

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091130** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.08.28

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.28

(54) **ЛИОФИЛИЗОВАННЫЙ ПРЕПАРАТ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К
ТРАНСТИРЕТИНУ**

(31) **62/592,294**

(32) **2017.11.29**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/062902**

(87) **WO 2019/108689 2019.06.06**

(71) Заявитель:
**ПРОТЕНА БИОСАЙЕНСИС
ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:

**Сото Джей (US), Хов Андреа,
Тантипольфан Рюдепорн (DE),
Хайндль Штефан (AT)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)**

(57) Данное изобретение предлагает препараты антител и способы, пригодные для профилактики или лечения транстиретинсвязанного амилоидоза.

A1

202091130

202091130

A1

ЛИОФИЛИЗОВАННЫЙ ПРЕПАРАТ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ТРАНСТИРЕТИНУ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по заявке США № 62/592294, поданной 29 ноября 2018 года, которая включена посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка включает в себя электронный перечень последовательностей в файле с именем 519102_SEQLIST.txt, созданным 28 ноября 2018 года, и содержащим 140679 байт, который включен посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Считается, что некоторые заболевания вызваны аномальным сворачиванием и агрегацией болезнь-специфических белков. Эти белки могут скапливаться в виде патологически диагностируемых накоплений, известных как амилоиды, которые визуализируются некоторыми гистологическими красителями. Считается, что амилоиды вызывают воспалительные реакции и имеют множество негативных последствий для вовлеченных тканей. Кроме того, могут существовать и оказывать цитотоксическое действие меньшие агрегаты аномально свернутого белка.

[0004] Транстиретин (ТТР) является одним из многих белков, которые, как известно, могут неправильно сворачиваться и агрегироваться (например, подвергаются амилоидогенезу). Транстиретин-опосредованный амилоидоз включает в себя две формы заболевания: наследственное заболевание, возникающее из-за неправильного сворачивания мутированного ТТР или варианта ТТР, а также спорадическое, негенетическое заболевание, вызванное неправильной агрегацией ТТР дикого типа. Процесс ТТР амилоидогенеза может вызвать патологию в нервной системе и/или сердце, а также в других тканях.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Данное изобретение предлагает фармацевтические препараты, которые содержат (а) моноклональное антитело, содержащее зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 61, и зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 70, за исключением того, что позиции H52 и L26

согласно нумерации Кабата могут независимо представлять собой N или S, или моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 16, причем антитело присутствует в концентрации в пределах диапазона от около 25 мг/мл до около 75 мг/мл; (b) буфер, присутствующий в концентрации около 20 мМ, причем буфер является цитратным, гистидиновым, фосфатным или сукцинатным; (c) сахар, присутствующий в концентрации в пределах диапазона от около 205 мМ до около 260 мМ, причем сахар является сахарозой или трегалозой или, если сахар отсутствует, присутствует около 160 мМ аргинина; и (d) поверхностно-активное вещество, присутствующее в концентрации в пределах диапазона от около 0,01% до около 1% по массе; причем препарат характеризуется рН в пределах диапазона от около 5,0 до около 6,5; при условии, что: (i) если присутствует гистидиновый или сукцинатный буфер, рН составляет около 6,0; (ii) если присутствует фосфатный буфер, рН составляет около 6,5; и (iii) если присутствуют гистидин и трегалоза, поверхностно-активное вещество представляет собой а. PS80; или б. PS20, при условии, что если присутствует PS20, то также присутствует около 25 мМ L-аргинина. Необязательно, препарат по существу не содержит маннита или сорбита. Необязательно, препарат, содержащий моноклональные антитела как описано в (а), по существу не содержит маннита и сорбита.

[0006] В некоторых препаратах, буфер является гистидиновым. Необязательно, сахар присутствует в концентрации в пределах диапазона от около 230 мМ до около 250 мМ, необязательно от около 230 мМ до около 240 мМ. Необязательно, сахар является трегалозой. Необязательно, сахар является сахарозой, а поверхностно-активное вещество - PS20 или PX188. Необязательно, поверхностно-активное вещество представляет собой PS20 в концентрации 0,02% мас./мас. Необязательно, поверхностно-активное вещество представляет собой PX188 в концентрации 0,04% мас./мас. В некоторых препаратах присутствует 160 мМ аргинина. Необязательно, присутствует сахар и он представляет собой трегалозу. Необязательно, трегалоза присутствует в концентрации 205 мМ. Необязательно, поверхностно-активное вещество представляет собой PS20.

[0007] В некоторых препаратах, буфер является цитратным. Необязательно, сахар присутствует в концентрации 230 мМ. Необязательно, поверхностно-активное вещество представляет собой 0,02% PS20. В некоторых препаратах, буфер является фосфатным. Необязательно, присутствует сахар и он представляет собой сахарозу. В некоторых

препаратах, буфер является сукцинатным. Необязательно, присутствует сахар и он представляет собой сахарозу.

[0008] Некоторые препараты содержат (a) 20 мМ цитрата, 230 мМ трегалозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 5; (b) 20 мМ гистидина, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20; (c) 20 мМ фосфата, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,5; (d) 20 мМ цитрата, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,5; (e) 20 мМ гистидина, 230 мМ трегалозы и 0,02% мас./мас. PS80; (f) 20 мМ гистидина, 0,02% мас./мас. PS20 и 160 мМ L-аргинин; (g) 20 мМ гистидина, 240 мМ сахарозы и 0,04% мас./мас. PX188; (h) 20 мМ сукцината, 240 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,0; или (i) 20 мМ гистидина, 205 мМ трегалозы, 0,02% мас./мас. PS20 и 25 мМ L-аргинина. Необязательно, препарат состоит по существу из антитела и около: (a) 20 мМ цитрата, 230 мМ трегалозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 5; (b) 20 мМ гистидина, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20; (c) 20 мМ фосфата, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,5; (d) 20 мМ цитрата, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,5; (e) 20 мМ гистидина, 230 мМ трегалозы и 0,02% мас./мас. PS80; (f) 20 мМ гистидина, 0,02% мас./мас. PS20 и 160 мМ L-аргинин; (g) 20 мМ гистидина, 240 мМ сахарозы и 0,04% мас./мас. PX188; (h) 20 мМ сукцината, 240 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,0; или (i) 20 мМ гистидина, 205 мМ трегалозы, 0,02% мас./мас. PS20 и 25 мМ L-аргинина. Необязательно, препарат состоит по существу из антитела и около: (a) 20 мМ гистидина, 240 мМ сахарозы и 0,04% мас./мас. PX188; (b) 20 мМ сукцината, 240 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,0; или (c) 20 мМ гистидина, 205 мМ трегалозы, 0,02% мас./мас. PS20 и 25 мМ L-аргинина.

[0009] В некоторых препаратах, антитело содержит зрелую варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и зрелую варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. Необязательно, препарат состоит по существу из антитела в концентрации около 50 мг/мл, и около 20 мМ гистидина, около 240 мМ сахарозы и около 0,04% мас./мас. PX188.

[0010] В некоторых препаратах, антитело содержит зрелую варибельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 61, и зрелую варибельную область легкой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 70, за исключением того, что позиции H52 и L26 согласно нумерации Кабата могут каждая независимо представлять собой N или S.

[0011] В некоторых препаратах, антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 16.

[0012] В некоторых препаратах, моноклональное антитело представляет собой гуманизированное, химерное или венеранное антитело. Необязательно, моноклональное антитело является гуманизированным. Необязательно, зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 64-66, и зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 74-76. Необязательно, зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 5-12, и зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 19-23. Необязательно, зрелая тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 11, и зрелая легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 19. Необязательно, зрелая тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 65, и зрелая легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 76.

[0013] В препаратах, содержащих гуманизированное антитело, зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, и зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи. Необязательно, зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 103, при условии, что С-концевой лизин может отсутствовать и/или зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 104 или 105.

[0014] В некоторых препаратах, моноклональное антитело присутствует в концентрации около 50 мг/мл. В некоторых препаратах, гистидиновый буфер присутствует в концентрации около 20 мМ. В некоторых препаратах, рН составляет около от 5,75 до 6,25. В некоторых препаратах, сахар/полиол представляет собой сахарозу, присутствующую в концентрации около 240 мМ. В некоторых препаратах, полоксамер представляет собой полоксамер 188 в концентрации около 0,04% по массе. В некоторых препаратах, в препарате содержится менее чем 5 или 3% по массе антитела в виде агрегата. В некоторых препаратах, по меньшей мере 95% или 97% по массе антитела проходят в качестве одного

пика при анализе HP-SEC. Некоторые препараты являются стерильными. Некоторые препараты стабильны при замерзании и оттаивании. Некоторые препараты имеют осмоляльность от около 270 мОсмоль/кг до около 330 мОсмоль/кг.

[0015] Данное изобретение также предлагает лиофилизированный препарат антитела, который содержит (а) моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 61, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 70 за исключением того, что позиции H52 и L26 согласно нумерации Кабата могут каждая независимо представлять собой N или S, или моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 16; (b) гистидин; (c) сахар/полиол; и (d) полуксамер. Необязательно, лиофилизированный препарат получают путем лиофилизации вышеуказанных препаратов. Необязательно, лиофилизированный препарат является пригодным для восстановления водой до pH от около 5,5 до около 6,5. Необязательно, лиофилизированный препарат является пригодным для восстановления водой до pH около 6,0. Необязательно, лиофилизированный препарат содержит от около 10 до около 40 мг антитела.

[0016] Данное изобретение также предлагает лиофилизированный препарат, который является пригодным для восстановления водой с получением водного раствора, содержащего: (а) антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 61 и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 70, за исключением того, что позиции H52 и L26 согласно нумерации Кабата могут независимо представлять собой N или S, или моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 16, причем антитело присутствует в концентрации в пределах диапазона от около 25 мг/мл до около 75 мг/мл; (b) буфер, присутствующий в концентрации в пределах диапазона от около 10 мМ до около 30 мМ; (c) сахар/полиол, присутствующий в концентрации в пределах диапазона от около 220 до около 260 мМ; (d) поверхностно-активное вещество, присутствующее в концентрации в пределах диапазона от около 0,01% до около 0,1% по массе; и (e) pH в пределах диапазона от около 5,5 до около 7,0.

[0017] В некоторых лиофилизированных препаратах, антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 64-66, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 74-76, или антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 5-12, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 19-23. Необязательно, лиофилизированный препарат является пригодным для восстановления водой таким образом, что антитело присутствует в концентрации около 50 мг/мл. Необязательно, буфер содержит гистидин. Необязательно, лиофилизированный препарат является пригодным для восстановления водой таким образом, что pH составляет около 6,0. Необязательно, сахар/полиол представляет собой сахарозу. Необязательно, поверхностно-активное вещество представляет собой полуксомер. Необязательно, полуксомер представляет собой PX188.

[0018] В некоторых лиофилизированных препаратах, (a) антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 64-66, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 74-76, и является пригодным для восстановления до концентрации около 50 мг/мл; (b) буфер является гистидиновым и пригодным для восстановления до концентрации около 20 мМ; (c) сахар/полиол представляет собой сахарозу и является пригодным для восстановления до концентрации около 240 мМ; а также (d) поверхностно-активное вещество представляет собой полуксомер 188 и является пригодным для восстановления до концентрации около 0,04% по массе. Необязательно, лиофилизированный препарат является пригодным для восстановления водой таким образом, что pH составляет около 6,0. Необязательно, антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 65, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 76. Необязательно, зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 103, и зрелая переменная область легкой цепи слита с константой областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 104. В этих лиофилизированных препаратах, по меньшей мере 95 или 97% антитела проходят в виде одного пика при HP-SEC после хранения в течение вплоть до 3 месяцев при 2-8 °C.

[0019] Данное изобретение также предлагает способ восстановления лиофилизированного препарата, который включает в себя объединение лиофилизированного препарата с стерильной водой для получения жидкого препарата. Необязательно, он дополнительно включает в себя введение восстановленного препарата в пакет с изотонической жидкостью для инфузии. Необязательно, лиофилизированный препарат представлен в форме порошка или в форме твердой пены в флаконе.

[0020] Данное изобретение дополнительно предлагает стерильную лиофилизированную дозированную форму препарата антитела в 20 мл флаконе, состоящую по существу из: (i) антитела в пределах диапазона около 225-275 мг; (ii) гистидина в пределах диапазона около 15-19 мг; (iii) полуксамера PX188 в пределах диапазона около 2-2,5 мг; и (iv) сахарозы в пределах диапазона около 400-490 мг; при этом антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 61, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 70, за исключением того, что позиции H52 и L26 согласно нумерации Кабата могут каждая независимо представлять собой N или S, или моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 16. Необязательно, флакон имеет содержимое, состоящее по существу из: (i) около 250 мг антитела; (ii) около 16,8 мг L-гистидина; (iii) около 2,2 мг полуксамера PX188; и (iv) около 445,3 мг сахарозы. Необязательно, антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 61, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 70, за исключением того, что позиции H52 и L26 согласно нумерации Кабата могут каждая независимо представлять собой N или S. Необязательно, антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 16. Необязательно, зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 64-66, и зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 74-76. Необязательно, зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 5-12, и зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 19-23. Необязательно, зрелая тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 65, и

зрелая легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 76. Необязательно, зрелая тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 6, и зрелая легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 21. Необязательно, зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 103, при условии, что С-концевой лизин может отсутствовать и/или зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 104 или 105. Необязательно, зрелая тяжелая цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 82, за исключением того, что С-концевой лизин может отсутствовать, и зрелая легкая цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 86.

[0021] Данное изобретение также предлагает способ приготовления лиофилизированной дозированной формы для введения субъекту, включающий в себя: (i) восстановление препарата антитела до объема около 5,0 мл стерильной водой, и (ii) разбавление восстановленного препарата антитела стадии (i) в физиологическом растворе для инфузии. Необязательно, полный объем для инфузии составляет 250 мл. Необязательно, полный объем для инфузии составляет 100 мл. Необязательно, полный объем для инфузии составляет 500 мл.

[0022] Данное изобретение также предлагает восстановленный препарат, полученный в результате восстановления лиофилизированных препаратов. Некоторые восстановленные препараты содержат антитело в концентрации около 50 мг/мл, гистиридиновый буфер в концентрации около 20 мМ, полоксамер в концентрации около 0,04% по массе, и при pH около 6,0. Необязательно, по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% антитела проходят в виде одного пика на эксклюзионной хроматографии высокого давления.

[0023] Данное изобретение также предлагает способ лечения или осуществления профилактики субъекта, имеющего или с риском транстретин-опосредованного амилоидоза, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме фармацевтического препарата или восстановленной формы лиофилизированного препарата. Необязательно, субъекта ранее лечили стабилизатором тетрамера ТТР, препаратом на основе антисмыслового олигонуклеотида, препаратом на основе РНК-интерференции (РНКи), или разрушителем амилоида. Необязательно, субъект больше не получает лечение стабилизатором тетрамера ТТР, препаратом на основе антисмыслового олигонуклеотида, препаратом на основе РНК-интерференции (РНКи), или разрушителем

амилоида. Необязательно, субъект одновременно получает лечение дифлунизалом. Необязательно, субъект одновременно получает лечение тафамидисом. Необязательно, субъект одновременно получает лечение стабилизатором тетрамера ТТР, препаратом на основе антисмыслового олигонуклеотида, препаратом на основе РНК-интерференции (РНКи) или разрушителем амилоида. Необязательно, субъект одновременно получает лечение тафамидисом, дифлуисалом, патизираном, инотерсенном, 4'-йод-4'-дезоксидоксорибуцином (IDOX), доксициклином, тауроурсодезоксихолевой кислотой (TUDCA), циклодекстрином (CyD) или анти-SAP антителом. Необязательно, у субъекта был диагностирован амилоидоз АТТР. Необязательно, субъект имеет кардиомиопатию АТТР дикого типа. Необязательно, субъект имеет наследственную кардиомиопатию АТТР или наследственную полинейропатию АТТР, или то и другое. Необязательно, субъект имеет АТТР-поражение сердца. Необязательно, субъект имеет поражение в виде периферической нейропатии вследствие амилоидоза АТТР. Необязательно, субъект одновременно получает тафамидис.

[0024] Данное изобретение также предлагает то, что фармацевтический препарат, восстановленную форму лиофилизированного препарата или восстановленную форму лиофилизированного препарата антитела вводят субъекту внутривенно в разбавленной форме. Необязательно, разбавитель для разбавленной формы представляет собой физиологический раствор. Необязательно, полный объем разбавленной формы, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере около 100 мл. Необязательно, полный объем разбавленной формы, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере около 250 мл. Необязательно, полный объем разбавленной формы, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере около 500 мл. Необязательно, полный объем составляет около 250 мл. Необязательно, 0,1, 0,2, 0,3, 1, 3, 10 или 30 мг/кг антитела вводят субъекту примерно один раз каждые 28 дней. Необязательно, 0,1, 0,2, 0,3, 1 или 3 мг/кг антитела вводят субъекту в виде инфузии в течение периода в диапазоне около от 60 до 120 минут. Необязательно, 10 или 30 мг/кг антитела вводят субъекту в виде инфузии в течение периода в диапазоне около от 90 до 180 минут. Необязательно, субъекту предварительно вводят антигистаминный препарат. Необязательно, субъекту вводят дифенгидрамин в течение периода в диапазоне около от 30 до 90 минут перед введением антитела. Необязательно, субъекту вводят ацетаминофен в течение периода в диапазоне около от 30 до 90 минут перед введением антитела. Необязательно, продолжительность схемы введения составляет по меньшей мере 3 месяца. Необязательно, продолжительность схемы введения составляет по меньшей мере 12 месяцев.

[0025] Данное изобретение дополнительно предлагает способ лечения или осуществления профилактики субъекта, имеющего или с риском транстиретин-опосредованного амилоидоза, который включает в себя введение по эффективной схеме стабилизатора тетрамера ТТР, препарата на основе антисмыслового олигонуклеотида, препарата на основе РНК-интерференции (РНКи), или разрушителя амилоида, при этом субъекта ранее лечили фармацевтическим препаратом или восстановленной формой лиофилизированного препарата, как описано выше. Необязательно, субъект больше не получает лечение фармацевтическим препаратом. Необязательно, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамидис или дифлунизал. Необязательно, препарат на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен. Необязательно, препарат на основе РНК-интерференции (РНКи) представляет собой патизиран или ревузиран. Необязательно, разрушители амилоида представляют собой 4'-йод-4'-дезоксидоксорубицин (IDOX), доксициклин, тауроурсодезоксихолевую кислоту (TUDCA), циклодекстрин (CyD) или анти-SAP антитело. Необязательно, разрушители амилоида представляют собой доксициклин в комбинации с тауроурсодезоксихолевой кислотой (TUDCA). Необязательно, у субъекта был диагностирован амилоидоз АТТР. Необязательно, субъект имеет кардиомиопатию АТТР дикого типа. Необязательно, субъект имеет наследственную кардиомиопатию АТТР. Необязательно, субъект имеет наследственную полинейропатию АТТР. Необязательно, субъект имеет АТТР-поражение сердца. Необязательно, субъект имеет поражение в виде периферической нейропатии вследствие амилоидоза АТТР. Необязательно, фармацевтический препарата, восстановленную форму лиофилизированного препарата или восстановленную форму лиофилизированного препарата антитела вводят субъекту внутривенно в разбавленной форме. Необязательно, разбавитель для разбавленной формы представляет собой физиологический раствор. Необязательно, полный объем разбавленной формы, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере около 100 мл. Необязательно, полный объем разбавленной формы, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере около 250 мл. Необязательно, полный объем разбавленной формы, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере около 500 мл. Необязательно, полный объем составляет около 250 мл. Необязательно, 0,1, 0,2, 0,3, 1, 3, 10 или 30 мг/кг антитела вводят субъекту примерно один раз каждые 28 дней. Необязательно, 0,1, 0,2, 0,3, 1 или 3 мг/кг антитела вводят субъекту в виде инфузии в течение периода в диапазоне около от 60 до 120 минут. Необязательно, 10 или 30 мг/кг антитела вводят субъекту в виде инфузии в течение периода в диапазоне около от 90 до 180 минут. Необязательно, субъекту предварительно вводят антигистаминный препарат. Необязательно, субъекту вводят дифенгидрамин в течение

периода в диапазоне около от 30 до 90 минут перед введением антитела. Необязательно, субъекту вводят ацетаминофен в течение периода в диапазоне около от 30 до 90 минут перед введением антитела. Необязательно, продолжительность схемы введения составляет по меньшей мере 3 месяца. Необязательно, продолжительность схемы введения составляет по меньшей мере 12 месяцев.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0026] SEQ ID NO: 1 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 9D5 мыши.

