело» включает ссылку на молекулу иммуноглобулина, иммунологически реактивную с конкретным антигеном, и включает как поликлональные, так и моноклональные антитела, например, полный тетрамерный белок IgG. Термин также включает генетически сконструированные формы, такие как химерные антитела (например, гуманизированные мышинные антитела) и гетероконъюгатные антитела. Термин «антитело» также включает антигенсвязывающие формы антител, включая фрагменты со способностью связывания с антигеном (например, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv и μ IgG). Термин также относится к рекомбинантным одноцепочечным Fv-фрагментам (scFv). Термин «антитело» также включает двухвалентные или биспецифические молекулы, диатела, триатела и тетратела

[0036] Антитела также существуют в виде ряда хорошо охарактеризованных фрагментов, полученных при расщеплении различными пептидазами. Таким образом, пепсин расщепляет антитело ниже дисульфидных связей в шарнирной области с образованием F(ab')₂, димера Fab, который сам представляет собой легкую цепь, соединенную с V_H-C_{H1} дисульфидной связью. F(ab')₂ может быть восстановлен в мягких условиях для разрыва дисульфидной связи в шарнирной области, тем самым превращая димер F(ab')₂ в мономер Fab'. Мономер Fab' по существу представляет собой Fab с частью шарнирной области. Хотя различные фрагменты антител определены с точки зрения расщепления интактного антитела, специалисту в данной области техники будет понятно, что такие фрагменты могут быть синтезированы *de novo* либо химически, либо с помощью методики рекомбинантной ДНК. Таким образом, используемый в настоящем документе термин «антитело» также включает фрагменты антител, либо полученных путем модификации целых антител, либо фрагменты, синтезированные *de novo* с помощью методологий рекомбинантной ДНК (например, одноцепочечный Fv), либо фрагменты, идентифицированные с помощью библиотек фагового дисплея.

[0037] Термин «гуманизированное антитело» представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая содержит минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки из определяющего комплементарность участка (CDR) реципиента заменены остатками из CDR вида, отличного от человека (донорное антитело), такого как мышь, крыса или кролик, имеющие требуемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых случаях каркасные остатки Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела также могут содержать остатки, которые не встречаются ни в антителе-реципиенте, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасных последовательностях. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все участки CDR соответствуют участкам

иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все каркасные (FR) области являются областями консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Оптимально гуманизированное антитело также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно у иммуноглобулина человека, особенно Fc-области IgG4.

[0038] «CDR» в данном документе могут быть определены по Chothia et al; Kabat et al.; *etc.* См. публикацию Chothia C, Lesk AM. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol.*, 196(4):901-17, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. См. публикацию Kabat E. A, Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. and Foeller C. (1991). *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5th edit., NIH Publication no. 91-3242, US Dept. of Health and Human Services, Washington, D.C., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0039] Термин «эпитоп» включает любую детерминанту белка, способную специфически связываться с антителом или иным образом взаимодействовать с молекулой. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или углеводов или сахаров, и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Эпитоп может быть «линейным» или «конформационным». Термин «линейный эпитоп» относится к эпитопу, в котором все точки взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка (непрерывно). Термин «конформационный эпитоп» относится к эпитопу, в котором прерывистые аминокислоты объединяются в трехмерную конформацию. В конформационном эпитопе точки взаимодействия происходят через аминокислотные остатки на белке, которые отделены друг от друга.

[0040] «Связывает тот же эпитоп, что и» означает способность антитела или другого связывающего агента связываться с CD47 и иметь тот же эпитоп, что и приведенное в качестве примера антитело. Эпитопы приведенного в качестве примера антитела и других антител к CD47 можно определить с помощью стандартных методов картирования эпитопов. Методы картирования эпитопов, хорошо известные в данной области техники, включают в себя протоколы картирования эпитопов, описанные в *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N.J. Например, линейные эпитопы можно определить, например, путем одновременного синтеза большого количества пептидов на твердых подложках, пептидов, соответствующих частям белковой молекулы, и взаимодействия пептидов с антителами, когда пептиды все еще прикреплены к подложкам. Такие методы известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 4 708 871; Geysen et al, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:3998-4002; Geysen et al, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:78-182; Geysen et al, (1986) *Mol. Immunol.* 23:709-715. Точно так же конформационные эпитопы легко идентифицируются путем определения пространственной конформации аминокислот, например, путем обмена водород/дейтерий, рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. См., например, *Epitope Mapping Protocols* (протоколы картирования эпитопов), выше.

Антигенные области белков также могут быть идентифицированы с помощью стандартных графиков антигенности и гидропатии, таких как рассчитанные с применением, например, программного обеспечения Omega версии 1.0, доступного от Oxford Molecular Group. В данной компьютерной программе используется Hopp/Woods способ, Hopp et al, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci USA 78:3824-3828; для определения профилей антигенности, и методика Kyte-Doolittle, Kyte et al, (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132; для графиков гидропатии.

Составы

- [0041] Составы по настоящему изобретению содержат 10-160 мг/мл, *например*, 10-100 мг/мл, *например*, 10-80 мг/мл антитела к CD47; и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, содержащие буфер, в концентрации 5-20 мМ; стабилизатор и поверхностно-активное вещество, при этом указанный состав имеет рН от около рН 4-6,5.
- [0042] Термины «фармацевтически приемлемый», «физиологически переносимый» и их грамматические вариации, поскольку они относятся к композициям, носителям, разбавителям и реагентам, применяются взаимозаменяемо и означают, что материалы можно вводить человеку возникновения нежелательных физиологических эффектов в такой степени, которая препятствует введению композиции.
- [0043] «Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» означает вспомогательное вещество, которое пригодно для получения фармацевтической композиции, которая обычно является безопасной, нетоксичной и желательной, и включает вспомогательные вещества, которые являются приемлемыми для ветеринарного применения, а также для фармацевтического применения у человека. Такие вспомогательные вещества могут быть твердыми, жидкими, полутвердыми или, в случае аэрозольной композиции, газообразными. Различные фармацевтически приемлемые разбавители, носители и вспомогательные вещества, а также способы приготовления и применения фармацевтических композиций будут известны специалистам в данной области техники в свете настоящего изобретения. Иллюстративные фармацевтические композиции и фармацевтически приемлемые разбавители, носители и вспомогательные вещества также описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (Lippincott, Williams & Wilkins 2003); Loyd V. Allen Jr (Editor), «Remington: The Science and Practice of Pharmacy,» 22nd Edition, 2012, Pharmaceutical Press; Brunton, Knollman and Hilal-Dandan, «Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,» 13th Edition, 2017, McGraw-Hill Education / Medical; McNally and Hastedt (Editors), «Protein Formulation and Delivery, 2nd Edition, 2007, CRC Press; Banga, «Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems,» 3rd Edition, 2015, CRC Press; Lars Hovgaard, Frokjaer and van de Weert (Editors), «Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins,» 2nd Edition, 2012, CRC Press; Carpenter and Manning (Editors), «Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice,» 2002, Springer (Pharmaceutical Biotechnology (Book 13)); Meyer (Editor), «Therapeutic Protein Drug Products: Practical Approaches to Formulation in the Laboratory, Manufacturing, and the Clinic,

2012, Woodhead Publishing; и Shire, «Monoclonal Antibodies: Meeting the Challenges in Manufacturing, Formulation, Delivery and Stability of Final Drug Product, 2015, Woodhead Publishing.

[0044] Фармацевтические композиции, включающие антитело, как описано в данном документе, для парентерального введения готовят в форме стандартной дозы для инъекций (*например*, раствор, суспензия, эмульсия) в сочетании с фармацевтически приемлемым парентеральным носителем, и при этом они могут быть стерильными, по существу изотоническими (250-350 мОсм/кг воды) и изготовлены в соответствии с требованиями GMP. Фармацевтические композиции могут быть представлены в виде стандартной дозы (т. е. доза для однократного введения). Фармацевтические композиции могут быть составлены с применением одного или большего количества фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ или дополнительных веществ. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекции, антитела могут быть приготовлены в виде водных растворов, например, в физиологически совместимых буферах, таких как фосфатно-солевой буфер, аминокислотные буферы (*например*, заряженные аминокислоты, включая без ограничения гистидин, аспаргат, глутамат, аспарагин, глутамин, лизин, аргинин), трис-буфер, раствор Хенкса, раствор Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека или ацетатный буфер (для уменьшения дискомфорта в месте инъекции), а также дополнительных буферах, перечисленных в данном документе. Раствор может содержать составные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В альтернативном варианте антитела могут быть в лиофилизированной форме для растворения с подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой, перед применением. Состав и способы доставки фармацевтических композиций, как правило, будут адаптированы в соответствии с местом и заболеванием, которое необходимо лечить. Типовые составы включают, помимо прочего, те, которые подходят для парентерального введения, например, внутривенного или подкожного введения.

[0045] «Фармацевтически приемлемые соли и сложные эфиры» означают соли и сложные эфиры, которые являются фармацевтически приемлемыми и имеют требуемые фармакологические свойства. Такие соли включают соли, которые могут образовываться, когда кислые протоны, присутствующие в соединениях, способны реагировать с неорганическими или органическими основаниями. Подходящие неорганические соли включают те, которые образованы с щелочными металлами, например натрий и калий, магний, кальций и алюминий. Подходящие органические соли включают соли, образованные с органическими основаниями, такими как аминовые основания, например, этаноламин, диэтиламин, триэтиламин, триметамин, N-метилглюкамин и т.п. Такие соли также включают кислотно-аддитивные соли, образованные неорганическими кислотами (*например*, хлористоводородной и бромистоводородной кислотами) и органическими кислотами (*например*, уксусной кислотой, лимонной кислотой, малиновой кислотой и алкан- и аренсульфокислотами, такими как метансульфокислота и бензолсульфокислота). Фармацевтически приемлемые сложные эфиры включают сложные эфиры, образованные карбоксильными, сульфилокси- и фосфоноксигруппами, присутствующими в соединениях, *например*, C₁₋₆ алкиловые эфиры. При наличии двух

присутствующих кислотных групп фармацевтически приемлемая соль или сложный эфир может представлять собой монокислотную моносоль или сложный эфир или дисоль или эфир, и аналогичным образом, когда присутствует более двух кислотных групп, некоторые или все такие группы могут быть преобразованы в соль или этерифицированы. Соединения, названные в данном изобретении, могут присутствовать в несолевой или неэтерифицированной форме, или в солевой и/или этерифицированной форме, и предполагается, что названия таких соединений включают как исходное (несолевое и неэтерифицированное) соединение, так и его фармацевтически приемлемые соли и сложные эфиры. Кроме того, некоторые соединения, названные в данном документе, могут присутствовать более чем в одной стереоизомерной форме, и названия таких соединений предназначены для включения всех отдельных стереоизомеров и всех смесей (будь то рацемических или иных) таких стереоизомеров. Используемый в настоящем документе термин «буфер» относится к забуференному раствору, который противостоит изменениям pH за счет действия его компонентов кислотно-щелочного конъюгата. Буферы, пригодные для фармацевтических составов, в частности составов для парентерального введения, могут применяться в настоящей композиции и включают без ограничений: ацетатные буферы, например, уксусная кислота/ацетат натрия, гистидин; фосфат, цитрат, лактат; аспарат; сукцинат; малат; фумарат; глюконат; глутамат. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный буфер представляет собой ацетатный буфер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный буфер представляет собой гистидиновый буфер.

[0046] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный буфер в составе находится в концентрации от 5 до 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный буфер в составе находится в концентрации от 7,5 до 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный буфер в составе находится в концентрации от 10 до 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный буфер в составе представляет собой ацетатный буфер или гистидиновый буфер.

[0047] В водном составе концентрация буфера может составлять около 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 11 мМ, 12 мМ, 13 мМ, 14 мМ, 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ, 20 мМ. В определенных вариантах осуществления данного изобретения концентрация составляет от 8 до 12 мМ, например, 10 мМ. Такие водные составы могут быть лиофилизированы, если это целесообразно или желательно.

[0048] pH буферного состава может составлять от pH 4 до pH 6,5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH составляет от pH 4,5 до 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH составляет от 4,7 до 5,3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH составляет от pH 4,75 до pH 5,25. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH составляет от pH 4,9 до pH 5,1.

[0049] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH состава составляет около pH 4,5, pH 4,6, pH 4,7, pH 4,8, pH 4,9, pH 5, pH 5,1, pH 5,2, pH 5,3, pH 5,4, pH 5,5. В определенных вариантах осуществления данного изобретения pH составляет от 4,9 до 5,1, например, pH 5.

- [0050] Стабилизаторы, криопротекторы и/или лиопротекторы включены для улучшения стабильности антитела в условиях хранения, переноса и применения. Подходящие стабилизаторы включают без ограничения углеводы, аминокислоты, соразтворители, антиоксиданты, хелаторы, соли, модификаторы тоничности, модификаторы ионной силы.
- [0051] Состав может содержать любую желаемую свободную аминокислоту, которая может быть в L-форме, D-форме или любой желаемой смеси этих форм. В одном аспекте свободные аминокислоты, которые могут быть включены в состав, включают, например, гистидин, аланин, аргинин, глицин, глутаминовую кислоту, серин, лизин, триптофан, валин, цистеин, метионин и их комбинации. Некоторые аминокислоты могут стабилизировать белки в отношении деградации во время изготовления, сушки, лиофилизации и/или хранения, например, посредством водородных связей, солевых мостиков, антиоксидантных свойств или гидрофобных взаимодействий или путем исключения из поверхности белка. Аминокислоты могут действовать как модификаторы тоничности или могут действовать для снижения вязкости состава. В другом аспекте свободные аминокислоты, такие как гистидин, глицин и аргинин, могут действовать как лиопротекторы и не кристаллизуются при лиофилизации в качестве компонентов состава. Свободные аминокислоты, такие как глутаминовая кислота и гистидин, отдельно или в комбинации, могут действовать в качестве буферных агентов в водном растворе в диапазоне pH от 5 до 7,5.
- [0052] Термин «сахарид» в данном документе представляет собой соединение, которое имеет общую формулу (C_nH_{2n}O_n), и его производные, включая моносахариды, дисахариды, трисахариды, полисахариды, сахарные спирты, восстанавливающие сахара, невосстанавливающие сахара и т.п. Примеры сахаридов в данном документе включают глюкозу, сахарозу, трегалозу, лактозу, фруктозу, мальтозу, декстран, эритрит, глицерин, арабитозилитозорбит, маннит, мелибозу, мелезитозу, рафмозу, маннотриозу, стахиозу, мальтозу, лакулозу, мальтулозу, глюцил, мальтит, лактит, изо-мальтулозу, сорбит и т. п. Сахарид может представлять собой лиопротектор. В одном аспекте сахарид, который не кристаллизуется, представляет собой лиопротектор, такой как сахароза или трегалоза. В другом аспекте сахарид в данном документе представляет собой невосстанавливающий дисахарид, такой как сахароза, трегалоза или сорбит.
- [0053] Термин «хелатор» относится к агенту, который связывается с атомом через более чем одну связь. В одном аспекте примеры хелаторов в данном документе включают цитрат, EDTA, EGTA, димеркапрол, диэтилентриаминепентауксусную кислоту и N,N-бис(карбоксиметил)глицин. В другом аспекте хелатор представляет собой цитрат или EDTA.
- [0054] Термин «антиоксидант» относится к агенту, который ингибирует окисление других молекул. Примеры антиоксидантов в данном документе включают цитрат, липоиновую кислоту, уриновую кислоту, глутатион, токоферол, каротин, ликопин, цистеин, фосфонатные соединения, например, этидроновую кислоту, дезфероксамин и малат.

