

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047163**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.13

(21) Номер заявки
202092334

(22) Дата подачи заявки
2019.03.29

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)

(54) **С-КОНЦЕВЫЕ ВАРИАНТЫ АНТИТЕЛ**

(31) **62/650,762; 62/812,741**

(32) **2018.03.30; 2019.03.01**

(33) **US**

(43) **2021.01.21**

(86) **PCT/US2019/024739**

(87) **WO 2019/191534 2019.10.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Хуан Чжэ, Стивенс Дженнитт ЛиЭнн,
Флинн Грегори, Фодор Шилан, Дарис
Марк (US)**

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

(56) **WO-A1-2014159579**

MASAHIRO TSUBAKI ET AL.: "C-terminal modification of monoclonal antibody drugs: Amidated species as a general product-related substance", **INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES**, vol. 52, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 139-147, XP055120412, ISSN: 0141-8130, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.09.016 page 139, right-hand column, paragraph 3 - page 140, left-hand column, line 4 page 140, left-hand column, paragraph 2

KRISTINA CARLSON ET AL.: "Optimizing production of Fc-amidated peptides by Chinese hamster ovary cells", **BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB**, vol. 15, no. 1, 16 October 2015 (2015-10-16), page 95, XP021230112, ISSN: 1472-6750, DOI: 10.1186/S12896-015-0210-4, abstract

WO-A2-2009039175

WO-A1-2011143307

(57) Настоящее изобретение в целом относится к антителам к склеростину, имеющим С-концевые модификации, и к композициям, содержащим такие антитела.

B1

047163

047163 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/650762, поданной 30 марта 2018 года, и предварительной заявки на патент США № 62/812741, поданной 1 марта 2019 года, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки в их полных объемах.

Область техники изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к антителам к склеростину, имеющим по меньшей мере одну С-концевую модификацию, и к композициям, содержащим такие антитела.

Включение посредством ссылки материала, поданного в электронном виде

Машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, включенный посредством ссылки в его полном объеме, подается одновременно с настоящей заявкой и обозначен следующим образом: файл в формате ASCII (текстовый) размером 21006 байт под названием "52080_SeqListing.txt", созданный 21 марта 2019 года.

Включение посредством ссылки

Следующие заявки настоящим включены посредством ссылки в их полном объеме: публикация международной заявки на патент № PCT/US 2012/049331, поданная 2 августа 2012 года, которая испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 61/515191, поданной 4 августа 2011 года; заявка на патент США № 11/410540, поданная 25 апреля 2006 года, которая испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 60/792645, поданной 17 апреля 2006 года, предварительная заявка на патент США № 60/782244, поданная 13 марта 2006 года, предварительная заявка на патент США № 60/776847, поданная 24 февраля 2006 года, предварительная заявка на патент США № 60/677583, поданная 3 мая 2005 года, а также заявка на патент США № 11/411003 (по которой выдан патент США № 7592429), поданная 25 апреля 2006 года, которая испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 60/792645, поданной 17 апреля 2006 года, предварительной заявки на патент США № 60/782244, поданной 13 марта 2006 года, предварительной заявки на патент США № 60/776847, поданной 24 февраля 2006 года, и предварительной заявки на патент США № 60/677583, поданной 3 мая 2005 года. Следующие заявки настоящим включены посредством ссылки: заявка на патент США № 12/212327, поданная 17 сентября 2008 года, которая испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 60/973024, поданной 17 сентября 2007 года; и заявка на патент США № 12/811171, поданная 29 июня 2010 года, которая является заявкой на патент США в Национальной фазе согласно статье 35 U.S.C. § 371 на основании международной заявки на патент № PCT/US 08/86864, поданной 15 декабря 2008 года, которая испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 61/013917, поданной 14 декабря 2007 года.

Уровень техники

Утрата содержания минеральных веществ в костной ткани может быть вызвана целым рядом условий и может приводить к серьезным проблемам со здоровьем. Например, остеопороз является изнуряющим заболеванием у людей и характеризуется заметным снижением массы и минеральной плотности скелетных костей, ухудшением структуры костей, включая деградацию микроархитектуры кости и соответствующее увеличение хрупкости кости (т.е. снижение прочности кости) и предрасположенность к переломам у пораженных индивидуумов. Хотя остеопороз рассматривался как повышение риска переломов из-за снижения костной массы, некоторые из доступных в настоящее время методов лечения нарушений скелета могут повышать плотность костей у взрослых, и большинство доступных в настоящее время методов лечения работают в основном за счет ингибирования дальнейшей резорбции кости вместо стимуляции образования новой кости. Чтобы замедлить потерю костной массы сегодня прописывают эстроген. Однако существуют некоторые разногласия по поводу того, получают ли пациенты какую-либо долгосрочную пользу и обладает ли эстроген каким-либо эффектом у пациентов старше 75 лет. Более того, считается, что употребление эстрогена увеличивает риск возникновения рака молочной железы и эндометрия. Также женщинам в постменопаузе были предложены кальцитонин, остеокальцин с витамином К или высокие дозы диетического кальция с витамином D или без такового. Однако высокие дозы кальция часто вызывают нежелательные побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта, и при этом уровни кальция в сыворотке и моче необходимо постоянно контролировать (например, Khosla and Riggs, Mayo Clin. Proc. 70:978982, 1995). Другие современные терапевтические подходы к остеопорозу включают бисфосфонаты (например, Fosamax™, Actonel™, Bonviva™, Zometa™, олладронат, неридронат, скелид, бонефос), гормон паразитовидной железы, кальцилитики, кальцимитетики (например, цинакальцет), статины, анаболические стероиды и соли лантана и стронция, а также фторид натрия. Однако такие терапевтические средства часто связаны с нежелательными побочными эффектами (см. Khosla and Riggs, выше).

Склеростин, продукт гена SOST, отсутствует при склеростеозе, заболевании скелета, характеризующемся чрезмерным разрастанием костей и сильными плотными костями (Brunkow et al., Am. J. Hum. Genet., 68:577-589, 2001; Balemans et al., Hum. Mol. Genet., 10:537-543, 2001). Аминокислотная последовательность человеческого склеростина описана у Brunkow et al. *ibid* и раскрыта в данном документе как SEQ ID NO: 1. Склеростин является ценной мишенью для опосредования повышения плотности костей.

Краткое описание

В одном аспекте в данном документе описано антитело, которое специфически связывается со склеростином под SEQ ID NO: 1 и содержит набор из шести CDR, представленных под SEQ ID NO: 2-7, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) на С-конце тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly-Lys (SEQ ID NO: 11) на С-конце тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) на С-конце первой тяжелой цепи, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи дикого типа (т.е. без С-концевой Pro-Ala-Arg-Gly). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 12, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly-Lys (SEQ ID NO: 11) на С-конце тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 12, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления С-конец одной из тяжелых цепей антитела является амидированным (т.е. антитело является однократно амидированным). В некоторых вариантах осуществления С-конец обеих тяжелых цепей антитела является амидированным (т.е. антитело является дважды амидированным).

Фармацевтические композиции, содержащие популяцию антител, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель также представлены в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит смесь антител, которые специфически связываются со склеростином под SEQ ID NO: 1, где смесь антител содержит популяцию антител, содержащих тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) на С-конце тяжелой цепи, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 3-5% антител в композиции составляют популяцию антител, предусматривающих тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) на С-конце тяжелой цепи. В некоторых аспектах менее чем 70% популяции антител являются амидированными на одной или обеих тяжелых цепях. В некоторых аспектах вся популяция антител или ее часть предусматривают одну тяжелую цепь, содержащую С-концевую последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8), которая необязательно амидирована. В некоторых аспектах вся популяция антител или ее часть предусматривают С-концевую последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) в обеих тяжелых цепях, и при этом обе тяжелые цепи необязательно амидированы. Необязательно, менее чем приблизительно 35% популяции антител является однократно амидированными, и/или менее чем приблизительно 35% популяции антител являются амидированными по обеим тяжелым цепям, и/или менее чем приблизительно 35% популяции антител предусматривают тяжелые цепи, которые не являются амидированными. В данном отношении в различных аспектах приблизительно 33% популяции антител не являются амидированными, приблизительно 33% популяции антител предусматривают одну амидированную тяжелую цепь и приблизительно 33% популяции антител предусматривают две амидированные тяжелые цепи.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит соль кальция, ацетатный буфер, многоатомный спирт и поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления ацетатная соль предусматривает ацетат кальция, ацетатный буфер предусматривает ацетат натрия, многоатомный спирт предусматривает сахарозу и поверхностно-активное вещество предусматривает полисорбат 20. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит 55 мМ ацетата, 13 мМ кальция, 6,0% (вес./об.) сахарозы и 0,006% (вес./об.) полисорбата 20, причем pH составляет 5,2.

Также в настоящем изобретении представлен способ повышения плотности минеральных веществ кости у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение композиции, описанной в данном документе, субъекту в количестве, эффективном для повышения плотности минеральных веществ кости у субъекта.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует часть С-конца ромосозумаба дикого типа.

На фиг. 2 представлена последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует часть С-конца С-концевого варианта ромосозумаба (вариант PARG).

На фиг. 3 представлен график, демонстрирующий масштабируемый в УФ-диапазоне профиль ромосозумаба дикого типа (пунктирная линия), наложенный на профиль варианта ромосозумаба PARG (сплошная линия), который был расщеплен с помощью Lys-C и проанализирован с помощью пептидного картирования с использованием LC/MS.

На фиг. 4 представлен график, демонстрирующий катионообменный профиль (СЕХ) варианта ромосозумаба PARC, обработанного карбоксипептидазой (пунктирная линия), наложенный на необработанный вариант ромосозумаба PARC (сплошная линия).

На фиг. 5 представлен график, демонстрирующий процент восстановления на модели Scissor после подкожной инъекции, показанный как временная зависимость. Ромосозумаб дикого типа (кружки) и С-концевой вариант ромосозумаба PARC диффундируют с разными скоростями на участке имитации инъекции.

На фиг. 6 представлен график, демонстрирующий, что и ромосозумаб дикого типа, и С-концевой вариант ромосозумаба PARC связывают FcRn сходным образом, и что на связывание FcRn не влияет мутация PARC.

На фиг. 7 представлен график, демонстрирующий, что относительное связывание С-концевого варианта ромосозумаба PARC с FcγRIIa (131H) было намного выше, чем у ромосозумаба дикого типа.

Подробное описание

В настоящем изобретении представлено антитело, которое специфически связывается со склеростином, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, содержащую Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) на С-конце тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, содержащую Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) на С-конце тяжелой цепи, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность аминокислот, содержащую Pro-Ala-Arg-Gly-Lys (SEQ ID NO: 11) на С-конце тяжелой цепи. Также представлены фармацевтические композиции, содержащие антитело (или смесь антител), и способы применения антитела.

"Антитело к склеростину" или "антитело, которое связывается со склеростином" представляет собой антитело, которое связывается со склеростином под SEQ ID NO: 1, или его части. Рекомбинантный человеческий склеростин/SOST является коммерчески доступным от, например, R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота, США; № по каталогу 2006 года 1406-ST-025). Патенты США №№ 6395511 и 6803453, а также патентные публикации США №№ 2004/0009535 и 2005/0106683, в целом относятся к антителам к склеростину. Примеры антител к склеростину, подходящих для применения в контексте настоящего изобретения, также описаны в патентных публикациях США №№ 2007/0110747 и 2007/0072797, которые настоящим включены посредством ссылки. Дополнительную информацию, касающуюся материалов и способов создания антител к склеростину, можно найти в патентной публикации США № 20040158045 (настоящим включенной посредством ссылки).

Термин "антитело" относится к интактной молекуле иммуноглобулина (включающей поликлональную, моноклональную, химерную, гуманизированную и/или человеческую версии, имеющие тяжелую и/или легкую цепи).

Как используется в данном документе, "специфически связывается" означает, что антитело преимущественно связывает антиген, а не другие белки. В некоторых вариантах осуществления "специфически связывает" означает, что антитело характеризуется более высокой аффинностью в отношении антигена, чем в отношении других белков. Антитела, которые специфически связывают антиген, могут характеризоваться аффинностью связывания в отношении антигена, меньшей или равной 1×10^{-7} М, меньшей или равной 2×10^{-7} М, меньшей или равной 3×10^{-7} М, меньшей или равной 4×10^{-7} М, меньшей или равной 5×10^{-7} М, меньшей или равной 6×10^{-7} М, меньшей

или равной 7×10^{-7} М, меньшей или равной 8×10^{-7} М, меньшей или равной 9×10^{-7} М, меньшей или равной 1×10^{-8} М, меньшей или равной 2×10^{-8} М, меньшей или равной 3×10^{-8} М, меньшей или равной 4×10^{-8} М, меньшей или равной 5×10^{-8} М, меньшей или равной 6×10^{-8} М, меньшей или равной 7×10^{-8} М, меньшей или равной 8×10^{-8} М, меньшей или равной 9×10^{-8} М, меньшей или равной 1×10^{-9} М, меньшей или равной 2×10^{-9} М, меньшей или равной 3×10^{-9} М, меньшей или равной 4×10^{-9} М, меньшей или равной 5×10^{-9} М, меньшей или равной 6×10^{-9} М, меньшей или равной 7×10^{-9} М, меньшей или равной 8×10^{-9} М, меньшей или равной 9×10^{-9} М, меньшей или равной 1×10^{-10} М, меньшей или равной 2×10^{-10} М, меньшей или равной 3×10^{-10} М, меньшей или равной 4×10^{-10} М, меньшей или равной 5×10^{-10} М, меньшей или равной 6×10^{-10} М, меньшей или равной 7×10^{-10} М, меньшей или равной 8×10^{-10} М, меньшей или равной 9×10^{-10} М, меньшей или равной 1×10^{-11} М, меньшей или равной 2×10^{-11} М, меньшей или равной 3×10^{-11} М, меньшей или равной 4×10^{-11} М, меньшей или равной 5×10^{-11} М, меньшей или равной 6×10^{-11} М, меньшей или равной 7×10^{-11} М, меньшей или равной 8×10^{-11} М, меньшей или равной 9×10^{-11} М, меньшей или равной 1×10^{-12} М, меньшей или равной 2×10^{-12} М, меньшей или равной 3×10^{-12} М, меньшей или равной 4×10^{-12} М, меньшей или равной 5×10^{-12} М, меньшей или равной 6×10^{-12} М, меньшей или равной 7×10^{-12} М, меньшей или равной 8×10^{-12} М или меньшей или равной 9×10^{-12} М.