[0027] SEQ ID NO: 2 представляет аминокислотную последовательность шаблона 1SEQ_H структуры вариабельной области тяжелой цепи мыши.

[0028] SEQ ID NO: 3 представляет аминокислотную последовательность вариабельного акцептора тяжелой цепи ACC № ВАСО2114.

[0029] SEQ ID NO: 4 представляет аминокислотную последовательность вариабельного акцептора тяжелой цепи ACC № ААХ82494.1.

[0030] SEQ ID NO: 5 представляет аминокислотную последовательность варианта 1 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv1).

[0031] SEQ ID NO: 6 представляет аминокислотную последовательность варианта 2 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv2).

[0032] SEQ ID NO: 7 представляет аминокислотную последовательность варианта 2b вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv2b).

[0033] SEQ ID NO: 8 представляет аминокислотную последовательность варианта 3 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv3).

[0034] SEQ ID NO: 9 представляет аминокислотную последовательность варианта 3b вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv3b).

[0035] SEQ ID NO: 10 представляет аминокислотную последовательность варианта 4 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv4).

[0036] SEQ ID NO: 11 представляет аминокислотную последовательность варианта 4b вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv4b).

[0037] SEQ ID NO: 12 представляет аминокислотную последовательность варианта 5 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv5).

- [0038] SEQ ID NO: 13 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 9D5 мыши.
- [0039] SEQ ID NO: 14 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 по Кабату антитела 9D5 мыши.
- [0040] SEQ ID NO: 15 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 9D5 мыши.
- [0041] SEQ ID NO: 16 представляет аминокислотную последовательность вариательной области легкой цепи антитела 9D5 мыши.
- [0042] SEQ ID NO: 17 представляет аминокислотную последовательность шаблона 1MJU_L структуры вариательной области легкой цепи мыши.
- [0043] SEQ ID NO: 18 представляет аминокислотную последовательность вариательного акцептора легкой цепи ACC № ABC66952.
- [0044] SEQ ID NO: 19 представляет аминокислотную последовательность варианта 1 вариательной области легкой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VLv1).
- [0045] SEQ ID NO: 20 представляет аминокислотную последовательность варианта 2 вариательной области легкой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VLv2).
- [0046] SEQ ID NO: 21 представляет аминокислотную последовательность варианта 3 вариательной области легкой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VLv3).
- [0047] SEQ ID NO: 22 представляет аминокислотную последовательность варианта 4 вариательной области легкой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VLv4).
- [0048] SEQ ID NO: 23 представляет аминокислотную последовательность варианта 5 вариательной области легкой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VLv5).
- [0049] SEQ ID NO: 24 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 9D5 мыши.
- [0050] SEQ ID NO: 25 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 по Кабату антитела 9D5 мыши.
- [0051] SEQ ID NO: 26 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 по Кабату антитела 9D5 мыши.
- [0052] SEQ ID NO: 27 представляет аминокислотную последовательность варианта 1 тяжелой цепи гуманизированного 9D5.

[0053] SEQ ID NO: 28 представляет аминокислотную последовательность варианта 2 тяжелой цепи гуманизированного 9D5.

[0054] SEQ ID NO: 29 представляет аминокислотную последовательность варианта 2b тяжелой цепи гуманизированного 9D5.

[0055] SEQ ID NO: 30 представляет аминокислотную последовательность варианта 3 тяжелой цепи гуманизированного 9D5.

[0056] SEQ ID NO: 31 представляет аминокислотную последовательность варианта 3b тяжелой цепи гуманизированного 9D5.

[0057] SEQ ID NO: 32 представляет аминокислотную последовательность варианта 4 тяжелой цепи гуманизированного 9D5.

[0058] SEQ ID NO: 33 представляет аминокислотную последовательность варианта 4b тяжелой цепи гуманизированного 9D5.

[0059] SEQ ID NO: 34 представляет аминокислотную последовательность варианта 5 тяжелой цепи гуманизированного 9D5.

[0060] SEQ ID NO: 35 представляет аминокислотную последовательность варианта 1 легкой цепи гуманизированного 9D5.

[0061] SEQ ID NO: 36 представляет аминокислотную последовательность варианта 2 легкой цепи гуманизированного 9D5.

[0062] SEQ ID NO: 37 представляет аминокислотную последовательность варианта 3 легкой цепи гуманизированного 9D5.

[0063] SEQ ID NO: 38 представляет аминокислотную последовательность варианта 4 легкой цепи гуманизированного 9D5.

[0064] SEQ ID NO: 39 представляет аминокислотную последовательность варианта 5 легкой цепи гуманизированного 9D5.

[0065] SEQ ID NO: 40 представляет нуклеотидную последовательность вариательной области тяжелой цепи антитела 9D5 мыши с сигнальным пептидом.

[0066] SEQ ID NO: 41 представляет аминокислотную последовательность вариательной области тяжелой цепи антитела 9D5 мыши с сигнальным пептидом.

[0067] SEQ ID NO: 42 представляет нуклеотидную последовательность вариательной области легкой цепи антитела 9D5 мыши с сигнальным пептидом.

- [0068] SEQ ID NO: 43 представляет аминокислотную последовательность вариabельной области легкой цепи антитела 9D5 мыши с сигнальным пептидом.
- [0069] SEQ ID NO: 44 представляет нуклеотидную последовательность варианта 1 вариabельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv1).
- [0070] SEQ ID NO: 45 представляет нуклеотидную последовательность варианта 2 вариabельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv2).
- [0071] SEQ ID NO: 46 представляет нуклеотидную последовательность варианта 2b вариabельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv2b).
- [0072] SEQ ID NO: 47 представляет нуклеотидную последовательность варианта 3 вариabельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv3).
- [0073] SEQ ID NO: 48 представляет нуклеотидную последовательность варианта 3b вариabельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv3b).
- [0074] SEQ ID NO: 49 представляет нуклеотидную последовательность варианта 4 вариabельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv4).
- [0075] SEQ ID NO: 50 представляет нуклеотидную последовательность варианта 4b вариabельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv4b).
- [0076] SEQ ID NO: 51 представляет нуклеотидную последовательность варианта 5 вариabельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv5).
- [0077] SEQ ID NO: 52 представляет нуклеотидную последовательность варианта 1 вариabельной области легкой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VLv1).
- [0078] SEQ ID NO: 53 представляет нуклеотидную последовательность варианта 2 вариabельной области легкой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VLv2).
- [0079] SEQ ID NO: 54 представляет нуклеотидную последовательность варианта 3 вариabельной области легкой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VLv3).
- [0080] SEQ ID NO: 55 представляет нуклеотидную последовательность варианта 4 вариabельной области легкой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VLv4).
- [0081] SEQ ID NO: 56 представляет нуклеотидную последовательность варианта 5 вариabельной области легкой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VLv5).
- [0082] SEQ ID NO: 57 представляет аминокислотную последовательность сигнального пептида вариabельной области тяжелой цепи 9D5 мыши.

[0083] SEQ ID NO: 58 представляет нуклеотидную последовательность сигнального пептида варибельной области тяжелой цепи 9D5 мыши.

[0084] SEQ ID NO: 59 представляет аминокислотную последовательность сигнального пептида варибельной области легкой цепи 9D5 мыши.

[0085] SEQ ID NO: 60 представляет нуклеотидную последовательность сигнального пептида варибельной области легкой цепи 9D5 мыши.

[0086] SEQ ID NO: 61 представляет аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 14G8 мыши.

[0087] SEQ ID NO: 62 представляет аминокислотную последовательность шаблона 1MQK_H структуры варибельной области тяжелой цепи мыши.

[0088] SEQ ID NO: 63 представляет аминокислотную последовательность варибельного акцептора тяжелой цепи ACC № AAD30410.1.

[0089] SEQ ID NO: 64 представляет аминокислотную последовательность варианта 1 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 14G8 (Hu14G8VHv1).

[0090] SEQ ID NO: 65 представляет аминокислотную последовательность варианта 2 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 14G8 (Hu14G8VHv2).

[0091] SEQ ID NO: 66 представляет аминокислотную последовательность варианта 3 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 14G8 (Hu14G8VHv3).

[0092] SEQ ID NO: 67 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 14G8 мыши.

[0093] SEQ ID NO: 68 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 по Кабату антитела 14G8 мыши.

[0094] SEQ ID NO: 69 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 14G8 мыши.

[0095] SEQ ID NO: 70 представляет аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи антитела 14G8 мыши.

[0096] SEQ ID NO: 71 представляет аминокислотную последовательность шаблона 1MJU_L структуры варибельной области легкой цепи мыши.

[0097] SEQ ID NO: 72 представляет аминокислотную последовательность варибельного акцептора легкой цепи ACC № ABA71374.1.

[0098] SEQ ID NO: 73 представляет аминокислотную последовательность переменного акцептора легкой цепи ACC № ABC66952.1.

[0099] SEQ ID NO: 74 представляет аминокислотную последовательность варианта 1 переменной области легкой цепи гуманизованного антитела 14G8 (Hu14G8VLv1).

[00100] SEQ ID NO: 75 представляет аминокислотную последовательность варианта 2 переменной области легкой цепи гуманизованного антитела 14G8 (Hu14G8VLv2).

[00101] SEQ ID NO: 76 представляет аминокислотную последовательность варианта 3 переменной области легкой цепи гуманизованного антитела 14G8 (Hu14G8VLv3).

[00102] SEQ ID NO: 77 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 14G8 мыши.

[00103] SEQ ID NO: 78 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 по Кабату антитела 14G8 мыши.

[00104] SEQ ID NO: 79 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 по Кабату антитела 14G8 мыши.

[00105] SEQ ID NO: 80 представляет аминокислотную последовательность варианта 3 CDR-L1 по Кабату гуманизованного антитела 14G8 мыши (Hu14G8VLv3).

[00106] SEQ ID NO: 81 представляет аминокислотную последовательность варианта 1 тяжелой цепи гуманизованного 14G8.

[00107] SEQ ID NO: 82 представляет аминокислотную последовательность варианта 2 тяжелой цепи гуманизованного 14G8.

[00108] SEQ ID NO: 83 представляет аминокислотную последовательность варианта 3 тяжелой цепи гуманизованного 14G8.

[00109] SEQ ID NO: 84 представляет аминокислотную последовательность варианта 1 легкой цепи гуманизованного 14G8.

[00110] SEQ ID NO: 85 представляет аминокислотную последовательность варианта 2 легкой цепи гуманизованного 14G8.

[00111] SEQ ID NO: 86 представляет аминокислотную последовательность варианта 3 легкой цепи гуманизованного 14G8.

[00112] SEQ ID NO: 87 представляет нуклеотидную последовательность переменной области тяжелой цепи антитела 14G8 мыши с сигнальным пептидом.

[00113] SEQ ID NO: 88 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 14G8 мыши с сигнальным пептидом.

[00114] SEQ ID NO: 89 представляет нуклеотидную последовательность вариабельной области легкой цепи антитела 14G8 мыши с сигнальным пептидом.

[00115] SEQ ID NO: 90 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи антитела 14G8 мыши с сигнальным пептидом.

[00116] SEQ ID NO: 91 представляет нуклеотидную последовательность варианта 1 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 14G8 (Hu14G8VHv1).

[00117] SEQ ID NO: 92 представляет нуклеотидную последовательность варианта 2 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 14G8 (Hu14G8VHv2).

[00118] SEQ ID NO: 93 представляет нуклеотидную последовательность варианта 3 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 14G8 (Hu14G8VHv3).

[00119] SEQ ID NO: 94 представляет нуклеотидную последовательность варианта 1 вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 14G8 (Hu14G8VLv1).

[00120] SEQ ID NO: 95 представляет нуклеотидную последовательность варианта 2 вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 14G8 (Hu14G8VLv2).

[00121] SEQ ID NO: 96 представляет нуклеотидную последовательность варианта 3 вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 14G8 (Hu14G8VLv3).

[00122] SEQ ID NO: 97 представляет аминокислотную последовательность сигнального пептида вариабельной области тяжелой цепи антитела 14G8 мыши.

[00123] SEQ ID NO: 98 представляет нуклеотидную последовательность сигнального пептида вариабельной области тяжелой цепи антитела 14G8 мыши.

[00124] SEQ ID NO: 99 представляет аминокислотную последовательность сигнального пептида вариабельной области легкой цепи антитела 14G8 мыши.

[00125] SEQ ID NO: 100 представляет нуклеотидную последовательность сигнального пептида вариабельной области легкой цепи антитела 14G8 мыши.

[00126] SEQ ID NO: 101 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи IgG1 человека.

[00127] SEQ ID NO: 102 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи IgG1 человека аллотипа G1m3 IgG1 с аланинами, занимающими позиции 234 и 235 согласно нумерации EU.

[00128] SEQ ID NO: 103 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи IgG1 человека аллотипа G1m3 IgG1.

[00129] SEQ ID NO: 104 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области каппа легкой цепи человека, имеющей N-концевой аргинин.

[00130] SEQ ID NO: 105 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области каппа легкой цепи человека без N-концевого аргинина.

[00131] SEQ ID NO: 106 представляет нуклеотидную последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи аллотипа G1m3.

[00132] SEQ ID NO: 107 представляет нуклеотидную последовательность иллюстративной константной области легкой цепи, имеющей N-концевой аргинин.

[00133] SEQ ID NO: 108 представляет нуклеотидную последовательность иллюстративной константной области легкой цепи без N-концевого аргинина.

[00134] SEQ ID NO: 109 представляет аминокислотную последовательность транстиретина человека, представленную под номером доступа P02766.1 (UniProt).

[00135] SEQ ID NO: 110 представляет аминокислотную последовательность транстиретина человека, представленная под номером доступа AAB35639.1 (GenBank).

[00136] SEQ ID NO: 111 представляет аминокислотную последовательность транстиретина человека, представленную под номером доступа AAB35640.1 (GenBank).

[00137] SEQ ID NO: 112 представляет аминокислотную последовательность транстиретина человека, представленную под номером доступа ABI63351.1 (GenBank).

[00138] SEQ ID NO: 113 представляет аминокислотную последовательность остатков 89-97 транстиретина человека.

[00139] SEQ ID NO: 114 представляет аминокислотную последовательность потенциального транстиретинового иммуногена.

[00140] SEQ ID NO: 115 представляет аминокислотную последовательность потенциального транстретинового иммуногена.

[00141] SEQ ID NO: 116 представляет аминокислотную последовательность потенциального транстретинового иммуногена.

[00142] SEQ ID NO: 117 представляет аминокислотную последовательность составной CDR-H1 согласно Чотиа-Кабата антитела 9D5 мыши.

[00143] SEQ ID NO: 118 представляет аминокислотную последовательность составной CDR-H1 согласно Чотиа-Кабата антитела 14G8 мыши.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[00144] Термин «антитело» включает в себя интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены, за специфическое связывание с целью. Фрагменты включают в себя отдельные тяжелые цепи, отдельные легкие цепи, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, Fv, одноцепочечные антитела и однодоменные антитела. Термин «антитело» также включает в себя биспецифическое антитело. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелых/легких цепей и два разных сайта связывания (смотрите, например, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)).

[00145] Основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну «легкую» цепь (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит переменную область длиной примерно от 100 до 110 или более аминокислот, в основном отвечающих за распознавание антигена. При первоначальной экспрессии данная переменная область обычно связана с отщепляемым сигнальным пептидом. Переменная область без сигнального пептида иногда упоминается как зрелая переменная область. Так, например, зрелая переменная область легкой цепи обозначает переменную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, главным образом отвечающую за эффекторную функцию. Константная область может содержать любую или все: область CH1, шарнирную область, область CH2 и область CH3.

[00146] Легкие цепи классифицируют либо как каппа, либо как лямбда. Тяжелые цепи разделяют на гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, и выделяют такие изоотипы антитела как: IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В пределах легкой и тяжелой цепей переменная и константная области соединяются областью «J», длиной около 12 или больше аминокислот, причем тяжелая цепь также содержит область «D», включающую в себя около 10 или больше аминокислот. (Смотрите в целом, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7) (включен в полном объеме посредством ссылки для всех целей).

[00147] Зрелые переменные области каждой пары легкая/тяжелая цепь формируют сайт связывания антитела. Таким образом, интактное антитело имеет два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два сайта связывания одинаковы. Все цепи демонстрируют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гиперпеременными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями или CDR. CDR из двух цепей каждой пары выравниваются каркасными областями, делая возможным связывание с специфичным эпитопом. От N-конца к C-концу легкие и тяжелые цепи содержат области FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Присвоение аминокислот каждой области осуществляется в соответствии с определениями Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), или Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989), или CDR могут быть определены альтернативными определениями в Таблице 1 ниже. Кабат также предлагает широко используемое соглашение о нумерации (нумерация Кабата), в котором соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями назначается одинаковое число.

[00148] Таблица 1: Общепринятые определения CDR с использованием нумерации Кабата

Таблица 1

Петля	Кабат	Чотиа	Совмещенная Чотиа и Кабата	АтМ	Контакт
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55

L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26-- H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50-H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95-H102	H93--H101

*CDR-H1 по Чотиа может заканчиваться на H32, H33 или H34 (в зависимости от длины петли). Это связано с тем, что в схеме нумерации Кабата размещают вставки дополнительных остатков в 35A и 35B, тогда как в нумерации Чотиа их размещают в 31A и 31B. Если не представлено ни H35A, ни H35B (нумерация Кабата), петля CDR-H1 по Чотиа заканчивается на H32. Если есть только H35A, она заканчивается на H33. Если присутствуют и H35A и H35B, она заканчивается на H34.

[00149] Зрелую вариабельную область тяжелой или легкой цепи сравнивают с той же областью контрольного антитела, идентичность последовательности в процентах между областями исследуемого и контрольного антитела представляет собой число позиций, занятых той же аминокислотой в области исследуемого и контрольного антитела, разделенное на совокупное число выровненных позиций двух областей (без учета пробелов), умноженное на 100 для преобразования в проценты.

[00150] В целях классификации аминокислотных замен на консервативные или неконсервативные, аминокислоты группируют следующим образом: Группа I (гидрофобные боковые цепи): Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; Группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): Cys, Ser, Thr; Группа III (кислотные боковые цепи): Asp, Glu; Группа IV (основные боковые цепи): Asn, Gln, His, Lys, Arg; Группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): Gly, Pro; и Группа VI (ароматические боковые цепи): Trp, Tyr, Phe. Консервативные замены подразумевают замены между аминокислотами в одном классе.

[00151] Неконсервативные замены заключаются в обмене члена одного из этих классов на член другого.

[00152] Антитела согласно данному изобретению обычно связываются с их обозначенной целью с константой аффинности по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , или 10^{10} M^{-1} . Такое связывание является специфическим связыванием в том смысле, что оно детектируемо выше по величине и отличается от неспецифического связывания, случающегося по меньшей мере с одной неродственной целью. Специфическое

связывание может быть результатом формирования связей между конкретными функциональными группами или конкретного пространственного соответствия (например, тип «замок и ключ»), тогда как неспецифическое связывание обычно является результатом Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Однако, специфическое связывание не обязательно означает, что моноклональное антитело связывается с одной и только одной целью.

[00153] Термин «симптом» относится к субъективным признакам заболевания, например измененной походке, как это воспринимается субъектом. «Признак» относится к объективным свидетельствам болезни, наблюдаемым врачом.

[00154] Индивид подвержен повышенному риску заболевания, если у субъекта есть по меньшей мере один известный фактор риска (например, генетический, биохимический, семейный анамнез и ситуационный риск), в результате чего индивиды с этим фактором риска имеют статистически значимый больший риск развития заболевания чем индивиды без фактора риска. Статистическая значимость означает $p \leq 0,05$.

[00155] Если иное не очевидно из контекста, термин «около» охватывает значения в пределах ± 5 или $\pm 10\%$ указанного значения.

[00156] Если иное не очевидно из контекста, ссылка на диапазон включает в себя любое целое число в пределах такого диапазона.

[00157] Термин «нативный» по отношению к структуре транстиретина (ТТР) относится к нормально свернутой структуре ТТР в его правильно функционирующем состоянии (т. е. тетрамер ТТР). Поскольку ТТР является тетрамером в его изначально свернутой форме, неродные формы ТТР включают, например, неправильно свернутые тетрамеры ТТР, мономеры ТТР, агрегированные формы ТТР, и ТТР в форме фибрилл. Неродные формы ТТР могут включать молекулы, содержащие аминокислотные последовательности ТТР дикого типа или мутации.

[00158] Термин «неправильно свернутый» по отношению к ТТР относится к вторичной и третичной структуре полипептидного мономера или мультимера ТТР и указывает на то, что полипептид принял конформацию, которая не является нормальной для этого белка в его правильно функционирующем состоянии. Хотя неправильное свертывание ТТР может быть вызвано мутациями в белке (например, делецией, заменой или добавлением), белки ТТР дикого типа также могут быть неправильно свернутыми при заболеваниях, экспонируя специфические эпитопы.