[0055] Конкретные стабилизаторы, представляющие интерес для составов согласно настоящему изобретению, могут включать один или большее количество из следующих агентов: сорбит, например, в концентрации от около 2% до около 12%, например, в концентрации от около 2,5% до около 10%; сахарозу, например, в концентрации от около 2% до около 12%, например, в концентрации от около 2,5% до около 10%; трегалозу, например, в концентрации от около 2% до около 12%, например, в концентрации от около 2,5% до около 10%; NaCl в концентрации около 100-200 мМ; аргинин в концентрации от около 15 мМ до 75 мМ; или их комбинацию, например аргинин и сорбит, аргинин и сахарозу, аргинин и трегалозу, сахарозу и сорбит и т. п.

[0056] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения стабилизатор представляет собой сорбит в концентрации около 2,5% мас./об., 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%. В определенных вариантах осуществления данного изобретения стабилизатор представляет собой сорбит в концентрации около 5% мас./об. в водном буфере.

[0057] Термин «поверхностно-активное вещество» относится к поверхностно-активному веществу. Поверхностно-активные вещества включены в состав, в первую очередь для уменьшения взаимодействия белка на границах раздела «твердое тело/жидкость», на границах раздела «жидкость/воздух» и на границах раздела «белок/белок». Поверхностно-активное вещество уменьшает образование частиц за счет уменьшения адсорбции белка на поверхностях, а также агрегации из-за стрессов от перемешивания, замораживания/оттаивания и сдвига. Кроме того, поверхностно-активное вещество может усиливать растворимость белка. Обычно категории поверхностно-активных веществ являются анионными, например, линейный алкилбензолсульфонат натрия (LABS); лаурилсульфат; сульфаты лаурилового эфира натрия; петролейные сульфонаты; линосульфонаты; нафталинсульфонаты, разветвленные алкилбензолсульфонаты; линейные алкилбензолсульфонаты; спиртовые сульфаты; катионные соединения, например, хлорид стеаралкония; бензалкония хлорид; четвертичные аммониевые соединения; аминокислоты, неионогенные соединения, например, додецилдиметиламинооксида; этоксилаты кокодиэтаноламидных спиртов; линейный первичный спиртовый полиэтоксилат; алкилфенольные этоксилаты; этоксилаты спирта; блок-полимеры полиола EO/PO; эфиры полиэтиленгликоля; алканоламиды жирных кислот; амфотерные соединения: кокамфокарбоксихлицилат; кокамидопропилбетаин; бетаины; имидазолины.

[0058] В дополнение к перечисленным выше, подходящие неионные поверхностно-активные вещества включают алканоламиды, оксиды амина, блок-полимеры, этоксилированные первичные и вторичные спирты, этоксилированные алкилфенолы, этоксилированные жирные эфиры, производные сорбитана, сложные эфиры глицерина, пропоксилированные и этоксилированные жирные кислоты, спирты и алкилфенолы, сложные полимерные полисахариды, сульфаты и сульфонаты этоксилированных алкилфенолов и полимерные поверхностно-активные вещества. Подходящие анионные поверхностно-активные вещества включают этоксилированные амины и/или амиды, сульфосукцинаты и производные, сульфаты этоксилированных спиртов, сульфаты спиртов,

сульфонатов и производных сульфоновой кислоты, сложные фосфатные эфиры и полимерные поверхностно-активные вещества

[0059] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поверхностно-активное вещество композиции представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80 или плуроник F68. В определенных вариантах осуществления данного изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20.

[0060] Идеальная концентрация поверхностно-активного вещества должна быть выбрана по меньшей мере такая, которая полностью насыщает гидрофобные поверхности белка, хотя не полностью насыщающая концентрация также может давать преимущества. Например, для оценки взаимодействия поверхностно-активного вещества с антителом, можно применять поверхностную тензиометрию, чтобы определить концентрацию, при которой поверхностно-активное вещество полностью адсорбируется на поверхности белка. Количество поверхностно-активного вещества будет увеличиваться с увеличением концентрации белка из-за увеличения площади поверхности белка в составе. Таким образом, концентрация поверхностно-активного вещества может быть увеличена с увеличением концентрации белка.

[0061] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация поверхностно-активного вещества составляет от около 0,002% до около 0,02% в жидком составе с 20-25 мг/мл антитела; и может составлять от около 0,0075% до около 0,015%. от около 0,008% до около 0,012%. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация поверхностно-активного вещества составляет около 0,004%, 0,006%, 0,01%, 0,011%, 0,012%, 0,013%, 0,014%, 0,015%.

[0062] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация поверхностно-активного вещества находится в молярном отношении «поверхностно-активное вещество:белок» в диапазоне от около 0,2 до около 2 и может составлять от около 0,2, около 0,3, около 0,4, примерно 0,5, около 0,6, до около 2, до около 1,5, до около 1,2. Поверхностно-активное вещество в таких вариантах осуществления данного изобретения может представлять собой, например, полисорбат.

[0063] «Стабильный» состав представляет собой состав, который можно вводить пациентам после хранения. В аспектах данного изобретения состав по существу сохраняет свои физико-химические свойства, а также биологическую активность при хранении. Различные аналитические методики измерения стабильности белка доступны в данной области техники и рассмотрены в публикациях Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993), например.

[0064] Стабильность может быть оценена качественно и/или количественно различными способами, включая оценку образования растворимых агрегатов (например, с помощью эксклюзионной хроматографии путем измерения мутности) и образования видимых частиц путем визуального осмотра); путем оценки неоднородности заряда с помощью ионообменной хроматографии (ИЕС) или изоэлектрического фокусирования капилляров с визуализацией (icIEF), эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC), анализа CE-SDS или SDS-PAGE для сравнения восстановленного и интактного антитела,

образования субвидимых частиц с помощью затемнения света, визуализации микропотоков или микроскопии; оценки биологической активности или антигенсвязывающей функции антитела; и т. д. Нестабильность может включать любой из следующих факторов: агрегацию, дезамидирование (например, дезамидирование Asp), окисление (например, окисление Met), изомеризацию (например, изомеризацию Asp), клиппирование/гидролиз/фрагментацию (например, фрагментацию шарнирной области), образование сукцинимида, неспаренный цистеин (цистеины), удлинение N-конца, процессинг C-конца, различия в гликозилировании и т. д.

[0065] Используемый в настоящем документе термин «биологическая активность» моноклонального антитела относится к способности антитела связываться с антигеном. Кроме того, указанный термин может включать связывание антитела с антигеном, приводящее к измеримому биологическому ответу, который можно измерить *in vitro* или *in vivo*.

[0066] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения стабильный фармацевтический состав является стабильным при температуре от около 2 °C до около 8 °C в течение по меньшей мере около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или более недель и до 3 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев или более. В определенных вариантах осуществления данного изобретения стабильный фармацевтический состав является стабильным при температуре от около 2 °C до около 8 °C в течение по меньшей мере около 1, 2, 4, 6, 8, 12 или более месяцев. В определенных вариантах осуществления данного изобретения стабильный фармацевтический состав является стабильным при температуре от около 2 °C до около 8 °C в течение по меньшей мере около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более месяцев.

[0067] В дополнительном варианте осуществления данного изобретения антитело к CD47 в составе сохраняет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% своей биологической активности после хранения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологическая активность измеряется связыванием антитела с CD47. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологическая активность измеряется связыванием антитела с CD47 в анализе связывания CD47 FACS. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологическая активность измеряется с помощью активности ADCP указанного антитела к CD47.

[0068] В другом аспекте настоящего изобретения документе предлагается изделие, содержащее контейнер, содержащий стабильный фармацевтический состав, как описано в данном документе. В варианте осуществления данного изобретения указанный контейнер представляет собой стеклянный флакон, *например*, стеклянный флакон типа 1, полимерный флакон (*например*, циклический олефиновый полимер, циклический олефиновый сополимер, полиэтилен высокой плотности (HDPE), поликарбонат, полиэтилентерефталатгликоль (PETG)), полимерный пакет или мешок (*например*, полиэтилен низкой плотности (LDPE), этилвинилацетат (EVA)), или контейнер из металлического сплава.

[0069] Термин «единица дозы» относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для конкретного индивидуума, подлежащего лечению. Каждая единица дозы может содержать предварительно определенное количество активного(-ых) соединения(-й), рассчитанное(-ых) для получения требуемого терапевтического(-их) эффекта(-ов) в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных форм единицы дозы может быть продиктована (а) уникальными характеристиками активного(-ых) соединения(-й) и конкретным терапевтическим(-и) эффектом(-ами), которые должны быть достигнуты, и (b) ограничениями, присущими технологии составления такого(-их) активного(-ых) соединения(-й).

[0070] Единица дозы настоящего состава может составлять 1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл, 15 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл в концентрации от около 10 до около 160 мг/мл, в концентрации от около 10 до около 100 мг/мл, в концентрации от около 10 до около 80 мг/мл, в концентрации от около 15 до около 50 мг/мл, в концентрации от около 10 до около 25 мг/мл, в концентрации от около 15 до около 20 мг/мл, и может быть в концентрации около 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения единица дозы составляет 10 мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения единица дозы составляет 20 мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения единица дозы составляет 30 мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения единица дозы составляет 40 мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения единица дозы составляет 50 мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения единица дозы составляет 60 мл.

[0071] «Терапевтически эффективная доза» или «терапевтическая доза» представляет собой количество, достаточное для достижения желаемых клинических результатов (т. е. достижения терапевтической эффективности) и может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более единиц дозы данного состава. Для целей настоящего изобретения терапевтически эффективная доза к CD47 агента представляет собой количество, достаточное для облегчения, ослабления, стабилизации, реверсии, предотвращения, замедления или задержки прогрессирования патологического состояния путем повышения уровня фагоцитоза целевой клетки (например, клетки-мишени); например, для уменьшения количества опухолевых клеток в крови, костном мозге и т. д. Таким образом, терапевтически эффективная доза анти-CD47-агента снижает связывание CD47 на клетке-мишени, с SIRP α на фагоцитирующей клетке, в дозе, эффективной для усиления фагоцитоза клетки-мишени.

[0072] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело к CD47 в описанном составе представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело к CD47 в описанном составе представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело к CD47 в описанном составе представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело к CD47 в описанном составе представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых

вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело содержит константную цепь IgG4 человека.

[0073] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело к CD47 содержит участок HCDR1, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 1), участок HCDR2, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 2), участок HCDR3, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 3), участок LCDR1, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 4), участок LCDR2, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 5), и участок LCDR3, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такое антитело содержит последовательность константной области IgG4 человека. SEQ ID NO:7, 8 и 9 представляют типовые последовательности переменной области тяжелой цепи; и SEQ ID NO: 10, 11, 12 представляют типовые последовательности переменной области легкой цепи.

[0074] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело представляет собой маглолимаб и содержит последовательность переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:8 и последовательность переменной области легкой цепи SEQ ID NO:11 с константной областью тяжелой цепи IgG4. Необязательно константная область IgG4 имеет аминокислотную модификацию для стабилизации шарнирной области, например, аминокислотную замену S228P.

Способы применения

[0075] Композиции можно вводить с целью терапевтического лечения. Композиции вводят пациенту в количестве, достаточном для существенного усиления фагоцитоза клеток-мишеней. Количество, достаточное для достижения этого, определяется как «терапевтически эффективная доза», которая может обеспечить улучшение показателей общей выживаемости. Однократное или многократное введение композиций может осуществляться в зависимости от дозировки и частоты, необходимых и переносимых пациентом. Конкретная доза, необходимая для лечения, будет зависеть от состояния здоровья и анамнеза млекопитающего, а также от других факторов, таких как возраст, вес, пол, способ введения, клиническая эффективность и т. д.

[0076] Составы, описанные в настоящем документе, находят применение, например, при лечении или снижении интенсивности рака, уменьшении инфекционного процесса по схеме, включающей приведение клеток-мишеней в контакт с эффективной дозой состава, который блокирует активность CD47; и т.д. Эффективные дозы агента по настоящему изобретению для лечения рака варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая способ введения, участок-мишень, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, другие вводимые лекарства и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациент представляет собой человека, но также можно лечить и млекопитающих, не относящихся к человеку, например, животных-компаньонов, таких как собаки, кошки, лошади, и т. д. лабораторных млекопитающих, такие как кролики, мышей, крыс, и т. д. и т. п. Дозы лечения можно титровать для оптимизации безопасности и эффективности.

- [0077] Термин «пациент» включает как людей, так и других животных, в частности млекопитающих, включая домашних животных и лабораторных животных, например, мышей, крыс, кроликов, и т. д. Таким образом, описанные способы применимы как к лечению человека, так и в области ветеринарии. В одном варианте осуществления пациент представляет собой млекопитающее, предпочтительно примата. В других вариантах осуществления пациент представляет собой человека.
- [0078] Термины «рак», «злокачественное новообразование» и «опухоль» применяются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения клеток, которые проявляют автономный, нерегулируемый рост, проявляя аберрантный фенотип роста, характеризующийся значительной потерей контроля в отношении пролиферации клеток. Клетки, представляющие интерес для обнаружения, анализа или лечения в настоящей заявке, включают предраковые (например, доброкачественные), злокачественные, преметастатические, метастатические и неметастатические клетки. Известны формы рака практически каждой ткани. Фраза «раковая нагрузка» относится к количеству раковых клеток или объему рака у субъекта. Соответственно, снижение раковой нагрузки относится к уменьшению количества раковых клеток или объема рака у субъекта. Используемый в настоящем документе термин «раковая клетка» относится к любой клетке, которая представляет собой раковую клетку или получена из раковой клетки, например клон раковой клетки.
- [0079] К «патологиям» рака относятся все явления, которые ставят под угрозу самочувствие пациента. Это включает, помимо прочего, аномальный или неконтролируемый рост клеток, метастазирование, нарушение нормального функционирования соседних клеток, высвобождение цитокинов или других секреторных продуктов на аномальных уровнях, подавление или обострение воспалительного или иммунологического ответа, неоплазию, предраковое состояние, злокачественное новообразование, инвазию в окружающие или отдаленные ткани или органы, такие как лимфатические узлы и *т. д.*
- [0080] Используемые в настоящем документе термины «рецидив рака» и «рецидив опухоли» и их грамматические варианты относятся к дальнейшему росту неопластических или раковых клеток после диагностики рака. В частности, рецидивы могут возникать при возникновении дополнительного роста раковых клеток в раковой ткани. «Распространение опухоли» также имеет место, когда клетки опухоли диссеминируют в местные или отдаленные ткани и органы; следовательно, распространение опухоли включает метастазы опухоли. «Опухолевая инвазия» происходит, когда рост опухоли распространяется локально, нарушая функцию пораженных тканей путем сжатия, разрушения или предотвращения нормальной функции органа.
- [0081] Используемый в настоящем документе термин «метастаз» относится к росту раковой опухоли в органе или части тела, который не связан напрямую с органом исходной раковой опухоли. Под метастазами следует понимать микрометастазы, которые представляют собой присутствие неопределяемого количества раковых клеток в органе или части тела, которые не связаны непосредственно с органом исходной раковой опухоли. Метастаз также может быть определен как несколько стадий процесса, таких как уход раковых клеток из первоначального очага опухоли и миграция и/или инвазия раковых клеток в другие части тела.

