

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291060 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.18

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/38 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.11.10

(54) СТАБИЛЬНЫЙ ВОДНЫЙ ПРЕПАРАТ АНТИТЕЛА ПРОТИВ TFPI

(31) 62/934,781; 63/081,409

(32) 2019.11.13; 2020.09.22

(33) US

(86) PCT/IB2020/060571

(87) WO 2021/094917 2021.05.20

(71) Заявитель:
ПФАЙЗЕР ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Кроули Томас Джозеф, Дафилд Роберт
Ли, Джуно Дженнифер (US)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к области фармацевтических препаратов антител. В частности, изобретение относится к стабильному жидкому препарату антител и его фармацевтическому препарату и применению. Изобретение проиллюстрировано водным препаратом антитела против ингибитора пути тканевого фактора (TFPI).

A1

202291060

202291060

A1

РСТ/ВВ2020/060571

МПК: А61К 39/395 (2006.01) С07К 16/38 (2006.01)

СТАБИЛЬНЫЙ ВОДНЫЙ ПРЕПАРАТ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ТFPI
ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В данной заявке испрашивается приоритет предварительных заявок на патент США No. 62/934781, поданной 13 ноября 2019 года, и No. 63/081409, поданной 22 сентября 2020 года, которые включены тем самым ссылкой во всей их полноте.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка подана в электронном виде через EFS-Web и включает поданный в электронном виде перечень последовательностей в формате .txt. Файл .txt с перечнем последовательностей, названный "PC72541A_Seq_Listing_ST25.txt", был создан 13 октября 2020 года и имеет размер 42550 байт. Перечень последовательностей, содержащийся в этом файле .txt, является частью материалов заявки и тем самым включен ссылкой во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области фармацевтических препаратов антител. В частности, настоящее изобретение относится к стабильному жидкому препарату антител и его фармацевтическому препарату и применению.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Препараты антител, предназначенные для терапевтического или профилактического применения, требуют стабилизаторов для предотвращения потери активности или структурной целостности белка из-за эффектов денатурации, дезамидирования, окисления или агрегации в течение определенного периода времени при хранении и транспортировке до использования. Эти проблемы усугубляются при высоких концентрациях антител, часто требуемых для терапевтического введения. Доступно большое количество вариантов препаратов, но ни один подход или система не подходят для всех белков (см., например, Wang et al., *J. Pharm Sci.* 96:1-26(2007)).

Основной задачей разработки препаратов антител является сохранение антитела, его растворимости, стабильности и эффективности его связывания с антигеном. Чтобы антитело оставалось биологически активным, препарат должен сохранять конформационную целостность по меньшей мере основного центра из антигенсвязывающих аминокислот антитела. Также особенно желательно избегать агрегатов и частиц в растворе, которые потребуют стерильной фильтрации перед

использованием для внутривенной или подкожной инъекции и ограничивают путь введения. Соли, поверхностно-активные вещества, агенты поддержания pH и тоничности, такие как сахара, могут быть использованы для преодоления проблем агрегации или денатурации. Составление препаратов антител требует тщательного отбора этих факторов среди прочих во избежание денатурации белка и потери антигенсвязывающей активности. Соответственно, существует потребность в стабильном водном препарате антител, который стабильно поддерживает высокие концентрации биоактивного антитела в растворе и подходит для парентерального введения, включая внутривенную, внутриглазную, интравитреальную, внутриартериальную, подоболочечную, внутрижелудочковую, интрауретральную, интрастернальную, интракраниальную, внутримышечную, внутрикостную, внутрибрюшинную, внутрикожную или подкожную инъекцию.

Было показано, что антитела к ингибитору пути тканевого фактора (TFPI) полезны в лечении и профилактике недостаточности свертывания крови или нарушений свертываемости крови, таких как гемофилия А и В (см., например, US 2017/0073428). Хотя в данной области техники известны жидкие препараты антител (см., например, WO 2006/096491, WO 2010/032220, WO 2013/186719, US 2009/0110681, US 2017/0360929 и US 2018/0000933), существует необходимость в предложении стабильного водного препарата антитела к TFPI для удовлетворения медицинских потребностей пациентов, страдающих недостаточностью свертывания крови или нарушениями свертываемости крови.

Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в данном документе, настоящим полностью включены в него посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент и патентная заявка были конкретно и индивидуально указаны как включенные таким образом посредством ссылки. В случае, если одна или несколько из включенных ссылок на литературу и подобных материалов отличаются или противоречат этой заявке, включая, помимо прочего, определенные термины, использование терминологии, описанные методы и тому подобное, данная заявка имеет преимущество.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены стабильные водные фармацевтические препараты с увеличенным сроком хранения, содержащие антитело к ингибитору пути тканевого фактора (TFPI) (также известное как антитело против TFPI). Показано, что препарат по настоящему

изобретению с высокой концентрацией антитела к TFPI является стабильным (например, имеет низкие уровни в % HMMS (высокомолекулярные формы), % LMMS (низкомолекулярные формы), % фрагментов и окисления) и поэтому подходит для парентерального введения.

Здесь раскрыты и приведены примеры составов для антител (включая их антигенсвязывающие фрагменты), которые связываются с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI). Специалисты в данной области техники знают или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретным воплощениям изобретения, описанным здесь. Предусмотрено, что такие эквиваленты охватываются следующими воплощениями (E).

E1. Препарат, содержащий: от примерно 15 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела, которое специфично связывается с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI), буфер, полиол, поверхностно-активное вещество и хелатирующий агент, где pH препарата составляет от примерно 5,0 до примерно 6,0.

E2. Препарат, содержащий: от примерно 15 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), буфер, полиол, поверхностно-активное вещество и хелатирующий агент, где pH препарата составляет от примерно 5,0 до примерно 6,0, и где эпитоп содержит остатки Ile105, Arg107 и Leu131, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2.

E3. Препарат в соответствии с любым из E1-E2, где буфер выбран из группы, состоящей из: ацетата, сукцината, глюконата, цитрата, гистидина, уксусной кислоты, фосфата, фосфорной кислоты, аскорбата, винной кислоты, малеиновой кислоты, глицина, лактата, молочной кислоты, аскорбиновой кислоты, имидазола, бикарбоната и угольной кислоты, янтарной кислоты, бензоата натрия, бензойной кислоты, глюконата, эдетата, ацетата, малата, имидазола, трис, фосфата и их смесей.

E4. Препарат в соответствии с E3, где буфер представляет собой гистидин.

E5. Препарат в соответствии с E3, где буфер представляет собой сукцинат.

E6. Водный препарат в соответствии с любым из E1-E5, где концентрация буфера составляет от примерно 0,1 mM до примерно 100 mM.

E7. Препарат в соответствии с E6, где концентрация буфера составляет от примерно 1 mM до примерно 40 mM или от примерно 10 mM до примерно 40 mM.

Е8. Препарат в соответствии с Е7, где концентрация буфера составляет примерно 10 мМ, примерно 20 мМ или примерно 40 мМ.

Е9. Препарат в соответствии с Е8, где концентрация буфера составляет примерно 20 мМ.

Е10. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е9, где полиол выбран из группы, состоящей из маннита, трегалозы, сорбита, эритрита, изомальта, лактита, мальтита, ксилита, глицерина, лактита, пропиленгликоля, полиэтиленгликоля, инозита, фруктозы, глюкозы, маннозы, сахарозы, сорбозы, ксилозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, декстрана, пуллулана, декстрина, циклодекстринов, растворимого крахмала, гидроксипропилкрахмала, водорастворимых глюкоанов или их смесей.

Е11. Препарат в соответствии с Е10, где полиол представляет собой сахарозу или трегалозу.

Е12. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е11, где концентрация полиола составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 300 мг/мл.

Е13. Препарат в соответствии с Е12, где концентрация полиола составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 120 мг/мл, от примерно 50 мг/мл до примерно 120 мг/мл или от примерно 60 мг/мл до примерно 110 мг/мл.

Е14. Препарат в соответствии с Е13, где концентрация полиола составляет примерно 64 мг/мл, примерно 85 мг/мл или примерно 106 мг/мл.

Е15. Препарат в соответствии с Е1-Е14, где концентрация полиола составляет примерно 85 мг/мл.