В некоторых или любых вариантах осуществления антитело связывается со склеростином под SEQ ID NO: 1 или его встречающимся в природе вариантом с аффинностью (Kd), меньшей или равной 1×10^{-7} М, меньшей или равной 1×10^{-8} М, меньшей или равной 1×10^{-9} М, меньшей или равной 1×10^{-10} М,

меньшей или равной 1×10^{-11} М или меньшей или равной 1×10^{-12} М. Аффинность определяют с использованием ряда методик, примером которых является анализ аффинности ELISA. В различных вариантах осуществления аффинность определяют с помощью анализа Viascog. В различных вариантах осуществления аффинность определяют с помощью кинетического способа. В различных вариантах осуществления аффинность определяют с помощью способа с использованием равновесия/раствора. В патентной публикации США № 2007/0110747 (раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки) содержится дополнительное описание анализов аффинности, подходящих для определения аффинности (K_d) антитела в отношении склеростина.

В некоторых или любых вариантах осуществления антитело (или фрагменты антитела) связывается с полипептидом склеростина, содержащим аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1, и связывает область склеростина, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 5 (CGPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFRC; соответствующую аминокислотам 86-111 под SEQ ID NO: 1). Эта область также называется в данном документе областью "петли 2" склеростина. Области склеростина вне области петли 2 определены в данном документе как "как отличные от петли 2 области". В качестве альтернативы или дополнения антитело к склеростину связывается с полипептидом склеростина, содержащим аминокислоты 57-146 под SEQ ID NO: 1. В качестве альтернативы или дополнения антитело к склеростину связывается с полипептидом склеростина, содержащим аминокислоты 89-103 под SEQ ID NO: 1 и/или аминокислоты 137-151 под SEQ ID NO: 1. В некоторых или любых вариантах осуществления полипептид склеростина, который является фрагментом полноразмерного склеростина, сохраняет третичную структуру соответствующей области полипептида человеческого склеростина под SEQ ID NO: 1.

В некоторых или любых вариантах осуществления антитело к склеростину, описываемое в данном документе, предпочтительно модулирует функцию склеростина в клеточном анализе, описанном в патентной публикации США № 2007/0110747, и/или в *in vivo* анализе, описанном в патентной публикации США № 2007/0110747, и/или связывается с одним или несколькими из эпитопов, описанных в патентной публикации США № 2007/0110747, и/или перекрестно блокирует связывание одного из антител, описанных в патентной публикации США № 2007/0110747, и/или перекрестно блокируется связыванием склеростина одним из антител, описанных в патентной публикации США № 2007/0110747 (включенных посредством ссылки в их полном объеме и с целью описания анализов для определения характеристик антитела к склеростину).

"CDR" относится к определяющей комплементарности области в переменных последовательностях антитела. Имеется три CDR в каждой из переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, которые обозначают CDR1, CDR2 и CDR3 для каждой из переменных областей. Термин "набор из шести CDR", как используется в данном документе, относится к группе из трех CDR, которые встречаются в переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи, которые способны связывать антиген. Точные границы CDR определены по-разному, в зависимости от разных систем. Система, описанная Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд. США (1987) и (1991)) не только обеспечивает однозначную систему нумерации остатков, применимую к любой переменной области антитела, но также обеспечивает точные границы остатков, определяющие три CDR. Эти CDR могут называться CDR согласно Kabat. Chothia и соавторы (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), и Chothia et al., *Nature* 342:877-883 (1989)) обнаружили, что некоторые субфрагменты в CDR согласно Kabat принимают почти идентичные конформации пептидного остова, несмотря на большое разнообразие на уровне аминокислотной последовательности. Эти субфрагменты были обозначены как L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, где "L" и "H" обозначают области легкой цепи и тяжелой цепи, соответственно. Эти области могут называться CDR согласно Chothia, границы которых перекрываются с CDR согласно Kabat. Другие границы, определяющие CDR, перекрывающиеся с CDR согласно Kabat, были описаны Padlan (*FASEB J.* 9:133-139 (1995)) и MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):73245 (1996)). Тем не менее, другие определения границ CDR могут не строго соответствовать одной из вышеперечисленных систем, однако, тем не менее, будут перекрываться с CDR согласно Kabat, хотя они могут быть укорочены или удлинены в свете прогноза или экспериментальных данных о том, что отдельные остатки, или группы остатков, или даже целые CDR не оказывают значительного влияния на связывание антигена. В применяемых в данном документе способах могут использоваться CDR, определенные в соответствии с любой из этих систем, хотя в предпочтительных вариантах осуществления используют CDR, определенные согласно Kabat или Chothia.

CDR получают, например, путем конструирования полинуклеотидов, которые кодируют CDR, представляющую интерес. Такие полинуклеотиды получают, например, с использованием полимеразной цепной реакции для синтеза переменной области с использованием mRNA клеток продуцирующих антитела, в качестве матрицы (см., например, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2:106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," в *Monoclonal Antibodies Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), page 166, Cambridge University Press (1995) и Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," в *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al., (eds.), page 137, Wiley-Liss, Inc. (1995)).

В различных аспектах антитело содержит по меньшей мере одну последовательность CDR, харак-

теризующуюся по меньшей мере 75% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичностью) по отношению к CDR, выбранной из CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2, CDR-H2 имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, CDR-H3 имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, CDR-L1 имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, CDR-L2 имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6, и CDR-L3 имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7. Антитело к склеростину в различных аспектах содержит две из CDR или шесть из CDR.

В предпочтительном варианте осуществления антитело к склеростину содержит набор из следующих шести CDR: CDR-H1 под SEQ ID NO: 2, CDR-H2 под SEQ ID NO: 3, CDR-H3 под SEQ ID NO: 4, CDR-L1 под SEQ ID NO: 5, CDR-L2 под SEQ ID NO: 6 и CDR-L3 под SEQ ID NO: 7.

В некоторых или любых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 75% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичностью) по отношению к аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 9, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 75% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичностью) по отношению к аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 10. В различных аспектах различие последовательности по сравнению с SEQ ID NO: 9 или 10 лежит вне области CDR в соответствующих последовательностях. В некоторых или любых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10.

В некоторых или любых вариантах осуществления антитело к склеростину содержит всю тяжелую цепь или ее часть (например, две тяжелых цепи), содержащие аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 75% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичностью) по отношению к аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 16, и всю легкую цепь или ее часть (например, две легких цепи), содержащие аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 75% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичностью) по отношению к аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12.

Антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) на С-конце тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления С-конец обеих тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8), и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность дикого типа. Антитело в различных аспектах содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 12, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 13.

В качестве альтернативы в некоторых или любых вариантах осуществления антитело содержит последовательность аминокислот, содержащую Pro-Ala-Arg-Gly-Lys (SEQ ID NO: 11) на С-конце тяжелой цепи, необязательно на С-конце обеих тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly-Lys (SEQ ID NO: 11), и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность дикого типа (т.е. без С-концевой Pro-Ala-Arg-Gly-Lys (SEQ ID NO: 11)). Антитело в различных аспектах содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 12, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 14.

Примеры других антител к склеростину включают без ограничения антитело к склеростину, раскрытые в международных патентных публикациях №№ WO 2008/092894, WO 2008/115732, WO 2009/056634, WO 2009/047356, WO 2010/100200, WO 2010/100179, WO 2010/115932 и WO 2010/130830 (каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в ее полном объеме).

Специалисту в данной области будет понятно, что некоторые белки, такие как антитела, могут подвергаться ряду посттрансляционных модификаций. Тип и степень таких модификаций часто зависит от линии клетки-хозяина, используемой для экспрессии белка, а также условий культивирования. Такие модификации могут включать вариации в гликозилировании, окислении метионина, образовании дикетопиперидина, изомеризации аспартата и деамидировании аспарагина. Частой модификацией является утрата карбокси-концевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) вследствие действия карбоксипептидаз (как описано у Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995).

Другие модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп сериловых или треонильных остатков, метилирование α-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (Т.Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983], полностью включенная посредством ссылки), ацетилирование N-

концевого амина и амидирование любой С-концевой карбоксильной группы.

В некоторых или любых вариантах осуществления С-конец тяжелой цепи антитела, содержащего аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8), является амидированным. В некоторых или любых вариантах осуществления обе тяжелых цепи антитела содержат аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8), и при этом обе тяжелых цепи являются амидированными. В некоторых вариантах осуществления глицин является амидированным. Амидирование может происходить, например, как описано у Prigg, S. T. et al., "New insights into copper monoxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function", *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1236-1259. Фермент пептидилглицин- α -амидирующая монооксигеназа (PAM) может катализировать амидирование глицина. PAM имеет два активных домена -пептидилглицин- α -гидроксилирующую монооксигеназу (PHM) и пептидил- α -гидроксилиглицин- α -амидирующую лиазу (PAL). PHM катализирует превращение пептидилглицин (вместе с аскорбатом и кислородом) в пептидил- α -гидроксилиглицин (вместе с семидегидроаскорбатом и водой). В свою очередь, PAL катализирует превращение пептидил- α -гидроксилиглицина в амидированный пептид (и глиоксилат).

Амидирование антитела можно контролировать, изменяя определенные условия в процессе культивирования клеток. Например, уровни меди (например, в железо-аммонийном цитрате) и/или кислорода можно использовать для воздействия на уровни амидирования. Предполагается, что увеличение концентрации меди (например, в среде) или доступности кислорода (например, во время культивирования) может усиливать амидирование, влияя на активность фермента, такого как PHM.

Фармацевтические композиции

В настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию антител, описанного в данном документе, вместе с фармацевтически эффективными разбавителем, носителем, растворителем, эмульгатором, консервантом и/или вспомогательным средством. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции.

В настоящем изобретении также представлена фармацевтическая композиция, содержащая смесь антител, которые специфически связываются со склеростином под SEQ ID NO: 1, и фармацевтически приемлемый носитель, где приблизительно 3-5% антител в композиции составляют популяцию антител, описанных в данном документе (например, антител, содержащих набор из шести CDR, представленных под SEQ ID NO: 2-7, и имеющих тяжелую цепь (или две тяжелых цепи), содержащую аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) на С-конце тяжелой(-ых) цепи(-ей)). Настоящее изобретение также охватывает композиции, содержащие альтернативные количества (например, 5-10%, 1-3%, 3-15%, 2-10%, 4-20%, 1-5%) популяции антител, описанных в данном документе (например, антител, содержащих набор из шести CDR, представленных под SEQ ID NO: 2-7, и имеющих тяжелую цепь (или две тяжелых цепи), содержащую аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) на С-конце тяжелой(ых) цепи(ей)).