- [0082] Термин «диагностика» используется в настоящем документе для обозначения идентификации молекулярного или патологического состояния, заболевания или состояния, такого как идентификация молекулярного субтипа рака молочной железы, рака предстательной железы или рака другого типа.
- [0083] Термин «прогноз» используется в настоящем документе для обозначения прогноза вероятности гибели или прогрессирования рака, включая рецидив, метастатическое распространение и лекарственную резистентность неопластического заболевания, такого как рак яичников. Используемый в настоящем документе термин «прогнозирование» относится к действию облучения или оценки на основании наблюдения, опыта или научных суждений. В одном примере врач может прогнозировать вероятность выживания пациента после хирургического удаления первичной опухоли и/или химиотерапии в течение определенного периода времени без рецидива рака.
- [0084] В одном варианте осуществления данного изобретения рак представляет собой гематологический рак или миелодиспластический синдром, например, неходжкинская лимфома, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, миелодиспластический синдром; множественная миелома и т. п. В вариантах осуществления данного изобретения неходжкинскую лимфому выбирают из группы, состоящей из фолликулярной лимфомы, малой лимфоцитарной лимфомы, лимфомы лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой, лимфомы маргинальной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы из клеток Беркитта и мантийноклеточной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения лечат MDS. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения лечат AML. В других вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой карциному, саркому, миелому, глиому и т. д.
- [0085] Используемые в настоящем документе термины «терапия», «лечение» и т. п. относятся к введению агента или осуществлению процедуры в целях получения эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения осуществления частичного или полного излечения заболевания и/или симптомов заболевания. Используемый в настоящем документе термин «лечение» может включать лечение опухоли у млекопитающего, в частности у человека, и включает в себя: (а) предотвращение возникновения заболевания или симптома заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще не определен как имеющий это заболевание (например, включая заболевания, которые могут быть ассоциированы с первичным заболеванием или вызваны им; (b) ингибирование заболевания, *т. е.* прекращение его развития; и (с) облегчение заболевания, *т. е.*, индуцирование регрессии заболевания.
- [0086] Лечение может относиться к любым показателям успешной терапии или улучшения состояния или профилактики рака, включая любые объективные или субъективные параметры, такие как снижение заболеваемости; ремиссия; уменьшение симптомов или обеспечение состояния заболевания более переносимым для пациента; замедление скорости ухудшения или прогрессирования заболевания; или получения менее ослабляющей конечной точки ухудшения. Терапия или облегчение симптомов

может быть основано на объективных или субъективных параметрах; включая результаты осмотра врачом. Соответственно, термин «лечение» включает введение соединений или агентов по настоящему изобретению для предотвращения или задержки, облегчения или остановки, или ингибирования развития симптомов или патологических состояний, связанных с раком или другими заболеваниями. Термин «терапевтический эффект» относится к уменьшению, устранению или профилактике заболевания, симптомам заболевания или побочным эффектам заболевания у субъекта.

[0087] Термины «в комбинации с», «комбинированная терапия» и «комбинированный лекарственный препарат» в определенных вариантах осуществления данного изобретения относятся к одновременному введению пациенту первого терапевтического средства и соединений, описанных в настоящем документе. При введении в комбинации каждый компонент можно вводить одновременно или последовательно в любом порядке в разные моменты времени. Таким образом, каждый компонент можно вводить отдельно, но достаточно близко по времени, чтобы обеспечить требуемый терапевтический эффект.

[0088] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения терапевтическая доза состава антитела к CD47 может находиться в диапазоне от около 1 до 100 мг/кг, например, от около 10 до 90 мг/кг, например, от около 10 до 60 мг/кг и чаще всего от 10 до 50 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять около 20, 30, 40, 45, 50, 60 мг/кг массы тела или находиться в диапазоне 20-60, 20-50 или 30-60 мг/кг. Типовая схема лечения предусматривает введение один раз каждые 3 дня, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или один раз в месяц, один раз каждые 6 недель или один раз каждые 3-6 месяцев. Терапевтические средства по настоящему изобретению обычно вводят многократно. Интервалы между однократными дозами могут составлять день, неделю, месяц или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровня терапевтического средства в крови пациента. Дозировка и частота варьируются в зависимости от периода полужизни полипептида у пациента.

[0089] Токсичность может быть определена стандартными фармацевтическими процедурами в культурах клеток или экспериментальных животных, *например*, путем определения LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции) или LD₁₀₀ (доза, летальная для 100% популяции). Соотношение дозы между токсическим и терапевтическим эффектом представляет собой терапевтический индекс. Данные, полученные из этих анализов клеточной культуры и исследований на животных, можно применять для составления диапазона дозировок, который не является токсичным для применения у человека. Дозировка белков, описанных в настоящем документе, предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают эффективную дозу с малой токсичностью или без токсичности. Доза может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от применяемой лекарственной формы и применяемого пути введения. Точный состав, способ введения и дозировка могут быть выбраны врачом в зависимости от состояния пациента.

[0090] Также в объем настоящего изобретения входят наборы, содержащие составы по настоящему изобретению и инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать вспомогательное

средство для жидкостной экстракции; по меньшей мере один дополнительный реагент, т.е. химиотерапевтический препарат, ESA и т. д. Наборы обычно включают этикетку, указывающую на предполагаемое применение содержимого набора. Термин «этикетка» включает в себя любой письменный или записанный материал, поставляемый вместе с набором или иным образом сопровождающий набор.

ПРИМЕРЫ

[0091] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полную характеристику и описание того, как создать и применять настоящее изобретение, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением, или предназначены ли они для представления того, что приведенные ниже эксперименты являются всеми или единственными проведенными экспериментами. Были приняты меры для того, чтобы сохранить точность в отношении используемых чисел (например, количеств, значений температуры и т. д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1

Составы, испытанные на стабильность гуманизованного антитела 5F9-G4 (маглолимаб).

[0092] Первоначально исследовали стабильность Nu5F9-g4 при различных условиях состава, включая pH, модификатор тоничности и поверхностно-активное вещество. Это исследование проводили с помощью слабой катионообменной HPLC (WCX-HPLC), эксклюзионной HPLC (SE-HPLC) и электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), которые являются эффективными анализами, указывающими на стабильность продукта.

[0093] Продукт становится мутным при воздействии такого стрессового условия, как перемешивание. Таким образом, полисорбат 20 в качестве поверхностно-активного вещества добавляли к составам Nu5F5-g4 для стабилизации продукта во время действия стрессового условия. Дополнительные исследования в условиях острого стресса показали, что продукт не восприимчив к последовательным циклам замораживания/оттаивания, перемешиванию и воздействию ультрафиолетового света широкого спектра (УФ-света).

[0094] Стабильность Nu5F9-g4 в различных составах исследовали в статических условиях хранения при замораживании (-70 °C), охлаждении (5 °C) и повышенных температурах (например, 25 C и 37 °C) в течение до 8 недель. Большинство составов оставались прозрачными и не содержали частиц во время хранения при разных температурах. Однако в присутствии ионного модификатора тоничности (хлорида натрия) при pH 4,0, Nu5F9-g4 становился мутным и демонстрировал значительную химическую и физическую деградацию уже через 1 неделю при 37 °C. Анализ WCX-HPLC выявил химическую нестабильность при хранении при повышенной температуре для продукта,

- приготовленного при pH 7 ± 1 и в отсутствие ионного модификатора тоничности, особенно при pH 6,0 и 6,5. Физическую стабильность Nu5F9-g4 оценивали с помощью SE-HPLC и SDS-PAGE. Эти исследования выявили повышенные уровни олигомерных или HMW видов во время хранения при повышенной температуре для продукта, приготовленного с неионогенным модификатором тоничности и в фосфатном буфере, особенно при более высоком pH. Напротив, анализ SE-HPLC показал большее количество HMW видов в присутствии ионного модификатора тоничности при хранении при температуре -70 °C.
- [0095] Состав при pH 5,0 с 10 mM ацетатным буфером, неионогенным модификатором тоничности (5% сорбита) и полисорбатом 20 (0,01%) был выбран в качестве наилучшего состава-кандидата в этом исследовании. Этот состав продемонстрировал как химическую, так и физическую стабильность во время стресса.
- [0096] Результаты стабильности выбранного состава A5S обобщены следующим образом. Большинство образцов в данном исследовании оставались прозрачными и без частиц после действия следующих стрессовых условий: замораживание/оттаивание, перемешивание, воздействие УФ-излучения и температуры. Таким образом, видимой физической деградации состава-кандидата A5S не наблюдалось. Концентрация выбранного состава-кандидата оставалась на заданном уровне в течение 8 недель при температуре хранения -70 °C, 5 °C, 25 °C и 37 °C.
- [0097] После 8 недель хранения при разных температурах некоторые составы Nu5F9-g4 продемонстрировали значение pH, немного превышающее целевое значение во время исследования стабильности. Тем не менее, результаты pH для выбранного кандидата во время хранения при разных температурах не отклонялись более чем на $\pm 0,2$ единицы pH от $T=0$. Значения осмоляльности для составов-кандидатов были почти изотоническими. Образцы, приготовленные с сорбитом, несколько более гипертонические, чем образцы, содержащие NaCl. Осмоляльность выбранного состава-кандидата (A5S) составляла 314 мОсм.
- [0098] Каждый из 13 протестированных составов демонстрировал сопоставимые данные WCX-HPLC после воздействия такого стрессового условия, как УФ-излучение. Во время действия этого стрессового условия не наблюдалось существенной деградации выбранного состава-кандидата.
- [0099] По сравнению с другими составами процент чистоты для A5S оставался относительно высоким в течение 8 недель хранения при -70 °C, 5 °C, 25 °C и 37 °C.
- [00100] Анализ SE-HPLC показал аналогичные результаты чистоты для каждого образца после перемешивания, замораживания/оттаивания и воздействия УФ-света. Таким образом, выбранный состав-кандидат не проявлял значительной олигомеризации или расщепления после этих острых стрессовых воздействий.
- [00101] Исследование SDS-PAGE не продемонстрировало существенной деградации выбранного кандидата во время хранения при -70 °C, 5 °C, 25 °C и 37 °C. Результаты SDS-PAGE для образцов, хранившихся как при 25 °C, так и при 37 °C в течение 8 недель, демонстрируют, что HMW виды были обнаружены только для образцов, приготовленных при более высоком pH без NaCl.

Таблица 1

Компоненты исходного состава Hu5F9-g4

Ингредиент	Концентрация	Цель
Hu5F9-g4	10 мг/мл	Активный ингредиент
Ацетат	10 мМ	Буферный агент
Сорбит	5% (мас./об.)	Модификатор тоничности
Полисорбат 20 (PS20)	0,01% (мас./об.)	Поверхностно-активное вещество
К конечному pH 5,0		

Пример 2

Оценка конечного состава

[00102] Скрининг состава. Были изучены составы со следующими изменяющимися параметрами:

- a. pH: 4-8
- b. Буфер 10 мМ ацетата натрия, 10 мМ гистидина и 10 мМ фосфата натрия
- c. Стабилизатор 5% сорбит (неионный) и 150 мМ NaCl (ионный)

Оцененные составы представлены в Таблице 2.

Таблица 2.

Композиции оцененных составов

Состав №	ID образца	Буфер (10 мМ)	pH	Модификатор тоничности	[Hu5F9-g4] (мг/мл)	Поверхностно-активное вещество *
F1	A4N	10 мМ ацетата натрия	4,0	150 мМ NaCl	10	0,01% PS20
F2	A4S	10 мМ ацетата натрия	4,0	5% сорбит	10	0,01% PS20
F3	A5N	10 мМ ацетата натрия	5,0	150 мМ NaCl	10	0,01% PS20
F4	A5S	10 мМ ацетата натрия	5,0	5% сорбит	10	0,01% PS20
F5	P6N	10 мМ фосфата натрия	6,0	150 мМ NaCl	10	0,01% PS20
F6	P6S	10 мМ фосфата натрия	6,0	5% сорбит	10	0,01% PS20
F7	H6,5N	10мМ гистидина	6,5	150 мМ NaCl	10	0,01% PS20
F8	H6,5S	10мМ гистидина	6,5	5% сорбит	10	0,01% PS20
F9	P7N	10 мМ фосфата натрия	7,0	150 мМ NaCl	10	0,01% PS20
F10	P7S	10 мМ фосфата натрия	7,0	5% сорбит	10	0,01% PS20
F11	P8N	10 мМ фосфата натрия	8,0	150 мМ NaCl	10	0,01% PS20
F12	P8S	10 мМ фосфата натрия	8,0	5% сорбит	10	0,01% PS20
F13	Контроль	PBS	7,2	NaCl	10	-

*Выбранное поверхностно-активное вещество было основано на исследованиях перемешивания.

Составы оценивали в следующих стрессовых условиях:

- a. Термостабильность
- b. Замораживание/размораживание (5 циклов от -70 °С до комнатной температуры)
- c. Перемешивание в течение 4 часов
- d. Воздействие естественного освещения в течение 24 часов

[00103] Оценка поверхностно-активного вещества. К маглолимабу (hu5F9-g4) в концентрации 11 мг/мл в PBS при pH 6,5 добавляли 0,01% мас./об. полисорбата 20, 0,01% мас./об. полисорбата 80 и 0,10% F68 плуроника. Эти растворы перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре и оценивали на мутность по внешнему виду и поглощению при 600 нм (Таблица 2) и на образование агрегатов с помощью SE-HPLC (Таблица 3). Измерения мутности демонстрируют, что PS20 и F68 дают меньшую мутность, чем PS80. Однако в целом результаты внешнего вида показали, что все 3 испытанных поверхностно-активных вещества защищали маглолимаб от образования частиц. Для всех 3 протестированных поверхностно-активных веществ не было изменений в профиле качества SE-HPLC.

Таблица 3. Результаты мутности

Условие	Поверхностно-активное вещество	Наблюдения	A ₆₀₀
<i>Перемешивание при комнатной температуре в течение 4 часов</i>	нет	Мутный (центрифугированный)	0,1767
	0,01% PS20	Прозрачный раствор	0,0021
	0,01% PS80	Прозрачный раствор	0,0169
	0,10% F-68	Прозрачный раствор	0,016

Таблица 4. Результаты SE-HPLC

Условие	Поверхностно-активное вещество	До пика %	Мономер %	После пика %	Общая площадь (mAU)
<i>Перемешивание при комнатной температуре в течение 4 часов</i>	нет	2,5	97,5	0,0	28670
	0,01% PS20	2,5	97,4	0,1	28642
	0,01% PS80	2,5	97,4	0,1	28882
	0,10% F-68	2,5	97,4	0,1	28897
<i>Контроль без перемешивания</i>	нет (#1)	2,5	97,4	0,1	28982
	нет (#2)	2,6	97,3	0,1	28926

[00104] Поверхностную тензиометрию выполняли для оценки взаимодействия полисорбата 20 с составом, содержащим 20 мг/мл маглолимаба, 10 мМ ацетата, 5% мас./об. сорбита, при pH 5,0. Профиль поверхностного натяжения приведен на Фиг. 1. Полисорбат 20 начинает взаимодействовать с белком при около 0,01 мг/мл (0,001%). Белок в растворе полностью насыщен полисорбатом 20 в концентрации около 0,1-0,2 мг/мл (от 0,01% до 0,02%).

[00105] Состав 1, содержащий 10 мМ ацетата натрия, 150 мМ NaCl при pH 4,0, характеризовался быстрой деградацией. Этот состав не подвергался дальнейшей оценке ни в одном из исследований стрессовых условий.

[00106] Результаты исследований с замораживанием/оттаиванием, перемешиванием и воздействием естественного освещения приведены в Таблице ниже.

Таблица 5

Стрессовое условие	Аналитические методы	Результаты
Замораживание/ размораживание	Внешний вид SE-HPLC	Все составы от F2 до F13 были прозрачными и не содержали твердых частиц. Все составы имели приемлемые профили SE-HPLC после 5 циклов замораживания/оттаивания. Однако составы, содержащие NaCl, характеризовались несколько более выраженному образованию агрегатов.
Возбуждение	Внешний вид SE-HPLC	Все составы от F2 до F13 были прозрачными и свободными от частиц и не имели изменений в профиле SE-HPLC.
Воздействие естественного освещения	Внешний вид SE-HPLC WCX-HPLC SDS-PAGE (с восстановлением и без восстановления)	Все составы от F2 до F13 прозрачны, не содержат частиц и стабильны при воздействии естественного освещения без значительных изменений в профиле SE-HPLC и WCX-HPLC и результатов SDS-PAGE.