[00159] Термин «фармацевтически приемлемый» означает, что носитель, разбавитель, наполнитель или вспомогательное вещество совместимы с другими ингредиентами препарата и не является по существу вредным для его реципиента.

[00160] Термин «пациент» включает людей и других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

[00161] Индивид подвержен повышенному риску заболевания, если у субъекта есть по меньшей мере один известный фактор риска (например, генетический, биохимический, семейный анамнез и ситуационный риск), в результате чего индивиды с этим фактором риска имеют статистически значимый больший риск развития заболевания чем индивиды без фактора риска.

[00162] Термин «болезнь» относится к любому аномальному состоянию, которое ухудшает физиологическую функцию. Этот термин широко используется для охвата любого нарушения, заболевания, аномалии, патологии, недуга, состояния или синдрома, при которых нарушается физиологическая функция, независимо от характера этиологии.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

[00163] 14G8 и 9G5 представляют собой антитела, связывающиеся с транстиретином (ТТР). Гуманизированные формы антител описаны в WO2016/120810, включено посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Данная заявка предлагает жидкие и лиофилизированные препараты, включающие в себя антитела, имеющие CDR антител 14G8 или 9G5, в частности химерных, винированных или гуманизированных форм 14G8 или 9G5. Препараты включают в себя комбинации фармацевтически приемлемых носителей, придающих антителу стабильность, как дополнительно описано ниже.

II. Целевые молекулы

[00164] Транстиретин (ТТР) представляет собой сывороточный белок и транспортный белок спинномозговой жидкости, имеет длину 127 аминокислот, массу 55 кДа, и синтезируется в основном печени. Он также упоминается как преальбумин, тироксинсвязывающий преальбумин, АТТР и ТВРА (thyroxine-binding prealbumin - тироксин-связывающий преальбумин). В своем нативном состоянии ТТР существует как тетрамер. У гомозигот тетрамеры содержат идентичные 127-аминокислотные

субъединицы, богатые на бета-слои. У гетерозигот тетрамеры ТТР состоят из различных субъединиц и/или субъединиц дикого типа, которые обычно объединяются статистическим способом.

[00165] Установленная функция ТТР в крови заключается в транспорте *holo*-ретинолсвязывающего белка. Хотя ТТР является основным переносчиком тироксина (Т₄) в крови грызунов, задействуя сайты связывания, которые ортогональны к сайтам, используемым для *holo*-ретинолсвязывающего белка, сайты связывания Т₄ фактически незаняты у людей.

[00166] ТТР является одним из по меньшей мере тридцати различных человеческих белков, чье внеклеточное неправильное свертывание и/или неправильная сборка (амилоидогенез) в многообразии агрегатных структур, как полагают, вызывает дегенеративные заболевания, называемые амилоидными заболеваниями. ТТР должен претерпеть конформационные изменения, чтобы стать амилоидогенным. Частичное разворачивание раскрывает участки в своем большинстве незаряженных гидрофобных остатков в развернутой конформации, которые эффективно неправильно собираются в по существу полностью неструктурированные сферические агрегаты, которые в конечном итоге претерпевают конформационное превращение в амилоидные структуры с бета-листами.

[00167] Если иное не очевидно из контекста, отсылка к транстиретину (ТТР) или его фрагментам или доменам включает в себя природные аминокислотные последовательности человека, включая их изоформы, мутантные, и аллельные варианты. Иллюстративные полипептидные последовательности ТТР обозначены номерами доступа P02766.1 (UniProt), AAB35639.1 (GenBank), AAB35640.1 (GenBank), и ABI63351.1 (GenBank) (SEQ ID NOS: 109-112, соответственно). Остатки нумеруются в соответствии с P02766.1 Swiss Prot, с первой аминокислоты зрелого белка (то есть, не включая 20-аминокислотную сигнальную последовательность), обозначенной остатком 1. В любом другом белке ТТР остатки нумеруются согласно соответствующим остаткам в P02766.1 при максимальном выравнивании.

III. Транстиретиновый амилоидоз

[00168] Транстиретиновый (ТТР) амилоидоз представляет собой системное нарушение, характеризующееся патогенным, неправильным свернутым ТТР и внеклеточным отложением амилоидных фибрилл, состоящих из ТТР. ТТР амилоидоз обычно вызван дестабилизацией нативной тетрамерной формы ТТР (из-за условий среды

или генетических патологий), что приводит к диссоциации, неправильному свертыванию и агрегации ТТР в амилоидные фибриллы, которые накапливаются в различных органах и тканях, вызывая прогрессирующую дисфункцию. Смотрите, например, Almeida and Saraiva, *FEBS Letters* 586:2891-2896 (2012); Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013).

[00169] У людей, как тетрамеры ТТР дикого типа, так и смешанные тетрамеры, состоящие из субъединиц мутантного и дикого типа, могут диссоциировать, неправильно свертываться и агрегировать, причем процесс амилоидогенеза приводит к дегенерации пост-митотической ткани. Таким образом, ТТР амилоидозы включают заболевания, вызванные патогенным неправильно свернутым ТТР, возникающим в результате мутаций в ТТР, или возникающим из не мутированного, неправильно свернутого ТТР.

[00170] Например, старческий системный амилоидоз (ССА) и старческий сердечный амилоидоз (ССерА) представляют собой возрастные типы амилоидоза, которые возникают в результате отложения ТТР амилоида дикого типа за пределами и внутри кардиомиоцитов сердца. ТТР амилоидоз также является наиболее распространенной формой наследственного (семейного) амилоидоза, который вызван мутациями, которые дестабилизируют белок ТТР. ТТР амилоидозы, связанные с точечными мутациями в гене ТТР, включают наследственную амилоидную полинейропатию (НАП), наследственную амилоидную кардиомиопатию (НАК) и редкий избирательный амилоидоз центральной нервной системы (АЦНС). Пациенты с наследственным (семейным) ТТР амилоидозом почти всегда являются гетерозиготами, что означает, что тетрамеры ТТР состоят из субъединиц ТТР мутантного и/или дикого типа, в целом, как правило, статистически распределены. Наследственные (семейные) формы амилоидоза ТТР, как правило, являются аутосомно-доминантными и, как правило, имеют более раннее проявление первых симптомов, чем спорадические заболевания (ССА и СсерА).

[00171] В гене, кодирующем ТТР, более 100 мутаций которые связывают с аутосомно-доминантными нарушениями НАП и НАК. Смотрите, например, US 2014/0056904; Saraiva, *Hum. Mutat.* 17(6):493-503 (2001); Damas and Saraiva, *J. Struct. Biol.* 130:290-299; Dwulet and Benson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:657-662 (1983). Эти мутации, вызывающие образование амилоида, распределены по всей молекуле ТТР. Как правило, чем более дестабилизирующими для тетрамерной структуры ТТР являются мутантные субъединицы, тем раньше проявляются первые симптомы амилоидного заболевания. Патогенный потенциал варианта ТТР в целом, как правило, определяется комбинацией его нестабильности и эффективности его клеточной секреции.

Первоначальная патология, вызванная некоторыми вариантами ТТР, является результатом их избирательного разрушения сердечной ткани, тогда как другие варианты ТТР приводят к нарушениям в периферической и вегетативной нервной системах. Повреждение ткани, вызванное ТТР амилоидогенезом, по-видимому, обусловлено главным образом токсичностью небольших, диффундирующих агрегатов ТТР, хотя накопление внеклеточного амилоида может способствовать и по существу наверняка приводит к изменению структуры органа на поздних стадиях амилоидоза ТТР.

[00172] Амилоидоз ТТР представлен многими различными формами, со значительными фенотипическими различиями между индивидами и географическими регионами. Например, амилоидоз ТТР может представлять собой прогрессирующую, аксональную сенсорную вегетативную и моторную невропатию. Амилоидоз ТТР может также представлять собой проникающую кардиомиопатию.

[00173] Возраст проявления первых симптомов, связанных с болезнью, колеблется между вторым и девятым десятилетиями жизни с большими вариациями в разных популяциях. Мультисистемное поражение амилоидозом ТТР является ключом к его диагностике. Например, диагноз амилоидоза ТТР рассматривается при наличии одного или нескольких следующих факторов: 1) семейный анамнез нейропатического заболевания, особенно связанного с сердечной недостаточностью; 2) невропатическая боль или прогрессирующие сенсорные нарушения неизвестной этиологии; 3) синдром запястного канала без очевидной причины, в частности если он двусторонний и требует хирургического устранения; 4) нарушения моторики желудочно-кишечного тракта или дисфункция автономной нервной системы неизвестной этиологии (например, эректильная дисфункция, ортостатическая гипотензия, нейрогенный мочевого пузыря); 5) сердечная болезнь, характеризующаяся утолщенными стенками желудочков в отсутствие гипертонии; 6) расширенный по неизвестным причинам атрио-вентрикулярный блок, в частности сопровождаемый утолщенным сердцем; и 6) включения в стекловидном теле по типу ваты. Смотрите Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). Другие симптомы могут включать в себя, например, полинейропатию, потерю чувствительности, боль, слабость нижних конечностей, дисгидроз, диарею, запор, потерю веса и недержание/удержание мочи.

[00174] Периферическая невропатия может быть обнаружена и определена количественно по различным клиническим шкалам. Например, Клиническая оценка невропатии (КОН), (Dyck PJ, Hughes RAC, O'Brien PC. Quantitating overall neuropathic symptoms, impairments and outcomes. In: Dyck PJ, Thomas PK., editors. *Peripheral neuropathy*.

4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2005. P 1031-51), предоставляет шкалу, включающую в себя оценку Функции нижних конечностей (ФНК) и способности (оценка 0) или неспособности (оценка 1) ходить на пальцах ног, ходить на пятках и вставать из положения на коленях; пункты оценивают отдельно для каждой стороны. Шкала невропатических нарушений (ШНН) предоставляет клиническую оценку, которая проверяет мышечную силу, рефлекторную активность и чувствование пальцев рук и ног. Для субъектов с НАТТР с периферической невропатией неврологическая функция может быть оценена с течением времени с использованием ШНН. ШНН включает в себя неврологическое обследование нижних конечностей, верхних конечностей и черепных нервов с совокупной оценкой 244 (слабость 192, чувствительность 32, рефлексы 20). Невропатические симптомы и изменения (НСИ) - это вопросник из 38 пунктов, в котором оценивается тяжесть и изменения симптомов (слабость, сенсорные, вегетативные) периферической невропатии по 3 шкалам: количество симптомов, тяжесть симптомов (легкая = 1, умеренная = 2, высокая = 3), которые могут использоваться для определения изменений со временем, и категории изменений (сравнение симптома с исходным уровнем). Другие шкалы - Стадия семейной амилоидной полинейропатии (САП) и Оценка недееспособности из-за полинейропатии (ОИП).

[00175] Диагностика амилоидоза ТТР обычно основывается на биопсии органов-мишеней с последующим гистологическим окрашиванием вырезанной ткани с помощью специфического к амилоиду красителя «конго красный». Если наблюдается положительный результат на амилоид, впоследствии проводится иммуногистохимическое окрашивание, чтобы гарантировать, что белок-предшественник, ответственный за образование амилоида, действительно является ТТР. Для наследственных форм заболевания, затем необходимо показать мутацию в гене, кодирующем ТТР, до того, как будет поставлен диагноз. Это можно достигнуть, например, посредством изоэлектрического фокусирующего электрофореза, полимеразной цепной реакции или лазерной диссекции/жидкостной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрией. Смотрите, например, US 2014/0056904; Ruberg and Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012); Ando et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013).

IV. АНТИТЕЛА

A. Специфичность связывания и функциональные свойства

[00176] Антитело 14G8 было первоначально выделено в виде антитела мыши, имеющего зрелую вариабельную область тяжелой цепи, определенную SEQ ID NO: 61, и зрелую вариабельную область легкой цепи, определенную SEQ ID NO: 70. CDRH1, H2 и

НЗ по Кабату имеют SEQ ID NO: 67-69, а CDRL1, L2 и L3 имеют SEQ ID NO: 77-79. Совмещенная CDR-H1 по Чотиа-Кабату представлена как SEQ ID NO: 118.

[00177] Антитело 9G5 было первоначально выделено в виде антитела мыши, имеющего зрелую переменную область тяжелой цепи, определенную SEQ ID NO: 61, и зрелую переменную область легкой цепи, определенную SEQ ID NO: 70. CDRH1, H2 и H3 по Кабату имеют SEQ ID NO: 13-15, а CDRL1, L2 и L3 по Кабату имеют SEQ ID NO: 24-26. CDR по Кабату 9G5 такие же, как и в 14G8, за исключением того, что в 9G5 позиции H52 и L26 согласно нумерации Кабата заняты N, а в 9G5 - S. Совмещенная CDR-H1 по Чотиа-Кабату представлена как SEQ ID NO: 117.

[00178] В альтернативном варианте, CDR могут определяться любым из следующих соглашений, описанных выше.

[00179] Препараты согласно данному изобретению содержат антитело, содержащее зрелую тяжелую цепь, содержащую CDR H1, H2 и H3 14G8 и CDR L1, L2 и L3 14G8, за исключением того, что позиции H52 и L26 согласно нумерации Кабата могут каждая независимо представлять собой N или S. Некоторые антитела содержат CDR H1, H2 и H3 14G8 и CDR L1, L2 и L3 14G8, при этом позиции H52 и L26 обе заняты N. Некоторые антитела содержат зрелую тяжелую цепь, содержащую CDR H1, H2, H3 из 9G5, и зрелую легкую цепь, содержащую CDR L1, L2 и L3 из 9G5, при этом позиции H52 и L26 представляют собой S.

[00180] Если иное не очевидно из контекста, отсылку к 14G8 или 9G5 следует понимать как отсылку к любой из мышиных, химерных, фанерованных и гуманизированных форм антитела мыши. Эти антитела специфически связываются примерно в пределах аминокислотных остатков 89-97 (SEQ ID NO: 113) ТТР. Такие эпитопы являются скрытыми в нативном тетрамере ТТР и экспонированы в мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фибрильных формах ТТР.

[00181] Другие антитела могут быть получены путем мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи иллюстративного антитела, такого как 14G8 или 9G5. В изобретение также включены моноклональные антитела, которые по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны антителу 14G8 по аминокислотной последовательности зрелых переменных областей тяжелой и/или легкой цепи, и сохраняют его функциональные свойства, и/или которые отличаются от соответствующего антитела небольшим числом функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или вставок.

[00182] Антитела, содержащие CDR 14G8 или 9G5, в целом как описано выше, характеризуются своей способностью связываться предпочтительно с мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными или фибрильными формами ТТР по сравнению с нативными тетрамерными формами ТТР. Кроме того, эти антитела характеризуются избирательной иммунореактивностью в отношении сердечно-сосудистой ткани, подверженной ТТР-опосредованному амилоидозу, но не в отношении здоровой сердечной ткани. Избирательное связывание или иммунореактивность могут быть относительными, например, по меньшей мере в 2 раза лучше или точнее (то есть, нет связывания или иммунореактивности по отношению к нативному ТТР или здоровой сердечной ткани).

[00183] Некоторые антитела могут ингибировать или уменьшать агрегацию ТТР, ингибировать или уменьшать формирование фибрилл ТТР, уменьшать или удалять отложения ТТР, либо агрегированный ТТР, или стабилизировать нетоксичные конформации ТТР в животной модели или клиническом испытании. Некоторые антитела могут лечить, оказывать профилактическое действие или замедлять начало проявления первых симптомов амилоидоза ТТР, как показано на животной модели или клинических испытаниях. Иллюстративные модели животных для исследования активности против амилоидоза ТТР включают в себя те, которые описаны в Kohno *et al.*, *Am. J. Path.* 150(4):1497-1508 (1997); Teng *et al.*, *Laboratory Investigations* 81:385-396 (2001); Wakasugi *et al.*, *Proc. Japan Acad.* 63B:344-347 (1987); Shimada *et al.*, *Mol. Biol. Med.* 6:333-343 (1989); Nagata *et al.*, *J. Biochem.* 117:169-175 (1995); Sousa *et al.*, *Am. J. Path.* 161:1935-1948 (2002); и Santos *et al.*, *Neurobiology of Aging* 31:280-289 (2010).

В. Гуманизированные антитела

[00184] Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором CDR из нечеловеческого «донорного» антитела встраивают в последовательности «акцепторного» антитела человека (смотрите, например, Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539; Carter, US 6407213; Adair, US 5859205; и Foote, US 6881557). Последовательности акцепторных антител могут представлять собой, например, зрелую последовательность антитела человека, составную последовательность из таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей антитела человека, или последовательность областей зародышевой линии. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее по меньшей мере три, четыре, пять или все CDR, полностью или по существу полностью из донорных антител, и каркасные последовательности вариабельной области,

и константные области, если они присутствуют, полностью или по существу полностью из последовательностей антитела человека. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR, полностью или по существу полностью из тяжелой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, и константную область тяжелой цепи, если она присутствует, по существу полностью из каркаса вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей константной области человека. Подобным образом, гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR, полностью или по существу полностью из легкой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность вариабельной области легкой цепи, и константную область легкой цепи, если она присутствует, по существу полностью из каркаса вариабельной области легкой цепи и последовательностей константной области человека. Помимо нанотел и дАт (доменное антитело), гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе является по существу из соответствующего CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено любым общепринятым соглашением, например по Кабату) являются идентичными между соответствующими CDR. Каркасные последовательности вариабельной области цепи антитела или константная область цепи антитела являются по существу из каркасной последовательности вариабельной области человека или константной области человека соответственно, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определенных согласно общепринятому соглашению, такому как, например, Кабата, являются идентичными.

[00185] Хотя гуманизированные антитела часто содержат все шесть CDR (определены любым общепринятым определением, таким как, например, Кабата) из антитела мыши, они также могут быть сконструированы с меньше, чем всеми CDR (например, по меньшей мере 3-мя, 4-мя, 5-тью CDR) из антитела мыши (например, *Pascalis et al., J. Immunol.* 169:3076, 2002; *Vajdos et al., J. of Mol. Biol.*, 320: 415-428, 2002; *Iwahashi et al., Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; *Tamura et al., J. Immunol.*, 164:1432-1441, 2000).

[00186] В некоторых антителах, для сохранения связывания в гуманизированном антителе необходима только часть CDR, а именно подгруппа остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном и не входящие в SDR, могут быть идентифицированы на основе предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDR-H2 часто не требуются), на основании областей CDR

по Кабату, расположенных вне гипервариабельных петель по Чотиа (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987), с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически, или как описано в Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004. В таких гуманизованных антителах в позициях, в которых отсутствует один или большее количество донорных остатков CDR, или в которых отсутствует весь донорный CDR, аминокислота, занимающая позицию, может быть аминокислотой, занимающей соответствующую позицию (по нумерации Кабата) в последовательности акцепторного антитела. Количество таких замен акцептора для донорных аминокислот в CDR что должны быть включены, отражают баланс конкурирующих предпочтений. Такие замены потенциально выгодны для уменьшения количества аминокислот мыши в гуманизованном антителе и, как следствие, уменьшения потенциальной иммуногенности. Однако замены могут также вызывать изменения аффинности, и предпочтительно избегать значительного снижения аффинности. Также могут быть выбраны эмпирически заменяемые позиции в пределах CDR, и аминокислоты для замены.

[00187] Последовательности акцепторного антитела человека могут быть необязательно выбраны из многих известных последовательностей антител человека для того, чтобы обеспечить высокую степень идентичности последовательности (например, идентичность 65-85%) между каркасами вариабельной области последовательности акцептора человека и соответствующими каркасами вариабельной области цепи донорного антитела.

[00188] Примеры акцепторных последовательностей для тяжелой цепи представляют собой зрелые вариабельные области тяжелой цепи человека с кодами доступа NCBI BAC02114 и AAX82494.1 (SEQ ID NO: 3 и 4) и вариабельные области тяжелой цепи подгруппы 3 человека по Кабату. BAC02114 имеет ту же каноническую форму, что и тяжелая цепь 9D5 мыши. Другие примеры акцепторных последовательностей для тяжелой цепи представляют собой зрелые вариабельные области тяжелой цепи человека с кодами доступа NCBI AAD30410.1 и AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 и 4, соответственно) и вариабельные области тяжелой цепи подгруппы 1 человека по Кабату. AAD30410.1 и AAX82494.1 включают в себя две CDR, имеющие ту же каноническую форму, что и тяжелая цепь 14G8 мыши. Примеры акцепторных последовательностей для легкой цепи представляют собой зрелую вариабельную область легкой цепи человека с кодом доступа NCBI ABC66952 (SEQ ID NO: 18) и вариабельные области легкой цепи подгруппы 3 человека по Кабату. ABC66952 включает в себя две CDR, имеющие ту же каноническую форму, что и легкая цепь 9D5 мыши. Другие

примеры акцепторных последовательностей для легкой цепи представляют собой зрелые переменные области легкой цепи человека с кодами доступа NCBI ABA71374.1 и ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 и 73, соответственно) и переменные области легкой цепи подгруппы 2 человека по Кабату. ABA71374.1 и ABC66952.1 имеют ту же каноническую форму, что и легкая цепь 14G8 мыши.