В некоторых вариантах осуществления менее чем 70% антител популяции (например, приблизительно 69%, приблизительно 68%, приблизительно 67%, приблизительно 66%, приблизительно 65%, приблизительно 64%, приблизительно 63%, приблизительно 62%, приблизительно 61%, приблизительно 60%, приблизительно 59%, приблизительно 58%, приблизительно 57%, приблизительно 56%, приблизительно 55%, приблизительно 54%, приблизительно 53%, приблизительно 52%, приблизительно 51%, приблизительно 50%, приблизительно 49%, приблизительно 48%, приблизительно 47%, приблизительно 46%, приблизительно 45%, приблизительно 44%, приблизительно 43%, приблизительно 42%, приблизительно 41%, приблизительно 40%, приблизительно 39%, приблизительно 38%, приблизительно 37%, приблизительно 36%, приблизительно 35%, приблизительно 34%, приблизительно 33%, приблизительно 32%, приблизительно 31%, приблизительно 30%, приблизительно 29%, приблизительно 28%, приблизительно 27%, приблизительно 26%, приблизительно 25%, приблизительно 24%, приблизительно 23%, приблизительно 22%, приблизительно 21%, приблизительно 20%, приблизительно 19%, приблизительно 18%, приблизительно 17%, приблизительно 16%, приблизительно 15%, приблизительно 14%, приблизительно 13%, приблизительно 12%, приблизительно 11%, приблизительно 10%, приблизительно 9%, приблизительно 8%, приблизительно 7%, приблизительно 6%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2%, приблизительно 1% или меньше) содержат тяжелую цепь, содержащую С-концевую последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8), которая необязательно амидирована. В некоторых вариантах осуществления менее чем 35% (например, приблизительно 34%, приблизительно 33%, приблизительно 32%, приблизительно 31%, приблизительно 30%, приблизительно 29%, приблизительно 28%, приблизительно 27%, приблизительно 26%, приблизительно 25%, приблизительно 24%, приблизительно 23%, приблизительно 22%, приблизительно 21%, приблизительно 20%, приблизительно 19%, приблизительно 18%, приблизительно 17%, приблизительно 16%, приблизительно 15%, приблизительно 14%, приблизительно 13%, приблизительно 12%, приблизительно 11%, приблизительно 10%, приблизительно 9%, приблизительно 8%, приблизительно 7%, приблизительно 6%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2%, приблизительно 1% или

меньше) антител популяции, содержат С-концевую последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) на обеих тяжелых цепях, где обе тяжелые цепи необязательно амидированы. Также предусматривается, что обе тяжелых цепи содержат С-концевую последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8), но только одна из цепей является амидированной. В некоторых вариантах осуществления менее чем 35% (например, приблизительно 34%, приблизительно 33%, приблизительно 32%, приблизительно 31%, приблизительно 30%, приблизительно 29%, приблизительно 28%, приблизительно 27%, приблизительно 26%, приблизительно 25%, приблизительно 24%, приблизительно 23%, приблизительно 22%, приблизительно 21%, приблизительно 20%, приблизительно 19%, приблизительно 18%, приблизительно 17%, приблизительно 16%, приблизительно 15%, приблизительно 14%, приблизительно 13%, приблизительно 12%, приблизительно 11%, приблизительно 10%, приблизительно 9%, приблизительно 8%, приблизительно 7%, приблизительно 6%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2%, приблизительно 1% или меньше) антител в композиции содержат С-концевую последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8), которая не является амидированной. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 33% антител популяции содержат С-концевую последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8), которая является амидированной, приблизительно 33% антител популяции содержат С-концевую последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) на обеих тяжелых цепях, обе из которых являются амидированными, и приблизительно 33% антител популяции содержат тяжелую(е) цепь(и) с С-концевой последовательностью Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8), но которая не является амидированной.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит материалы для составления, предназначенные для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В таких вариантах осуществления подходящие материалы для составления включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, пролин или лизин); противомикробные вещества; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как боратный, бикарбонатный, Tris-HCl, цитратные, фосфатные буферы или буферы на основе других органических кислот); объемобразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); окрашивающие, ароматизирующие и разбавляющие средства; эмульгирующие средства, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (как например, натрия); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или смачивающие средства (такие как плуроники, PEG, сложные эфиры сорбита, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тринитротолуол, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал); средства, увеличивающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); среденосители для доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адьюванты. См., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

Выбор конкретных материалов для составления, описанных в данном документе, может определяться, например, предполагаемым путем введения, форматом доставки и требуемой дозировкой. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES выше. Основная среда-носитель или основной носитель в фармацевтической композиции могут являться либо водными, либо неводными по своей природе. Например, подходящими средой-носителем или носителем могут являться вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно дополненная другими материалами, традиционно используемыми в композициях для парентерального введения. Нейтральный буферный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, являются дополнительным примером сред-носителей. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат Tris-буфер со значением pH, составляющим приблизительно 7,0-8,5, или ацетатный буфер со значением pH, составляющим приблизительно 4,0-5,5, и могут дополнительно содержать сорбит или его подходящий заменитель. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть получена для хранения путем смешивания выбранной композиции, обладающей требуемой степенью чистоты, с необязательными средствами для составления (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в виде лиофилизированной таблетки или водного раствора. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент может быть составлен в виде лиофилизата с использованием соответствующих вспомогательных веществ, таких как сахароза.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть выбраны для парентеральной доставки. В качестве альтернативы могут быть выбраны композиции для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например перорально. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах компетенции специалиста в данной области. Компоненты состава предпочтительно присутствуют в концентрациях, которые приемлемы для участка введения. В определенных вариантах осуществления для поддержания композиции при физиологическом рН или при немного более низком рН, как правило, рН в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 8, используются буферы.

Если предполагается парентеральное введение, то терапевтические композиции для применения в настоящем изобретении могут предусматриваться в виде апирогенного, приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего требуемое антитело или фрагмент в фармацевтически приемлемой среде-носителе. Особенно подходящей средой-носителем для парентерального введения является стерильная дистиллированная вода, в которой антитело или фрагмент составляют в виде стерильного, изотонического раствора, сохраняемого должным образом. В определенных вариантах осуществления имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств могут использоваться для введения требуемого антитела или фрагмента.

В некоторых или любых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, содержит соль кальция, ацетатный буфер, многоатомный спирт и поверхностно-активное вещество. Иллюстративные соли кальция включают без ограничения ацетат кальция, карбонат кальция и хлорид кальция. В некоторых вариантах осуществления соль кальция находится в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,5 мМ, по меньшей мере 1 мМ, по меньшей мере 2 мМ, по меньшей мере 3 мМ, по меньшей мере 4 мМ, по меньшей мере 5 мМ, по меньшей мере 6 мМ, по меньшей мере 7 мМ, по меньшей мере 8 мМ, по меньшей мере 9 мМ или по меньшей мере 10 мМ. В определенных вариантах осуществления концентрация соли кальция составляет не более чем 11 мМ, не более чем 12 мМ, не более чем 13 мМ, не более чем 14 мМ, не более чем 15 мМ, не более чем 16 мМ, не более чем 17 мМ, не более чем 18 мМ, не более чем 19 мМ, не более чем 20 мМ, не более чем 21 мМ, не более чем 22 мМ, не более чем 23 мМ, не более чем 24 мМ или не более чем 25 мМ. Предусмотрен любой диапазон, характеризующийся комбинацией вышеуказанных конечных точек, включающей без ограничения от приблизительно 0,5 мМ до приблизительно 10 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит ацетатный буфер (например, ацетат натрия), характеризующийся диапазоном концентраций от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 1000 мМ (1 М). В некоторых вариантах осуществления концентрация ацетатного буфера составляет по меньшей мере 5 мМ, по меньшей мере 6 мМ, по меньшей мере 7 мМ, по меньшей мере 8 мМ, по меньшей мере 9 мМ, по меньшей мере 10 мМ, по меньшей мере 15 мМ, по меньшей мере 60 мМ, по меньшей мере 70 мМ, по меньшей мере 80 мМ, по меньшей мере 90 мМ, по меньшей мере 100 мМ, по меньшей мере 200 мМ, по меньшей мере 500 мМ, по меньшей мере 700 мМ или по меньшей мере 900 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация ацетатного буфера составляет не более чем 10 мМ, не более чем 15 мМ, не более чем 20 мМ, не более чем 25 мМ, не более чем 30 мМ, не более чем 35 мМ, не более чем 40 мМ, не более чем 45 мМ, не более чем 50 мМ, не более чем 55 мМ, не более чем 60 мМ, не более чем 65 мМ, не более чем 70 мМ, не более чем 75 мМ, не более чем 80 мМ, не более чем 85 мМ, не более чем 90 мМ, не более чем 95 мМ или не более чем 100 мМ. Предусмотрен любой диапазон, характеризующийся комбинацией вышеуказанных конечных точек, включающей без ограничения от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ, или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ, или от приблизительно 10 мМ до приблизительно 25 мМ. Буфер предпочтительно добавляется до концентрации, которая поддерживает рН около 5-6, или 5-5,5, или 4,5-5,5. Если соль кальция в составе представляет собой ацетат кальция, то в некоторых вариантах осуществления общая концентрация ацетата составляет от приблизительно 10 мМ до приблизительно 55 мМ или от приблизительно 20 мМ до приблизительно 40 мМ.

В некоторых аспектах фармацевтическая композиция предусматривает общую концентрацию ацетата, которая составляет по меньшей мере приблизительно 10 мМ, по меньшей мере приблизительно 15 мМ, по меньшей мере приблизительно 20 мМ, по меньшей мере приблизительно 25 мМ, по меньшей мере приблизительно 30 мМ, по меньшей мере приблизительно 35 мМ, по меньшей мере приблизительно 40 мМ, 45 мМ или 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация ацетата составляет не более чем приблизительно 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ или 90 мМ. Предусмотрен любой диапазон, характеризующийся комбинацией вышеупомянутых конечных точек, в том числе без ограничения от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 40 мМ, от приблизительно 30 мМ до приблизительно 50 мМ или от приблизительно 30 мМ до приблизительно 75 мМ. В некоторых вариантах осуществления солью кальция является ацетат кальция, а ацетатным буфером является ацетат натрия. В качестве неограничивающего примера, раствор, содержащий 10 мМ ацетата кальция, будет содержать 20 мМ аниона ацетата и 10 мМ катиона кальция по причи-

не двухвалентной природы катиона кальция, тогда как раствор, содержащий 10 мМ ацетата натрия, будет содержать 10 мМ катиона натрия и 10 мМ аниона ацетата.

В некоторых вариантах осуществления общая концентрация ионов (катионов и анионов) в растворе составляет по меньшей мере 10 мМ, по меньшей мере приблизительно 15 мМ, по меньшей мере приблизительно 20 мМ, по меньшей мере приблизительно 25 мМ, по меньшей мере приблизительно 30 мМ, по меньшей мере приблизительно 35 мМ, по меньшей мере приблизительно 40 мМ, по меньшей мере приблизительно 45 мМ, по меньшей мере приблизительно 50 мМ, по меньшей мере приблизительно 55 мМ, по меньшей мере приблизительно 60 мМ, по меньшей мере приблизительно 65 мМ, по меньшей мере приблизительно 70 мМ, по меньшей мере приблизительно 75 мМ, по меньшей мере приблизительно 80 мМ или по меньшей мере приблизительно 85 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация ионов составляет не более чем приблизительно 30 мМ, не более чем приблизительно 35 мМ, не более чем приблизительно 40 мМ, не более чем приблизительно 45 мМ, не более чем приблизительно 50 мМ, не более чем приблизительно 55 мМ, не более чем приблизительно 60 мМ, не более чем приблизительно 65 мМ, не более чем приблизительно 70 мМ, не более чем приблизительно 75 мМ, не более чем приблизительно 80 мМ, не более чем приблизительно 85 мМ, не более чем приблизительно 90 мМ, не более чем приблизительно 95 мМ, не более чем приблизительно 100 мМ, не более чем приблизительно 110 мМ, не более чем приблизительно 120 мМ, не более чем приблизительно 130 мМ, не более чем приблизительно 140 мМ, не более чем приблизительно 150 мМ, не более чем приблизительно 160 мМ, не более чем приблизительно 170 мМ, не более чем приблизительно 180 мМ, не более чем приблизительно 190 мМ или не более чем приблизительно 200 мМ. Предусмотрен любой диапазон, характеризующийся комбинацией вышеупомянутых конечных точек, в том числе без ограничения от приблизительно 30 мМ до приблизительно 60 мМ, или от приблизительно 30 мМ до приблизительно 70 мМ, или от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ, или от приблизительно 40 мМ до приблизительно 150 мМ, или от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ. В качестве неограничивающего примера раствор 10 мМ ацетата кальция будет иметь общую концентрацию ионов 30 мМ (10 мМ катионов и 20 мМ анионов).

В некоторых или любых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит многоатомный спирт. Многоатомные спирты охватывают класс вспомогательных веществ, который включает сахара (например, маннит, сахарозу, сорбит) и другие многоатомные спирты (например, глицерин и пропиленгликоль). Иллюстративные многоатомные спирты включают без ограничения пропиленгликоль, глицерин (глицерол), треозу, трент, эритрозу, эритрит, рибозу, арабинозу, арабит, ликсозу, мальтит, сорбит, сорбозу, глюкозу, маннозу, маннит, левулозу, декстрозу, мальтозу, трегалозу, фруктозу, ксилит, инозит, галактозу, ксилозу, фруктозу, сахарозу, 1,2,6-гексантриол и т.п. Высшие сахара включают без ограничения декстран, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Восстанавливающие сахара, такие как фруктоза, мальтоза или галактоза, окисляются быстрее, чем невосстанавливающие сахара. Дополнительными примерами сахарных спиртов являются глюцит, мальтит, лактит или изомальтулоза. Дополнительные иллюстративные лиопротекторы включают глицерин и желатин, а также сахара меллибиозу, мелецитозу, раффинозу, маннотриозу и стахиозу. Примеры восстанавливающих сахаров включают глюкозу, мальтозу, лактозу, мальтулозу, изомальтулозу и лактулозу. Примеры невосстанавливающих сахаров включают невосстанавливающие гликозиды полигидроксисоединений, выбранные из сахарных спиртов и других многоатомных спиртов с прямой цепью. Моногликозиды включают соединения, полученные восстановлением дисахаридов, таких как лактоза, мальтоза, лактулоза и мальтулоза.