[00107] Термостабильность. Для исследования стабильности составы оставляли на 8 недель при -70 °С, 5 °С, 25 °С и 37 °С. Составы оценивали по концентрации белка, pH, внешнему виду, SE-HPLC, WCX-HPLC и SDS-PAGE с восстановлением и без восстановления.

[00108] Через 8 недель все составы, за исключением состава 1, были прозрачными и не содержали частиц при всех протестированных температурах. Состав 1 помутнел через 1 неделю при 37 °С и был исключен из исследования.

[00109] Концентрация белка оставалась неизменной после 8 недель, как показано в Таблице 6.

Таблица 6. Результаты концентрации белка

Состав №	ID образца	Результаты концентрации (мг/мл)				
		T=0	T=8 недель стресса			
			-70 °С	4 °С	25 °С	37 °С
F1*	A4N	9,8	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
F2	A4S	10,2	10,2	10,2	10,2	10,3
F3	A5N	9,8	10,0	10,2	10,2	10,2
F4	A5S	9,9	10,1	9,9	9,9	10,1
F5	P6N	9,9	10,4	10,3	10,3	10,3
F6	P6S	10,0	10,0	10,3	10,3	10,3

F7	H6,5N	10,1	10,4	10,5	10,5	10,5
F8	H6,5S	9,8	9,9	10,2	10,3	10,3
F9	P7N	10,0	10,2	10,3	10,3	10,3
F10	P7S	9,9	10,3	10,2	10,3	10,3
F11	P8N	10,0	10,0	10,2	10,2	9,9
F12	P8S	10,0	9,8	10,1	10,0	9,9
F13	Контроль	9,9	9,4	9,4	9,4	9,4

*Этот образец больше не анализировали после момента времени 1 неделя.

[00110] Значение pH измеряли в конце исследования. Как правило, значение pH было выше начального момента времени, но в пределах погрешности измерения.

Таблица 7. Результаты pH

Состав №	ID образца	Целевой pH	Результаты pH				
			T=0	T=8 недель стресса			
				-70 °C	4 °C	25 °C	37 °C
F1*	A4N	4,0	4,0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
F2	A4S	4,0	4,1	4,4	4,4	4,4	4,5
F3	A5N	5,0	5,0	5,2	5,2	5,3	5,3
F4	A5S	5,0	5,1	5,2	5,2	5,3	5,3
F5	P6N	6,0	5,9	6,2	6,3	6,3	6,3
F6	P6S	6,0	6,1	6,3	6,4	6,4	6,4
F7	H6,5N	6,5	6,5	6,6	7,2	7,9	6,5
F8	H6,5S	6,5	6,6	6,7	6,8	6,8	6,8
F9	P7N	7,0	7,0	7,3	7,3	7,3	7,2
F10	P7S	7,0	7,1	7,3	7,3	7,3	7,3
F11	P8N	8,0	7,9	7,8	7,8	7,8	7,9
F12	P8S	8,0	7,9	7,9	7,9	7,9	7,8
F13	Контроль	7,2	7,2	7,5	7,6	7,6	7,5

*Этот образец больше не анализировали после момента времени 1 неделя.

[00111] Были определены профили основного пика и пре-пика WCX-HPLC для всех составов при различных температурах хранения до 8 недель хранения, как показано на Фиг. 2 и 3. При температуре хранения -70 °C и 5 °C изменений до 8 недель не отмечалось. При температуре 25 °C и 37 °C составы с наименьшим снижением основного пика представляют собой составы с pH 5 и pH 6. При pH 4 состав с сорбитом более стабилен, чем состав с NaCl, тогда как при pH 6,5 состав с сорбитом менее стабилен, чем состав с NaCl. По мере уменьшения основного пика количество пре-пиковых/кислотных частиц увеличивается с аналогичными тенденциями стабильности в отношении pH и стабилизатора.

[00112] Профили мономера SE-HPLC и агрегатов/пре-пика всех составов при различных температурах хранения до 8 недель приведены на Фиг. 4 и Фиг. 5 соответственно. При температуре хранения 5 °C и 25 °C существенных изменений до 8 недель не отмечалось. При температуре -70 °C и при 37 °C наблюдалось уменьшение мономера при одновременном увеличении агрегатов. При -70 °C, составы с pH от 6 до 8, содержащие NaCl или PBS, приводили к более высокому образованию агрегатов. При

37°C, составы, содержащие фосфатный буфер и сорбит с pH 6-8, характеризовались более высокими скоростями образования агрегатов.

[00113] Результаты для пространства параметров стабильного состава обобщены в Таблице 8.

Таблица 8.

Пространство параметров вспомогательного вещества стабильного состава

Вспомогательное вещество состава	pH, стабильный диапазон	Оцененные атрибуты
NaCl	5,0-6,5	WCX-HPLC
	5,0	SE-HPLC (при -70°C, замороженный жидкий состав)
	5,0-8,0	SE-HPLC (при 37°C, жидкий состав)
Сорбит	4,0-6,0	WCX-HPLC
	4,0-6,5	SE-HPLC

[00114] Долгосрочная стабильность выбранного состава. На основании исследований разработки, для долгосрочного анализа был выбран следующий состав: маглолимаб 20 мг/мл, ацетат 10 мМ, сорбит 5% мас./об., полисорбат 20 0,01% при pH 5,0. Этот состав хранится в стеклянных флаконах типа 1 с бутиловыми пробками, покрытыми фторполимером, и является стабильным при 5°C в течение по меньшей мере 3 лет, как измерено с помощью SE-HPLC, icIEF, CE-SDS, с восстановлением и без восстановления, а также с помощью связывания, как подробно описано в таблице ниже.

Таблица 9. Стабильность 20 мг/мл маглолимаба, 10 мМ ацетата, 5% масс./об. сорбита, 0,01% полисорбата 20 при pH 5,0, хранящегося при 5 °C

Момент времени (месяцы)	Частицы	Концентрация белка (нг/мл)	icIEF %, кислотный	icIEF %, главный	icIEF %, основной	CE-SDS с восстановлением (HC + LC) %	CE-SDS без восстановления, главный (%)	SEC мономер (%)	SEC агрегаты (%)	Связывание (%)
0	FVP	21	37,9	56,3	5,8	98	97,4	98,6	1,3	84,9
1	FVP	21,2	38,0	55,8	6,2	97,8	97,1	98,4	1,5	88,9
3	FVP	20,4	37,1	56,1	6,8	97,6	97,7	98,6	1,3	81,1
6	FVP	20,7	37,1	56,2	6,8	98,1	97,2	98,6	1,3	95,9
9	FVP	20,6	38,6	55,1	6,3	98,3	97	98,6	1,3	100,1
12	FVP	21,4	37,6	56,5	5,9	98,5	97,2	98,6	1,4	109
24	FVP	20,8	37,3	55,6	7,7	98,4	97,2	98,5	1,4	97
36	FVP	20,8	38,5	54,5	7,1	98,2	97,3	98,50	1,5	102

FVP = не содержит видимых частиц

Пример 3

Измерение вязкости маглолимаба

[00115] Вязкость маглолимаба измеряли как функцию концентрации. Белок был сконцентрирован до концентрации более 120 мг/мл, все еще остававшейся в растворе, и был визуально прозрачным. Вязкость белка определяется низкой, достигая примерно 20 сП при 160 мг/мл. Результаты приведены на Фиг. 6.

Пример 4

Оценка мутности составов маглолимаба

[00116] Исследования со встряхиванием проводили с маглолимабом с различными концентрациями полисорбата 20. При отсутствии полисорбата 20 в составе раствор демонстрировал повышенную мутность и образование агрегатов, измеренных с помощью SEC-HPLC, и субвидимые частицы. При 0,005% и более высоких концентрациях полисорбата 20 не было никаких изменений в характеристиках качества состава. Этот результат хорошо коррелирует с данными поверхностной тензиометрии.

Концентрация полисорбата 20 (% мас./об.)	Мутность (NTU)	SEC-HPLC % HMW	Субвидимые частицы	
			Частицы \geq 10 мкм/мл	Частицы \geq 25 мкм/мл
0,0	30	8,3	690461	5632
0,005	6	1,8	118	0
0,010	6	1,6	171	0
0,015	6	1,6	91	0

Пример 5

Скрининг вспомогательных веществ с маглолимабом

[00117] С маглолимабом исследовали различные стабилизирующие вспомогательные вещества, а температуру плавления оценивали по собственной флуоресценции. Данные температуры и стабильности плавления, приведенные на Фиг. 7, указывают на то, что все тестируемые вспомогательные вещества стабилизируют маглолимаб. Значения температур плавления показали, что маглолимаб был наиболее стабилизирован в присутствии сахаридных вспомогательных веществ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

(ОТКОРРЕКТИРОВАННАЯ В ОТВЕТ НА ЗАПРОС ОТ 02.02.2023 Г., СООТВЕТСТВУЕТ МЕЖДУНАРОДНОЙ ПУБЛИКАЦИИ)

1. Фармацевтически стабильный водный состав, содержащий 10-100 мг/мл антитела к CD47; и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, содержащие буфер в концентрации 5-20 мМ; по меньшей мере один стабилизатор и поверхностно-активное вещество, при этом состав имеет рН от около рН 4 до 6,5.
2. Состав по п. 1, отличающийся тем, что буфер присутствует в концентрации от 10 до 15 мМ.
3. Состав по любому из пп. 1-2, отличающийся тем, что буфер в составе представляет собой ацетатный буфер или гистидиновый буфер.
4. Состав по п. 3, отличающийся тем, что буфер представляет собой ацетатный буфер.
5. Состав по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что рН составляет от рН 4 до рН 6,5.
6. Состав по п. 5, отличающийся тем, что рН составляет от рН 4,7 до рН 5,3.
7. Состав по п. 5, отличающийся тем, что рН составляет от рН 4,9 до рН 5,1.
8. Состав по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой сорбит в концентрации от 2,5% до 10%.
9. Состав по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой сахарозу в концентрации от 2,5% до 10%.
10. Состав по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой трегалозу в концентрации от 2% до 12%.
11. Состав по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой NaCl в концентрации от 100 до 200 мМ.
12. Состав по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 80 или плуроник F68.
13. Состав по п. 12, отличающийся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 при концентрации поверхностно-активного вещества от около 0,005% до около 0,05%.

14. Состав по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что указанный состав стабилен при температуре от около 2 °С до около 8 °С в течение по меньшей мере 12 месяцев.

15. Состав по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что указанный состав стабилен при температуре от около 2 °С до около 8 °С в течение по меньшей мере 16 недель.

16. Состав по п. 15, отличающийся тем, что антитело к CD47 в указанном составе сохраняет по меньшей мере 50% своей биологической активности после хранения.

17. Состав по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что антитело к CD47 в указанном составе представляет собой полноразмерное антитело.

18. Состав по п. 17, отличающийся тем, что указанное антитело содержит последовательность константной области IgG4 человека.

19. Состав по п. 17 или п. 18, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой гуманизованное антитело, содержащее участок HCDR1, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 1), участок HCDR2, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 2), участок HCDR3, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 3), участок LCDR1, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 4), участок LCDR2, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 5), и участок LCDR3, содержащий последовательность (SEQ ID NO: 6).

20. Состав по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой маглолимаб.

21. Фармацевтически приемлемый стабильный жидкий состав, содержащий 10-20 мг/мл маглолимаба; 10 mM ацетатного буфера; 5% мас./об. сорбита; 0,01% - 0,04% полисорбата 20 при pH от 4,5 до 5,5.

22. Фармацевтически приемлемый стабильный жидкий состав, содержащий 10-20 мг/мл маглолимаба; 10 mM ацетатного буфера; 9% мас./об. сахарозы; 0,01% - 0,04% полисорбата 20 при pH от 4,5 до 5,5.

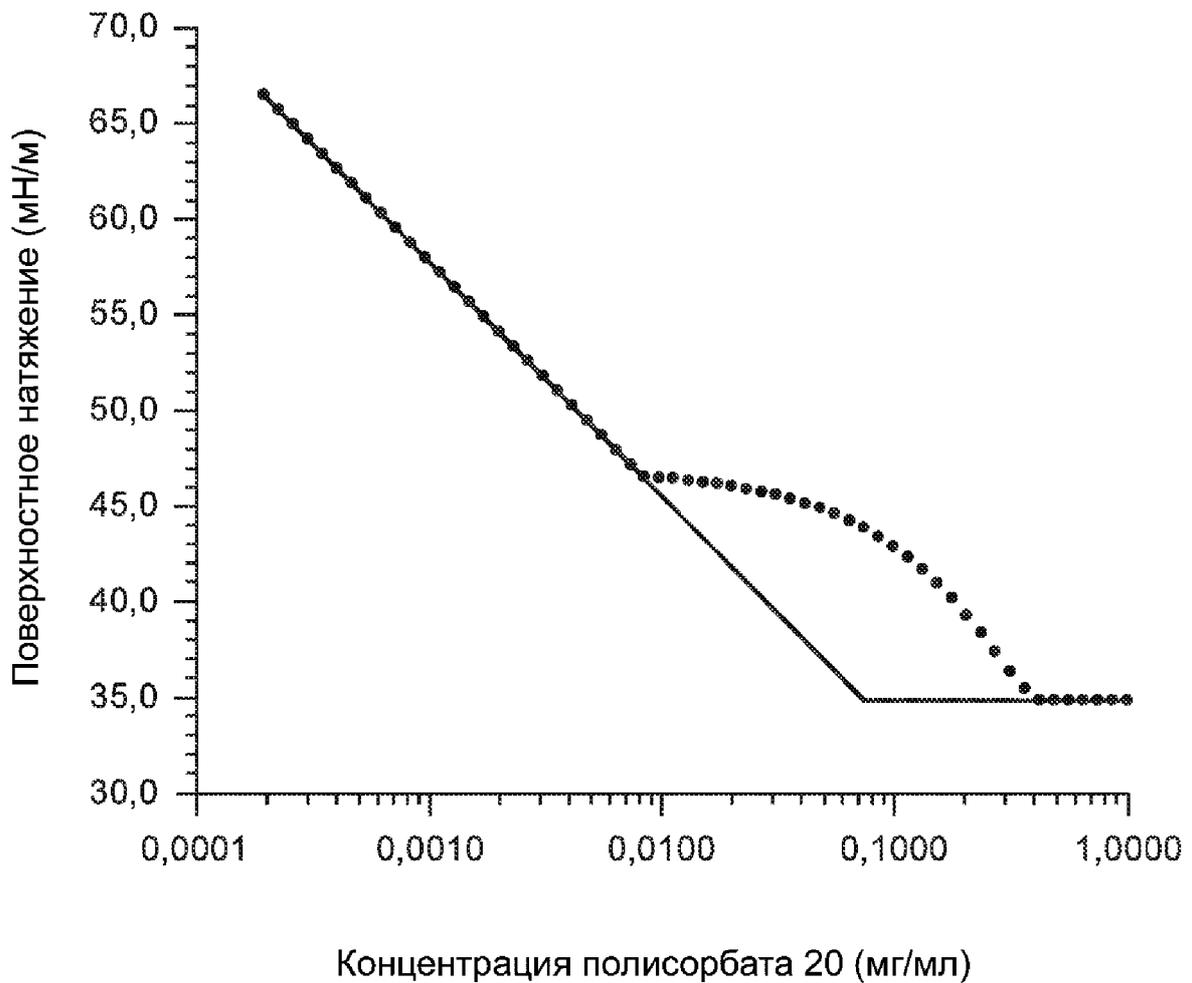
23. Фармацевтически приемлемый стабильный жидкий состав, содержащий 10-20 мг/мл маглолимаба; 10 mM ацетатного буфера; 9% мас./об. трегалозы; 0,01% - 0,04% полисорбата 20 при pH от 4,5 до 5,5.

24. Готовое изделие, содержащее стандартную дозу состава по любому из пп. 1-23.