[00189] Если выбирают больше чем одну акцепторную последовательность антитела человека, может быть использован композит или гибрид этих акцепторов, и аминокислоты, используемые в разных позициях в гуманизованных переменных областях легкой цепи и тяжелой цепи, могут быть взяты из любых используемых акцепторных последовательностей антитела человека. Например, зрелые переменные области тяжелой цепи человека с кодами доступа NCBI BACO2114 и AAX82494.1 (SEQ ID NO: 3 и 4) были использованы в качестве акцепторных последовательностей для гуманизации зрелой переменной области тяжелой цепи 9D5. Примеры позиций, в которых эти два акцептора различаются, включают в себя позиции H19 (R или K), H40 (A или T), H44 (G или R), H49 (S или A), H77 (S или T), H82a (N или S), H83 (R или K), H84 (A или S) и H89 (V или M). Гуманизованные варианты переменной области тяжелой цепи 9D5 могут содержать любую аминокислоту в любой из данных позиций. Аналогично, зрелые переменные области тяжелой цепи человека с кодами доступа NCBI AAD30410.1 и AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 и 4, соответственно) использовали в качестве акцепторных последовательностей для гуманизации переменной области зрелой тяжелой цепи 14G8. Примеры позиций, в которых эти два акцептора различаются, включают в себя позиции H82a (N или S), H83 (R или K), H84 (A или S) и H89 (V или M). Гуманизованные варианты переменной области тяжелой цепи 14G8 могут содержать любую аминокислоту в любой из данных позиций. Аналогично, зрелые переменные области легкой цепи человека с кодами доступа NCBI ABA71374.1 и ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 и 73, соответственно) использовали в качестве акцепторных последовательностей для гуманизации переменной области зрелой легкой цепи 14G8. Примером позиции, в которой эти два акцептора различаются, является позиция L18 (S или P). Гуманизованные варианты переменной области легкой цепи 14G8 могут содержать любую аминокислоту в этой позиции.

[00190] Могут быть выбраны определенные аминокислоты из остатков в каркасе переменной области человека для замены, исходя из их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывания с антигеном. Исследование таких возможных влияний заключается в моделировании, изучении характеристик аминокислот в

определенных местах, или эмпирическом наблюдении эффектов замены или мутагенеза определенных аминокислот.

[00191] Например, когда аминокислота различается между остатком каркаса зрелой варибельной области мыши и выбранным остатком каркаса зрелой варибельной области человека, аминокислота в человеческом каркасе может быть замещена эквивалентной каркасной аминокислотой из мышинового антитела, если разумно ожидать, что аминокислота:

- (1) нековалентно прямо связывается с антигеном;
- (2) является смежной с областью CDR,
- (3) в противном случае взаимодействует с областью CDR (например, находится в пределах около 6 Å области CDR)
- (4) опосредует взаимодействие между тяжелой и легкой цепями.

[00192] Аминокислотные остатки каркаса из классов (1) - (3), как определено Queen, US 5530101, иногда упоминаются в качестве альтернативы как канонические остатки и остатки Вернье. Остатки каркаса, которые помогают определить конформацию петли CDR, иногда упоминаются как канонические остатки (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Thornton & Martin, J. Mol. Biol. 263:800815 (1996)). Остатки каркаса, которые поддерживают конформацию антиген-связывающей петли и играют определенную роль в тонкой подгонке антитела к антигену, иногда упоминаются как остатки Вернье (Foote & Winter, J. Mol. Biol. 224:487-499 (1992)).

[00193] Другими остатками каркаса, которые представляют собой кандидаты на замену, являются остатки, создающие потенциальный сайт гликозилирования. Еще другими кандидатами на замещение являются каркасные аминокислоты акцептора человека, которые являются необычными для иммуноглобулина человека в этой позиции. Эти аминокислоты могут быть заменены аминокислотами из эквивалентной позиции донорного антитела мыши, или из эквивалентных позиций более типичных человеческих иммуноглобулинов.

[00194] По причинам, таким как: возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелыми и легкими цепями, взаимодействие с константной областью, является сайтом для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, является необычным остатком для своей позиции в последовательности варибельной области человека и, следовательно, потенциально иммуногенен, повышает потенциал к агрегированию, и другим причинам,

следующие 15 позиций каркаса варибельной области были рассмотрены в качестве кандидатов на замены в 8-ми зрелых варибельных областях тяжелой цепи Hu9D5 и в 5-ти зрелых варибельных областях легкой цепи Hu9D5, как дополнительно указано в примерах: H42 (G42E), H47 (W47L), H69 (I69F), H82 (M82S), H82b (S82(b)L), H108 (T108L), L8 (P8A), L9 (L9P), L18 (P18S), L19 (A19V), L36 (Y36F), L39 (K39R), L60 (D60S), L70 (D70A), и L74 (K74R). Также, следующие 11 позиций каркаса варибельной области были рассмотрены в качестве кандидатов на замены в 3-ех иллюстративных зрелых варибельных областях тяжелой цепи Hu14G8 и в 3-ех иллюстративных зрелых варибельных областях легкой цепи Hu14G8, как дополнительно указано в примерах: H1 (Q1E), H3 (Q3K), H47 (W47L), H105 (Q105T), L8 (P8A), L9 (L9P), L19 (A19V), L26 (N26S), L36 (Y36F), L60 (D60S), и L70 (D70A).

[00195] Здесь, как и в других местах, первый упомянутый остаток представляет собой остаток гуманизированного антитела, сформированного путем вставки CDR по Кабату или составной CDR по Чотиа-Кабату в случае CDR-H1, в каркас акцептора человека (например, составной или гибридный каркас акцептора человека), а второй упомянутый остаток представляет собой остаток, который рассматривается как заменяющий такой остаток. Таким образом, в пределах каркасов варибельной области, первый упомянутый остаток является человеческим, а в пределах CDR, первый упомянутый остаток является мышинным.

[00196] Иллюстративные антитела Hu9D5 включают любые перестановки или комбинации иллюстративных варибельных областей зрелой тяжелой и легкой цепей (например, VHv1/VLv1 или H1L1, VHvi/VLv2 или H1L2, VHvi/VLv3 или H1L3, VHvi/VLv4 или H1L4, VHvi/VLv5 или H1L5, VHv2/VLv1 или H2L1, VHv2/VLv2 или H2L2, VHv2/VLv3 или H2L3, VHv2/VLv4 или H2L4, VHv2/VLv5 или H2L5, VHv2b/VLvi или H2bL1, VHv2b/VLv2 или H2bL2, VHv2b/VLv3 или H2bL3, VHv2b/VLv4 или H2bL4, VHv2b/VLv5 или H2bL5, VHv3/VLv1 или H3L1, VHv3/VLv2 или H3L2, VHv3/VLv3 или H3L3, VHv3/VLv4 или H3L4, VHv3/VLv5 или H3L5, VHv3bNLv1 или H3bL1, VHv3b/VLv2 или H3bL2, VHv3b/VLv3 или H3bL3, VHv3b/VLv4 или H3bL4, VHv3b/VLv5 или H3bL5, VHv4/VLv1 или H4L1, VHv4/VLv2 или H4L2, VHv4/VLv3 или H4L3, VHv4/VLv4 или H4L4, VHv4/VLv5 или H4L5, VHv4b/VLv1 или H4bL1, VHv4b/VLv2 или H4bL2, VHv4b/VLv3 или H4bL3, VHv4b/VLv4 или H4bL4, VHv4b/VLv5 или H4bL5, VHv5/VLvi или H5L1, VHv5/VLv2 или H5L2, VHv5/VLv3 или H5L3, VHv5/VLv4 или H5L4, и VHv5/VLv5 или H5L5).

[00197] Данное изобретение предлагает препараты вариантов гуманизированных антител 9D5, в которых гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи показывает по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с гуманизированной Hu9D5VHv4b (SEQ ID NO: 11), и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи показывает по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с Hu9D5VLv1 (SEQ ID NO: 19). В некоторых таких антителах сохраняют по меньшей мере 1, 2 или все 3 обратные мутации или другие мутации в H4bL1 Hu9D5. Данное изобретение также предлагает варианты других иллюстративных гуманизированных антител 9D5. Такие варианты имеют зрелые переменные области легкой и тяжелой цепей, показывающие по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательностей с зрелыми переменными областями легкой и тяжелой цепей иллюстративных гуманизированных антител 9D5 H1L1, H1L2, H1L3, H1L4, H1L5, H2L1, H2L2, H2L3, H2L4, H2L5, H2bL1, H2bL2, H2bL3, H2bL4, H2bL5, H3L1, H3L2, H3L3, H3L4, H3L5, H3bL1, H3bL2, H3bL3, H3bL4, H3bL5, H4L1, H4L2, H4L3, H4L4, H4L5, H4bL1, H4bL2, H4bL3, H4bL4, H4bL5, H5L1, H5L2, H5L3, H5L4, или H5L5.

[00198] Позиции каркаса переменных областей соответствуют нумерации по Кабату, если не указано иное. Другие такие варианты обычно отличаются от последовательностей иллюстративных тяжелой и легкой цепей Hu9D5 небольшим числом (например, обычно не больше чем 1, 2, 3, 5, 10 или 15) замен, делеций или инсерций. Такие отличия обычно приходятся на каркас, но могут также встречаться в CDR.

[00199] Иллюстративные антитела Hu14G8 включают в себя любые перестановки или комбинации иллюстративных зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей (например, VHv1/VLv1 или H1L1, VHv1/VLv2 или H1L2, VHv1/VLv3 или H1L3, VHv2NLv1 или H2L1, VHv2/VLv2 или H2L2, VHv2/VLv3 или H2L3, VHv3/VLv1 или H3L1, VHv3/VLv2 или H3L2, и VHv3/VLv3 или H3L3).

[00200] Данное изобретение предлагает варианты гуманизированных антител 14G8, в которых гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи показывает по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с Hu14G8VHv2 (Hu14G8 H2) (SEQ ID NO: 65), и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи показывает по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с Hu14G8VLv3 (Hu14G8 L3) (SEQ ID NO: 76). В некоторых таких антителах сохраняют по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или все 5 обратных мутаций или других мутаций в Hu14G8 H2L3. Данное изобретение также предлагает варианты других иллюстративных

гуманизированных антител 14G8. Такие варианты имеют зрелые переменные области легкой и тяжелой цепей, показывающие по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательностей с зрелыми переменными областями легкой и тяжелой цепей иллюстративных гуманизированных антител 14G8 H1L1, H1L2, H1L3, H2L1, H2L2, H2L3, H3L1, H3L2, или H3L3.

[00201] В некоторых антителах по меньшей мере одна из позиций H1, и H47 в области Vh занята E и L, соответственно. В некоторых антителах позиции H1 и H47 в области Vh заняты E и L соответственно, как в Hu14G8VHv2 и Hu14G8VHv3. В некоторых антителах по меньшей мере одна из позиций H3 и H105 в области Vh занята соответственно K и T. В некоторых антителах позиции H3 и H105 в области Vh заняты соответственно K и T, как в Hu14G8VHv1. В некоторых антителах позиция L36 в области Vk занята F, как в Hu14G8VLv2. В некоторых антителах по меньшей мере одна из позиций L8, L9, L19, L26, L60 и L70 в области Vk занята соответственно A, P, V, S, S и A. В некоторых антителах позиции L8, L9, L19 и L70 в области Vk заняты соответственно A, P, V и A, как в Hu14G8VLv1. В некоторых антителах позиции L26 и L60 в области Vk заняты S, как в Hu14G8VLv3. Области CDR таких гуманизированных антител могут быть идентичными или почти полностью идентичными областям CDR мышинового донорного антитела 14G8. Области CDR могут быть определены согласно любому общепринятому соглашению (например, согласно Чотиа, или составному Чотиа и Кабата), например, как определено согласно Кабату.

[00202] Позиции каркаса переменных областей соответствуют нумерации по Кабату, если не указано иное. Другие такие варианты обычно отличаются от последовательностей иллюстративных тяжелой и легкой цепей Hu14G8 небольшим числом (например, обычно не большим чем 1, 2, 3, 5, 10 или 15) замен, делеций или инсерций. Такие отличия обычно приходятся на каркас, но могут также встречаться в CDR.

[00203] Возможностью для дополнительных вариаций в гуманизированных вариантах 14G8 или 9G5 являются дополнительные обратные мутации в каркасах переменной области. Многие из остатков каркаса, не контактирующих с CDR в гуманизованном мАт, могут вмещать замены аминокислот из соответствующих позиций донорного мАт мыши, или других антител мыши или человека, и даже многие потенциальные контактные остатки в CDR также поддаются замене. Даже аминокислоты в CDR могут быть изменены, например, на остатки, обнаруженные в соответствующей позиции последовательности акцептора человека, используемой для предоставления

каркасов вариабельной области. Кроме того, альтернативные последовательности акцептора человека могут быть использованы, например, для тяжелой и/или легкой цепей. Если применяются различные акцепторные последовательности, одна или большее количество рекомендованных выше обратных мутаций могут не выполняться, поскольку соответствующие донорные и акцепторные остатки уже одинаковы без обратных мутаций.

[00204] Предпочтительно замены или обратные мутации в гуманизованных вариантах 14G8 или 9G5 (независимо от того, консервативны они или нет) не оказывают существенного отрицательного влияния на аффинность связывания или активность гуманизованного мАт, то есть его способность связываться с мономерным ТТР (например, активность в некоторых или всех анализах, описанных в данных примерах, варианта гуманизованного антитела 14G8 или 9G5, является по существу, такой же или составляет по меньшей мере 90%, то есть в пределах экспериментальной погрешности, таковой антитела 14G8 или 9G5 мыши).

C. Выбор константной области

[00205] Вариабельные области тяжелой и легкой цепей гуманизованных антител могут быть соединены по меньшей мере с частью константной области антитела человека. Выбор константной области зависит от желаемого эффекта, будь то антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или зависимость от комплемента цитотоксичность. Например, изотипы IgG1 и IgG3 человека могут вызывать зависимость от комплемента цитотоксичность, а изотипы IgG2 и IgG4 человека - не могут. IgG1 и IgG3 человека также индуцируют более сильные клеточно-опосредованные эффекторные функции, чем IgG2 и IgG4 человека. Константными областями легкой цепи могут быть лямбда или каппа.

[00206] Одна или большее количество аминокислот на амино- или карбоксиконце легкой и/или тяжелой цепи, такая как С-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или могут образовать производное в пропорции, или быть во всех молекулах. Могут быть сделаны замены в константных областях для снижения или усиления эффекторной функции, такой как комплемент-опосредованная цитотоксичность или АЗКЦ (смотрите, например, Winter et al., патент США № 5624821, Tso et al., патент США № 5834597 и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), или для увеличения периода полувыведения у человека (смотрите, например, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Иллюстративные замены включают в себя Gln в позиции 250 и/или

Leu в позиции 428 (нумерация EU используется в этом параграфе для константной области) для увеличения периода полужизни антитела. Замены в любой или во всех позициях 234, 235, 236 и/или 237 уменьшают сродство к рецепторам Fcγ, в частности рецептору FcγRI (смотрите, например, US 6624821). Может быть использована замена на аланин в позициях 234, 235 и 237 человеческого IgG1 для снижения эффекторных функций. Некоторые антитела имеют замены на аланин в позициях 234, 235 и 237 IgG1 человека для снижения эффекторных функций. Необязательно, позиции 234, 236 и/или 237 в IgG2 человека замещают аланином, а позицию 235 - глутамином (смотрите, например, US 5624821). В некоторых антителах, используется мутация в одной или большем количестве позиций 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 и 331 по нумерации EU IgG1 человека. В некоторых антителах, используется мутация в одной или нескольких позициях 318, 320 и 322 по нумерации EU IgG1 человека. В некоторых антителах, в позициях 234 и/или 235 аминокислота замещена аланином, и/или в позиции 329 замещена глицином. В некоторых антителах, в позициях 234 и 235 аминокислоты замещены на аланин, например, в SEQ ID NO: 102. В некоторых антителах, изотипом является IgG2 или IgG4 человека.

[00207] Иллюстративная константная область каппа-легкой цепи человека имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104. N-концевой аргинин SEQ ID NO: 104 может быть опущен, и в этом случае константная область каппа-легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105. Антитела могут быть экспрессированы в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')₂ и F_v, или в виде одноцепочечных антител, в которых зрелые вариабельные домены тяжелой и легкой цепей соединены через спейсер.

[00208] Константные области человека показывают аллотипическую вариацию и изоаллотипическую вариацию между различными индивидами, то есть константные области могут различаться у разных людей в одной или большем количестве полиморфных позиций. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотки, распознающие изоаллотип, связываются с непалиморфной областью одного или большего количества других изотипов. Отсылка к константной области антитела человека включает в себя константную область с любым природным аллотипом или любой перестановкой остатков, занимающих позиции в природных аллотипах. Иллюстративные последовательности тяжелых цепей, включая те, что имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 101-103 с SEQ ID NO: 103, которая имеет аллотип G1m3

IgG1, являются предпочтительными. Отсылка к константной области антитела человека включает в себя константную область с любым природным аллотипом или любой перестановкой остатков, занимающих позиции в природных аллотипах.

D. Экспрессия рекомбинантных антител

[00209] Антитела могут быть получены с помощью рекомбинантной экспрессии. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, могут быть кодон-оптимизированными для экспрессии в желаемом типе клеток (например, CHO или Sp2/0). Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции обычно содержат последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с последовательностями, кодирующими цепи антитела, включая природные или гетерологичные элементы области промотора. Последовательности контроля экспрессии могут быть эукариотическими промоторными системами в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева. Как только вектор был внедрен в соответствующего хозяина, хозяина поддерживают в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидных последовательностей на высоком уровне, и сбора, и очистки перекрёстно-реактивных антител. Вектор или векторы, кодирующие цепи антитела, также могут содержать ген отбора, такой как дигидрофолатредуктаза, чтобы сделать возможной амплификацию количества копий нуклеиновых кислот, кодирующих цепи антитела.

[00210] *E. coli* является прокариотическим хозяином, полезным для экспрессии антител, в частности фрагментов антител. Микробы, такие как дрожжи, также полезны для экспрессии. *Saccharomyces* является предпочтительным дрожжевым хозяином с подходящими векторами, имеющими последовательности контроля экспрессии, точку начала репликации, последовательности терминации транскрипции, и тому подобное по желанию. Типичные промоторы включают в себя 3-фосфоглицераткиназу и другие гликолитические ферменты. Индуцируемые дрожжевые промоторы включают в себя, среди прочего, промоторы из алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома C и ферментов, ответственных за использование мальтозы и галактозы.

[00211] Клетки млекопитающих могут быть использованы для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. Смотрите Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). В данной области техники был создан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и они включают в себя клеточные линии CHO, различные клеточные линии COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и не продуцирующие

антитела клетки миеломы, включая Sp2/0 и NS0. Может быть целесообразно использовать нечеловеческие клетки. Векторы экспрессии для этих клеток могут содержать последовательности контроля экспрессии, такие как точку начала репликации, промотор, энхансер (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)) и необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и терминирующие транскрипцию последовательности. Подходящие последовательности контроля экспрессии могут представлять собой промоторы, полученные из: эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, бычьего папилломавируса и тому подобных. Смотрите, Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

[00212] После введения вектора(-ов), кодирующего тяжелые и легкие цепи антитела, в культуру клеток, клеточные пулы можно проскринировать на рост продуктивности и качество продукта в бессывороточной среде. Топ-продуцирующие пулы клеток затем могут быть подвергнуты поклеточному клонированию на основе FACS для создания моноклональных линий. Могут быть целесообразными специфические продуктивности выше 50 пг или 100 пг на клетку в день, которые соответствуют титрам продукта больше чем 7,5 г/л культуры. Антитела, продуцированные клонами одной клетки, также могут быть протестированы на мутность, фильтрационные свойства, проведены электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГЭ), изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), УФ сканирование, ВЭЭХ (высокоэффективная эксклюзионная хроматография), картирование углеводов-олигосахаридов, масс-спектрометрия и анализ связывания, такой как ИФА или Вiasoge. Выбранный клон затем может быть перенесен в несколько флаконов и сохранен в замороженном виде для последующего использования.