В некоторых или любых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит многоатомный спирт в концентрации, варьирующей от приблизительно 0% до приблизительно 40% вес./об. В некоторых или любых вариантах осуществления композиции содержат многоатомный спирт в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30 или по меньшей мере 40% вес./об. В некоторых или любых вариантах осуществления композиции содержат многоатомный спирт в концентрации от приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9% до приблизительно 10% вес./об. В некоторых или любых вариантах осуществления композиции содержат многоатомный спирт в концентрации от приблизительно 2% до приблизительно 6% вес./об. В некоторых или любых вариантах осуществления композиции содержат многоатомный спирт в концентрации приблизительно 4% вес./об. В некоторых или любых вариантах осуществления композиции содержат многоатомный спирт при приблизительно 6% вес./об.

В некоторых или любых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество. Иллюстративные поверхностно-активные средства включают без ограничения анионные, катионные, неионные, цвиттерионные и амфотерные поверхностно-активные вещества, включающие поверхностно-активные вещества, полученные из встречающихся в природе аминокислот. Анионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия, хенодезоксихолевою кислоту, натриевую соль N-лауроилсаркозина, додецилсульфат лития, натриевую соль 1-октансульфоновой кислоты, гидрат

холата натрия, дезоксихолат натрия и натриевую соль гликодезоксихолево́й кислоты. Катионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения хлорид бензалкония или хлорид бензетония, моногидрат хлорида цетилпиридиния и бромид гексадецилтриметиламмония. Цвиттерионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения CHAPS, CHAPSO, SB3-10 и SB3-12. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают без ограничения дигитонин, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20 и TWEEN-80. В другом варианте осуществления поверхностно-активные вещества включают без ограничения лауромакрогол 400, полиоксил-40-стеарат, полиоксиэтилен-10, -40, -50 и -60-гидрогенизированное касторовое масло, моностеарат глицерина, полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65 и полисорбат 80, соевый лецитин и другие фосфолипиды, такие как DOPC, DMPG, DMPC и DOPG; сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. В некоторых или любых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20.

Поверхностно-активные вещества могут быть включены в композиции либо отдельно, либо в виде смеси в различных соотношениях. В некоторых или любых вариантах осуществления композиция содержит поверхностно-активное вещество в концентрации, составляющей от приблизительно 0% до приблизительно 5% вес./об. (например, приблизительно 0,001, приблизительно 0,002, приблизительно 0,005, приблизительно 0,007, приблизительно 0,01, приблизительно 0,05, приблизительно 0,1, приблизительно 0,2, приблизительно 0,3, приблизительно 0,4, приблизительно 0,5, приблизительно 0,6, приблизительно 0,7, приблизительно 0,8, приблизительно 0,9, приблизительно 1,0, приблизительно 1,5, приблизительно 2,0, приблизительно 2,5, приблизительно 3,0, приблизительно 3,5, приблизительно 4,0 или приблизительно 4,5% вес./об.). В некоторых или любых вариантах осуществления композиция содержит поверхностно-активное вещество в концентрации от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,5% вес./об. В некоторых или любых вариантах осуществления композиция содержит поверхностно-активное вещество в концентрации, составляющей приблизительно 0,004, приблизительно 0,005, приблизительно 0,007, приблизительно 0,01, приблизительно 0,05 или от приблизительно 0,1% вес./об. до приблизительно 0,2% вес./об. В некоторых или любых вариантах осуществления композиция содержит поверхностно-активное вещество в концентрации от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% вес./об.

В некоторых или любых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит 55 мМ ацетата, 13 мМ кальция, 6,0% (вес./об.) сахарозы, 0,006% (вес./об.) полисорбата 20, причем pH составляет 5,2.

Специалистам в данной области будут очевидны дополнительные фармацевтические композиции, включая составы, содержащие антигенсвязывающие белки, в виде составов, обеспечивающих замедленную или контролируемую доставку. Также специалистам в данной области известны методики составления ряда других средств с замедленной или контролируемой доставкой, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и депо-инъекции. См., например, международную патентную заявку № PCT/U S93/00829, которая включена посредством ссылки и описывает контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Матрицы для замедленного высвобождения могут включать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (раскрытые в патенте США № 3773919 и публикации заявки на европейский патент № EP058481, каждый из которых включен посредством ссылки), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Bio-polymers* 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 и Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация заявки на Европейский патент № EP133988). Композиции с замедленным высвобождением могут также включать липосомы, которые могут быть получены с помощью любого из нескольких способов, известных из уровня техники. См., например, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3688-3692; публикации заявок на европейские патенты №№ EP 036676; EP 088046 и EP 143949, включенные посредством ссылки.

Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, как правило, предусмотрены в виде стерильных препаратов. Стерилизация может быть достигнута посредством фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации. В случае если композицию лиофилизируют, то стерилизацию с помощью данного способа можно выполнять либо перед лиофилизацией и восстановлением, либо после них. Композиции для парентерального введения могут храниться в лиофилизированной форме или в виде раствора. Обычно композиции для парентерального введения помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет или флакон для внутривенного раствора с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Свободные аминокислоты можно использовать в составах антитела или фрагмента в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения в качестве объемобразующих средств, стабилизаторов и антиоксидантов, а также для других стандартных вариантов применения. Лизин, пролин, серин и аланин могут использоваться для стабилизации белков в составе. Глицин пригоден в лиофилизации для обеспечения надлежащей структуры и свойств таблетки. Аргинин может быть пригоден для ингибирования агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Метионин при-

годен в качестве антиоксиданта.

Варианты осуществления составов антитела дополнительно предусматривают один или несколько антиоксидантов. В некоторой степени вредное окисление белков может быть предупреждено в фармацевтических составах путем поддержания надлежащих уровней кислорода и температуры окружающей среды и избегания воздействия света. Антиоксидантные вспомогательные вещества также могут применяться для предупреждения окислительной деградации белков. К числу применимых в данном отношении антиоксидантов относятся восстанавливающие средства, поглотители кислорода/свободных радикалов и хелатирующие средства. Антиоксиданты для применения в составах на основе терапевтического белка в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно являются водорастворимыми и сохраняют свою активность на протяжении всего срока годности продукта. В данном отношении EDTA является предпочтительным антиоксидантом в соответствии с настоящим изобретением.

Составы в соответствии с настоящим изобретением могут включать ионы металлов, которые являются белковыми кофакторами и которые необходимы для образования белковых координационных комплексов, таких как цинк, необходимый для образования определенных суспензий инсулина. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые разрушают белки. Однако ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, которые разрушают белки.

Ионы магния (10-120 мМ) могут использоваться для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту. Ионы Ca^{+2} (не более 100 мМ) могут повышать стабильность дезоксирибонуклеазы человека. Однако Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} могут дестабилизировать rhDNase. Аналогичным образом, Ca^{+2} и Sr^{+2} могут стабилизировать фактор VIII, при этом он может дестабилизироваться за счет ионов Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} , и его агрегация может быть увеличена за счет ионов Al^{+3} .

Варианты осуществления составов антитела могут дополнительно предусматривать один или несколько консервантов.

После того, как фармацевтическая композиция была составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла или в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к применению форме, либо в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением. Настоящее изобретение также предусматривает наборы для получения единицы введения в виде однократной дозы. Каждый набор по настоящему изобретению может содержать как первый контейнер с сухим белком, так и второй контейнер с водным составом. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидким содержимым и шприцы с лиофилизатом).

Терапевтически эффективное количество подлежащей применению фармацевтической композиции, содержащей антитело, будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалист в данной области будет принимать во внимание, что соответствующие уровни дозирования для лечения, отчасти, будут варьироваться в зависимости от доставляемой молекулы, показания(-ий), для которого(-ых) применяют антитело, пути введения и размера (веса тела, площади поверхности тела или размера органа) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента.

Стабильность

Термины "стабильность" и "стабильный", используемые в данном документе в контексте композиции, содержащей антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), относятся к устойчивости антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) в композиции к агрегации, разложению или фрагментации при данных условиях изготовления, получения, транспортировки и/или хранения. Составы антител с высокой степенью стабильности демонстрируют повышенную надежность и безопасность и, как таковые, являются предпочтительными для клинического применения.

Стабильность антитела в композиции необязательно оценивают путем исследования требуемого параметра антитела в композиции (например, агрегации, разложения тяжелых и/или легких цепей, химической модификации и т.д.) с течением времени. В данном отношении параметр обычно исследуют и сравнивают в начальный момент времени (T_0) и момент времени оценки (T_1), необязательно во время воздействия на антитело любого из ряда условий окружающей среды. Начальным моментом времени может являться, например, время, когда антитело впервые составляют в композицию или впервые изучают в отношении качества (т.е. изучают, чтобы определить, соответствует ли композиция на основе антитела нормативным или производственным спецификациям в отношении агрегации или разложения). Начальным моментом времени также может являться время, когда антитело повторно составляют в композицию (например, повторно составляют с более высокой или более низкой концентрацией по сравнению с исходным препаратом). Моментом времени оценки является в различных вариантах осуществления приблизительно 1 неделя (или приблизительно 2 недели, или приблизительно 3 недели, или приблизительно 4 недели, или приблизительно 5 недель, или приблизительно 6 недель, или приблизительно 7 недель, или приблизительно 8 недель, или приблизительно 10 недель, или приблизительно 3 месяца, или приблизительно 6 месяцев, или приблизительно 1 год) после начального момента времени. Требуемый параметр (например, агрегация или разложение) антитела или его фрагмента в композиции может быть оценена при различных условиях хранения, таких как температуры -30°C , 4°C , 20°C или 40°C ,

встряхивание, pH, хранение в контейнерах из различных материалов (например, стеклянных флаконах, предварительно заполненных шприцах и т.д.) и т.п.

Иллюстративные способы определения степени агрегации, и/или типов, и/или размеров агрегатов, присутствующих в композиции, содержащей антитело, включают без ограничения эксклюзионную хроматографию (SEC), высокоэффективную эксклюзионную хроматографию (HPSEC), статическое рассеяние света (SLS), инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье (FTIR), круговой дихроизм (CD), методики индуцированного мочевиной разворачивания белка, флуоресценцию собственного триптофана, дифференциальную сканирующую калориметрию и методики связывания белка с 1-анилино-8-нафталинсульфоновой кислотой (ANS). Эксклюзионная хроматография (SEC) может быть выполнена для разделения молекул на основе их размера путем пропускания молекул через колонку, заполненную соответствующей смолой, при этом более крупные молекулы (например, агрегаты) будут элюироваться раньше, чем более мелкие молекулы (например, мономеры). Молекулы обычно выявляют по поглощению УФ-излучения при 280 нм, и при этом они могут быть собраны для дальнейшего определения характеристик. Колонки жидкостной хроматографии высокого давления часто используют для анализа SEC (HP-SEC). В качестве альтернативы может использоваться аналитическое ультрацентрифугирование (AUC). AUC представляет собой ортогональную методику, которая определяет коэффициенты седиментации макромолекул в жидком образце. Подобно SEC, AUC способно отделять и выявлять фрагменты/агрегаты антител от мономеров и, кроме того, может предоставлять информацию о молекулярной массе. Также можно определять характеристики агрегации антител в композиции с помощью анализа подсчета частиц с использованием счетчика Коултера или с помощью измерений мутности с использованием турбидиметра. Мутность представляет собой меру значения, на которое частицы в растворе рассеивают свет, и, таким образом, может использоваться в качестве общего индикатора агрегации белка. Кроме того, электрофорез в полиакриламидном геле при невозстанавливающих условиях (PAGE) или капиллярный гель-электрофорез (CGE) можно использовать для определения характеристик состояния агрегации и/или фрагментации антител или фрагментов антител в композиции.

Иллюстративные способы определения разложения антител включают без ограничения эксклюзионную хроматографию (SEC), электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), капиллярный электрофорез с SDS (CE-SDS) и HPLC с обращенной фазой с совмещенным выявлением MS.

В различных вариантах осуществления менее чем 5% антитела, описанного в данном документе, в композиции находится в агрегированной форме в условиях, представляющих интерес. Например, менее чем 4%, или менее чем 3%, или менее чем 2%, или менее чем 1% антитела в композиции находится в агрегированной форме после хранения при -30°C, 4°C, 20°C или 40°C на протяжении периода времени приблизительно 1 неделя (или приблизительно 2 недели, или приблизительно 3 недели, или приблизительно 4 недели, или приблизительно 5 недель, или приблизительно 6 недель, или приблизительно 7 недель, или приблизительно 8 недель, или приблизительно 10 недель, или приблизительно 3 месяца, или приблизительно 6 месяцев, или приблизительно 1 год). В некоторых вариантах осуществления менее чем 5% (или менее чем 4%, или менее чем 3%, или менее чем 2%, или менее чем 1% или меньше) антитела, описанного в данном документе, в композиции находится в агрегированной форме после хранения на протяжении двух недель при приблизительно 4°C.

Например, по меньшей мере 85% (или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%) антитела в композиции необязательно находится в неагрегированной (т.е. мономерной) форме после хранения при -30°C, 4°C, 20°C или 40°C на протяжении периода времени приблизительно 1 неделя (или приблизительно 2 недели, или приблизительно 3 недели, или приблизительно 4 недели, или приблизительно 5 недель, или приблизительно 6 недель, или приблизительно 7 недель, или приблизительно 8 недель, или приблизительно 10 недель, или приблизительно 3 месяца, или приблизительно 6 месяцев, или приблизительно 1 год). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 85% (или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% или больше) антитела в композиции необязательно находится в неагрегированной форме после двух недель хранения при приблизительно 4°C. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 99% антитела находится в композиции в неагрегированной форме после хранения на протяжении двух недель при приблизительно 4°C, и/или по меньшей мере 95% антитела находится в композиции в неагрегированной форме после хранения на протяжении двух недель при 40°C.