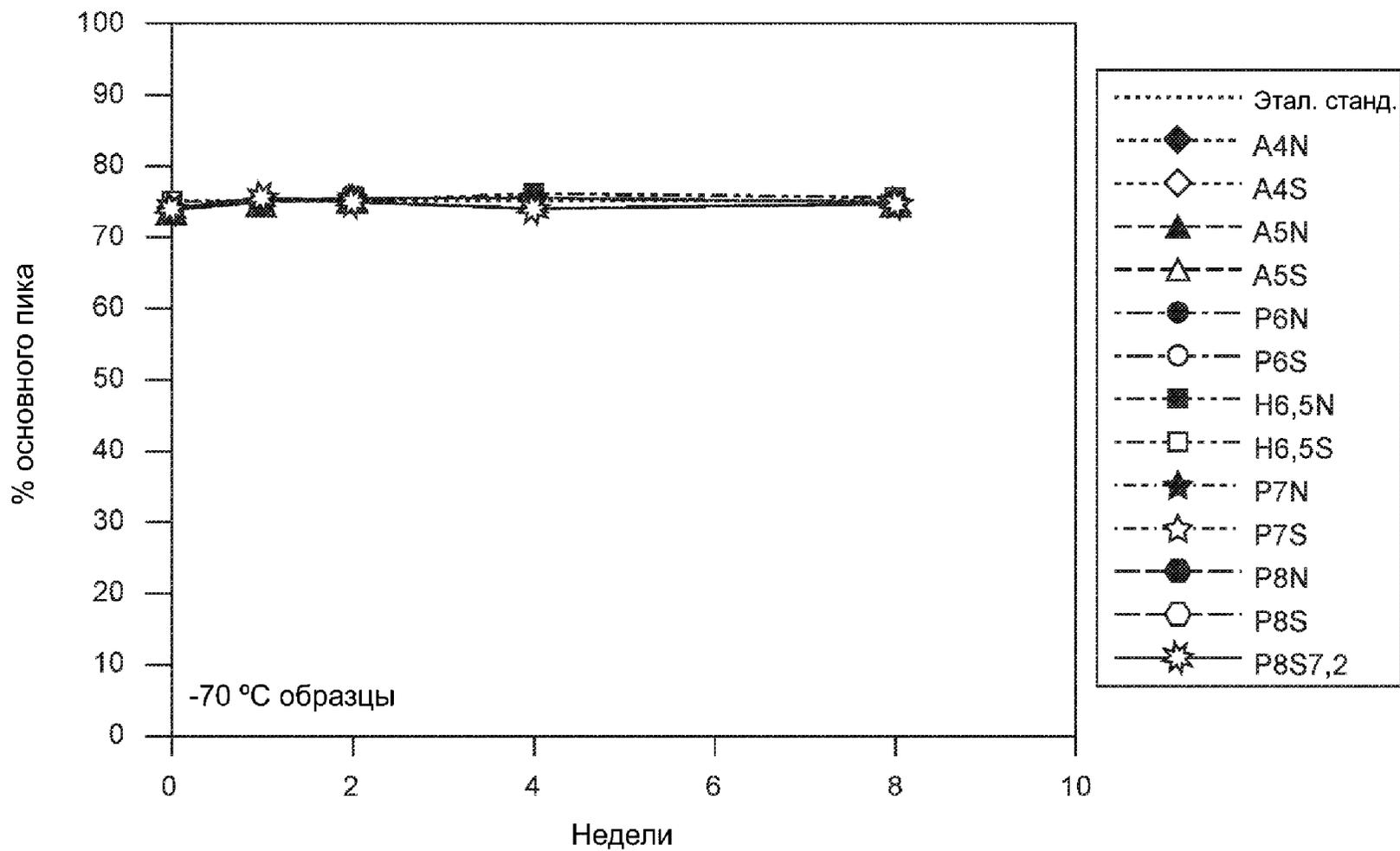
25. Способ лечения индивидуума, нуждающегося в этом, путем введения эффективной дозы состава антитела по любому из пп. 1-23.

ФИГ. 1

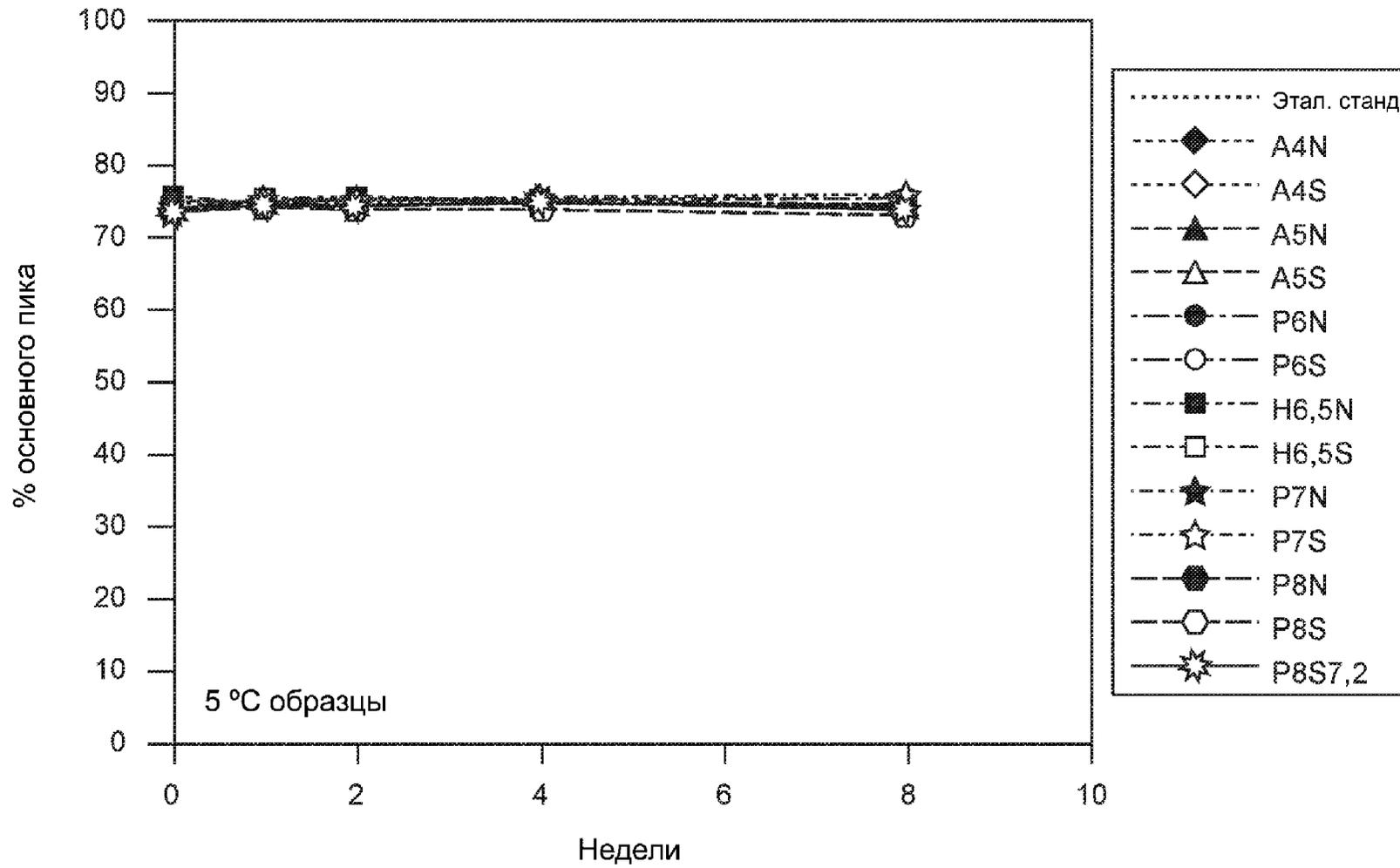
Данные о поверхностном натяжении для
раствора с полисорбатом 20 в 10 мМ
ацетата, 5% сорбита с 20 мг/мл белка



ФИГ. 2

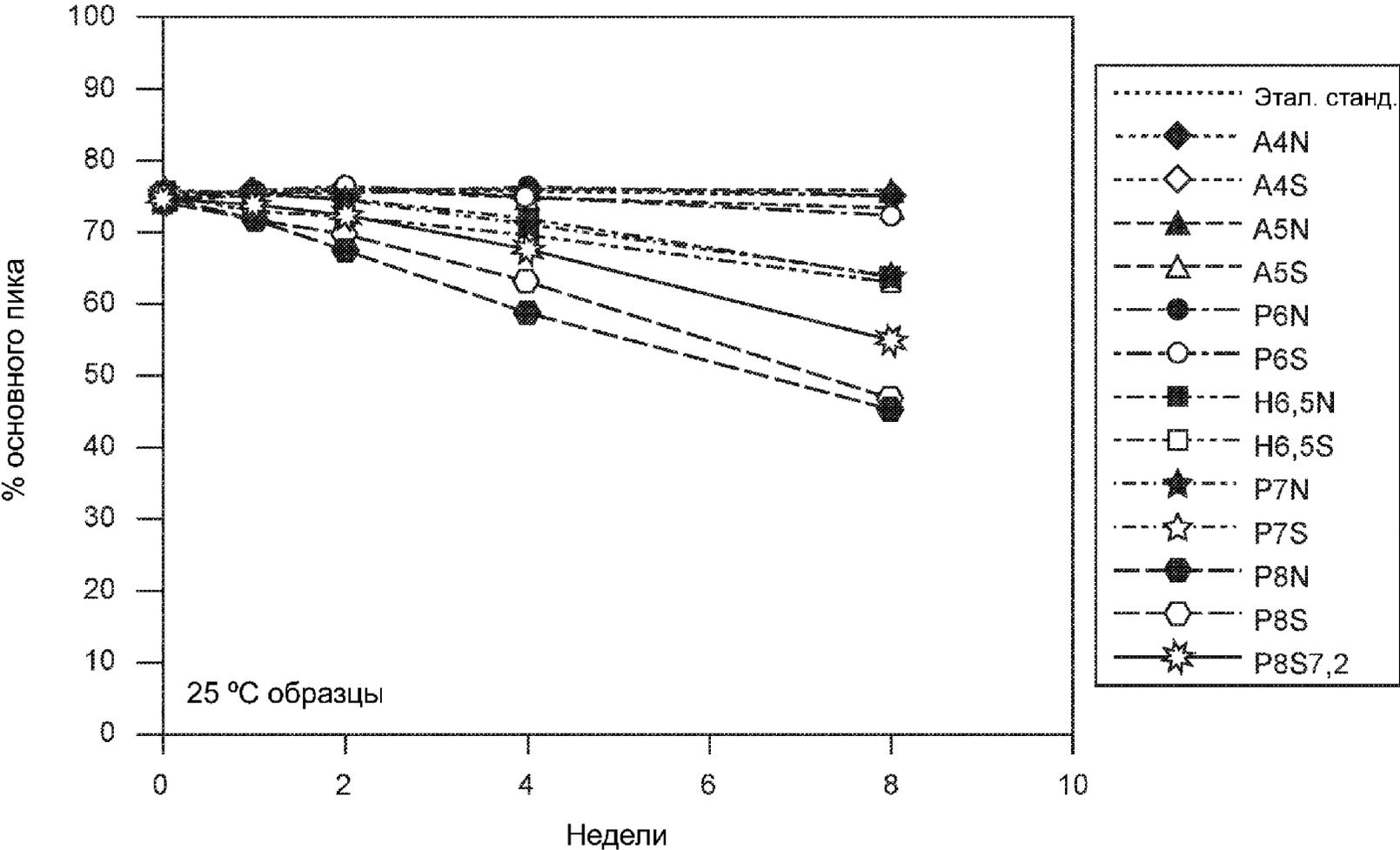


ФИГ. 2 (продолжение)



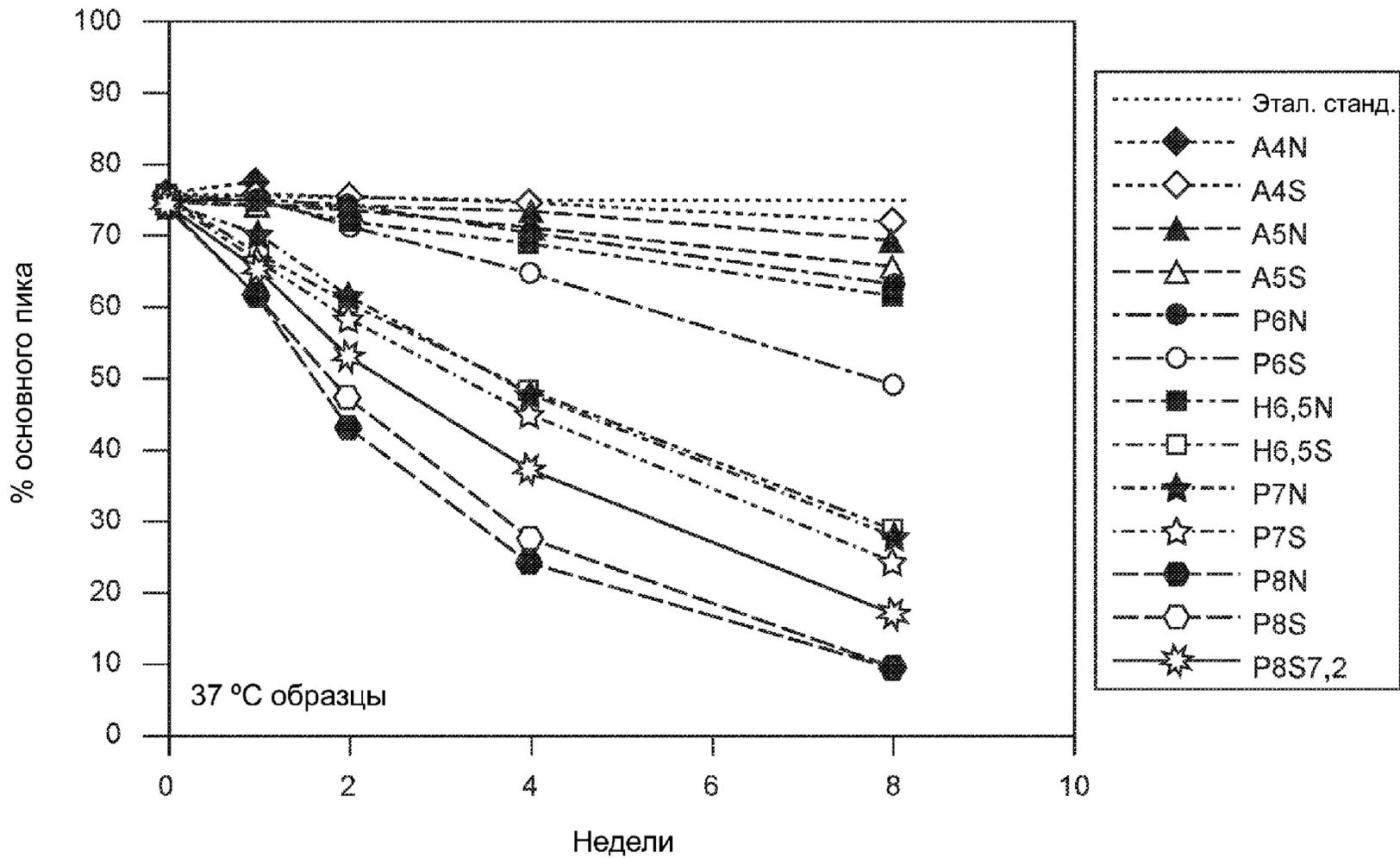
ЗАМЕНЕННЫЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

ФИГ. 2 (продолжение)