[00213] Может быть использована методика коммерческого производства антител, включая оптимизацию кодонов, подбор промоторов, выбор элементов транскрипции, выбор терминаторов, клонирование из одной клетки без сыворотки, создание стока клеток, использование маркеров отбора для амплификации количества копий, терминатора СНО, или улучшение титров белка (смотрите, например US 5786464, US 6114148, US 6063598, US 7569339, WO2004/050884, WO2008/012142, WO2008/012142, WO2005/019442, WO2008/107388, и WO2009/027471, и US 5888809).

[00214] После экспрессии антитела могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники, включая захват белком А, колоночную хроматографию (например, гидрофобного взаимодействия или

йонного обмена), низкий pH для инактивации вирусов и тому подобное (смотрите, *Scopes, Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

[00215] Антитела, используемые для приготовления раскрытых препаратов, являются как правило, выделенными или очищенными, т. е. по существу не содержат клеточного материала или других загрязняющих белков из клеток, в которых они продуцируются, или по существу не содержат химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Например, антитело, которое по существу не содержит клеточного материала, включает в себя препараты антитела, имеющие менее чем около 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% или меньше (по сухой массе) загрязняющего белка. Когда антитело получают рекомбинантным способом, оно также по существу не содержит культуральной среды таким образом, что культуральная среда составляет менее чем около 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% или меньше от объема белкового препарата. Когда антитело получают химическим синтезом, оно предпочтительно по существу не содержит или отделено от химических предшественников или других химических веществ, вовлеченных в синтезе белка. Соответственно, такие препараты антител имеют менее чем около 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% или меньше (в пересчете на сухую массу) химических предшественников или соединений, отличных от лекарственной субстанции антитела. Рекомбинантно экспрессируемое антитело может быть очищено такими способами, как, например, аффинная хроматография, кислотная обработка, глубинная фильтрация, анионообменная хроматография, катионообменная хроматография, нанофильтрация, ультрафильтрация, диализ и диафильтрация.

[00216] Очищенная лекарственная субстанция антитела может быть доведена до раствора, содержащего любой из препаратов, описанных в данном документе, разбавлена до желаемой концентрации, и сохранена до готовности к применению. Необязательно, препарат может храниться в концентрированной форме до готовности к применению.

Е. Конъюгаты

[00217] Антитела, используемые в раскрытых препаратах, могут быть связаны с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксический агент, радиотерапевтический агент, иммуномодулятор, вторым антителом (например, для образования гетероконъюгата антитела) или любым другим биологически активным агентом, который облегчает или усиливает активность химерного, венероанного или гуманизированного 14G8 или 9G5. Характерные терапевтические фрагменты включают в себя лекарственные средства,

которые снижают уровни ТТР, стабилизируют нативную тетрамерную структуру ТТР, ингибируют агрегацию ТТР, разрушают фибрилльные или амилоидные образования ТТР, или противодействуют клеточной токсичности.

[00218] Раскрытые в данном документе антитела также могут быть связаны или конъюгированы с одним или большим количеством других антител (например, для формирования гетероконъюгатов антител). Такие другие антитела могут связываться с различными эпитопами в ТТР или его части, или могут связываться с другим целевым антигеном.

[00219] Антитела также могут быть соединены с детектируемой меткой. Такие антитела могут быть использованы, например, для диагностики амилоидоза ТТР, для мониторинга прогрессирования амилоидоза ТТР и/или для оценки эффективности лечения. Такие антитела особенно полезны для выполнения таких определений у субъектов, которые подвержены или могут быть подвержены амилоидозу ТТР, или в соответствующих биологических образцах, полученных из таких субъектов. Характерные обнаруживаемые метки, которые могут быть присоединены или прицеплены к антителу, включают в себя: различные ферменты, такие как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как люминол; биолюминесцентные материалы, такие как люцифераза, люциферин и азкорин; радиоактивные материалы, такие как иттрий⁹⁰ (⁹⁰Y), радиосеребро-111, радиосеребро-199, висмут²¹³, йод (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), технеций (⁹⁹Tc), таллий (²⁰¹Tl), галлий (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), палладий (¹⁰³Pd), молибден (⁹⁹Mo), ксенон (¹³³Xe), фтор (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rn, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn, и ¹¹⁷Tm; позитрон-излучающие металлы с использованием различных позитронно-эмиссионных томографий; нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов; и молекулы, которые радиоактивно мечены или конъюгированы с определенными радиоизотопами.

[00220] Соединение радиоизотопов с антителами может быть выполнено с использованием обычных бифункциональных хелатов. Для присоединения радиосеребра-111 и радиосеребра-199 можно использовать линкеры на основе серы. Смотрите Nazga *et al.*, Cell Biophys. 24-25:1-7 (1994). Присоединение радиоизотопов серебра может включать

в себя восстановление иммуноглобулина с помощью аскорбиновой кислоты. Для радиоизотопов, таких как ^{111}In и ^{90}Y , можно использовать ибритумомаб-тиуксетан, и оно будет реагировать с такими изотопами с образованием ^{111}In -ибритумомаб-тиуксетана и ^{90}Y -ибритумомаб-тиуксетана, соответственно. Смотрите Witzig, *Cancer Chemother. Phannacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

[00221] Терапевтические фрагменты, другие белки, другие антитела и/или детектируемые метки могут быть соединены или конъюгированы, прямо или косвенно через посредника (например, линкер), с антителом согласно данному изобретению. Смотрите, например, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985); и Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Подходящие линкеры включают в себя, например, отщепляемые и неотщепляемые линкеры. Можно применять различные линкеры, которые высвобождают присоединенные терапевтические фрагменты, белки, антитела и/или детектируемые метки в кислотных или восстановительных условиях, при воздействии специфических протеаз или в других определенных условиях.

V. Препараты

[00222] Препараты (также известные как фармацевтические композиции) согласно данному изобретению содержат любое из моноклональных антител, описанных в данной заявке, включая химерный, венероанный или гуманизированный вариант антитела 14G8 или 9G5, буфер, один или большее количество сахаров и/или полиолов, и поверхностно-активное вещество, и имеют рН в диапазоне от около 4,5 до около 7,5. Другие компоненты (помимо воды в жидких препаратах), такие как, например, аргинин, лизин, NaCl, сорбит или маннит, могут присутствовать или отсутствовать. Препараты могут быть в жидкой или лиофилизированной форме. Жидкие препараты могут относиться к препарату до лиофилизации или после восстановления лиофилизованного препарата. В целом, компоненты препарата, отличные от воды, встречаются в тех же относительных

массовых пропорциях или молях в лиофилизированном препарате, что и в жидком препарате до лиофилизации. Аналогичным образом, компоненты препарата после восстановления водой в целом находятся в тех же относительных пропорциях, что и в препарате до лиофилизации или лиофилизированном препарате, но абсолютные концентрации могут изменяться пропорционально относительным объемам препарата до и после восстановления. Объем после восстановления может быть таким же, меньшим или большим, чем объем до лиофилизации. Обычно объем после восстановления остается таким же в пределах 5, 3, 2, 1,5, 1,2 или 1,1 объема до лиофилизации. Если, например, объем после восстановления вдвое превышает объем до лиофилизации, то концентрации компонентов примерно вдвое меньше таковых после восстановления чем до лиофилизации.

[00223] В жидких препаратах антитело может присутствовать в концентрации в пределах диапазона около 10-100, 15-80, 20-65, 25-75, 40-65, 45-65 мг/мл, среди прочих. В некоторых препаратах, антитело присутствует в концентрации 55-65 мг/мл до лиофилизации и 45-55 мг/мл после восстановления. В некоторых препаратах, антитело присутствует в концентрации 50 мг/мл после восстановления.

[00224] Препараты содержат буфер, такой как, например, цитратный, гистидиновый, фосфатный или сукцинатный, для обеспечения диапазона pH от около 4,5 до около 7,5, например, pH 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или 7,0. Некоторые препараты имеют pH от около 5,5 до около 7,0, или от около 5,5 до около 6,5, или от около 5,5 до около 6,0, или от около 6,0 до около 6,5, или от около 6,0 до около 7,0, или около 5,75-6,25. Некоторые препараты имеют pH около 6,0, а некоторые препараты имеют pH около 6,5. В некоторых препаратах, гистидин присутствует в концентрации в пределах диапазона около 10-30 мМ или 15-25 мМ, например, в концентрации около 10 мМ, 20 мМ или 25 мМ. В некоторых препаратах, цитрат присутствует в концентрации в пределах диапазона около 10-30 мМ, например, в концентрации около 10 мМ или 20 мМ. В некоторых препаратах, фосфат присутствует в концентрации около 20 мМ. В некоторых препаратах, сукцинат присутствует в концентрации около 20 мМ.

[00225] Препараты содержат сахар/полиол, такой как, например, трегалоза или сахароза. Сахар/полиол может присутствовать в концентрации от около 30 мМ до около 260 мМ, или около 150-350 мМ, или около 200-300 мМ, или около 220-260 мМ, или около 230-250 мМ, или около 205-240 мМ, или около 205-250 мМ, или около 205-260 мМ, или около 230-250 мМ, или около 230-240 мМ, или около 30 мМ, около 205 мМ или около 240 мМ. В некоторых препаратах, трегалоза присутствует в концентрации в пределах

диапазона около 205-260 мМ, около 205-250 мМ или около 205-240 мМ, такой как, например, около 205 мМ, около 230 мМ или около 240 мМ. В некоторых препаратах, сахара присутствует в концентрации в пределах диапазона около 30-260 мМ, около 30-250 мМ или около 30-240 мМ, такой как, например, около 30 мМ, около 230 мМ или около 240 мМ.

[00226] Препараты содержат поверхностно-активное вещество, такое как, например, полисорбат 20 (PS20), полисорбат 80 (PS80) или поллоксамер, например, поллоксамер 188 (также известный как PX188, PLURONIC F68 или FLOCOR). Поверхностно-активное вещество может присутствовать в концентрации в пределах диапазона около от 0,01 до 0,1%, от 0,02 до 0,04%, или от 0,03 до 0,05% по массе. Например, концентрация может составлять 0,005%, 0,01%, 0,015%, 0,02%, 0,025%, 0,03%, 0,035%, 0,04%, 0,045% или 0,05% по массе. Поллоксамеры представляют собой нейонные трёхблочные сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (поли(пропиленоксида)), фланкированной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксида)). Некоторые препараты содержат около 0,02% мас./мас. PS20, около 0,02% мас./мас. PS80 или около 0,04% поллоксамера, например, 0,04% поллоксамера PX188 по массе.

[00227] Некоторые такие препараты характеризуются осмоляльностью в диапазоне от около 270 мОсм/кг до около 330 мОсм/кг, такой как, например, около 335 мОсм/кг.

[00228] Иллюстративный препарат, характеризующийся рН в пределах диапазона от около 5,0 до около 6,5, содержит (а) химерный, венированный или гуманизированный вариант антитела 14G8, содержащего зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 61 и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 70, за исключением того, что позиции H52 и/или L26 согласно нумерации Кабата могут представлять собой N или S, или химерный, венированный или гуманизированный вариант анти-ТТР антитела 9G5, содержащего зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 16, причем антитело присутствует в концентрации в пределах диапазона от около 25 мг/мл до около 75 мг/мл; (b) гистидин, цитрат, фосфат или сукцинат, присутствующий в концентрации около 20 мМ; (c) сахарозу или трегалозу, присутствующую в концентрации в пределах диапазона от около 295 мМ до около 240 мМ или, если сахар отсутствует, присутствует 160 мМ аргинин; и (d) поверхностно-активное вещество, присутствующее в концентрации в пределах диапазона от около 0,01% до около 0,1% по массе; при условии, что (i) если

присутствует гистидиновый или сукцинатный буфер, рН составляет около 6,0; (ii) если присутствует фосфатный буфер, рН составляет около 6,5, и если присутствуют гистидин и трегалоза, поверхностно-активное вещество представляет собой PS80 или PS20, при условии, что если присутствует PS20, также присутствует 25 мМ L-аргинина.

[00229] Некоторые препараты по существу не содержат маннита или сорбита, или как маннита, так и сорбита. В некоторых препаратах, буфер содержит гистидин, такой как, например, гистидиновый буфер. В некоторых таких препаратах, сахар может присутствовать в концентрации в диапазоне от около 230 мМ до около 240 мМ. В некоторых препаратах, сахар представляет собой сахарозу, а поверхностно-активное вещество представляет собой PS20 или PX188, например PS20 в концентрации 0,02% мас./мас. или PX188 в концентрации 0,04% мас./мас. В других препаратах, сахар представляет собой трегалозу. В некоторых препаратах присутствует 160 мМ аргинина. Буфер некоторых препаратов может быть цитратным. В некоторых таких препаратах сахар присутствует в концентрации 230 мМ. В некоторых таких препаратах поверхностно-активное вещество представляет собой 0,02% PS20. В альтернативном варианте, буфер может быть фосфатным. В некоторых таких препаратах присутствует сахароза. В других препаратах буфер является сукцинатным. В некоторых таких препаратах присутствует сахароза. В некоторых препаратах, содержащих гистидин, присутствует трегалоза, например, в концентрации 205 мМ.

[00230] Иллюстративные препараты содержат около (a) 20 мМ цитрата, 230 мМ трегалозы и 0,02% мас./мас. PS20 при рН 5; (b) 20 мМ гистидина, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20; (c) 20 мМ фосфата, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при рН 6,5; (d) 20 мМ цитрата, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при рН 6,5; (e) 20 мМ гистидина, 230 мМ трегалозы и 0,02% мас./мас. PS80; (f) 20 мМ гистидина, 0,02% мас./мас. PS20 и 160 мМ L-аргинин; (g) 20 мМ гистидина, 240 мМ сахарозы и 0,04% мас./мас. PX188; (h) 20 мМ сукцината, 240 мМ сахарозы и 0,022% мас./мас. PS20 при рН 6,0; и (i) 20 мМ гистидина, 205 мМ трегалозы, 0,02% мас./мас. PS20 и 25 мМ L-аргинина. Некоторые из таких препаратов состоят по существу из антитела и (a) 20 мМ цитрата, 230 мМ трегалозы и 0,02% мас./мас. PS20 при рН 5; (b) 20 мМ гистидина, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20; (c) 20 мМ фосфата, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при рН 6,5; (d) 20 мМ цитрата, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при рН 6,5; (e) 20 мМ гистидина, 230 мМ трегалозы и 0,02% мас./мас. PS80; (f) 20 мМ гистидина, 0,02% мас./мас. PS20 и 160 мМ L-аргинин; (g) 20 мМ гистидина, 240 мМ сахарозы и 0,04% мас./мас. PX188; (h) 20 мМ сукцината, 240 мМ сахарозы и 0,022% мас./мас. PS20 при рН

6,0 или (i) 20 мМ гистидина, 205 мМ трегалозы, 0,02% мас./мас. PS20 и 25 мМ L-аргинина. Например, препарат может состоять по существу из антитела и около (а) 20 мМ гистидина, 240 мМ сахарозы и 0,04% мас./мас. PX188; (b) 20 мМ сукцината, 240 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,0; или (с) 20 мМ гистидина, 205 мМ трегалозы, 0,02% мас./мас. PS20 и 25 мМ L-аргинина.

[00231] Например, препарат может содержать (а) антитело, содержащее зрелую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 65, и зрелую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 76, которое присутствует в концентрации около 45-65 мг/мл; (b) гистидиновый буфер в концентрации около 15-25 мМ; (с) сахарозу в концентрации около 220-260 мМ; (d) полоксамер в концентрации около 0,03-0,05%; и pH около 5,75-6,25. Препарат может содержать (а) антитело, содержащее зрелую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 65, и зрелую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 76, которое присутствует в концентрации около 45-65 мг/мл; (b) гистидиновый буфер в концентрации около 20 мМ; (с) сахарозу в концентрации около 240 мМ; (d) полоксамер в концентрации около 0,04%; и pH около 6. Например, препарат может состоять по существу из антитела, содержащего зрелую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 65, и зрелую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 76, и около 20 мМ гистидина, около 240 мМ сахарозы и около 0,04% мас./мас. PX188.

[00232] Лиофилизированные препараты содержат любое из антител, описанных в данном документе, (b) буфер, такой как гистидиновый; (с) сахар/полиол, такой как сахароза; и (d) поверхностно-активное вещество, такое как полоксамер. В некоторых лиофилизированных препаратах любая остаточная вода составляет менее чем 5% по массе, а в некоторых таких препаратах менее чем 2 или 1% по массе препарата. Количества компонентов зависят от объема лиофилизированного, но могут составлять, например, около 100-300, 150-250 или 225-275 мг антитела, около 15-35 или 15-19 мг буфера, и около 0,2-2,5 или 2,0-2,5 мг сурфактанта, и около 400-490 мг сахара или полиола. Иллюстративный лиофилизированный препарат содержит 225-275 мг гуманизированного антитела 14G8, около 15-19 мг L-гистидина, около 400-490 мг сахарозы и около 2,0-2,5 мг полоксамера, или те же компоненты, присутствующие в тех же пропорциях, но в разных количествах. Лиофилизированные препараты могут быть

приготовлены из любых жидких препаратов, описанных выше. Один такой лиофилизированный препарат состоит по существу из около 250 мг гуманизированного антитела 14G8, около 16,8 мг L-гистидина, около 2,2 мг полуксомера PX188 и около 445,3 мг сахарозы или различных количеств тех же компонентов в тех же пропорциях. Лиофилизированные препараты могут храниться в замороженном виде (например, -20 °C), в холоде (например, 4 °C) или при комнатной температуре (например, 22 °C). Примерный размер флакона для лиофилизированного препарата составляет 20 мл.

[00233] Лиофилизированные препараты могут быть восстановлены путем объединения с подходящей жидкостью, например, стерильной водой. Лиофилизированные препараты могут быть восстановлены стерильной водой в раствор без частиц на глаз, менее чем за 5, 4, 3, 2 минуты. Восстановление может быть доведено до того же объема (+/- 20%), что и объем жидкого препарата до лиофилизации. Восстановление до определенного желаемого конечного объема, например, около 5 мл, может быть достигнуто путем добавления определенного количества жидкости с учетом объема, занимаемого сухими компонентами. Например, некоторые лиофилизированные препараты могут быть восстановлены до полного объема около 5 мл путем добавления около 4,9 мл стерильной воды. Восстановление может иметь результатом компоненты, имеющие примерно те же концентрации, относительные и абсолютные, как до лиофилизации, или может иметь результатом примерно те же относительные концентрации, что и до лиофилизации, но уменьшенные или увеличенные абсолютные концентрации. Некоторые лиофилизированные препараты готовят в объеме около 1,2 объема препарата до лиофилизации, что приводит к снижению концентрации на около 17%. Некоторые восстановленные препараты содержат антитело в концентрации около 40-60 мг/мл, например, около 50 мг/мл; (b) гистидиновый буфер присутствует в концентрации около 15-25 мМ, например, около 20 мМ; (c) сахароза присутствует в концентрации около 200-300 мМ, например около 240 мМ; (d) полуксамер присутствует в концентрации от около 0,01% до около 0,1% по массе, например около 0,04% по массе; и (e) pH составляет около 5,5-6,5, например, около 6,0.

[00234] Жидкие или восстановленные лиофилизированные препараты могут быть по существу изотоническими, что подразумевает осмоляльность около 250-350 мОсм/кг воды. Некоторые препараты имеют осмоляльность около 335 мОсм/кг. Некоторые препараты имеют осмоляльность 270-300 мОсм/кг. Жидкие или восстановленные лиофилизированные препараты также могут быть гипертоническими > 350 мОсм/кг воды, или гипотоническими (<250 мОсм/кг воды).

[00235] Жидкие препараты (обычно после восстановления) могут быть добавлены в инфузионный пакет, содержащий разбавитель, такой как физиологический раствор или раствор Рингера, перед введением пациенту. Объем инфузионного пакета обычно относительно велик (например, от 50 мл до 1 л или 100-500 мл) по сравнению с объемом жидкого препарата или составленного лиофилизированного препарата (например, 1-10 мл). В пакете для инфузии можно использовать несколько жидкостей, таких как физиологический раствор, раствор Рингера с лактатом или 5% раствор декстрозы, каждая из которых является по существу изотонической. В типичной схеме около 5 мл жидкого или восстановленного лиофилизированного препарата впрыскивают через порт в 100-мл пакет с физиологическим раствором, и вводят путем внутривенной инфузии в течение периода около часа со скоростью потока около 1,75 мл/мин.