В различных вариантах осуществления менее чем 5% антитела, описанного в данном документе, разлагается в композиции. Например, менее чем 4%, или менее чем 3%, или менее чем 2%, или менее чем 1% или меньше антитела в композиции разлагается в условиях, представляющих интерес. Например, необязательно по меньшей мере 85% (или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по

меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%) антител являются интактными (т.е. не разлагаются) в композиции, хранящейся при приблизительно -30°C , приблизительно 4°C , приблизительно 20°C или приблизительно 40°C на протяжении периода приблизительно 1 неделя (или приблизительно 2 недели, или приблизительно 3 недели, или приблизительно 4 недели, или приблизительно 5 недель, или приблизительно 6 недель, или приблизительно 7 недель, или приблизительно 8 недель, или приблизительно 10 недель, или приблизительно 3 месяца, или приблизительно 6 месяцев, или приблизительно 1 год). В некоторых аспектах по меньшей мере 85% (или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% или больше) антител являются интактными (т.е. не разлагаются) после хранения в композиции при приблизительно 4°C на протяжении периода времени две недели. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 99% антител сохраняются интактными при хранении в композиции при приблизительно 4°C на протяжении двух недель и/или по меньшей мере 95% сохраняются интактными при хранении в композиции при приблизительно 40°C на протяжении двух недель.

В данном документе также рассматривается функциональная стабильность или стабильность активности антитела в композиции. Анализы для выявления и/или количественной оценки, например, связывания антитела с мишенью или нейтрализации склеростина, известны из уровня техники. Необязательно, антитело демонстрирует приблизительно 50-100% активности в условиях, представляющих интерес, по сравнению с активностью антитела в начальный момент времени. Например, антитело сохраняет уровень активности от приблизительно 60-90% или 70-80% по сравнению с активностью в начальный момент времени. Соответственно, функциональная стабильность антитела включает сохранение активности, составляющей по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%, и может включать измерения активности, составляющей более чем 100%, например, 105%, 110%, 115%, 120%, 125% или 150% или больше по сравнению с активностью в начальный момент времени.

Вязкость

В некоторых вариантах осуществления определяют вязкость композиции, содержащей одно или несколько антител, описанных в данном документе. Термин "вязкость", используемый в данном документе, относится к "абсолютной вязкости". Абсолютная вязкость, иногда называемая динамической или простой вязкостью, является произведением кинематической вязкости и плотности жидкости (абсолютная вязкость=кинематическая вязкость \times плотность). Размерность кинематической вязкости представляет собой L^2/T , где L представляет собой длину, и T представляет собой время. Обычно кинематическая вязкость выражается в сантистоксах (сСт). Единицей измерения кинематической вязкости в системе СИ является $\text{мм}^2/\text{с}$, что составляет 1 сСт. Абсолютная вязкость выражается в сантипуазах (сП). Единицей измерения абсолютной вязкости в системе СИ является миллипаскаль-секунда (мПа·с), где 1 сП=1 мПа·с.

Вязкость композиции может измеряться часами (например, 1-23 ч), днями (например, 1-10 дней), неделями (например, 1-5 недель), месяцами (например, 1-12 месяцев) или годами (например, 1-2 года, 1-3 года) после добавления антитела к композиции. Измерения вязкости можно проводить при температуре хранения или введения, например, $2-8^{\circ}\text{C}$ или 25°C (комнатная температура). В некоторых вариантах осуществления абсолютная вязкость жидкой или восстановленной жидкой композиции при температуре хранения и/или введения составляет 15 сП или меньше, или 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 сП или меньше. В некоторых вариантах осуществления абсолютная вязкость жидкой или восстановленной жидкой композиции составляет 6 сП или меньше.

В некоторых вариантах осуществления вязкость композиции на основе антитела измеряют до и после добавления антитела. Способы измерения вязкости хорошо известны из уровня техники и включают, например, использование капиллярного вискозиметра или вискозиметра с системой "конус-плоскость". Можно применять любой способ, при условии, что тот же способ применяется для сравнения тестируемого и эталонного составов.

Терапевтические способы

Антитело и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, применимы для лечения или предупреждения заболеваний, связанных с костями, таких как заболевания, связанные с костями, ассоциированные с аномальной активностью остеобластов или остеокластов. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят субъекту, страдающему нарушением, связанным с костями, из группы, состоящей из ахондроплазии, клейдокраниального дизостоза, энхондроматоза, фиброзной дисплазии, болезни Гоше, гипофосфатемического рахита, синдрома Марфана, множественных наследственных экзостозов, нейрофиброматоза, несовершенного остеогенеза, остеопетроза, остеопойкилоза, склеротических поражений, псевдоартроза, гнойного остеомиелита, заболевания пародонта, потери костной массы, вызванная противоэпилептическими лекарственными средствами, первичного и вторичного гиперпаратиреоза, синдромов семейного гиперпаратиреоза, потери костной массы, вызванной невесомостью, остео-

пороза у мужчин, постменопаузальной потери костной массы, остеоартрита, почечной остеодистрофии, инфилтративных нарушений кости, утраты костной массы в ротовой полости, остеонекроза челюсти, ювенильной болезни Педжета, мелореостоза, метаболических заболеваний костей, мастоцитоза, серповидноклеточной анемии/болезни, потери костной массы, связанной с трансплантацией органов, потери костной массы, связанной с трансплантацией почки, системной красной волчанки, анкилозирующего спондилита, эпилепсии, ювенильных артритов, талассемии, мукополисахаридозов, болезни Фабри, синдрома Тернера, синдрома Дауна, синдрома Клайнфельтера, проказы, болезни Пертэ, юношеского идиопатического сколиоза, мультисистемного воспалительного заболевания младенческого возраста, синдрома Винчестера, болезни Менкеса, болезни Вильсона, ишемической болезни кости (например, болезни Легга-Кальве-Пертеса и регионарного мигрирующего остеопороза), анемических состояний, состояний, вызванных стероидами, потери костной массы, вызванной глюкокортикоидами, потери костной массы, вызванной гепарином, нарушений костного мозга, цинги, недоедания, дефицита кальция, остеопороза, остеопении, алкоголизма, хронического заболевания печени, состояния в постменопаузе, хронических воспалительных состояний, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, воспалительного колита, болезни Крона, олигоменореи, аменореи, потери костной массы, связанной с беременностью, сахарного диабета, гипертиреоза, нарушений щитовидной железы, нарушений паращитовидной железы, болезни Кушинга, акромегалии, гипогонадизма, иммобилизации или бездействия, синдрома рефлекторной симпатической дистрофии, регионарного остеопороза, остеомалации, потери костной массы, ассоциированной с заменой суставов, потери костной массы, ассоциированной с ВИЧ, потери костной массы, ассоциированной с утратой гормона роста, потери костной массы, ассоциированной с кистозным фиброзом, потери костной массы, ассоциированной с химиотерапией, потери костной массы, вызванной опухолью, потери костной массы, связанной с раком, гормональной абляционной потери костной массы, множественной миеломы, потери костной массы, вызванной лекарственными средствами, нервной анорексии, потери лицевой костной ткани, ассоциированной с заболеванием, потери краниальной костной ткани, ассоциированной с заболеванием, потери костной ткани челюсти, связанной с заболеванием, потери костной ткани черепа, связанной с заболеванием, потери костной ткани, ассоциированной со старением, потери лицевой костной ткани, ассоциированной со старением, потери краниальной костной ткани, ассоциированной со старением, потери костной ткани челюсти, ассоциированной со старением, потери костной ткани черепа, ассоциированной со старением, и потери костной ткани, ассоциированной с космическим полетом.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, применимы для улучшения исходов в ортопедических процедурах, дентальных процедурах, имплантационной хирургии, замене суставов, пересадке кости, косметической хирургии костей и восстановлении костей, например, сращении перелома, сращении несрачиваемого перелома, излечении замедленного сращения и реконструкции лица. Композиция, содержащая одно или несколько антител, может быть введена до, в ходе и/или после процедуры, замены, пересадки, хирургического вмешательства или восстановления.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, применимы для лечения любого перелома, содержащего щель между двумя сегментами кости (например, щель размером по меньшей мере приблизительно 1 мм между двумя сегментами кости). В некоторых или любых вариантах осуществления щель составляет по меньшей мере приблизительно 2 мм, по меньшей мере приблизительно 3 мм, по меньшей мере приблизительно 4 мм, по меньшей мере приблизительно 5 мм, по меньшей мере приблизительно 6 мм, по меньшей мере приблизительно 7 мм, по меньшей мере приблизительно 8 мм, по меньшей мере приблизительно 9 мм или по меньшей мере приблизительно 1 см или больше. В некоторых или любых вариантах осуществления щель составляет от приблизительно 5 мм до 1 см или не более 1 см. Термины "дефект костной щели" и "сегментарный дефект скелета" используются в данном документе как синонимы и относятся к щели между двумя сегментами кости (например, щель, составляющая по меньшей мере 1 мм).

Иллюстративные дефекты костной щели включают без ограничения оскольчатый перелом, несрачивающийся перелом, сегментарный дефект скелета, хирургически созданные дефекты кости, дефекты кости при хирургическом лечении и дефекты кости, возникшие в результате травматического повреждения кости или заболевания (в том числе без ограничения артрит, удаление опухоли (резекция) или устранение инфекции). В некоторых или любых вариантах осуществления дефект костной щели возникает в результате удаления инфицированных участков кости или удаления рака из кости, вызванного формами рака кости, включая без ограничения остеосаркому, саркому Юинга, хондросаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому, фибросаркому и хордому. В некоторых или любых вариантах осуществления дефект костной щели является пороком развития, например, из-за генетического дефекта.

В некоторых или любых вариантах осуществления дефект костной щели возникает в результате удаления участков кости, содержащих доброкачественную опухоль. Иллюстративные доброкачественные опухоли кости включают без ограничения остеоому, остеонидную остеоому, остеобластоому, остеохондрому, энхондрому, хондромиксоидную фиброму, аневризматическую кисту кости, однокамерную кисту кости, фиброзную дисплазию кости и гигантоклеточную опухоль кости.

Введение антитела усиливает или ускоряет заживление дефекта костной щели, "излечивая" тем са-

мым дефект костной щели. "Усиление" заживления кости означает опосредование уровня заживления кости, превышающего (т.е. выше чем) уровень заживления кости, наблюдаемый у субъектов (например, млекопитающих, таких как люди), которым не вводили ингибитор склеростина (т.е. у контрольных субъектов). Заживление кости подтверждается, например, состоянием заполнения, улучшенным объемом кости, улучшенным содержанием минеральных веществ в кости и их плотностью в щели перелома (т.е. формированием заполнения кости), созревшей костной мозолю, улучшенной прочностью кости (необязательно сопровождаемой клинически приемлемым уровнем жесткости кости) или улучшенным использованием пациентом пораженного участка. Под "улучшенным" подразумевается увеличение или уменьшение (по требованию) измеряемого параметра. Увеличение может являться возвращением, полностью или частично, измеренного параметра к исходному уровню (например, уровню до дефекта костной щели), к значениям, указанным в нормативных базах данных, используемых в уровне техники, или к контралатеральному функциональному уровню (например, возвращение, полное или частичное, к функциональным возможностям, например, контралатеральной конечности). В некоторых случаях увеличение может являться улучшением по сравнению с исходным уровнем. Если требуется, измеренные параметры у пациентов, которым вводили одну или несколько доз антитела, можно сравнивать с такими параметрами у пациентов с переломами (необязательно, совпадающих по возрасту и полу), которым не вводили антитело, для дальнейшего анализа эффективности способов, описанных в данном документе.