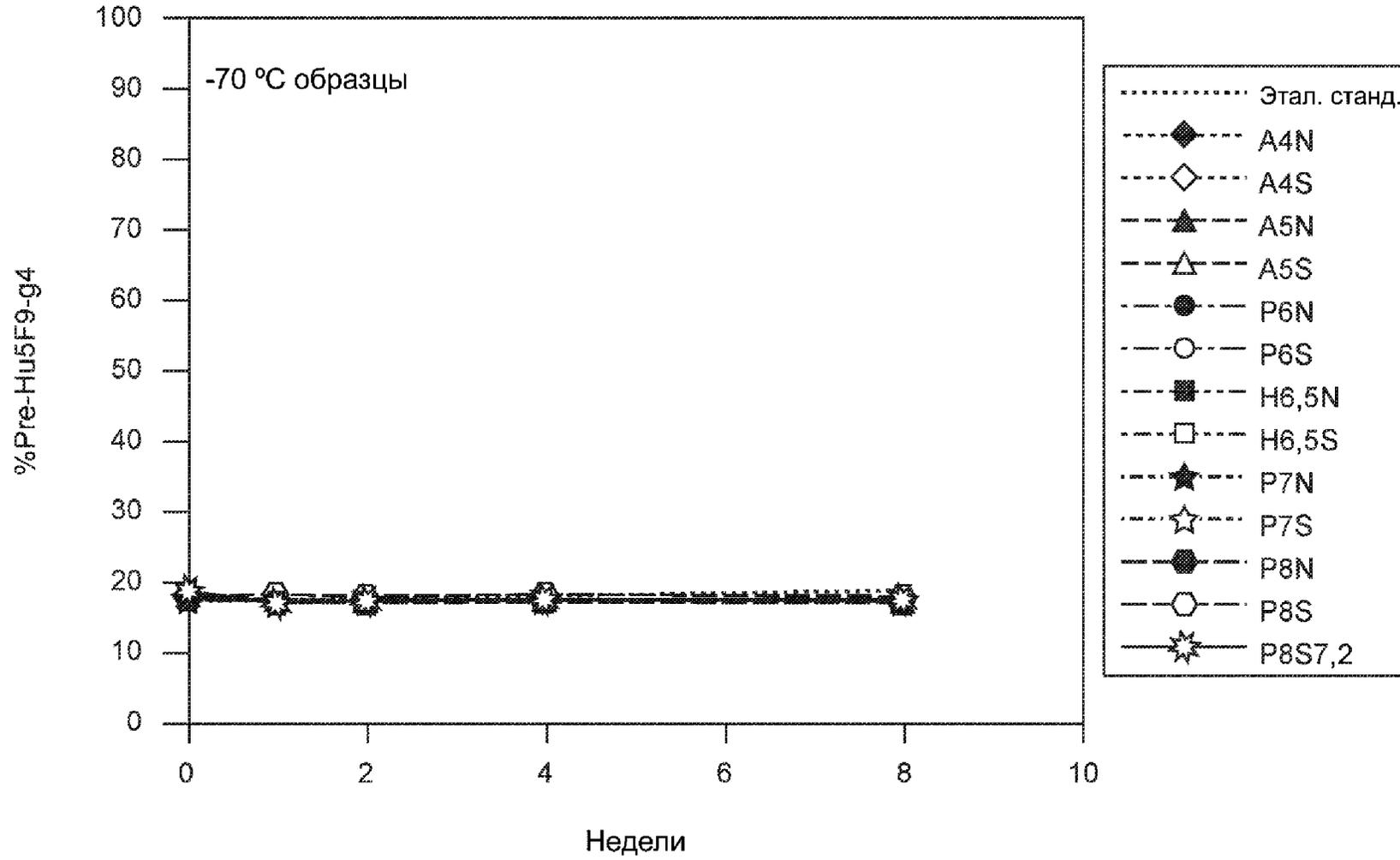


ЗАМЕНЕННЫЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

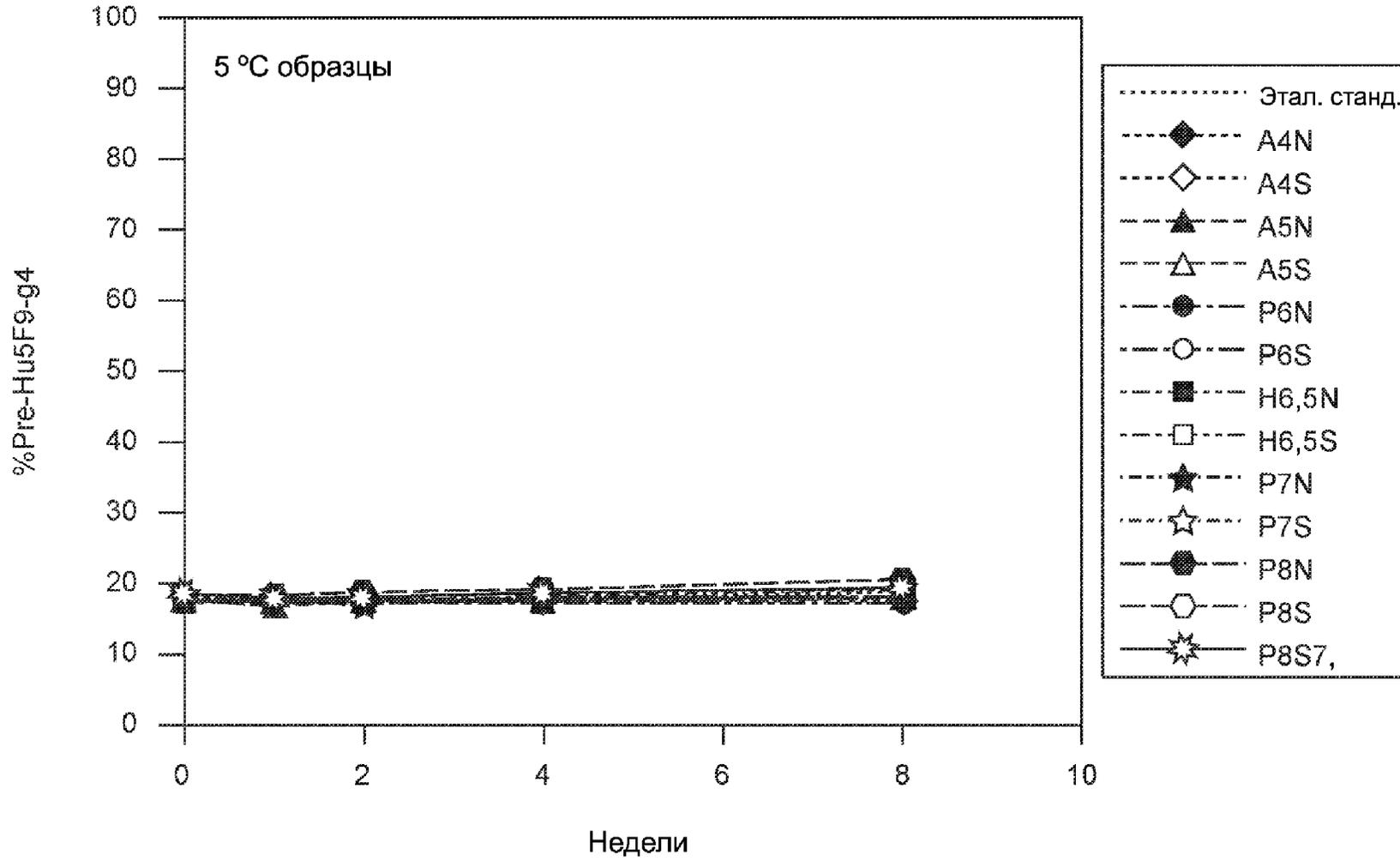
ФИГ. 2 (продолжение)



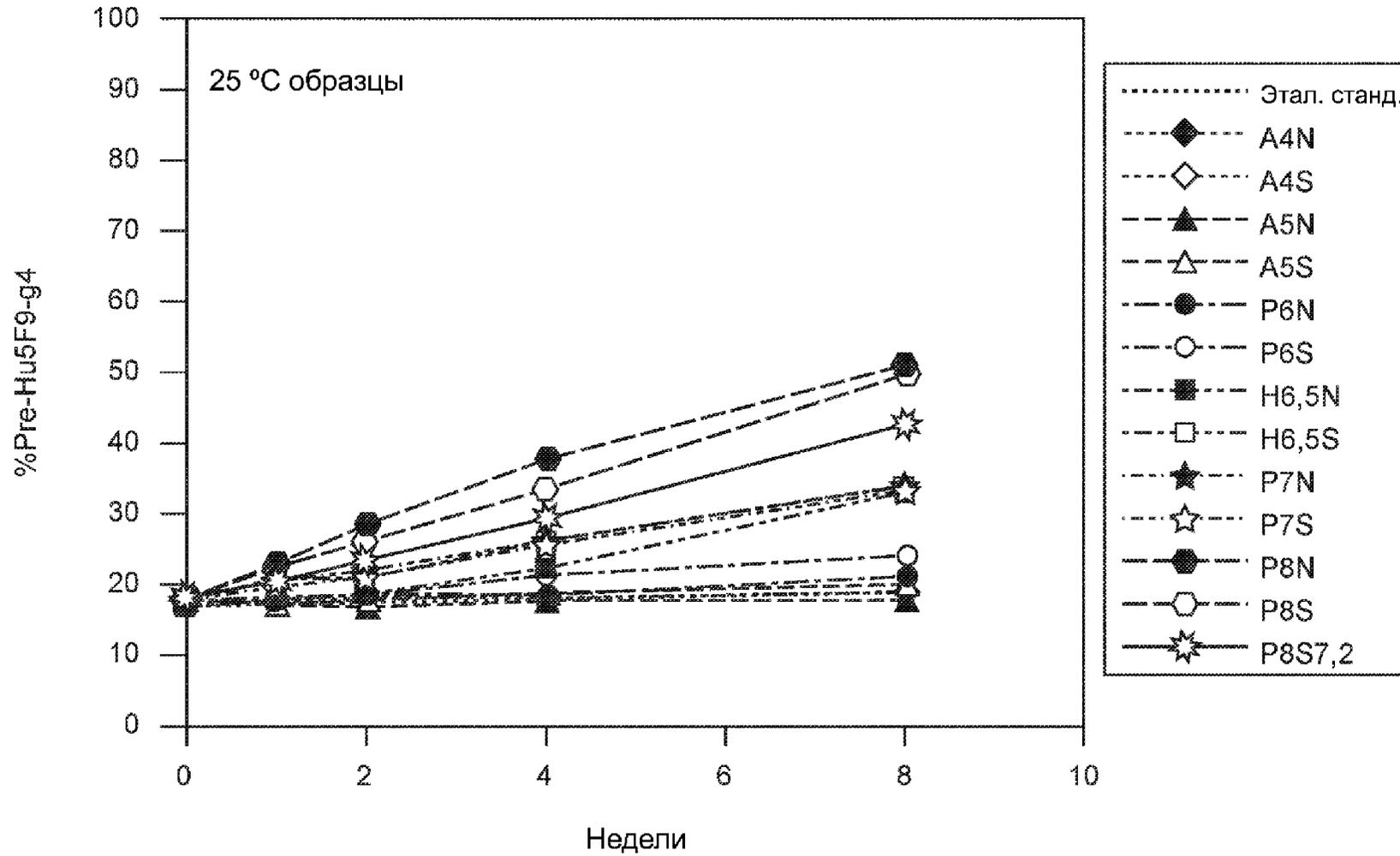
ФИГ. 3



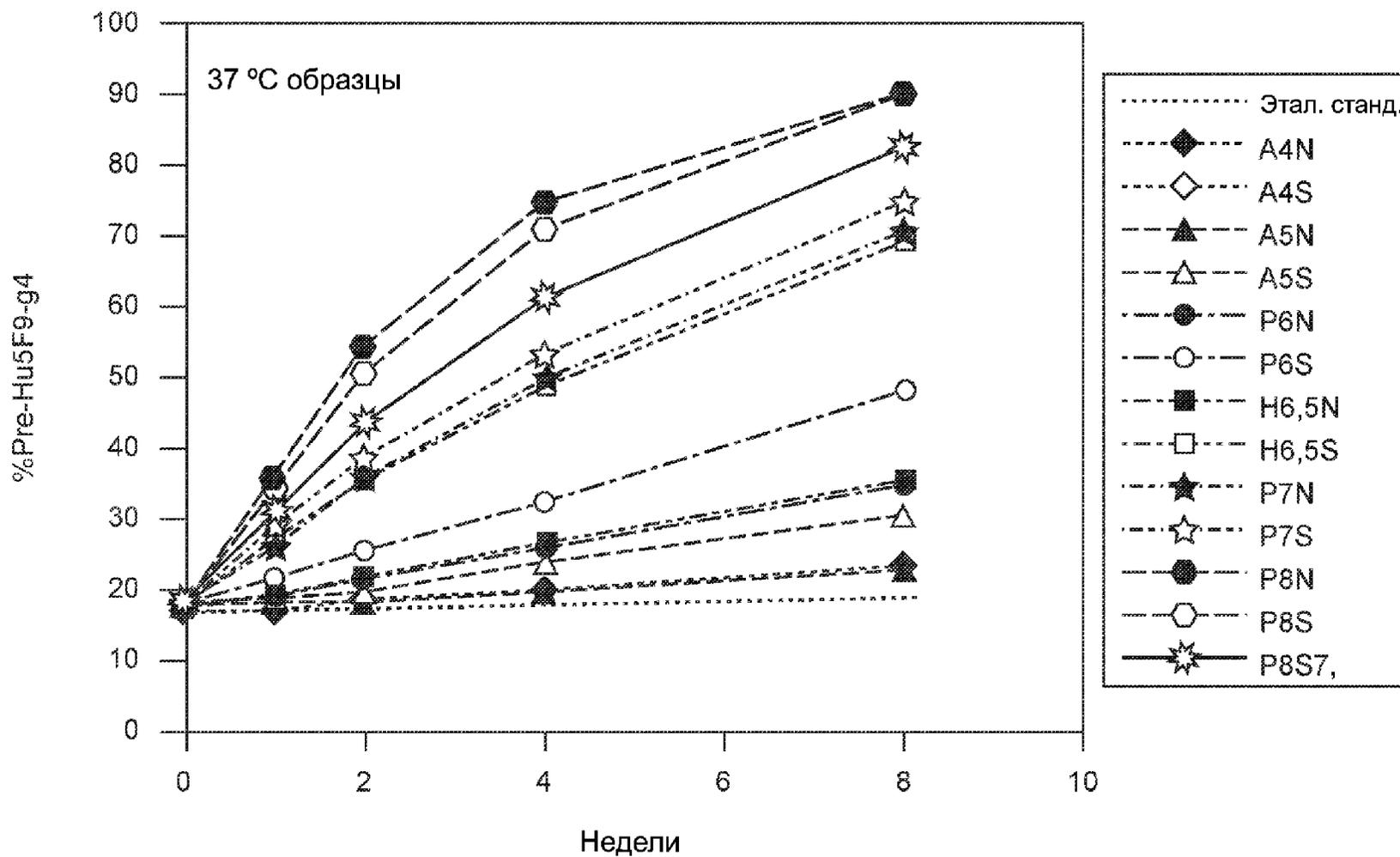
ФИГ. 3 (продолжение)