[00236] Препараты, предназначенные для введения людям, предпочтительно изготавливаются в соответствии с Надлежащей производственной практикой (НПП), одобренной или которая может быть одобрена FDA или регулирующим агентством для страны, отличной от США, например, Европейским агентством по лекарственным средствам, для приготовления лекарств для введения людям. Как правило, препараты являются стерильными, например, что достигается стерильной фильтрацией с использованием фильтра 0,2 мкм или 0,22 мкм.

[00237] Стабильность препарата может быть оценена после хранения в лиофилизированной форме с последующим восстановлением. Иллюстративные препараты стабильны при 38-42 °C (например, как оценено с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HPSEC)) после хранения в лиофилизированной форме в течение, по меньшей мере, около 30 дней, препараты стабильны при 20-24 °C, после хранения, по меньшей мере, около 1 года, и препараты стабильны при 2 °C-4 °C после хранения в течение по меньшей мере около 3 лет. Препарат считается стабильным, если после инкубации при одной или большем количестве из таких указанных комбинаций времени и температуры он соответствует приведенному ниже определению от низкой до необнаруживаемой фрагментации и/или от низкой до необнаруживаемой агрегации. Более конкретно, раскрытые препараты демонстрируют низкие или необнаруживаемые уровни агрегации и/или фрагментации антител, или низкое или необнаруживаемое увеличение фрагментации и/или агрегации антитела выше исходного уровня (например, менее чем около 10% агрегации). Некоторые препараты показывают совокупную агрегацию и/или фрагментацию \leq около 5%. Препарат, имеющий низкие или необнаруживаемые уровни фрагментации, содержит по

меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% совокупного белка, например, в одном пике, как определено с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HPSEC), или в двух пиках (каждый соответствует каждой из тяжелых цепей и легких цепей антитела), как определено с помощью восстановительного капиллярного гель-электрофореза (rCGE), представляя нераспавшееся антитело, и не содержащий других одиночных пиков, имеющих больше чем 5%, больше чем 4%, больше чем 3%, больше чем 2%, больше чем 1% или больше чем 0,5% от совокупного белка каждый. Препарат, имеющий низкие или не обнаруживаемые уровни агрегации, содержит не больше чем около 15%, не больше чем около 10%, не больше чем около 5%, не больше чем около 4%, не больше чем около 3%, не больше чем около 2%, не больше чем около 1% или не больше чем около 0,5% агрегации по массе белка, как измерено с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HPSEC). Например, в некоторых препаратах в виде агрегата присутствует менее чем около 10% анти-синуклеинового антитела. Стабильные препараты согласно данному изобретению также показывают небольшую потерю или отсутствие потери биологической активности(ей) антитела, имеющего, например, аффинность связывания, измеряемую с помощью ИФА и/или дополнительного функционального анализа, которая составляет, по меньшей мере, около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% от исходного измеряемого значения. Некоторые препараты имеют аффинность связывания, которая составляет от около 60% до около 140% от исходного измеряемого значения контрольного материала.

VI. Способы лечения

[00238] Препараты согласно данному изобретению могут быть использованы для лечения или осуществления профилактики заболевания у пациента, имеющего или с риском заболевания, опосредованного, по меньшей мере частично, транстиретином (ТТР) и, в частности, мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формами ТТР. В некоторых способах лечения у пациента был диагностирован амилоидоз АТТР. Некоторые такие пациенты могут иметь АТТР-поражения сердца и/или поражения в виде периферической невропатии. Некоторые такие пациенты имеют АТТР-кардиомиопатию дикого типа, при которой нормальные, «дикого типа», белки ТТР слипаются и образуют амилоидные отложения. Некоторые такие пациенты имеют наследственную АТТР-кардиомиопатию. Некоторые такие пациенты имеют наследственную полинейропатию.

[00239] Препараты вводят эффективной схемой, что означает дозировку, способ введения и частоту введения, которая задерживает начало проявления симптомов, уменьшает тяжесть заболевания, замедляет дальнейшее ухудшение и/или улучшает по меньшей мере один признак или симптом нарушения, что подвергается лечению. Если пациент уже страдает от нарушения, схему можно обозначить как терапевтически эффективная схема. Если пациент подвергается повышенному риску заболевания по сравнению с общей популяцией, но еще не испытывает симптомов, схему можно назвать профилактически эффективной схемой. В некоторых случаях можно наблюдать терапевтическую или профилактическую эффективность у отдельного пациента по сравнению с историческими контролями или прошлым опытом у того же пациента. В других случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может быть продемонстрирована в доклиническом или клиническом исследовании на популяции пациентов, получавших лечение, по сравнению с контрольной популяцией необработанных пациентов.

[00240] Частота введения зависит от периода полужизни антитела в системе кровообращения, состояния пациента и пути введения среди прочих факторов. Частота может быть ежедневной, еженедельной, ежемесячной, ежеквартальной или с нерегулярными интервалами в ответ на изменения состояния пациента или прогрессирования нарушения, которое лечат. Иллюстративная частота внутривенного введения находится между еженедельной и ежеквартальной при непрерывном курсе лечения, например, один раз в четыре недели, хотя также возможно более или менее частое дозирование. Для подкожного введения иллюстративная частота дозирования составляет от ежедневной до ежемесячной, хотя возможно более или менее частое дозирование.

[00241] Количество вводимых доз зависит от того, является ли нарушение острым или хроническим, а также от ответа нарушения на лечение. При острых нарушениях или острых обострениях хронического нарушения часто бывает достаточно от 1 до 10 доз. Иногда одной болюсной дозы, необязательно в виде разделенной дозы, достаточно для острого нарушения или острого обострения хронического нарушения. Лечение может повторяться для рецидивов острого нарушения или острого обострения. При хронических нарушениях антитело можно вводить через регулярные промежутки времени, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, каждые шесть месяцев в течение по меньшей мере 3 месяцев, 12 месяцев, 5 лет, 10 лет, или в течение жизни пациента.

[00242] Схема считается терапевтически или профилактически эффективной, если отдельный пациент, прошедший лечение, достигает более благоприятного исхода, чем средний исход в контрольной популяции сопоставимых пациентов, не прошедших лечение способами согласно данному изобретению, или если демонстрируется более благоприятный исход у прошедших лечение пациентов по сравнению с контрольными пациентами в контролируемом клиническом исследовании (например, исследование фазы II, фазы II/III или фазы III), при $p < 0,05$ или $0,01$, или даже $0,001$.

[00243] Эффективные дозы варьируются в зависимости от многих различных факторов, таких как способы введения, целевая локализация, физиологическое состояние субъекта, независимо от того, является ли субъект человеком или животным, других вводимых лекарств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

[00244] Иллюстративный диапазон доз для антител может составлять от около $0,1$ до 80 мг/кг, $0,1-30$, $0,5-5$ или $1-10$ мг/кг массы тела (например, $0,1$, $0,2$, $0,3$, $1,0$, $3,0$, $10,0$ или $30,0$ мг/кг) или $10-5000$, например, $10-1500$ мг в виде фиксированной дозы. Некоторые способы увеличивают дозу со временем. Доза может быть увеличена с шагом один (то есть одно изменение дозы), два, три или больше. Может быть 1 , 2 , 3 или больше доз на каждом уровне до конечного уровня. Конечный уровень может продолжаться, например, по меньшей мере, 15 доз. Например, начальная доза может находиться в диапазоне от $0,1$ мг/кг до 3 мг/кг для трех инфузий один раз каждые 28 дней, затем три инфузии на промежуточном уровне также каждые 28 дней с последующим введением дозы на более высоком уровне, например, $10-30$ мг/кг каждые 38 часов, необязательно по меньшей мере 15 раз. Дозирование зависит от состояния пациента и реакции на предшествующий курс лечения, если таковой присутствует, является ли лечение профилактическим или терапевтическим, и является ли заболевание острым или хроническим, среди прочих факторов.

[00245] Препараты могут вводиться периферическим путем. Пути введения включают в себя местный, внутривенный, оральный, подкожный, внутриартериальный, внутрочерепный, интратекальный, внутрибрюшинный, интраназальный или внутримышечный. Например, пути введения препаратов, предложенных в данном документе, могут быть внутривенным или подкожным. Внутривенное введение может осуществляться, например, путем инфузии в течение периода времени в диапазоне $30-180$ минут, например $30-90$ минут, $60-120$ минут или $90-180$ минут. Этот тип инъекции чаще всего выполняется в мышцы рук или ног. В некоторых таких способах, пациенту могут предварительно вводить обезболивающее, или антигистамин, или дифенгидрамин.

Например, дифенгидрамин может быть введен пациенту в пределах диапазона около от 30 до 90 минут до введения антитела. Некоторым пациентам может быть введен ацетаминофен в течение периода в пределах диапазона около от 30 до 90 минут до введения антитела. В некоторых способах, агенты вводят непосредственно в определенную ткань, где накапливаются отложения, например, путем внутрочерепной инъекции.

[00246] Жидкие препараты можно вводить непосредственно пациенту, например, подкожной инъекцией или инфузией. Лиофилизированные препараты восстанавливают в жидкости, например, в стерильной воде, перед введением пациенту. Для инфузии жидкую композицию вводят в пакет с изотонической жидкостью, например, с физиологическим раствором. Например, лиофилизированная форма дозирования препарата может быть восстановлена до объема около 5,0 мл стерильной водой и разбавлена физиологическим раствором для инфузии, например, до полного инфузионного объема 100 мл, 250 мл или 500 мл.

[00247] Приготовленные антитела согласно схемам могут быть введены в комбинации с другими видами препаратов субъекту, имеющему или с риском транстретин-опосредованного амилоидоза. Необязательно, в дополнение к введению приготовленного антитела в данном документе, такие препараты вводят последовательно или отдельно субъекту, нуждающемуся в этом. Необязательно, субъект больше не получает лечение фармацевтической композицией, содержащей приготовленные антитела.

[00248] Эти препараты включают в себя стабилизаторы ТТР, такие как тафамидис и дифлунизал, генную терапию для подавления экспрессии ТТР и последующей продукции белка ТТР, включая использование малых интерферирующих РНК, например патизирана и инотерсена, и антисмысловых олигонуклеотидов, и также разрушителей амилоида, включая 4'-йодо -4'-дезоксидоксорубицин (IDOX), доксициклин, тауроурсодезоксихолевую кислоту (TUDCA), и циклодекстрин (CyD), и анти-SAP антитела.

[00249] Стабилизаторы ТТР, такие как тафамидис (Vyndaquel от Pfizer) (смотрите, например, WO2011116123, US 9150489) и дифлунизал (генерик), можно использовать для поддержания нормальной растворимой тетрамерной структуры ТТР и для ограничения количества мономеров ТТР в кровотоке. Например, тафамидис активно исследуется как новое соединение, которое связывается с тироксин-связывающими сайтами тетрамера

TTR, ингибирует его диссоциацию на мономеры и блокирует стадию, ограничивающую скорость, в каскаде амилоидогенеза TTR. Дифлунизал связывает и стабилизирует общеизвестные семейные варианты TTR в отношении кислото-опосредованного формирования фибрилл.

[00250] Препараты, ингибирующие РНК, связывают целевую мРНК и тем самым подавляют экспрессию мРНК и предотвращают трансляцию соответствующего белка. Клинические результаты к настоящему времени показали, что малые интерферирующие РНК, например, патизиран или ревузиран (смотрите, например, WO 2016033326), и антисмысловой олигонуклеотид, например, инотерсен (смотрите, например, US 8101743 и 9061044), являются мощными подходами для устранения продуцирования белка TTR путем запуска разрушения мРНК TTR или ингибирования трансляции.

[00251] Патизиран, препарат миРНК, испытывается в многоцентровом клиническом испытании фазы III на пациентах с наследственным АТТР-амилоидозом с полинейропатией (нАТТР-ПН). Также исследуется инотерсен (IONIS-TTRRx), подкожно вводимый антисмысловой олигонуклеотид, разработанный под ту же группу пациентов, что и патизиран.

[00252] Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) проходят клиническое испытание на предмет их способности ингибировать печеночную экспрессию амилоидогенного белка TTR. В данное время соединение АСО, ISIS-TTR_{Rx}, исследуется в многоцентровом рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом клиническом испытании фазы 3 у пациентов с семейной амилоидной полинейропатией (САП).

[00253] Разрушители амилоида, например комбинированный препарат доксициклин/таурурсодезоксихолевая кислота, могут удалять амилоид TTR, отложившийся в органах. Например, комбинированные доксициклин и таурурсодезоксихолевая кислота (TUDCA) разрушают амилоидные фибриллы TTR и, по-видимому, имеют приемлемый профиль безопасности в небольшом, с открытой маркировкой, исследовании фазы 2 среди 20 пациентов с TTR.

[00254] Другим примером разрушителей TTR являются анти-SAP антитела. Анти-SAP антитела являются антителами против обычного нефибриллярного гликопротеина SAP, который стимулирует гиганто-клеточную реакцию, которая удаляет отложения висцерального амилоида.

X. Примеры

Пример 1. Предварительное исследование препарата при низких концентрациях

[00255] Предварительное исследование-разработку препарата проводили на гуманизованном антителе 14G8, имеющем последовательность зрелой тяжелой цепи SEQ ID NO: 82 (за исключением того, что С-концевой лизин может отсутствовать) и последовательность зрелой легкой цепи SEQ ID NO: 86. Предварительный анализ препарата выполняли с гуманизованным антителом 14G8 в 20 препаратах, содержащих комбинации различных буферов в диапазоне рН от около 4,5 до около 7,0, с включением или без определенных сахаров, поверхностно-активных веществ и других наполнителей.

[00256] Свойства препаратов были проверены способами, включающими в себя визуальный осмотр, динамическое светорассеяние (DLS), микропотоковую визуализацию (MFI), дифференциальную сканирующую флуориметрию (DSF), дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) и высокоэффективную эксклюзионную хроматографию (HP-SEC).

[00257] В качестве испытуемых буферов использовали цитратный, гистидиновый, сукцинатный и фосфатный в концентрации от около 10 до около 20 мМ. Испытуемые сахара представляли собой трегалозу и сахарозу в концентрации в диапазоне от около 205 мМ до около 230 мМ. Были испытаны препараты, содержащие трегалозу в цитратном или гистидиновом буфере, а также препараты, содержащие сахарозу в любом из четырех буферов.

[00258] Испытуемыми поверхностно-активными веществами были PS20, PS80 и полуксамер 188 в концентрации в диапазоне от около 0,02% мас./мас. до около 0,04% мас./мас. PS20 был испытан в различных препаратах. Полуксамер и PS80 были испытаны только в одном препарате, который содержал трегалозу в гистидиновом буфере.

[00259] Дополнительные испытанные вспомогательные вещества представляли собой L-аргинин, L-лизин и NaCl в концентрациях от около 25 мМ до около 160 мМ в композициях гистидина с или без трегалозы, или PS20.

[00260] Результатам препаратов при каждом из этих испытаний (F1-F20) были присвоены значения в соответствии с относительной степенью изменения по сравнению с T0. Наиболее благоприятными были обстоятельства, при которых не наблюдали каких-либо изменений. Недопустимы были те обстоятельства, при которых наблюдали большие изменения. Дополнительные значения были присвоены обстоятельствам, при которых наблюдались небольшие изменения и при которых наблюдались промежуточные изменения. В Таблицах 2-3 приводятся результаты воздействия на образцы стресса в виде

замораживания-оттаивания (З-ОТ) и хранения в течение 1 недели при 50 °С (Т-50), как определено с помощью визуального осмотра, MFI, DLS и HP-SEC. В Таблице 2 приведен список общих свойств препаратов, для которых не наблюдалось каких-либо значительных изменений ни в одном из испытаний. В целом, препараты F13 и F20, в обоих которых отсутствовало поверхностно-активное вещество, показали худшие результаты при стрессе. Препараты с рН 4,5 или меньше, или 7,0 или больше, обычно не показывали себя так же хорошо, как другие препараты. 10 мМ концентрации буфера не показывали себя так же хорошо, как 20 мМ концентрации буфера. Присутствие сахаров было полезным, хотя препараты без сахаров и высокой концентрации L-аргинина показали результаты лучше, чем препараты, в которых отсутствовали как сахара, так и высокие концентрации L-аргинина.

[00261] В Таблице 2 приведен список выводов из препаратов, демонстрирующих приемлимые результаты во всех тестах (то есть без значительных изменений).

Таблица 2

Вывод	Подробности
Подходящий диапазон рН	5-6,5
Подходящие буферы	20 мМ цитратный, гистидиновый или фосфатный
Присутствие сахаров или высокая концентрация L-аргинина полезны	230 мМ трегалозы или сахарозы
Требуется поверхностно-активное вещество	0,02% мас./мас. PS20 или PS80

[00262] В Таблице 3 приведен список конкретных комбинаций наполнителей, которые не показали значительных изменений при каком-либо конкретном испытании.

Таблица 3

Препарат	рН	Буфер	Наполнитель 1 (сахар)	Наполнитель 2 (поверхностно-активное вещество)	Другие наполнители

F2	5,0	20 мМ цитратный	230 мМ трегалозы	0,02% мас./мас. PS20	-
F8	6,0	20 мМ гистидиновый	230 мМ сахарозы	0,02% мас./мас. PS20	-
F10	6,5	20 мМ фосфатный	230 мМ сахарозы	0,02% мас./мас. PS20	-
F11	6,5	20 мМ цитратный	230 мМ сахарозы	0,02% мас./мас. PS20	-
F14	6,0	20 мМ гистидиновый	230 мМ трегалозы	0,02% мас./мас. PS80	-
F16	6,0	20 мМ гистидиновый	-	0,02% мас./мас. PS20	160 мМ L- аргинина

[00263] Однако, поскольку все препараты продемонстрировали промежуточные изменения по меньшей мере в одном из испытаний, были проведены дополнительные модификации препаратов, как обсуждается в Примере 2, для создания препаратов, которые обеспечивали бы наиболее стабилизирующие условия для антитела.

Пример 2. Скрининг препаратов при 50 мг/мл

[00264] Исходя из результатов предварительного препаратного скрининга, препараты F21-F31, указанные в Таблице 4, были подвергнуты испытанию при концентрации антитела 50 мг/мл.

[00265] Таблица 4: Список препаратов, испытанных при 50 мг/мл

Таблица 4

Препарат	pH	Буфер	Наполнитель 1 (сахар)	Наполнитель 2 (поверхностно-активное вещество)	Другие наполнители
F21	6,5	25 мМ	230 мМ	0,02% мас./мас.	-

		гистидиновый	трегалозы	PS20	
F22	6,0	20 мМ гистидиновый	240 мМ сахарозы	0,02% мас./мас. PS20	-
F23	6,5	20 мМ гистидиновый	240 мМ сахарозы	0,02% мас./мас. PS20	-
F24	7,0	20 мМ гистидиновый	240 мМ сахарозы	0,02% мас./мас. PS20	-
F25	6,0	20 мМ гистидиновый	240 мМ сахарозы	0,04% мас./мас. PX188	-
F26	6,0	20 мМ фосфатный	240 мМ сахарозы	0,02% мас./мас. PS20	-
F27	6,0	20 мМ сукцинатный	240 мМ сахарозы	0,02% мас./мас. PS20	-
F28	6,0	20 мМ гистидиновый	240 мМ трегалозы	0,02% мас./мас. PS20	-
F29	6,0	20 мМ гистидиновый	30 мМ сахарозы	0,02% мас./мас. PS20	220 мМ маннита
F30	6,0	20 мМ гистидиновый	205 мМ трегалозы	0,02% мас./мас. PS20	25 мМ L- аргинина
F31	6,0	20 мМ гистидиновый	205 мМ трегалозы	0,02% мас./мас. PS20	25 мМ L-лизина

[00266] Образцы подвергались визуальному осмотру, испытаниям - температуры стеклования, MFI, HP-SEC и cIEF, если уместно, после приготовления (Т-жидкость), лиофилизации (T0), двухнедельного хранения в жидком состоянии при 25 °С, и хранения в течение одного и трех месяцев лиофилизированных форм при 2-8 °С, 25 °С и 40 °С. Результатам препаратов по каждому из этих испытаний были присвоены значения «плохо», «приемлемо», «хорошо» и «очень хорошо». Подходящие препараты имели 4000-6000 частиц ≥ 10 мкм/мл (F27), больше чем 94,0% мономера и менее чем 3% высокомолекулярных частиц (F22-F27 и F30) и больше чем 74% основных изоформ после хранения в течение трех месяцев при 40 °С/75% отн. влаж.. В Таблице 5 приведен список общих свойств препаратов, которые не получили оценку «плохо» ни в одном из проведенных испытаний.

[00267] Таблица 5: Список выводов из препаратов, демонстрирующих от приемлимых до очень хороших результатов во всех испытаниях.