Формирование заполнения кости, содержание минеральных веществ в кости и плотность кости и/или созревшая костная мозоль на участке костного дефекта могут быть измерены с помощью рентгенографии (например, рентгеновской абсорбтометрии), одно- и/или двухэнергетической рентгеновской абсорбтометрии, количественной компьютерной томографии (QCT), ультразвуковой сонографии, рентгенографии (например, рентгенографической абсорбтометрии) и магниторезонансной визуализации. В некоторых вариантах осуществления антитело можно вводить в дозе и в течение периода времени, эффективных для усиления формирования заполнения кости, образования костной мозоли или плотности (или объема) кости в участке дефекта на по меньшей мере приблизительно 5% (приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8% или приблизительно 9%). В некоторых вариантах осуществления формирование заполнения кости, образование костной мозоли или плотность кости в участке дефекта усиливается на по меньшей мере приблизительно 10% (например, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 12%, по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 18%, по меньшей мере приблизительно 20% или по меньшей мере приблизительно 22%). В других вариантах осуществления формирование заполнения кости, образование костной мозоли или плотность кости в участке дефекта усиливается ингибитором склеростина на по меньшей мере приблизительно 25% (например, по меньшей мере приблизительно 26% или по меньшей мере приблизительно 28%). В следующих вариантах осуществления формирование заполнения кости, образование костной мозоли или плотность кости в участке дефекта усиливается на по меньшей мере приблизительно 30% (например, на по меньшей мере приблизительно 32%, на по меньшей мере приблизительно 35%, на по меньшей мере приблизительно 38% или на по меньшей мере приблизительно 40%) или на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 60%, на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 80%, на по меньшей мере приблизительно 90% или приблизительно 100%). Усиление или восстановление формирования заполнения кости можно определить через 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели после первоначального введения антитела. В качестве альтернативы, уровень плотности кости можно определить после окончания периода лечения (например, через 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели после окончания периода лечения). В одном аспекте способ сокращает количество времени, необходимого для установления требуемого уровня формирования кости, объема кости, костной мозоли или плотности кости (например, любого процентного повышения формирования кости, плотности минеральных веществ кости, костной мозоли или объема кости, описанных в данном документе), по сравнению с пациентами того же возраста и пола, которые не получают антитело, сокращая тем самым время восстановления для субъекта. Например, в одном варианте осуществления антитело сокращает количество времени, необходимое для повышения плотности или объема кости в участке дефекта на по меньшей мере приблизительно 10% (например, на по меньшей мере приблизительно 20%, на по меньшей мере приблизительно 25%, на по меньшей мере приблизительно 30%, на по меньшей мере приблизительно 35%, на по меньшей мере приблизительно 40%, на по меньшей мере приблизительно 45% или на по меньшей мере приблизительно 50%).

Антитело не обязательно излечивает субъекта от нарушения или полностью защищает от проявления заболевания, связанного с костями, для достижения полезного биологического ответа. Антитело можно использовать в профилактических целях, что означает защиту, полностью или частично, от нарушения, связанного с костями, или его симптома. Антитело также можно использовать терапевтически для облегчения, полностью или частично, нарушения, связанного с костями, или его симптома, или для защиты, полностью или частично, от дальнейшего прогрессирования нарушения, связанного с костями, или его симптома. Действительно, материалы и способы по настоящему изобретению особенно применимы для повышения плотности минеральных веществ кости и необязательно для поддержания повышенной плотности минеральных веществ кости в течение определенного периода времени.

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько введений антитела, описанного в данном документе, осуществляют в течение терапевтического периода времени, например, от приблизительно 1 недели до приблизительно 18 месяцев (например, от приблизительно 1 месяца до приблизительно 12 месяцев, от приблизительно 1 месяца до приблизительно 9 месяцев, или от приблизительно 1 месяца до приблизительно 6 месяцев, или от приблизительно 1 месяца до приблизительно 3 месяцев). В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят одну или несколько доз антитела, описанного в данном документе, в течение терапевтического периода, например, от приблизительно 1 месяца до приблизительно 12 месяцев (52 недели) (например, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев или приблизительно 11 месяцев).

Кроме того, может быть полезным введение нескольких доз антитела или увеличение интервала между введением доз в зависимости от терапевтического режима, выбранного для конкретного субъекта. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент вводят периодически в течение одного года (12 месяцев, 52 недели) или меньше (например, 9 месяцев или меньше, 6 месяцев или меньше или 3 месяца или меньше). В данном отношении антитело или его фрагмент вводят человеку один раз каждые приблизительно 3 дня, или приблизительно 7 дней, или 2 недели, или 3 недели, или 4 недели, или 5 недель, или 6 недель, или 7 недель, или 8 недель, или 9 недель, или 10 недель, или 11 недель, или 12 недель, или 13 недель, или 14 недель, или 15 недель, или 16 недель, или 17 недель, или 18 недель, или 19 недель, или 20 недель, или 21 неделю, или 22 недели, или 23 недели, или 6 месяцев, или 12 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления одну или несколько доз антитела вводят в некотором количестве и на протяжении времени, эффективных для повышения плотности минеральных веществ кости или лечения нарушения кости, связанного с пониженной плотностью минеральных веществ кости. В различных вариантах осуществления одну или несколько доз, содержащих от приблизительно 50 миллиграммов до приблизительно 1000 миллиграммов антитела, вводят субъекту за неделю (например, субъекту-человеку). Например, доза антитела может содержать по меньшей мере приблизительно 5 мг, 15 мг, 25 мг, 50 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 210 мг, приблизительно 240 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 280 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 420 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 650 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 750 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 850 мг, приблизительно 900 мг, приблизительно 950 мг или не более чем приблизительно 1000 мг антитела. Также охватываются диапазоны между любыми и всеми из этих конечных точек, например, от приблизительно 50 мг до приблизительно 80 мг, от приблизительно 70 мг до приблизительно 140 мг, от приблизительно 70 мг до приблизительно 270 мг, от приблизительно 75 мг до приблизительно 100 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 150 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 210 мг, или от приблизительно 150 мг до приблизительно 200 мг, или от приблизительно 180 мг до приблизительно 270 мг, или от приблизительно 280 до приблизительно 410 мг. Дозу вводят с любым интервалом, например, несколько раз в неделю (например, два или три раза в неделю), один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели. В некоторых или любых вариантах осуществления дозу антитела, варьирующую от приблизительно 120 мг до приблизительно 210 мг, вводят дважды в неделю. В некоторых или любых вариантах осуществления дозу, составляющую приблизительно 140 мг антитела, вводят дважды в неделю. В различных аспектах дозу, составляющую приблизительно 210 мг антитела, вводят один раз в месяц.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько доз антитела могут содержать от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 миллиграммов (например, от приблизительно 5 до приблизительно 50 миллиграммов) или от приблизительно 1 до приблизительно 100 миллиграммов антитела на килограмм веса тела (мг/кг). Например, доза антитела может содержать по меньшей мере приблизительно 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 26 мг/кг, приблизительно 27 мг/кг, приблизительно 28 мг/кг, приблизительно 29 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 31 мг/кг, приблизительно 32 мг/кг, приблизительно 33 мг/кг, приблизительно 34 мг/кг, приблизительно 35 мг/кг, приблизительно 36 мг/кг, приблизительно 37 мг/кг, приблизительно 38 мг/кг, приблизительно 39 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг, приблизительно 41 мг/кг, приблизительно 42 мг/кг, приблизительно 43 мг/кг, приблизительно 44 мг/кг, приблизительно 45 мг/кг, приблизительно 46 мг/кг, приблизительно 47 мг/кг, приблизительно 48 мг/кг, или приблизительно 49 мг/кг, или приблизительно 50 мг/кг, приблизительно 55 мг/кг, приблизительно 60 мг/кг, приблизительно 65 мг/кг, приблизительно 70 мг/кг, приблизительно 75 мг/кг, приблизительно 80 мг/кг, приблизительно 85 мг/кг, приблизительно 90 мг/кг, приблизительно 95 мг/кг или не более чем приблизительно 100 мг/кг. Также охватываются диапазоны между любыми и всеми из этих конечных точек, например, от прибли-

тельно 1 мг/кг до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 8 мг/кг, от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 8 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг или от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг.

Мониторинговая терапия

Опосредованные антителами повышения содержания минеральных веществ в костях или плотности костей можно измерить с помощью одно- и двухэнергетической рентгеновской абсорбтометрии, ультразвука, компьютерной томографии, рентгенографии и магниторезонансной визуализации. Количество костной массы также можно рассчитать по весу тела или с помощью других способов (см. Guinness-Heu, *Metab. Bone Dis. Relat. Res.*, 5:177-181 (1984)). Животные модели используют в данной области для тестирования влияния фармацевтических композиций и способов, например, на параметры потери костной ткани, резорбции костной ткани, формирования кости, прочности кости или минерализации кости, которые имитируют состояния заболевания человека, такого как остеопороз и остеопения. Примеры таких моделей включают модель крысы с удаленными яичниками (Kalu, *Bone and Mineral*, 15:175-192 (1991); Frost and Jee, *Bone and Mineral*, 18:227-236 (1992) и Jee and Yao, *J. Musculoskel. Neuron. Interact.*, 1:193-207 (2001)). Способы измерения активности антител, описанные в данном документе, также можно применять для определения эффективности других ингибиторов склеростина.

У людей плотность минеральных веществ кости можно определить клинически с помощью двойной рентгеновской абсорбциометрии (DXA), например бедра и позвоночника. Другие способы включают количественную компьютерную томографию (QCT), ультразвуковую сонографию, одноэнергетическую рентгеновскую абсорбциометрию (SXA) и радиографическую абсорбциометрию. Общие центральные участки скелета для измерения включают позвоночник и бедро; периферические участки включают предплечье, палец, запястье и пятку. Американская медицинская ассоциация отмечает, что за исключением ультразвуковой сонографии методики BMD обычно предусматривают использование рентгеновских лучей и основаны на том принципе, что ослабление излучения зависит от толщины и состава тканей на пути излучения. Все методики предусматривают сравнение результатов с нормативной базой данных.

В качестве альтернативы физиологический ответ на одно или несколько антител к склеростину можно измерить путем мониторинга уровней маркеров кости. Маркеры кости представляют собой продукты, созданные в процессе ремоделирования кости и высвобождаемые костью, остеобластами и/или остеокластами. Колебания уровней "маркера" резорбции кости и/или образования кости включают изменения в ремоделировании/моделировании кости. Международный фонд остеопороза (IOF) рекомендует использовать маркеры кости для терапевтических средств мониторинга плотности кости (см., например, Delmas et al., *Osteoporos Int.*, Suppl. 6:S2-17 (2000), включенную в данный документ посредством ссылки). Маркеры, указывающие на резорбцию кости (или активность остеокластов), включают, например, С-телопептид (например, С-концевой телопептид коллагена 1 типа (CTX) или сывороточный перекрестноноситель С-телопептид), N-телопептид (N-концевой телопептид коллагена 1 типа (NTX)), дезоксипиридинолин (DPD), пиридинолин, мочевой гидроксипролин, галактозилгидроксизин и устойчивую к тартрату кислотную фосфатазу (например, изоформу 5b сывороточной кислотной фосфатазы, устойчивой к тартрату). Маркеры формирования/минерализации кости включают без ограничения костно-специфическую щелочную фосфатазу (BSAP), пептиды, высвобождаемые из N- и С-концевого удлинения проколлагена I типа (P1NP, PICP), и остеокальцин (OstCa). На рынке имеется несколько наборов для выявления и количественной оценки маркеров в клинических образцах, таких как моча и кровь.

Комбинированная терапия

Лечение патологии путем объединения двух или более средств, нацеленных на один и тот же патоген, или биохимический путь, или биологический процесс, иногда приводит к большей эффективности и уменьшению побочных эффектов по сравнению с применением терапевтически релевантной дозы каждого средства отдельно. В некоторых случаях эффективность комбинации лекарственных средств является аддитивной (эффективность комбинации приблизительно равна сумме эффектов каждого лекарственного средства отдельно), но в других случаях эффект является синергетическим (эффективность комбинации превышает сумму эффектов каждого лекарственного средства отдельно). Используемый в данном документе термин "комбинированная терапия" означает, что два или более средства доставляют совместно, например одновременно, или когда сперва вводят одно средство, а затем второе средство, например последовательно.

В некоторых вариантах осуществления антитело вводят вместе со стандартом лечебного терапевтического средства для лечения пониженной плотности минеральных веществ кости (т.е. антитело и стандарт лечебного терапевтического средства являются частью одного и того же плана лечения). Используемый в данном документе термин "стандарт лечения" относится к лечению, которое обычно принимается клиницистами для определенного типа пациента, у которого диагностирован тип заболевания. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят вместе со вторым укрепляющим кость средством, применимым для лечения пониженной плотности минеральных веществ кости или дефекта кости. В некоторых вариантах осуществления средство, усиливающее кость, выбрано из группы, состоящей из ан-

тирезорбтивного средства, костеобразующего средства (т.е. анаболического), модулятора рецептора эстрогена (в том числе без ограничения ралоксифена, базедоксифена и лазофоксифена) и лекарственного средства, которое оказывает ингибиторный эффект в отношении остеокластов. В некоторых вариантах осуществления второе средство, усиливающее кость, выбрано из группы, состоящей из бисфосфоната (в том числе без ограничения алендроната натрия (FOSAMAX®), ризедроната, ибандроната натрия (BONIVA®) и золедроновой кислоты (RECLAST®)); эстрогена или аналога эстрогена; ингибитора лиганда против RANK (RANKL), такого как антитело против RANKL (например, деносумаб, PROLIA®); витамина D, или его производного, или его миметика; источника кальция, ингибитора катепсина-K (кат-К) (например, оданакатиба), тиболона, кальцитонина или кальцитриола; а также гормональной заместительной терапии. В некоторых вариантах осуществления второе средство, усиливающее кость, включает без ограничения гормон паращитовидной железы (PTH) или его пептидный фрагмент, PTH-родственный белок (PTHrp), костный морфогенетический белок, остеогенин, NaF, агонист PGE2, статины, ранелат стронция и ингибитор склеростина (например, антитело к склеростину, описанное, например, в патентах США №№ 7592429 или 7872106). В некоторых вариантах осуществления второе средство, усиливающее кость, представляет собой Forteo® (терипаратид), Preotact® или Protelos®. В некоторых вариантах осуществления второе средство, усиливающее кость, включает морфогенетический белок кости (например, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14 и/или BMP-15).