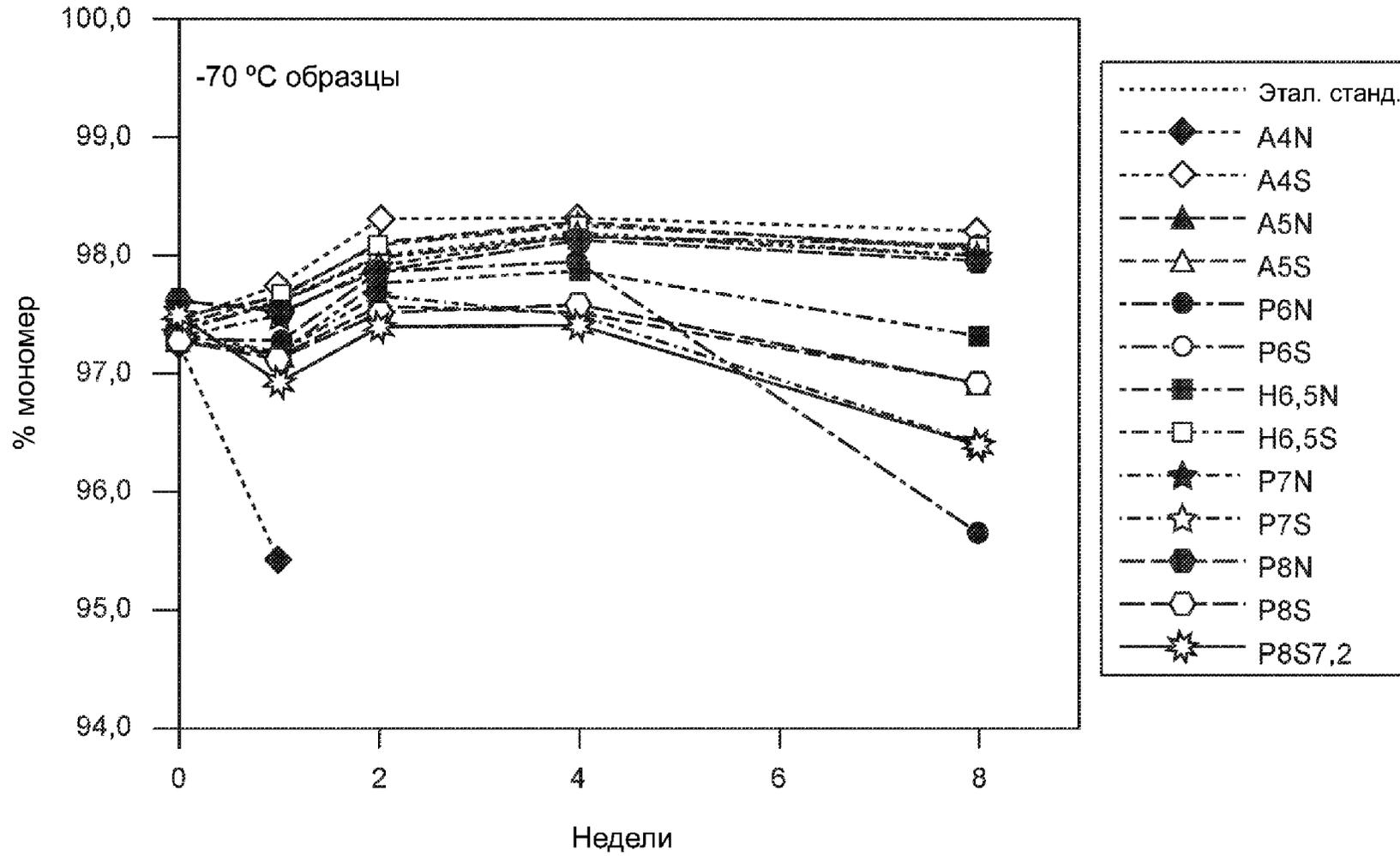
ФИГ. 3 (продолжение)



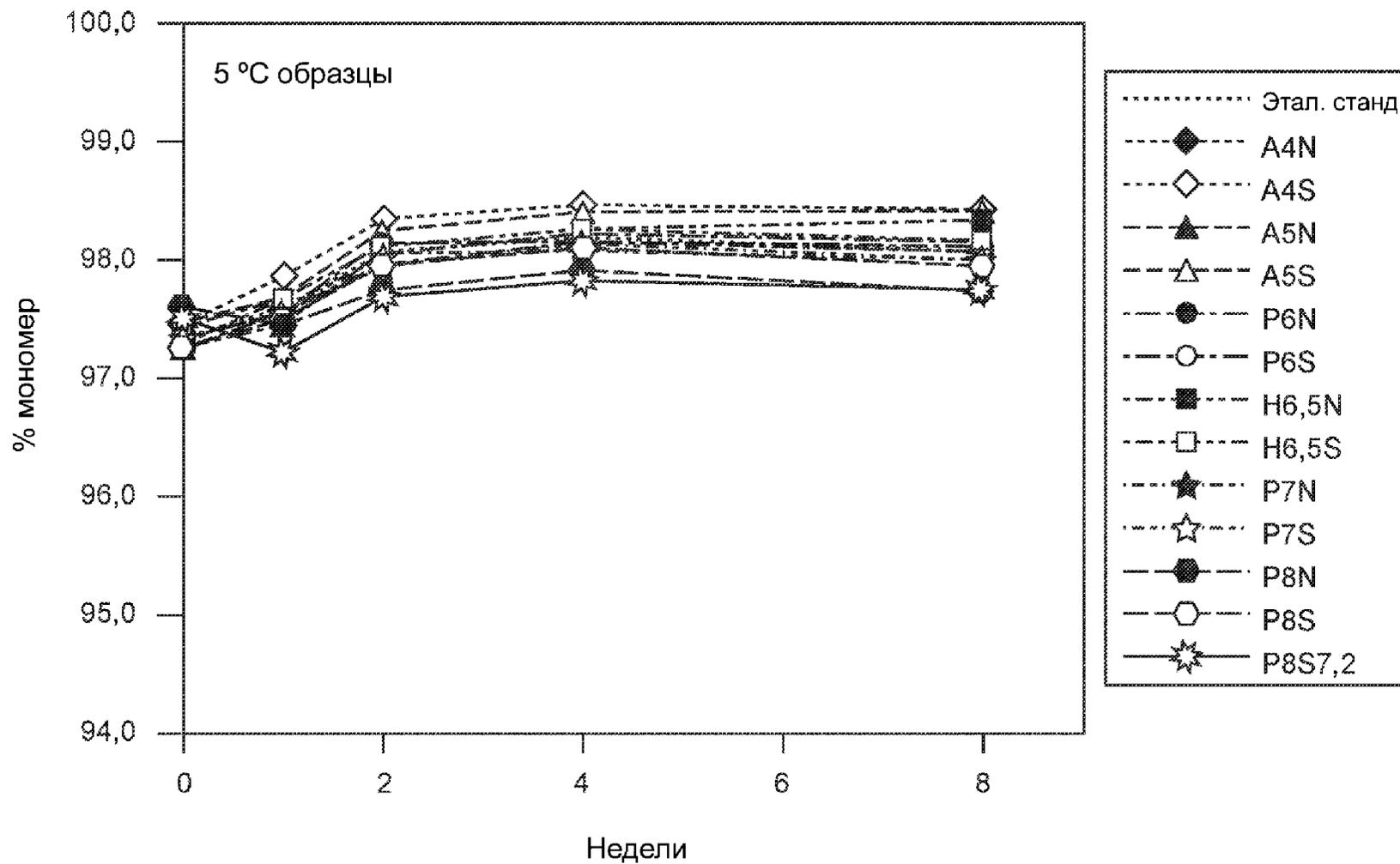
ФИГ. 3 (продолжение)



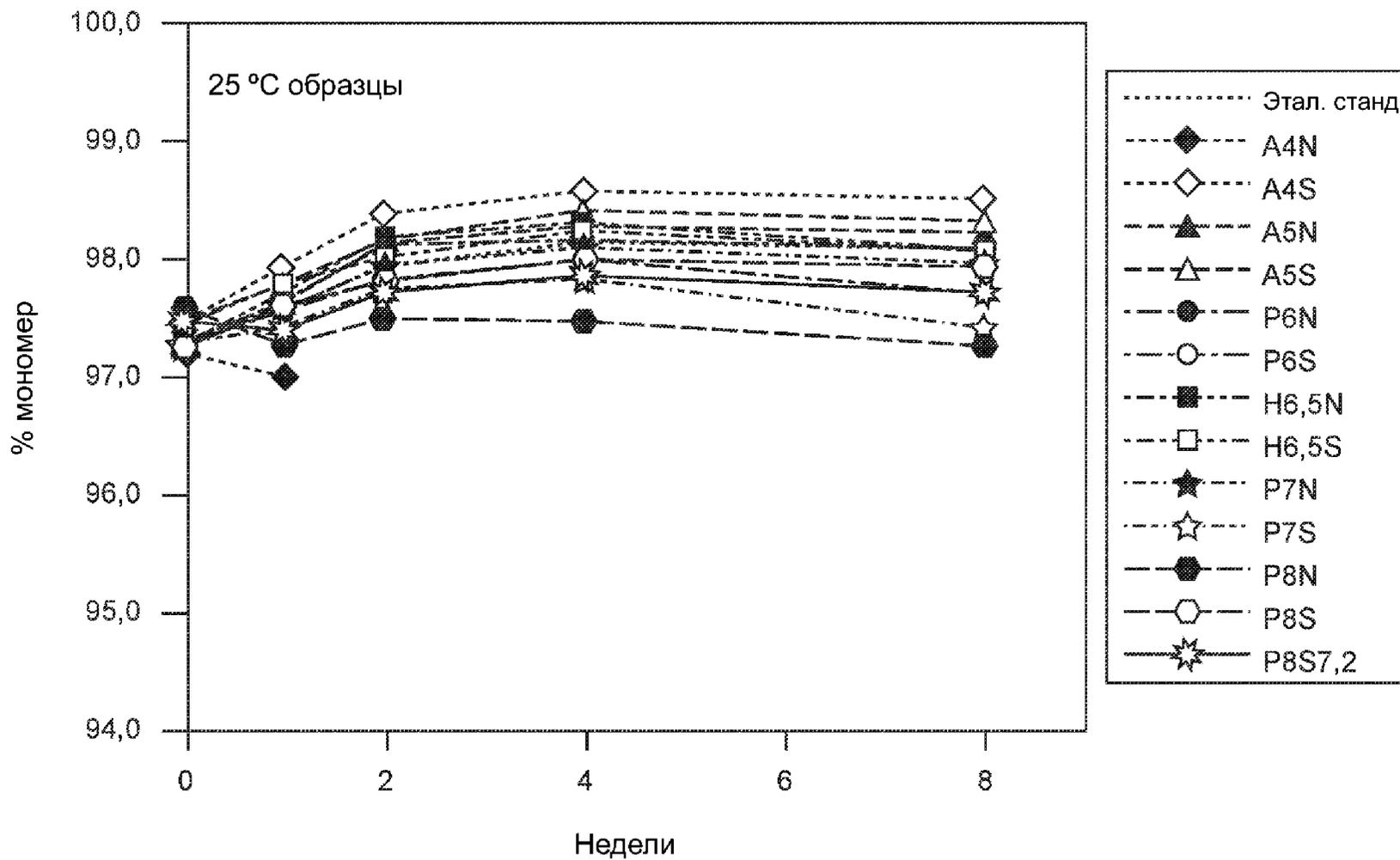
ФИГ. 4



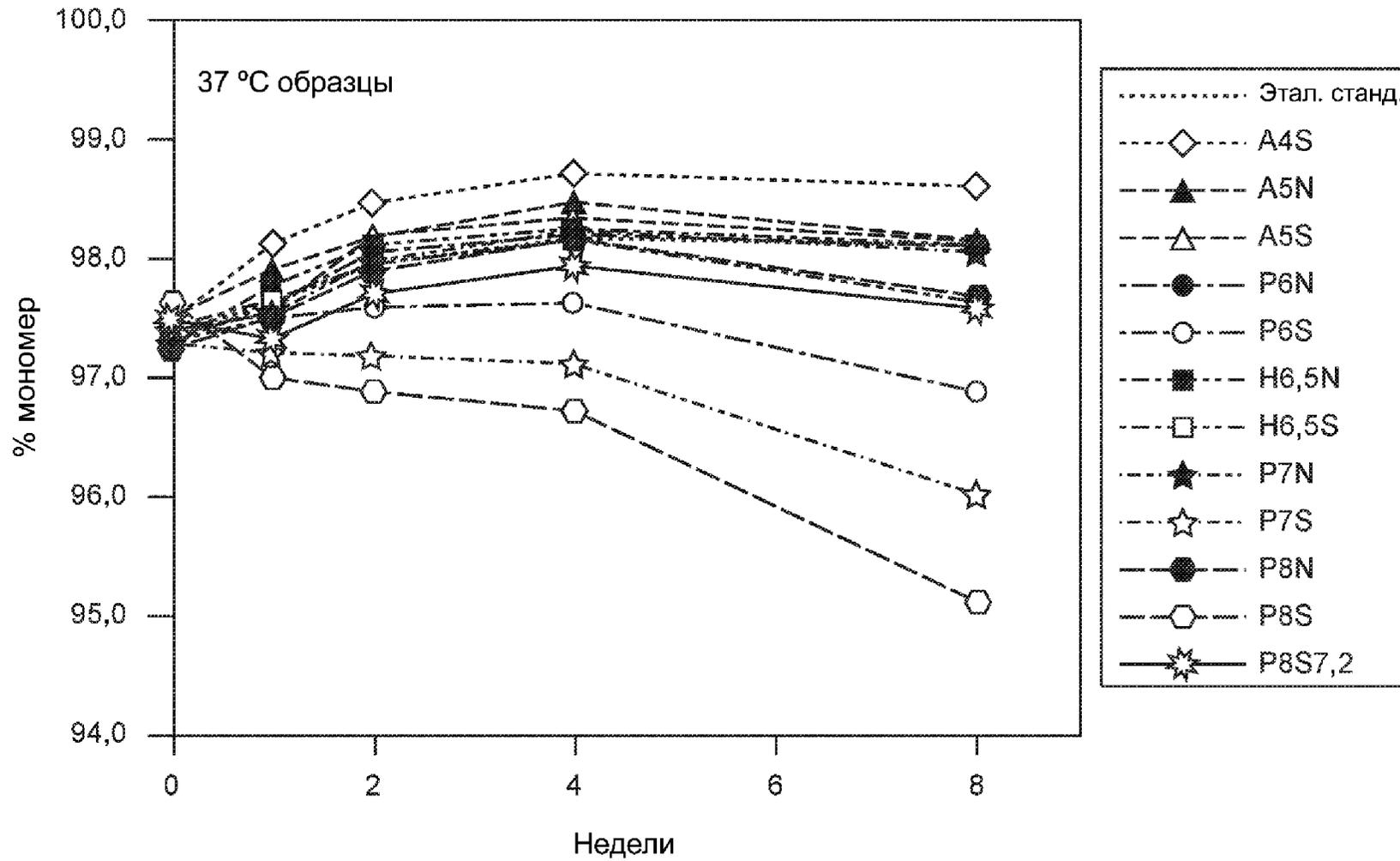
ФИГ. 4 (продолжение)