Таблица 5

Вывод	Подробности
Оптимальный pH	6,0
Оптимальные буферы	20 мМ гистидиновый или сукцинатный
Оптимальные сахара	205-240 мМ трегалозы или сахарозы
Оптимальное поверхностно-активное вещество	0,02%-0,04% мас./мас. PS20 или PX188

[00268] Таблица 6: Список препаратов, демонстрирующих от приемлимых до очень хороших результатов во всех испытаниях.

Таблица 6

Препарат	pH	Буфер	Наполнитель 1 (сахар)	Наполнитель 2 (поверхностно-активное вещество)	Другие наполнители
F25	6,0	20 мМ гистидиновый	240 мМ сахарозы	0,04% мас./мас. PX188	-
F27	6,0	20 мМ сукцинатный	240 мМ сахарозы	0,02% мас./мас. PS20	-
F30	6,0	20 мМ гистидиновый	205 мМ трегалозы	0,02% мас./мас. PS20	25 мМ L-аргинина

[00269] Было обнаружено, что препарат F25 превосходит все испытанные препараты, демонстрируя меньше 4000 частиц/мл, больше чем 96,0% мономера с менее чем 2,5% высокомолекулярных частиц, и 77% основных изоформ (определено с помощью sIEF) в жидком препарате, хранящимся в течение 2 недель при 25 °C и в лиофилизированных формах, хранящихся в течение 1 месяца и 3 месяцев при испытанных

температурах (40 °C). На основании этих исследований Препарат 25 (20 мМ гистидин-НСl, 240 мМ сахарозы, 0,04% полоксамера, рН 6,0) был идентифицирован в качестве основного кандидата для дальнейшей разработки, как описано в Примере 3.

Пример 3: Приготовление и охарактеризование Препарата F25

[00270] Приготовление образца: Жидкий препарат до лиофилизации представлял собой 61 мг/мл гуманизованного 14G8, 20 мМ гистидина, 240 мМ сахарозы и 0,04% полоксамера. После лиофилизации препарат восстанавливали до концентрации антитела около 50 мг/мл.

[00271] Замороженный исходный материал, как описано выше, оттаивали на водяной бане при 20 °C. После оттаивания материал двух партий смешивали и определяли концентрацию белка. Аликвоту для второй партии снова замораживали до -80 °C до дальнейшего использования. Концентрацию образца корректировали путем разбавления буфером препарата для получения целевой концентрации 50 мг/мл. Поверхностно-активное вещество добавляли путем внесения аликвоты концентрированного стокового раствора в воде прямо в препарат. Затем образец фильтровали через мембранные PVDF-фильтры 0,22 мкм в вытяжном шкафу с ламинарным потоком. Наконец, отфильтрованный препарат был разлит в предварительно очищенные стеклянные флаконы типа I, 20R; каждый флакон с объемом заполнения 5 мл, перед загрузкой в лиофилизатор.

[00272] Лиофилизация: Лиофилизацию образцов выполняли с использованием лиофилизатора полупромышленного масштаба Epsilon 2-12D (Martin Christ, Остероде, Германия). Процессы лиофилизации были основаны на критических температурах продукта выбранного препарата (T_g' -25,7 °C и T_{conset} -25,3 °C) и были разработаны для активного DP. Исходную точку для выбранных условий для выполнения сублимационной сушки выбирали исходя из опубликованных руководств (смотрите, например, Carpenter JF et al., Pharm Res. 1997 August, 4(8):969-75; Jameel F et al., Book chapter 30 in Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals, published online: August 2010; and Remmele RL et al, Curr Pharm Biotechnol., 2012 March, 13(3):471-96). Применяли стандартный протокол замораживания, который используют для препаратов на основе сахарозы путем охлаждения до -45 °C со скоростью 0,5 °C/мин. Первоначальное примерное значение для температуры полки во время первичной сушки поддерживалось таким образом, чтобы конечная температура продукта была равна или ниже измеренной T_g' и измеренной температуры разрушения препарата, чтобы избежать разрушения во время первичной сушки. Было выбрано давление 0,13 мбар в камере так, чтобы вакуум

был в пределах практического диапазона для сушки как в лабораторном, так и в полупромышленном и промышленном масштабе (рекомендуемый диапазон давления в камере - 0,07-0,20 мбар), также с учетом содержания твердых веществ в препарате. Таким образом, выбранное давление в камере обеспечит оптимальную сублимацию и завершение первичной сушки в течение разумного периода времени (в лабораторных масштабах, примерно 25 часов). Температуру полки при вторичной сушке поддерживали на уровне 25 °С при давлении в камере 0,13 мбар. Для препаратов на основе сахарозы с высоким содержанием твердых веществ. Температура полки 25-45 °С во время вторичной сушки должна подходить для десорбции воды в течение разумного периода времени для достижения низкого содержания влаги без неблагоприятного влияния на качество продукта (Pikal MJ, International Journal of Pharmaceutics, 1990, 60:203-217; Startzel P et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 104:2345-2358; и Davis JM et al, Pharm Dev Technol. 2013, July-August, 18(4): 883-96.). Поддерживались низкими (консервативные) скорости нарастания от первичной до вторичной сушки, чтобы избежать повышения температуры продукта выше температуры полки (и, возможно, выше T_g) во время начальных фаз вторичной сушки, когда содержание влаги в продукте является высоким. Вакуум во время процесса лиофилизации контролировался емкостным датчиком (MKS). Во время процесса лиофилизации дверь из оргстекла сублимационной сушилки была покрыта экраном из нержавеющей стали для уменьшения теплового излучения. Чтобы получить образцы с разной остаточной влажностью и охарактеризовать поведение препарата при сушке в ходе процессов, выполняли закрытие одной полки в следующие моменты времени отбора проб: 1) T-IPC1: в конце первичной сушки; 2) T-IPC2: после повышения до температуры вторичной сушки (25 °С); 3) T-IPC3: через 5 ч (Режим разработки № 1) и 6 ч (Режим разработки № 2) вторичной сушки при 25 °С; 4) T-финал (=T₀): в конце вторичной сушки.

Аналитическая характеристика лиофилизованного препарата 25:

[00273] Визуальный внешний вид: В целом, лиофилизованные препараты в процессе сушки (T-IPC1, T-IPC2, T-IPC3) показали превосходное сохранение структуры спекшегося осадка с белыми осадками.

[00274] Титрование Карла Фишера: Содержание воды в лиофилизованных осадках определяли с использованием кулонометрического титратора Карла Фишера Aqua 40.00 (Analytik Jena GmbH, Йена, Германия), который оснащен модулем воздушной камеры. Для измерения, около 15 мг образца взвешивали в стеклянных флаконах 2R в перчаточной камере в условиях с контролируемой влажностью (относительная влажность

<5%) и нагревали до 120 °С в печи, соединенной с реакционным сосудом через систему трубок. Выпаренную воду переносили в раствор для титрования и определяли количество воды. Измерение проводили до тех пор, пока испарения воды становились необнаруживаемыми. Содержание воды в образце рассчитывали с учетом влажности окружающей среды, определенной в трех контрольных пробах. В конце обеих циклов все образцы имели остаточную влажность $\leq 1,0\%$.

[00275] Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC): Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) в Mettler Toledo DSC1_943 (Mettler Toledo, Гиссен, Германия) была использована для оценки тепловых событий, происходящих с замороженным препаратом, например, температуры стеклования лиофилизированных продуктов (T_g). 10 мг лиофилизированного продукта анализировали в опрессованных алюминиевых тиглях (Mettler Toledo, Гиссен, Германия) для физико-химического анализа высушенного продукта. Образцы охлаждали до 0 °С со скоростью 10 К/мин и снова нагревали до 120 °С со скоростью сканирования 10 К/мин. Этот температурный профиль повторяли во втором цикле. Средняя точка эндотермического сдвига исходного уровня при сканировании нагрева была принята за T_g . Температура стеклования изменялась в зависимости от остаточной влажности.

[00276] Дифракция рентгеновских лучей на порошке (XRD): Была использована широкоугольная дифракция рентгеновских лучей на порошке (XRD) для изучения морфологии лиофилизированных продуктов. Использовали рентгеновский дифрактометр Empyrean (Panalytical, Алмело, Нидерланды), оснащенный медным анодом (45 кВ, 40 мА, излучение $K\alpha_1$ на длине волны 0,154 нм) и детектор PIXcel3D. Примерно 100 мг лиофилизированных образцов анализировали в режиме отражения в диапазоне углов 5–45° 2θ , с размером шага 0,04° 2θ и с временем счета 100 секунд/шаг. Морфологию/кристалличность лиофилизированных образцов осадков, полученных в процессе сублимационной сушки (T-IPC1, T-IPC2, T-IPC3, T0) в обеих процессах лиофилизации, определяли с помощью XRD. Все образцы демонстрировали полностью аморфную структуру осадка, и не было обнаружено четких пиков, относящихся к кристаллизации буферных солей или других наполнителей. Во всех образцах наблюдался только один широкий пик с максимумом примерно при 20 градусах 2θ , который характерен для аморфных образцов (Liu W et al., AAPS Pharmscitech, 2005, Vol. 6 (2)).

[00277] Восстановление лиофилизированных препаратов: Объем восстановления определяли путем взвешивания четырех флаконов/полка до и после каждого цикла для определения массы удаленной воды. Образцы лиофилизированных продуктов (флаконы с

плацебо и активным веществом) восстанавливали в вытяжном шкафу с ламинарным потоком в соответствии со следующей процедурой: необходимое количество сверхчистой воды (вода Milli-Q) добавляли к лиофилизированному продукту (в центр флакона) с помощью пипетки. Флакон аккуратно вращали (избегали встряхивания). Время восстановления измеряли как время для достижения полного восстановления лиофилизированного продукта после добавления жидкости. Протекание восстановления оценивали, главным образом, в отношении пенообразования. Время восстановления (растворение всех видимых твердых веществ) образцов, полученных в процессе сублимационной сушки (T-IPC1, T-IPC2, T-IPC3, T0) в обоих процессах лиофилизации, определяемое после добавления сверхчистой воды к лиофилизатам, показано в Таблице 7. После добавления 4,5 мл сверхчистой воды восстановление конечных продуктов было завершено менее чем за 4 минуты.

[00278] Таблица 7: Время восстановления образцов, полученных в разные моменты времени во время лиофилизации

Таблица 7

Момент времени	Время восстановления [мин:с]	
	Режим разработки №	Режим разработки №
	1	2
T-жидкость	-	
T-IPC1	01:55	04:26
T-IPC2	02:33	04:20
T-IPC3	02:32	05:03
T-конечное	01:35	03:52

[00279] pH: pH препарата измеряли с помощью калиброванного pH-метра (SevenEasy®, Mettler Toledo AG, Шверценбах, Швейцария) с использованием электрода с низкой ионной силой (InLab® Pure Pro) или электрода с высокой/нормальной ионной силой (InLab® Micro). Значение pH всех образцов, полученных в процессе сублимационной сушки (T-IPC1, T-IPC2, T-IPC3, T0) в обоих процессах лиофилизации после восстановления, показано в Таблице 8. Не наблюдали изменений pH до и после лиофилизации. После приготовления (T-жидкость) в обоих циклах было достигнуто

целевое значение рН 6,0, и значения рН оставались в пределах целевого диапазона $6,0 \pm 0,1$ в течение и после двух процессов лиофилизации.

[00280] Таблица 8: Значения рН образцов, полученных в различные моменты времени во время лиофилизации.

Таблица 8

Момент времени	Визуальная оценка	
	Режим разработки № 1	Режим разработки № 2
Т-жидкость	6,0	6,0
Т-IPC1	6,1	6,0
Т-IPC2	6,0	6,0
Т-IPC3	6,0	6,0
Т-конечное	6,0	5,9

[00281] Осмоляльность: Осмоляльность образцов измеряли способом понижения температуры замерзания с использованием автоматического полумикроосмометра Knauer № А0300 (Knauer, Берлин, Германия). Осмоляльность всех образцов, полученных в процессе сублимационной сушки (Т-IPC1, Т-IPC2, Т-IPC3, Т0) в обоих процессах лиофилизации после восстановления, показана в Таблице 9. Осмоляльность после приготовления (Т-жидкость) находилась в пределах физиологического диапазона (270–330 мОсмоль/кг) и оставалась в основном неизменной во время и после лиофилизации.

[00282] Таблица 9: Осмоляльность образцов, полученных в разные моменты времени во время лиофилизации.

Таблица 9

Момент времени	Осмоляльность [мОсмоль/кг]	
	Режим разработки № 1	Режим разработки № 2
Т-жидкость	317	310
Т-IPC1	314	317
Т-IPC2	321	314
Т-IPC3	319	315
Т-конечное	320	314

[00283] Спектроскопия ультрафиолетового и видимого излучения (УФ-Вид): Для определения концентрации и оценки мутности использовали считыватель плашек Tecan Safire² (Tecan Austria GmbH, Грёдиг, Австрия). 200 мкл образцов в трех повторностях готовили в 96-луночных плашках (Corning Incorporation, Нью-Йорк, США). После измерения полученные значения поглощения были скорректированы по длине хода луча и с вычитанием значения соответствующего пустого контроля. Все образцы разбавляли до $0,5^{-1}$ мг/мл в буфере плацебо перед измерением. Для расчета концентрации использовали коэффициент экстинкции, основанный на концентрации 1 мг/мл при длине хода луча 1 см, составляющий $1,404 \text{ мл мг}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при 280 нм (информация от Rentschler). Кроме того, увеличение оптической плотности при 350 нм в результате рассеяния света частиц было использовано для оценки мутности образцов. Для расчета индекса агрегации (И.А.) было использовано следующее уравнение: $\text{И.А.} = 100 \cdot (A_{350} / (A_{280} - A_{350}))$. Концентрация белка для всех образцов ($n=3$), полученных в процессе сублимационной сушки (Т-IPC1, Т-IPC2, Т-IPC3, T0) в обоих процессах лиофилизации после восстановления, показана в Таблице 10. После приготовления (Т-жидкость), для всех образцов была достигнута целевая концентрация $50 \pm 2,5$ мг/мл, и она оставалась в пределах спецификации во время и после лиофилизации.

[00284] Таблица 10: Концентрация белка образцов, полученных в разные моменты времени во время лиофилизации.

Таблица 10

Момент времени	Концентрация белка [мг/мл]	
	Режим разработки № 1	Режим разработки № 2
Т-жидкость	$48,8 \pm 0,5$	$49,7 \pm 0,4$
Т-IPC1	$48,3 \pm 0,5$	$51,8 \pm 0,1$
Т-IPC2	$47,8 \pm 0,3$	$51,5 \pm 0,3$

T-IPC3	47,9 ± 0,5	51,2 ± 0,2
T-конечное	51,0 ± 0,3	48,7 ± 0,1

[00285] Высокоэффективная эксклюзионная хроматография (HP-SEC): HP-SEC выполняли в соответствии с информацией, полученной от Rentschler. На колонку наносили 20 мкг стандарта для гель-фильтрации от Bio-Rad (GFS) и образцов антител (использовали концентрацию 1 мг/мл). Как показано в Таблице 11, не наблюдали изменений в низкомолекулярных твердых веществах и при лиофилизации, и изменение в высокомолекулярных твердых веществах было незначительным или отсутствовало. Таким образом, лиофилизация сохраняет подавляющее большинство антител в мономерной форме.

[00286] Таблица 11: Относительное содержание разных молекул в образцах, образующихся в разные моменты времени при лиофилизации.

Таблица 11

Момент и времен и	Мономер [%]		ВМТВ [%]		НМТВ [%]		Полная площадь пика [мЕА*мин]	
	Режим разрабо т-ки №	Режим разрабо т-ки №						
	1	2	1	2	1	2	1	2
Т- жидко сть	97,4 ± 0,0	97,4 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,4 ± 0,0	762,7 ± 0,4	746,8 ± 85,2
T-IPC1	97,6 ± 0,0	97,3 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,4 ± 0,0	757,6 ± 0,3	649,9 ± 65,5
T-IPC2	97,6 ± 0,1	97,3 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	761,3 ± 0,3	687,9 ± 8,2

T-IPC3	97,6	96,7	0,9	1,9	1,5	1,3	753,6	534,3
	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,9	119,2
T- конечн ое	97,6	96,7	0,9	1,9	1,5	1,4	770,3	503,9
	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,3	82,6

[00287] Могут быть внесены различные изменения в форму и детали без отклонения от сущности и объема изобретения. Если иное не очевидно из контекста, любой вариант осуществления, аспект, элемент, признак, этап или тому подобное можно использовать в комбинации с любым другим. Поскольку информация, связанная с цитированием, может изменяться со временем, подразумевается информация, связанная с цитированием, на самый ранний момент действительной даты подачи, и самый ранний момент действительной даты подачи для цитирования означает дату подачи данной заявки или более раннюю приоритетную заявку, раскрывающую цитирование. Все ссылки, опубликованные патенты и патентные заявки, процитированные в основной части данного описания, тем самым включены посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Любой вариант осуществления, аспект, признак, элемент, этап или тому подобное можно комбинировать с любым другим, если контекст не указывает на иное. Когда говорят, что композиция содержит определенные указанные компоненты, заявку следует истолковывать таким образом, что композиция может состоять из или состоять по существу из указанных компонентов, как это раскрывается в альтернативном варианте, пока контекст не требует иного. Например, когда говорят, что цепь антитела имеет аминокислотную последовательность, содержащую указанную SEQ ID NO, следует понимать, если контекст не требует иного, что в альтернативном варианте цепь антитела может состоять из или состоять по существу из SEQ ID NO. «Состоит по существу из» используется в соответствии с соглашением для обозначения основных и новых компонентов композиции. Если иное не очевидно из контекста, вода также может присутствовать в любом количестве. Другие компоненты могут присутствовать в незначительных количествах, не оказывающих существенного влияния на активность или стабильность композиции. Термин «по существу не содержит» определен таким же образом, чтобы указать на то, что компонент может присутствовать, если он вообще присутствует, только в таких незначительных количествах. Когда говорят, что компонент композиции присутствует в концентрации «около» обозначенного значения

или диапазона значений, заявку следует истолковывать как раскрывающую в альтернативном варианте то, что компонент может присутствовать в обозначенном значении или диапазоне значений.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтический препарат, содержащий:

(a) моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 61, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 70, за исключением того, что позиции H52 и L26 согласно нумерации Кабата могут независимо представлять собой N или S, или моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 16, причем указанное антитело присутствует в концентрации в пределах диапазона от около 25 мг/мл до около 75 мг/мл;

(b) буфер, присутствующий в концентрации около 20 мМ, причем буфер является цитратным, гистидиновым, фосфатным или сукцинатным;

(c) либо сахар, присутствующий в концентрации в пределах диапазона от около 205 мМ до около 260 мМ, причем сахар является сахарозой или трегалозой, либо, если сахар отсутствует, присутствуют около 160 мМ аргинина; и

(d) поверхностно-активное вещество, присутствующее в концентрации в пределах диапазона от около 0,01% до около 1% по массе;

причем указанный препарат характеризуется рН в пределах диапазона от около 5,0 до около 6,5; при условии, что:

(i) если присутствует гистидиновый или сукцинатный буфер, рН составляет около 6,0;

(ii) если присутствует фосфатный буфер, рН составляет около 6,5; и

(iii) если присутствуют гистидин и трегалоза, поверхностно-активное вещество представляет собой

a. PS80; или

b. PS20, при условии, что если присутствует PS20, то также присутствуют около 25 мМ L-аргинина.

2. Препарат по п. 1, отличающийся тем, что по существу не содержит маннита или сорбита.
3. Препарат по п. 1, отличающийся тем, что буфер является гистидиновым.
4. Препарат по п. 3, отличающийся тем, что сахар присутствует в концентрации в диапазоне от около 230 мМ до около 250 мМ.
5. Препарат по п. 4, отличающийся тем, что сахар присутствует в концентрации около 230-240 мМ.
6. Препарат по п. 5, отличающийся тем, что сахар является сахарозой, а поверхностно-активное вещество - PS20 или PX188.
7. Препарат по п. 6, отличающийся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой PS20 в концентрации 0,02% мас./мас.
8. Препарат по п. 7, отличающийся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой PX188 в концентрации 0,04% мас./мас.
9. Препарат по п. 5, отличающийся тем, что сахар представляет собой трегалозу.
10. Препарат по п. 1, отличающийся тем, что присутствуют 160 мМ аргинина.
11. Препарат по п. 1, отличающийся тем, что буфер является цитратным.
12. Препарат по п. 11, отличающийся тем, что сахар присутствует в концентрации 230 мМ.
13. Препарат по п. 12, отличающийся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой 0,02% PS20.
14. Препарат по п. 1, отличающийся тем, что буфер является фосфатным.
15. Препарат по п. 14, отличающийся тем, что присутствует сахар и он представляет собой сахарозу.