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия с использованием антитела, описанного в данном документе, может предшествовать введению или следовать за введением дополнительного(-ых) терапевтического(-их) средства(-ств) (например, второго средства, усиливающего кость) с интервалами, варьирующими от минут до недель и месяцев. Например, отдельные методы лечения вводят в пределах приблизительно 24 ч друг от друга, например, в пределах приблизительно 6-12 часов друг от друга, или в пределах приблизительно 1-2 ч друг от друга, или в пределах приблизительно 10-30 минут друг от друга. В некоторых ситуациях может быть желательно значительно продлить период времени лечения, когда проходит от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель) между соответствующими введениями различных методов лечения. В частности, предусматривается повторное лечение одним или обоими средствами/терапевтическими средствами комбинированной терапии.

Поддерживающий терапевтический режим

Также предусмотрено применение второго средства, усиливающего кость, и/или антитела, описанных в данном документе, в поддерживающем режиме, например, для предупреждения или замедления утраты плотности минеральных веществ кости. В данном отношении способ или применение, описанные в данном документе, необязательно предусматривают введение одного или нескольких количеств второго средства, усиливающего кость, эффективных для поддержания плотности минеральных веществ кости, на протяжении поддерживающего периода, составляющего от приблизительно 1 недели до приблизительно 5 лет после окончания периода лечения антителом. Например, в некоторых вариантах осуществления способ или применение, описанные в данном документе, предусматривают введение второго средства, усиливающего кость, субъекту на протяжении поддерживающего периода, составляющего по меньшей мере приблизительно 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 5 недель, приблизительно 6 недель, приблизительно 7 недель, приблизительно 8 недель, приблизительно 9 недель, приблизительно 10 недель, приблизительно 11 недель, приблизительно 12 недель, приблизительно 3 месяца, приблизительно 13 недель, приблизительно 14 недель, приблизительно 15 недель, приблизительно 16 недель, приблизительно 4 месяца, приблизительно 17 недель, приблизительно 18 недель, приблизительно 19 недель, приблизительно 20 недель, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 21 неделю, приблизительно 22 недели, приблизительно 23 недели, приблизительно 24 недели, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 25 недель, приблизительно 26 недель, приблизительно 27 недель, приблизительно 28 недель, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 29 недель, приблизительно 30 недель, приблизительно 31 неделю или дольше (например, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, приблизительно 1 год, приблизительно 15 месяцев, приблизительно 18 месяцев, приблизительно 2 года, приблизительно 3 года, приблизительно 4 года, приблизительно 5 лет или дольше (например, на протяжении жизни субъекта)). В некоторых вариантах осуществления поддерживающий период составляет приблизительно 6-12 недель. В некоторых вариантах осуществления поддерживающий период составляет приблизительно 4-12 недель или приблизительно 1-3 месяца. В некоторых вариантах осуществления поддерживающий период составляет приблизительно 12-20 недель или приблизительно 3-5 месяца. В некоторых вариантах осуществления поддерживающий период составляет приблизительно 20-32 недель или приблизительно 5-8 месяца. В некоторых вариантах осуществления поддерживающий период составляет приблизительно 24-36 недель или приблизительно 6-9 месяца. В некоторых вариантах осуществления поддерживающий период составляет приблизительно 1 год, приблизительно 2 года, приблизительно 3 года, приблизительно 4 года, приблизительно 5 лет или дольше. "Поддерживание" плотности

минеральных веществ кости предусматривает поддержание подобных уровней параметров плотности минеральных веществ кости, наблюдаемых у субъекта, получавшего лечение антителом.

Наборы

Фармацевтическая композиция, содержащая одно или несколько антител, описанных в данном документе, может быть помещена в контейнеры (например, флаконы или шприцы) вместе с упаковочным материалом, который предусматривает инструкции в отношении применения таких фармацевтических композиций. Как правило, такие инструкции будут включать конкретную формулировку, описывающую концентрацию антитела, а также в определенных вариантах осуществления относительные количества вспомогательных ингредиентов или разбавителей (например, воды, солевого раствора или PBS), которые могут потребоваться для воспроизведения фармацевтической композиции.

Примеры

Пример 1. Анализ С-концевого варианта ромосозумаба PARG.

Ромосозумаб дикого типа и С-концевой вариант ромосозумаба PARG расщепляли с помощью Lys-C и анализировали с помощью пептидного картирования с использованием LC/MS. УФ-профили этих двух конструкций сравнивали одновременно (Фиг. 3). Определяли, что ромосозумаб дикого типа и С-концевой вариант ромосозумаба PARG имеют подобный пик элюирования через 37,7 мин, однако определяли, что ромосозумаб дикого типа имеет массу 659,3 Да, а С-концевой вариант ромосозумаба PARG имеет массу 886,7 Да. Считалось, что большинство лизиновых (K) вариантов ромосозумаба (PGK) были удалены из процесса. Присутствие значительного количества амидированной формы С-концевого варианта ромосозумаба PARG (пик 828,6 Да) подтверждало, что эффективность амидирования зависела от последовательности при сравнении с последовательностью ромосозумаба PG дикого типа.

Затем С-концевой вариант PARG обрабатывали карбоксипептидазой (CP-B), анализировали с помощью способа CEX-HPLC и сравнивали с контролем С-концевого варианта PARG, который не обрабатывали с помощью CP-B. После обработки наблюдали значительный сдвиг для пиков элюирования на 17,5 мин и 21 мин, но не для пика на 24 мин (фиг. 4). Предполагалось, что 24-минутный пик представлял дважды амидированную форму, которая защищена от протеолитического разложения.

Пример 2. Обогащение С-концевого варианта.

Очистка или обогащение для различных видов ромосозумаба из композиции, содержащей ромосозумаб дикого типа и С-концевой вариант ромосозумаба PARG, достигалась фракционированием с помощью катионообменной хроматографии (CEX). CEX разделяла белки на основании различий в их поверхностных зарядах. При заданном наборе pH положительно заряженные варианты ромосозумаба дикого типа разделяли на катионообменной колонке (например, аналитической колонке Dionex Pro Pac WCX-10, 2,0 мм × 250 мм) и элюировали с использованием солевого градиента (например, подвижная фаза А: 10:90 (об./об.) ACN, 19 mM MES, pH 6,2; подвижная фаза В: 10:90 (об./об.) ACN, 19 mM MES, 250 mM NaCl, pH 6,2). Различные С-концевые варианты ромосозумаба заряжались по-разному, и более положительно заряженный вариант элюировался позже при CEX. Таким образом, порядок элюирования представлял собой: PG (дикого типа), Р-амид (амидированный пролин дикого типа), вариант PARG и PAR-амид. Коллектор фракций можно запрограммировать для сбора элюентов CEX, содержащих различные варианты, при разных значениях времени элюирования.

Пример 3. Анализ агрегации С-концевого варианта ромосозумаба PARG.

Без связи с какой-либо конкретной теорией предполагали, что поскольку С-концевой вариант PARG имеет высокий заряд - такие формы будут отталкивать неамидированные формы в композициях, снижая тем самым агрегацию в композиции.

Пул С-концевого варианта белка А ромосозумаба PARG анализировали параллельно с пулом белка А ромосозумаба дикого типа с использованием SEC-HPLC, способа эксклюзионной HPLC, который разделяет белки на основании различий в их гидродинамическом объеме (см. табл.).

| Молекула | % HMW |
|---------------------|-------|
| Пул AMG785 ARG ProA | 3,4% |
| Пул AMG785 WT ProA | 7,2% |

Данные продемонстрировали, что С-концевой вариант ромосозумаба PARG имеет менее высокомолекулярные частицы по сравнению с ромосозумабом дикого типа.

Пример 4. Анализ вязкости С-концевого варианта ромосозумаба PARG.

Растворы антител, содержащие С-концевой вариант ромосозумаба PARG или ромосозумаб дикого типа, измеряли с помощью конуса и пластины. Растворы концентрировали до 120 мг/мл в соответствии с приблизительным убыванием объема, и конечные концентрации определяли ($\pm 10\%$) с использованием оптической плотности белка при 280 нм (после разбавления до 0,1-1 единицы оптической плотности (AU)) и специфического для белка коэффициента экстинкции. Анализ вязкости выполняли на приборе Brookfield LV-DVIII с конусом и пластиной (Brookfield Engineering, Мидлборо, Массачусетс, США) с использованием шпинделя CP-40 и чашки для образца или реометра ARES-G2 (TA Instruments, Нью-Касл, Делавэр, США) с использованием шпинделя TA Smart Swar с конусом 2 градуса/пластиной. Все

измерения выполняли при 25°C и контролировали с помощью водяной бани, прикрепленной к чашке для образца. Многократные измерения вязкости собирали вручную в пределах определенного диапазона крутящего момента (10-90%) с помощью увеличения RPM шпинделя. Измерения усредняли с целью указания в отчете одного значения вязкости на образец для упрощения полученной диаграммы сравнения.

Пример 5. Анализ растворимости С-концевого варианта ромосозумаба PARG Чтобы определить влияние аминокислотной вариации варианта ромосозумаба PARG по сравнению с ромосозумабом дикого типа на растворимость при подкожной (SC) инъекции, выполняли диализный анализ растворимости как для ромосозумаба дикого типа, так и для С-концевого варианта ромосозумаба PARG параллельно. Этот скрининг включает диализ образца С-концевого варианта ромосозумаба PARG и образца ромосозумаба дикого типа в раствор, который имитирует pH и ионную силу пространства SC, а также мониторинг растворимости и физической стабильности антитела в этих условиях за короткий период времени. Образцы составляли при ~63 мг/мл в буфере для составления (pH 5,2). Затем каждый образец инъецировали в диализную кассету и подвергали диализу в буфере PBS для имитации пространства SC. Визуальные наблюдения проводили через 24 ч после первоначального диализа. Ромосозумаб дикого типа обычно демонстрировал осаждение через 24 ч.

Результаты показали, что обе молекулы осаждались в этом анализе, но С-концевой вариант PARG осаждался меньше и с меньшей скоростью. Это говорит о том, что этот вариант был более устойчивым к осаждению, чем дикий тип, хотя этот вариант не устраняет осаждение полностью.

Пример 6. Анализ диффузии С-концевого варианта ромосозумаба PARG Чтобы определить влияние аминокислотной вариации С-концевого варианта ромосозумаба PARG по сравнению с ромосозумабом дикого типа на диффузию из подкожного (SC) пространства, выполняли анализ с использованием Scissor (Pion Inc., Биллерика, Массачусетс, США). Этот анализ включал инъекцию образцов (С-концевого варианта ромосозумаба PARG или ромосозумаба дикого типа) при концентрации ~70 мг/мл в моделируемое SC пространство, состоящее из матрикса коллагена и гиалуроновой кислоты. Антитело способно диффундировать из этого матрикса через диализную мембрану в резервуар с карбонатным буфером при pH 7,4. Образцы собирали в моменты времени не более 3 дней и анализировали в каждый момент времени в отношении концентрации белка с помощью RP-HPLC. Полученные кривые зависимости концентрации белка от времени моделируют скорости диффузии из SC пространства. Кроме того, осаждение в матриксе SC контролировали визуально.

Как ромосозумаб дикого типа, так и С-концевой вариант ромосозумаба PARG тестировали в Scissor, как описано выше. Результаты, показанные на фиг. 5, указывают на то, что ромосозумаб дикого типа диффундирует из моделированного SC пространства с гораздо меньшей скоростью, и при этом больше ромосозумаба дикого типа остается в моделированном участке инъекции, чем С-концевого варианта ромосозумаба PARG.

Пример 7. Связывание FcRn.

FcRn, неонатальный Fc-рецептор, представляет собой гетеродимер, подобный MHC класса I, состоящий из трансмембранной а-цепи (гомологичной молекулам, подобным MHC класса I) и легкой цепи p2-микроглобулина. FcRn связывался с областью контакта между доменами C_H2 и C_H3 тяжелых цепей IgG в Fc-области молекулы IgG в умеренно кислых условиях (~pH 6) и высвобождал его при нейтральном pH (~7,4). Посредством этого сильно зависимо от pH взаимодействия FcRn опосредовал гомеостаз IgG у взрослых людей, поддерживая уровни IgG в сыворотке крови.

Анализ конкурентного связывания, анализ связывания AlphaScreen® (PerkinElmer, Сан-Хосе, Калифорния, США) использовали для оценки связывания Fc-домена ромосозумаба дикого типа и С-концевого варианта ромосозумаба PARG с FcRn. Анализ представлял собой гомогенный анализ усиления люминесценции при сближении на основе гранул ("Alpha"), который выявлял бимолекулярные взаимодействия. Анализ включал два типа гранул: акцепторную гранулу и донорную гранулу. Акцепторные гранулы были покрыты гидрогелем, который содержал производные тиоксена, а также хелат никеля, который связывался с гистидиновым доменом FcRn, меченого гистидином (FcRn-His). Донорные гранулы были покрыты гидрогелем, который содержал фталоцианин, фотосенсибилизатор и стрептавидин, который связывался с биотинилированным производным CHO Fc человека. Когда FcRn-His и биотинилированный Fc человека связывались вместе, - они приводили акцепторные и донорные гранулы в непосредственную близость. Когда лазерный луч воздействовал на этот комплекс - окружающий кислород превращался в синглетный кислород с помощью донорной гранулы. Если гранулы находились в непосредственной близости, то происходила передача энергии на акцепторную гранулу, что приводило в результате к выделению светового излучения (люминесценции), которое измеряли на устройстве для считывания планшетов, оборудованном для выявления сигнала AlphaScreen®.