Е16. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е15, где поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата, полоксамера, тритона, додецилсульфата натрия, лаурилсульфата натрия, октилглюкозида натрия, лаурилсульфобетаина, миристил-сульфобетаина, линолеил-сульфобетаина, стеарил-сульфобетаина, лаурил-саркозина, миристил-саркозина, линолеил-саркозина, стеарил-саркозина, линолеил-бетаина, миристил-бетаина, цетил-бетаина, лауроамидопропил-бетаина, кокамидопропил-бетаина, линолеамидопропил-бетаина, миристамидопропил-бетаина, пальмидопропил-бетаина, изостеарамидапропил-бетаина, миристамидопропил-диметиламина, пальмидопропил-диметиламина, изостеарамидапропил-диметиламина, метилкокоил-таурата натрия, метилолеил-таурата динатрия, дигидроксипропил-PEG 5 линолеаммония хлорида, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, полисорбата 20, полисорбата 21, полисорбата 40, полисорбата 60,

полисорбата 61, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 81, полисорбата 85, PEG3350 и их смесей.

E17. Препарат в соответствии с E16, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

E18. Препарат в соответствии с любым из E1-E17, где концентрация поверхностно-активного вещества составляет от примерно 0,01 мг/мл до примерно 10 мг/мл, от примерно 0,05 мг/мл до примерно 5 мг/мл, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 1 мг/мл или от примерно 0,1 мг/мл до примерно 0,5 мг/мл.

E19. Препарат в соответствии с E18, где концентрация поверхностно-активного вещества составляет примерно 0,1 мг/мл, примерно 0,2 мг/мл или примерно 0,3 мг/мл.

E20. Препарат в соответствии с E19, где концентрация поверхностно-активного вещества составляет примерно 0,2 мг/мл.

E21. Препарат в соответствии с любым из E1-E20, где препарат не содержит поверхностно-активное вещество (например полисорбат 80).

E22. Препарат в соответствии с любым из E1-E21, где хелатирующий агент выбран из группы, состоящей из этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), диэтилентриаминпентауксусной кислоты 5 (DTPA), нитрилотриуксусной кислоты (NTA), N-2-ацетиламино-2-иминодиуксусной кислоты (ADA), бис(аминоэтил)гликолевого эфира N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (EGTA), транс-диаминоциклогексантиуксусной кислоты (DCTA), глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, N-гидроксиэтилиминодиуксусной кислоты (HIMDA), N,N-бис-гидроксиэтилглицина (бицина) и N-(трисгидроксиметилметил) 10 глицина (трицина), глицилглицина, дезоксихолата натрия, этилендиамина, пропилендиамина, диэтилентриамина, триэтилентетраамина (триена), дигидрата эдетата динатрия (или дигидрата EDTA динатрия или динатриевой соли EDTA), кальций-EDTA-щавелевой кислоты, малеата, лимонной кислоты, моногидрата лимонной кислоты и дигидрата цитрата тринатрия, 8-гидроксихинолата, аминокислот, гистидина, цистеина, метионина, пептидов, полипептидов и белков и их смесей.

E23. Препарат в соответствии с E22, где хелатирующий агент представляет собой дигидрат эдетата динатрия.

E24. Препарат в соответствии с любым из E1-E23, где концентрация хелатирующего агента составляет от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, от

примерно 0,01 мг/мл до примерно 10 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1 мг/мл или от примерно 0,02 мг/мл до примерно 0,08 мг/мл.

E25. Препарат в соответствии с E24, где концентрация хелатирующего агента составляет примерно 0,038 мг/мл, примерно 0,05 мг/мл или примерно 0,063 мг/мл.

E26. Препарат в соответствии с E25, где концентрация хелатирующего агента составляет примерно 0,05 мг/мл.

E27. Препарат в соответствии с любым из E1-E26, где препарат имеет pH примерно от 5,0 до 6,6 или примерно от 5,2 до 6,4.

E28. Препарат в соответствии с E27, где препарат имеет pH примерно 5,2, 5,8 или 6,4.

E29. Препарат в соответствии с E27, где препарат имеет pH примерно 5,5 или 5,8.

E30. Препарат в соответствии с любым из E1-E29, где антитело не связывается с доменом Кунитца 1 (K1) TFPI.

E31. Препарат в соответствии с любым из E2-E30, где эпитоп дополнительно содержит остатки Cys106, Gly108, Cys130, Leu131 и Gly132, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2.

E32. Препарат в соответствии с любым из E2-E31, где эпитоп дополнительно содержит Asp102, Arg112, Tyr127, Gly129, Met134 и Glu138, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2.