16. Препарат по п. 1, отличающийся тем, что буфер является сукцинатным.

17. Препарат по п. 16, отличающийся тем, что присутствует сахар и он представляет собой сахарозу.

18. Препарат по п. 4, отличающийся тем, что присутствует сахар и он представляет собой трегалозу.

19. Препарат по п. 18, отличающийся тем, что трегалоза присутствует в концентрации 205 мМ.

20. Препарат по п. 4, отличающийся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой PS20.

21. Препарат по п. 1, содержащий:

(a) 20 мМ цитрата, 230 мМ трегалозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 5;

(b) 20 мМ гистидина, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20;

(c) 20 мМ фосфата, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,5;

(d) 20 мМ цитрата, 230 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,5;

(e) 20 мМ гистидина, 230 мМ трегалозы и 0,02% мас./мас. PS80;

(f) 20 мМ гистидина, 0,02% мас./мас. PS20 и 160 мМ L-аргинина;

(g) 20 мМ гистидина, 240 мМ сахарозы и 0,04% мас./мас. PX188;

(h) 20 мМ сукцината, 240 мМ сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,0; или

(i) 20 мМ гистидина, 205 мМ трегалозы, 0,02% мас./мас. PS20 и 25 мМ L-аргинина.

22. Препарат по п. 21, отличающийся тем, что препарат состоит по существу из антитела и около:

(a) 20 мМ цитрата, 230 мМ трегалозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 5;

- (b) 20 mM гистидина, 230 mM сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20;
- (c) 20 mM фосфата, 230 mM сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,5;
- (d) 20 mM цитрата, 230 mM сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,5;
- (e) 20 mM гистидина, 230 mM трегалозы и 0,02% мас./мас. PS80;
- (f) 20 mM гистидина, 0,02% мас./мас. PS20 и 160 mM L-аргинина;
- (g) 20 mM гистидина, 240 mM сахарозы и 0,04% мас./мас. PX188;
- (h) 20 mM сукцината, 240 mM сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,0; или
- (i) 20 mM гистидина, 205 mM трегалозы, 0,02% мас./мас. PS20 и 25 mM L-аргинина.

23. Препарат по п. 22, отличающийся тем, что указанный препарат состоит по существу из антитела и около:

- (a) 20 mM гистидина, 240 mM сахарозы и 0,04% мас./мас. PX188;
- (b) 20 mM сукцината, 240 mM сахарозы и 0,02% мас./мас. PS20 при pH 6,0; или
- (c) 20 mM гистидина, 205 mM трегалозы, 0,02% мас./мас. PS20 и 25 mM L-аргинина.

24. Препарат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что антитело содержит зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

25. Препарат по п. 24, отличающийся тем, что препарат состоит по существу из антитела в концентрации около 50 мг/мл, и около 20 mM гистидина, около 240 mM сахарозы и около 0,04% мас./мас. PX188.

26. Препарат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанное антитело содержит зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 61, и зрелую вариабельную область легкой

цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 70, за исключением того, что позиции H52 и L26 согласно нумерации Кабата могут каждая независимо представлять собой N или S.

27. Препарат по любому из п. 1-25, отличающийся тем, что указанное антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 16.

28. Фармацевтический препарат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что моноклональное антитело представляет собой гуманизованное, химерное или венеризованное антитело.

29. Препарат по п. 28, отличающийся тем, что моноклональное антитело является гуманизованным.

30. Препарат по п. 29, отличающийся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 64-66, и указанная зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 74-76.

31. Препарат по п. 29, отличающийся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 5-12, и указанная зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 19-23.

32. Препарат по п. 30, отличающийся тем, что указанная зрелая тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 65, и указанная зрелая легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 76.

33. Препарат по п. 31, отличающийся тем, что указанная зрелая тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 11, и указанная зрелая легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 19.

34. Гуманизированное антитело по любому из пп. 28-33, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, и указанная зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи.

35. Гуманизированное антитело по п. 34, отличающееся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 103, при условии, что С-концевой лизин может отсутствовать, и/или указанная зрелая переменная область легкой цепи слита с константой областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 104 или 105.

36. Препарат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что моноклональное антитело присутствует в концентрации около 50 мг/мл.

37. Препарат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что гистидиновый буфер присутствует в концентрации около 20 мМ.

38. Препарат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что рН составляет около 5,75-6,25.

39. Препарат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что сахар/полиол представляет собой сахарозу, присутствующую в концентрации около 240 мМ.

40. Препарат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полоксамер представляет собой полоксамер 188 в концентрации около 0,04 % по массе.

41. Препарат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что менее чем около 5% или 3% по массе антитела присутствует в виде агрегата в препарате.

42. Препарат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что по меньшей мере 95% или 97% антитела по массе проходят в виде одного пика при анализе HP-SEC.

43. Препарат по любому из п. 1-42, отличающийся тем, что является стерильным.

44. Препарат по любому из п. 1-43, отличающийся тем, что является стабильным при замораживании и оттаивании.

45. Препарат по любому из п. 1-44, отличающийся тем, что имеет осмоляльность от около 270 мОсмоль/кг до около 330 мОсмоль/кг.

46. Лиофилизированный препарат антитела, содержащий

(a) моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 61, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 70, за исключением того, что позиции H52 и L26 согласно нумерации Кабата могут каждая независимо представлять собой N или S, или моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 16.

(b) гистидин;

(c) сахар/полиол; и

(d) полксамер.

47. Лиофилизированный препарат по п. 46, приготовленный путем лиофилизации препарата по любому из пп. 1-45.

48. Лиофилизированный препарат по п. 46, который является пригодным для восстановления водой до pH от около 5,5 до около 6,5.

49. Лиофилизированный препарат по п. 46, отличающийся тем, что является пригодным для восстановления водой до pH около 6,0.

50. Лиофилизированный препарат по п. 46, содержащий от около 10 мг до около 40 мг антитела.

51. Лиофилизированный препарат, отличающийся тем, что является пригодным для восстановления водой, давая водный раствор, содержащий:

(a) антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 61 и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 70, за исключением того, что позиции H52 и L26

согласно нумерации Кабата могут независимо представлять собой N или S, или моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 16, причем указанное антитело присутствует в концентрации в пределах диапазона от около 25 мг/мл до около 75 мг/мл;

(b) буфер, присутствующий в концентрации в пределах диапазона от около 10 мМ до около 30 мМ;

(c) сахар/полиол, присутствующий в концентрации в пределах диапазона от около 220 мМ до около 260 мМ;

(d) поверхностно-активное вещество, присутствующее в концентрации в пределах диапазона от около 0,01% до около 0,1% по массе; и

(e) pH в пределах диапазона от около 5,5 до около 7,0.

52. Лиофилизированный препарат по п. 51, отличающийся тем, что указанное антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 64-66, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 74-76, или антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 5-12, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 19-23.

53. Лиофилизированный препарат по п. 52, отличающийся тем, что является пригодным для восстановления водой таким образом, что антитело присутствует в концентрации около 50 мг/мл.

54. Лиофилизированный препарат по любому из п. 51-53, отличающийся тем, что буфер содержит гистидин.

55. Лиофилизированный препарат по любому из п. 51-54, отличающийся тем, что является пригодным для восстановления водой таким образом, что pH составляет около 6,0.

56. Лиофилизированный препарат по любому из п. 51-55, отличающийся тем, что сахар/полиол представляет собой сахарозу.

57. Лиофилизированный препарат по любому из п. 51-56, отличающийся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер.

58. Лиофилизированный препарат по п. 57, отличающийся тем, что полоксамер представляет собой PX188.

59. Лиофилизированный препарат по п. 51, отличающийся тем, что:

(a) антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 64-66, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 74-76, и является пригодным для восстановления до концентрации около 50 мг/мл;

(b) буфер является гистидиновым и является пригодным для восстановления до концентрации около 20 мМ;

(c) сахар/полиол представляет собой сахарозу и является пригодным для восстановления до концентрации около 240 мМ; и

(d) поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер 188 и является пригодным для восстановления до концентрации около 0,04% по массе.

60. Лиофилизированный препарат по п. 59, который является пригодным для восстановления водой таким образом, что pH составляет около 6,0.

61. Лиофилизированный препарат по п. 60, отличающийся тем, что указанное антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 65, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 76.

62. Лиофилизированный препарат по п. 61, отличающийся тем, что зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 103, при условии, что C-концевой лизин может

отсутствовать, и зрелая переменная область легкой цепи слита с константой областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 104.

63. Лиофилизированный препарат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что по меньшей мере 95 или 97% антитела проходят в виде одного пика при HP-SEC после хранения в течение вплоть до 3 месяцев при 2-8 °C.

64. Способ восстановления лиофилизованного препарата по любому из пп. 46-63, включающий в себя:

объединение лиофилизованного препарата со стерильной водой для получения жидкого препарата.

65. Способ по п. 64, дополнительно включающий в себя введение восстановленного препарата в пакет с изотонической жидкостью для инфузии.

66. Способ по п. 64, отличающийся тем, что лиофилизированный препарат представлен в форме порошка или в форме твердой пены в флаконе.

67. Стерильная лиофилизованная форма дозирования препарата антитела в 20 мл флаконе, состоящая по существу из:

- (i) антитела в пределах диапазона около 225-275 мг;
- (ii) гистидина в пределах диапазона около 15-19 мг;
- (iii) полоксамера PX188 в пределах диапазона около 2-2,5 мг; и
- (iv) сахарозы в пределах диапазона около 400-490 мг;

в которой антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 61, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 70, за исключением того, что позиции H52 и L26 согласно нумерации Кабата могут каждая независимо представлять собой N или S, или моноклональное антитело, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR SEQ ID NO: 16.

68. Лиофилизированная форма дозирования по п. 67, отличающаяся тем, что флакон имеет содержимое, состоящее по существу из:

- (i) около 250 мг антитела;
- (ii) около 16,8 мг L-гистидина;
- (iii) около 2,2 мг полуксомера PX188; и
- (iv) около 445,3 мг сахарозы.

69. Лиофилизированная форма дозирования по п. 67 или 68, отличающаяся тем, что указанное антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 61, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 70, за исключением того, что позиции H52 и L26 согласно нумерации Кабата могут каждая независимо представлять собой N или S.

70. Лиофилизированная форма дозирования по п. 67 или 68, отличающаяся тем, что указанное антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 1, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую три CDR по Кабату SEQ ID NO: 16.

71. Лиофилизированная форма дозирования по п. 67 или 68, отличающаяся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 64-66, и указанная зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 74-76.

72. Лиофилизированная форма дозирования по п. 67 или 68, отличающаяся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 5-12, и указанная зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 19-23.

73. Лиофилизированная форма дозирования по п. 67 или 68, отличающаяся тем, что указанная зрелая тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 65, и указанная зрелая легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 76.

74. Лиофилизированная форма дозирования по п. 67 или 68, отличающаяся тем, что указанная зрелая тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 11, и указанная зрелая легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 19.

75. Лиофилизированная форма дозирования по п. 67 или 68, отличающаяся тем, что указанная зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 103, при условии, что С-концевой лизин может отсутствовать, и/или указанная зрелая переменная область легкой цепи слита с константой областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 104 или 105.

76. Лиофилизированная форма дозирования по п. 67 или 68, отличающаяся тем, что указанная зрелая тяжелая цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 82, за исключением того, что С-концевой лизин может отсутствовать, и указанная зрелая легкая цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 86.

77. Способ приготовления лиофилизированной дозированной формы по любому из пп. 67-76 для введения субъекту, включающий в себя:

(i) восстановление препарата антитела до объема около 5,0 мл стерильной водой, и

(ii) разбавление восстановленного препарата антитела стадии (i) в физиологическом растворе для инфузии.

78. Способ по п. 77, отличающийся тем, что полный объем для инфузии составляет 250 мл.

79. Способ по п. 77, отличающийся тем, что полный объем для инфузии составляет 100 мл.

80. Способ по п. 77, отличающийся тем, что полный объем для инфузии составляет 500 мл.

81. Восстановленный препарат, полученный в результате восстановления лиофилизированного препарата по любому из пп. 46-80.

82. Восстановленный препарат по п. 81, содержащий антитело в концентрации около 50 мг/мл, гистидиновый буфер в концентрации около 20 мМ, полоксамер в концентрации около 0,04% по массе, и при рН около 6,0.

83. Восстановленный препарат по пп. 81 или 82, отличающийся тем, что по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% антитела проходят в виде одного пика при эксклюзионной хроматографии высокого давления.

84. Способ лечения или осуществления профилактики субъекта, имеющего или с риском транстретин-опосредованного амилоидоза, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме фармацевтического препарата по любому из пп. 1-23 или восстановленной формы лиофилизированного препарата по любому из пп. 46-63.

85. Способ по п. 84, отличающийся тем, что субъекта ранее лечили стабилизатором тетрамера ТТР, препаратом на основе антисмыслового олигонуклеотида, препаратом на основе РНК-интерференции (РНКи), или разрушителем амилоида.

86. Способ по п. 85, отличающийся тем, что субъект больше не получает лечение стабилизатором тетрамера ТТР, препаратом на основе антисмыслового олигонуклеотида, препаратом на основе РНК-интерференции (РНКи), или разрушителем амилоида.

87. Способ по п. 84, отличающийся тем, что субъект одновременно получает лечение дифлунизалом.

88. Способ по п. 84, отличающийся тем, что субъект одновременно получает лечение тафамидисом.

89. Способ по п. 84, отличающийся тем, что субъект одновременно получает лечение стабилизатором тетрамера ТТР, препаратом на основе антисмыслового олигонуклеотида, препаратом на основе РНК-интерференции (РНКи), или разрушителем амилоида.

90. Способ по п. 89, отличающийся тем, что субъект одновременно получает лечение тафамидисом, дифлуисалом, патизираном, инотерсенном, 4'-йод-4'-дезоксидоксорубицином (IDOX), доксициклином, тауроурсодезоксихолевой кислотой (TUDCA), циклодекстрином (CyD) или анти-SAP антителом.

91. Способ по п. 84, отличающийся тем, что субъекту поставлен диагноз амилоидоз АТТР.
92. Способ по п. 84, отличающийся тем, что субъект имеет АТТР-кардиомиопатию дикого типа.
93. Способ по п. 84, отличающийся тем, что субъект имеет наследственную АТТР-кардиомиопатию.
94. Способ по п. 84, отличающийся тем, что субъект имеет наследственную АТТР-полинейропатию.
95. Способ по п. 84, отличающийся тем, что субъект имеет АТТР-поражение сердца.
96. Способ по п. 84, отличающийся тем, что субъект имеет поражение в виде периферической нейропатии вследствие амилоидоза АТТР.
97. Способ по п. 84, отличающийся тем, что фармацевтический препарат, восстановленную форму лиофилизированного препарата или восстановленную форму лиофилизированного препарата антитела вводят субъекту внутривенно в разбавленной форме.
98. Способ по п. 97, отличающийся тем, что разбавитель для разбавленной формы представляет собой физиологический раствор.
99. Способ по п. 98, отличающийся тем, что полный объем разбавленной формы, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере около 100 мл.
100. Способ по п. 99, отличающийся тем, что полный объем разбавленной формы, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере около 250 мл.
101. Способ по п. 100, отличающийся тем, что полный объем разбавленной формы, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере около 500 мл.
102. Способ по п. 100, отличающийся тем, что полный объем составляет около 250 мл.
103. Способ по п. 97, отличающийся тем, что 0,1, 0,2, 0,3, 1, 3, 10 или 30 мг/кг антитела вводят субъекту примерно один раз каждые 28 дней.

104. Способ по п. 103, отличающийся тем, что 0,1, 0,2, 0,3, 1 или 3 мг/кг антитела вводят субъекту в виде инфузии в течение периода в диапазоне около от 60 до 120 минут.

105. Способ по п. 103, отличающийся тем, что 10 или 30 мг/кг антитела вводят субъекту в виде инфузии в течение периода в диапазоне около от 90 до 180 минут.

106. Способ по п. 97, отличающийся тем, что субъекту предварительно вводят антигистамин.

107. Способ по п. 97, отличающийся тем, что субъекту вводят дифенгидрамин в пределах диапазона около от 30 до 90 минут перед введением антитела.

108. Способ по п. 107, отличающийся тем, что субъекту вводят ацетаминофен в пределах диапазона около от 30 до 90 минут перед введением антитела.

109. Способ по п. 84, отличающийся тем, что продолжительность схемы введения составляет по меньшей мере 3 месяца.

110. Способ по п. 109, отличающийся тем, что продолжительность схемы введения составляет по меньшей мере 12 месяцев.

111. Способ по п. 84, отличающийся тем, что субъект одновременно получает тафамидис.

112. Способ лечения или осуществления профилактики субъекта, имеющего или с риском транстретин-опосредованного амилоидоза, включающий в себя введение по эффективной схеме стабилизатора тетрамера ТТР, препарата на основе антисмыслового олигонуклеотида, препарата на основе РНК-интерференции (РНКи), или разрушителя амилоида, при этом субъекта ранее лечили фармацевтическим препаратом по любому из пп. 1-23, или восстановленной формой лиофилизированного препарата по любому из пп. 46-63.

113. Способ по п. 112, отличающийся тем, что субъект больше не получает лечение фармацевтическим препаратом по любому из пп. 1-45.

114. Способ по п. 112, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамидис или дифлунизал.

115. Способ по п. 112, отличающийся тем, что указанный препарат на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен.

116. Способ по п. 112, отличающийся тем, что указанный препарат на основе РНК-интерференции (РНКи) представляет собой патизиран или ревузиран.

117. Способ по п. 112, отличающийся тем, что разрушитель амилоида представляет собой 4'-йод-4'-дезоксидоксорибуцин (IDOX), доксициклин, тауроурсодезоксихолевую кислоту (TUDCA), циклодекстрин (CyD) или анти-SAP антитело.

118. Способ по п. 117, отличающийся тем, что разрушители амилоида представляют собой доксициклин в комбинации с тауроурсодезоксихолевой кислотой (TUDCA).

119. Способ по п. 112, отличающийся тем, что субъекту поставлен диагноз амилоидоз АТТР.

120. Способ по п. 112, отличающийся тем, что субъект имеет АТТР-кардиомиопатию дикого типа.

121. Способ по п. 112, отличающийся тем, что субъект имеет наследственную АТТР-кардиомиопатию.

122. Способ по пп. 112 или 121, отличающийся тем, что субъект имеет наследственную АТТР-полинейропатию.

123. Способ по п. 112, отличающийся тем, что субъект имеет АТТР-поражение сердца.

124. Способ по п. 112, отличающийся тем, что субъект имеет поражение в виде периферической нейропатии вследствие амилоидоза АТТР.

125. Способ по п. 112, отличающийся тем, что фармацевтический препарат, восстановленную форму лиофилизированного препарата или восстановленную форму лиофилизированного препарата антитела вводят субъекту внутривенно в разбавленной форме.

126. Способ по п. 125, отличающийся тем, что разбавитель для разбавленной формы представляет собой физиологический раствор.

127. Способ по п. 126, отличающийся тем, что полный объем разбавленной формы, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере около 100 мл.

128. Способ по п. 127, отличающийся тем, что полный объем разбавленной формы, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере около 250 мл.

129. Способ по п. 128, отличающийся тем, что полный объем разбавленной формы, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере около 500 мл.

130. Способ по п. 128, отличающийся тем, что полный объем составляет около 250 мл.

131. Способ по п. 125, отличающийся тем, что 0,1, 0,2, 0,3, 1, 3, 10 или 30 мг/кг антитела вводят субъекту примерно один раз каждые 28 дней.

132. Способ по п. 131, отличающийся тем, что 0,1, 0,2, 0,3, 1 или 3 мг/кг антитела вводят субъекту в виде инфузии в течение периода в диапазоне около от 60 до 120 минут.

133. Способ по п. 131, отличающийся тем, что 10 или 30 мг/кг антитела вводят субъекту в виде инфузии в течение периода в диапазоне около от 90 до 180 минут.

134. Способ по п. 125, отличающийся тем, что субъекту предварительно вводят антигистамин.

135. Способ по п. 125, отличающийся тем, что субъекту вводят дифенгидрамин в пределах диапазона около от 30 до 90 минут перед введением антитела.

136. Способ по п. 135, отличающийся тем, что субъекту вводят ацетаминофен в пределах диапазона около от 30 до 90 минут перед введением антитела.

137. Способ по п. 112, отличающийся тем, что продолжительность схемы введения составляет по меньшей мере 3 месяца.

138. Способ по п. 137, отличающийся тем, что продолжительность схемы введения составляет по меньшей мере 12 месяцев.