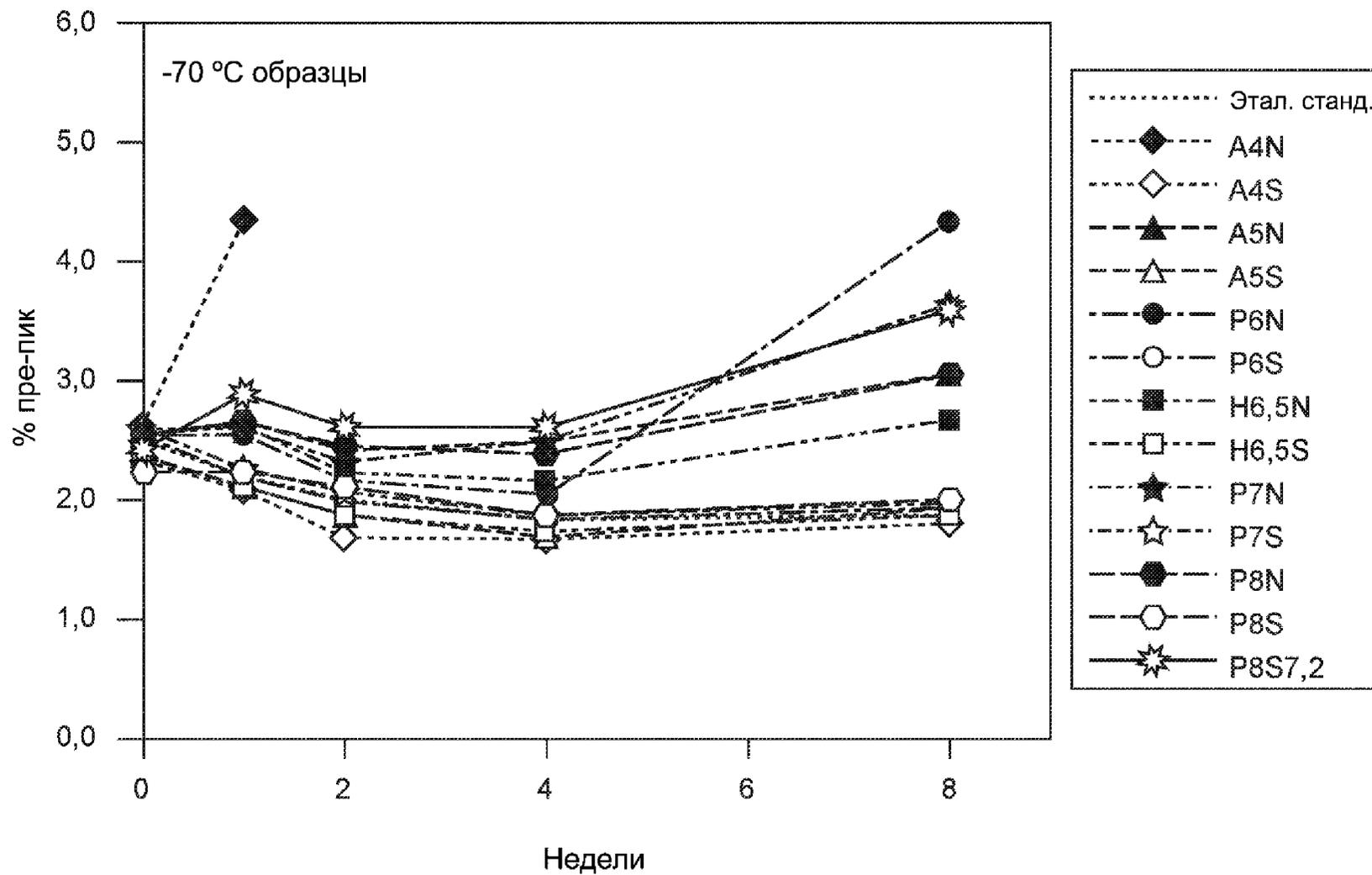
ФИГ. 4 (продолжение)



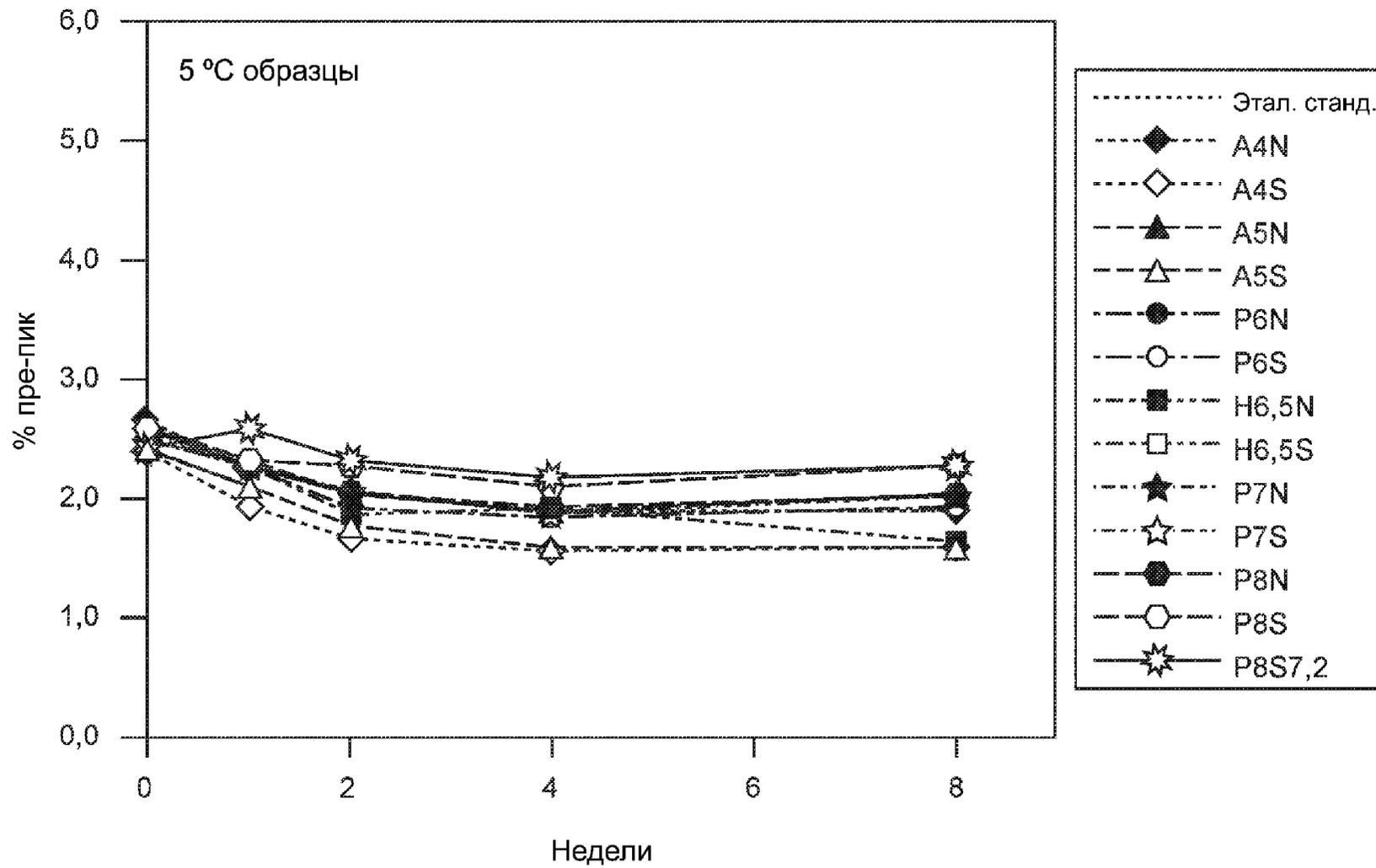
ФИГ. 4 (продолжение)



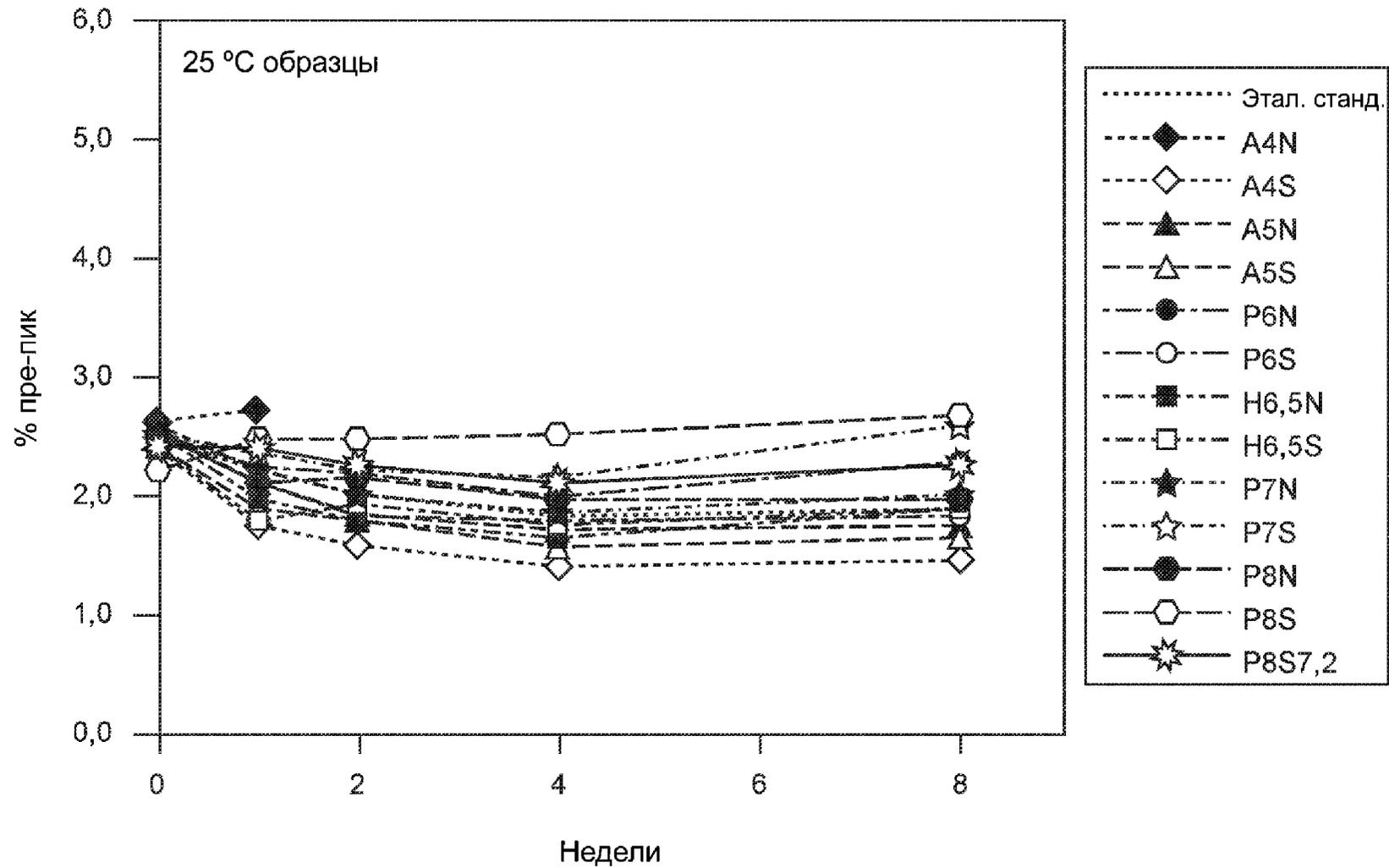
ФИГ. 5



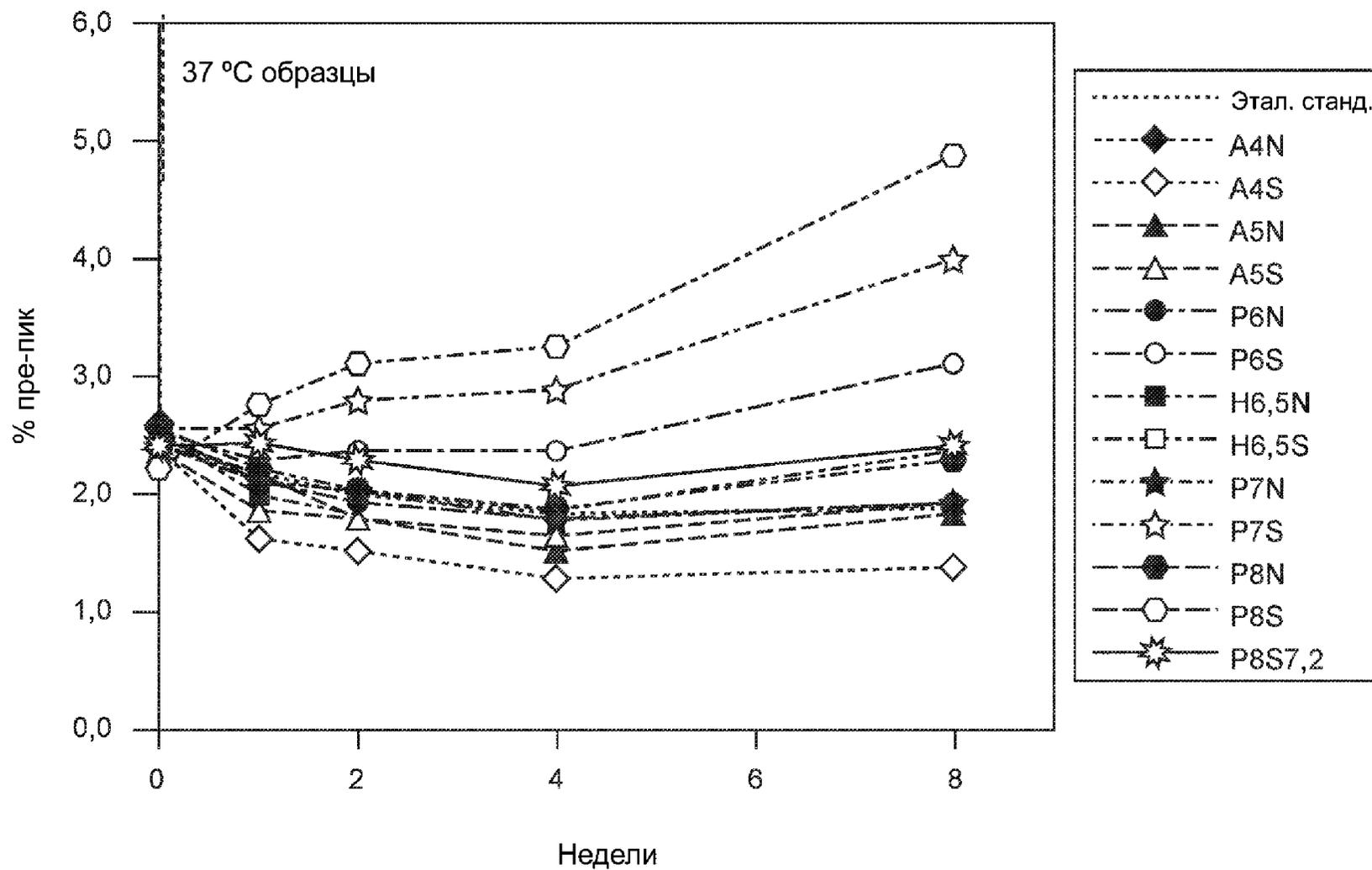
ФИГ. 5 (продолжение)



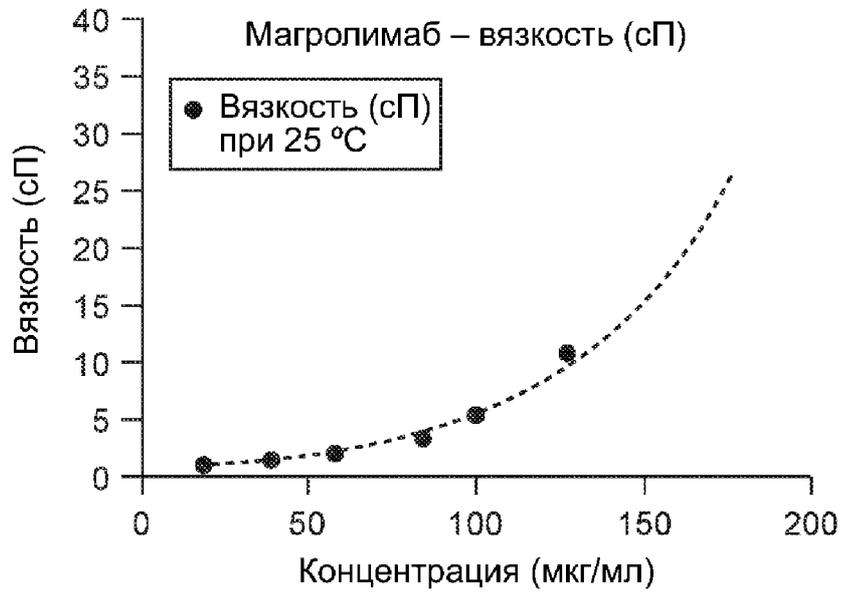
ФИГ. 5 (продолжение)



ФИГ. 5 (продолжение)



ФИГ. 6



ФИГ. 7