Когда антитело присутствовало при концентрациях, достаточных для ингибирования связывания FcRn-His с биотинилированным Fc-доменом человека, наблюдалось дозозависимое уменьшение эмиссии при 570 нм. Связывание тестируемого образца относительно эталонного стандарта антитела определяли и регистрировали в виде % относительного связывания, и его можно было использовать для демонстрации целостности Fc-домена антитела. Предполагалось, что композиции, содержащие С-концевой вариант

PARG, будут характеризоваться подобной или лучшей кривой зависимости ответа от дозы, чем антитело дикого типа.

Результаты показаны на фиг. 6. Наблюдали, что и ромосозумаб дикого типа, и С-концевой вариант ромосозумаба PARG связывали FcRn сходным образом, и при этом на связывание FcRn не влияла мутация PARG.

Пример 8. Связывание FcγRIIa.

FcγRIIa представляет собой активирующий Fc рецептор, экспрессируемый на моноцитах, некоторых дендритных клетках, нейтрофилах, В-клетках, тромбоцитах и NK-клетках. FcγRIIa (CD32a) является наиболее широко распространенным FcγR с двумя внеклеточными Ig-подобными доменами и низкой аффинностью связывания с мономерным IgG. Имелись два распространенных аллельных варианта у людей, которые, как известно, существуют для FcγRIIa, экспрессирующие либо гистидин, либо аргинин в положении 131 (131H и 131R соответственно).

Анализ конкурентного связывания разрабатывали для оценки связывания ромосозумаба дикого типа и С-концевого варианта ромосозумаба PARG с FcγRIIa (131H). Анализ связывания FcγRIIa (131H) представлял собой гомогенный анализ усиления люминесценции при сближении на основе гранул (анализ связывания AlphaScreen® (PerkinElmer, Сан-Хосе, Калифорния, США), который выявлял бимолекулярные взаимодействия. Анализ включал 2 типа гранул: акцепторную гранулу и донорную гранулу. Акцепторные гранулы содержали хелат флуорофора европия и были покрыты гидрогелем, который содержал глутатион, который связывал рекомбинантный FcγRIIa-(131H)-глутатион-S-трансферазу человека (FcγRIIa (131H) - GST). Донорные гранулы были покрыты гидрогелем, который содержал фталоцианин, фотосенсибилизатор и стрептавидин, который связывался с биотинилированным IgG1 человека. Когда FcγRIIa (131H) - GST и биотинилированный IgG1 человека связывались вместе, они сближали акцепторные и донорные гранулы. Когда лазер воздействовал на этот комплекс -окружающий кислород превращался в синглетный кислород с помощью донорной гранулы. Когда акцепторные и донорные гранулы находились рядом - синглетный кислород диффундировал внутрь акцепторных гранул, что приводило к выделению светового излучения (люминесценции), которое измеряли на устройстве для считывания планшетов, оборудованном для выявления люминесцентного сигнала.

Когда антитело присутствовало при концентрациях, достаточных для ингибирования связывания FcγRIIa (131H) - GST с биотинилированным IgG1 человека, измеряли дозозависимое уменьшение эмиссии при 570 нм. Связывание тестируемого образца относительно эталонного стандарта антитела определяли и регистрировали в виде % относительного связывания, и его можно было использовать для демонстрации целостности Fc-домена антитела. Результаты показаны на фиг. 7. Наблюдали, что относительное связывание С-концевого варианта ромосозумаба PARG с FcγRIIa (131H) было намного выше, чем у ромосозумаба дикого типа.

Пример 9. Фармакокинетическое исследование мыши.

Чтобы оценить воздействие и биодоступность лекарственного средства *in vivo*, выполняли фармакокинетическое исследование однократной дозы на мышах. С-концевой вариант ромосозумаба PARG инъецировали либо внутривенно (через хвостовую вену), либо подкожно в дозе 1 мг/кг. С использованием девяти животных на группу отбор образцов в шахматном порядке позволял собирать данные за большое количество моментов времени без превышения максимального объема крови, который может быть взят от отдельного животного. В каждый момент времени брали 0,05 мл крови. У животных 1-3 образцы брали через 0,083, 24, 96 и 192 ч после введения дозы. У животных 4-6 образцы брали через 1, 48, 168 и 240 ч. У животных 7-9 образцы брали через 6, 72 и 192 ч. Сыворотку собирали из образца цельной крови и определяли концентрацию тестируемого соединения с помощью иммунологического анализа связывания, такого как ELISA (ферментный иммуносорбентный анализ). Изменения концентрации тестируемого соединения с течением времени можно использовать для расчета фармакокинетических параметров с помощью двухкомпарментного анализа. Параметры, представляющие интерес, включают без ограничения площадь под кривой концентрация в плазме-время (AUC), период полувыведения ($t_{1/2}$) и клиренс (CL) для каждой дозовой группы. Биодоступность можно определять как соотношение AUC для подкожной дозы и AUC для внутривенной дозы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфически связывается со склеростинном с SEQ ID NO: 1 и содержит набор из шести CDR с SEQ ID NO: 2-7, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) на С-конце тяжелой цепи.

2. Антитело по п.1, где антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

3. Антитело по п.1 или 2, где С-конец тяжелой цепи является амидированным.

4. Антитело по любому из пп.1-3, где С-конец обеих тяжелых цепей содержит аминокислотную последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8).
5. Антитело по п.4, где С-конец обеих тяжелых цепей является амидированным.
6. Антитело по любому из пп.1-5, содержащее аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 12 и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 13.
7. Антитело по п.1 или 2, где антитело содержит последовательность аминокислот, содержащую Pro-Ala-Arg-Gly-Lys (SEQ ID NO: 11) на С-конце тяжелой цепи, отличной от указанной в п.1.
8. Антитело по п.7, содержащее аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 12 и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 14.
9. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию антител по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.
10. Фармацевтическая композиция по п.9, где вся популяция антител или ее часть содержит одну тяжелую цепь, содержащую С-концевую последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8).
11. Фармацевтическая композиция по п.9, где вся популяция антител или ее часть содержит тяжелую цепь, содержащую С-концевую последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8), которая является амидированной.
12. Фармацевтическая композиция по п.11, где менее чем 35% популяции антител являются однократно амидированными.
13. Фармацевтическая композиция по п.9, где вся популяция антител или ее часть содержит С-концевую последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8) в обеих тяжелых цепях.
14. Фармацевтическая композиция по п.13, где вся популяция антител или ее часть содержит две тяжелые цепи, содержащие С-концевую последовательность Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8), являются амидированными по обоим тяжелым цепям.
15. Фармацевтическая композиция по п.14, где менее чем 35% популяции антител являются амидированными по обоим тяжелым цепям.
16. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-15, где менее чем 35% популяции антител содержат тяжелые цепи, которые не являются амидированными.
17. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-16, где 33% популяции антител не являются амидированными, 33% популяции антител содержит одну амидированную тяжелую цепь и 33% популяции антител содержит две амидированные тяжелые цепи.
18. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-17, дополнительно содержащая соль кальция, ацетатный буфер, многоатомный спирт и поверхностно-активное вещество.
19. Фармацевтическая композиция по п.18, где соль кальция содержит ацетат кальция.
20. Фармацевтическая композиция по п.18, где ацетатный буфер содержит ацетат натрия.
21. Фармацевтическая композиция по п.18, где многоатомный спирт содержит сахарозу.
22. Фармацевтическая композиция по п.18, где поверхностно-активное вещество содержит полисорбат 20.
23. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-22, дополнительно содержащая 55 мМ ацетата, 13 мМ кальция, 6,0% (мас./об.) сахарозы, 0,006% (мас./об.) полисорбата 20, рН составляет 5,2.
24. Способ повышения плотности минеральных веществ кости у пациента, предусматривающий введение пациенту композиции по любому из пп.9-23 в количестве, эффективном для повышения плотности минеральных веществ кости у пациента.

```

CCGGGTAAAT GAGCGGCCGC GTTTAAACGG
CCGGGTAAAT GAGCGGCCGC GTTTAAACGG
.....
CCGGGTAAAT GAGCGGCCGC GTTTAAACGG
P G K .

```

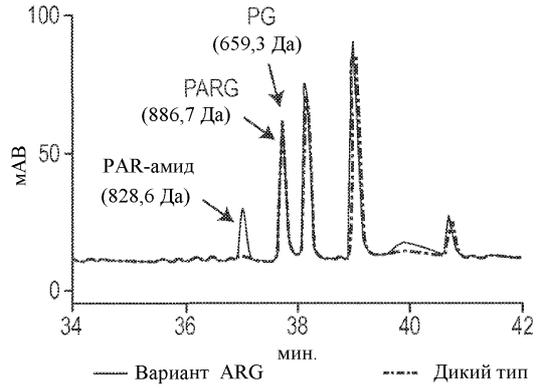
Фиг. 1

```

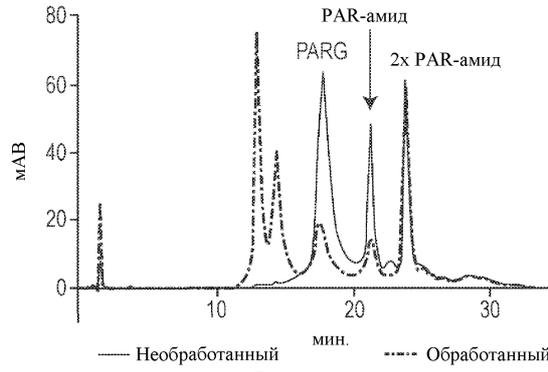
CCGGCTCGCG GTTGAGGACA AACTCTTCGC GGT
CCGGCTCGCG GTTGAGGACA AACTCTTCGC GGT
.....
CCGGCTCGCG GTTGAGGACA AACTCTTCGC GGT
P A R G .

```

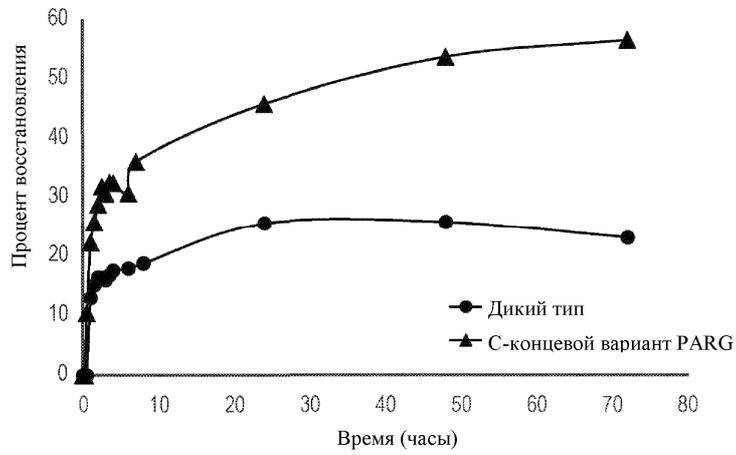
Фиг. 2



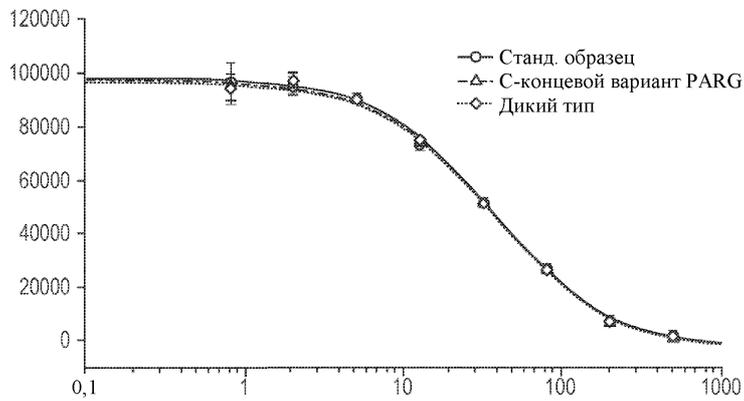
Фиг. 3



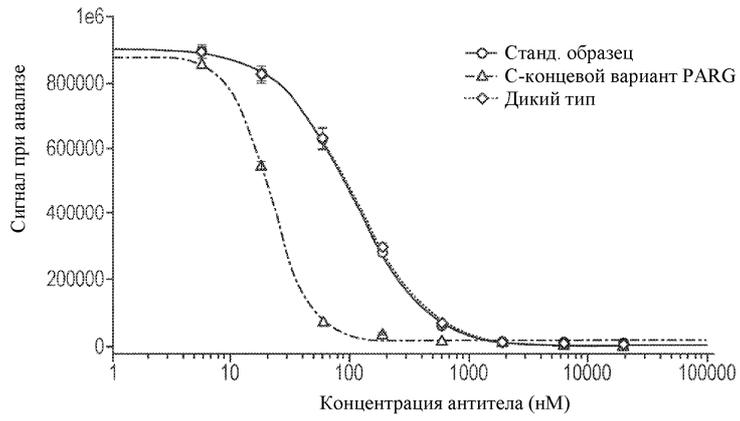
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