E33. Препарат в соответствии с любым из E2-E32, где эпитоп не содержит: E100, E101, P103, Y109, T111, Y113, F114, N116, Q118, Q121, C122, E123, R124, F125, K126 и L140, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2.

E34. Препарат в соответствии с любым из E2-E32, где эпитоп не содержит: D31, D32, P34, C35, K36, E100, E101, P103, Y109, K126 и G128, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2.

E35. Препарат в соответствии с любым из E1-E34, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую:

(а) определяющую комплементарность область 1 VH (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

(б) определяющую комплементарность область 2 VH (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и

(в) определяющую комплементарность область 3 VH (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Е36. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е35, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 18 и 20.

Е37. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е36, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 18 и 20.

Е38. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е37, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

Е39. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е37, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Е40. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е37, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Е41. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е40, где антитело содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую:

(а) определяющую комплементарность область 1 VL (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

(б) определяющую комплементарность область 2 VL (CDR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и

(в) определяющую комплементарность область 3 VL (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

Е42. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е41, где антитело содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 11.

Е43. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е42, где антитело содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

Е44. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е43, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

Е45. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е43, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

E46. Препарат в соответствии с любым из E1-E43, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

E47. Препарат в соответствии с любым из E1-E46, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

E48. Препарат в соответствии с любым из E1-E47, где антитело содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VH (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; (б) определяющую комплементарность область 2 VH (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и (в) определяющую комплементарность область 3 VH (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и (2) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VL (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (б) определяющую комплементарность область 2 VL (CDR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и (в) определяющую комплементарность область 3 VL (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

E49. Препарат в соответствии с E48, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

E50. Препарат в соответствии с любым из E1-E49, где антитело содержит последовательность VH, кодируемую вставкой, присутствующей в плазмиде, депонированной под номером доступа No. PTA-122329 в Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC).

E51. Препарат в соответствии с любым из E1-E50, где антитело содержит последовательность VL, кодируемую вставкой, присутствующей в плазмиде, депонированной под номером доступа No. PTA-122328 в ATCC.

E52. Препарат в соответствии с любым из E1-E51, где антитело содержит последовательность, кодируемую вставкой, присутствующей в плазмиде, депонированной под номером доступа No. PTA-122329 в ATCC, и последовательность, кодируемую вставкой, присутствующей в плазмиде, депонированной под номером доступа No. PTA-122328 в ATCC.

E53. Препарат в соответствии с любым из E1-E52, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

E54. Препарат в соответствии с E48, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

E55. Препарат в соответствии с E54, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

E56. Препарат в соответствии с E48, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

E57. Препарат в соответствии с E56, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

E58. Препарат в соответствии с любым из E1, E3-E29, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

E59. Препарат в соответствии с любым из E1, E3-E29, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

E60. Препарат в соответствии с любым из E1-E59, где антитело имеет время полужизни в сыворотке крови по меньшей мере 25 часов, по меньшей мере 29 часов, по меньшей мере 30 часов, по меньшей мере 35 часов, по меньшей мере 40 часов, по меньшей мере 50 часов, по меньшей мере 55 часов, по меньшей мере 60 часов, по меньшей мере 65 часов, по меньшей мере 70 часов, по меньшей мере 75 часов, по меньшей мере 80 часов, по меньшей мере 85 часов, по меньшей мере 90 часов, по меньшей мере 95 часов, по меньшей мере 100 часов, по меньшей мере 105 часов, по меньшей мере 110 часов, по меньшей мере 115 часов, по меньшей мере 120 часов или по меньшей мере 125 часов.

E61. Препарат в соответствии с любым из E1-E60, где антитело имеет аффинность связывания (K_D) от примерно 5×10^{-7} М до примерно 5×10^{-11} М.

Е62. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е61, где антитело имеет биодоступность при подкожном (SC) введении по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95 или по меньшей мере 99% относительно биодоступности при внутривенном введении.

Е63. Препарат в соответствии с любым из Е1-Е62, где концентрация антитела составляет примерно 20 мг/мл, 25 мг/мл, 50 мг/мл, 75 мг/мл, 100 мг/мл, 125 мг/мл, 150 мг/мл, 175 мг/мл, 200 мг/мл, 225 мг/мл или 250 мг/мл.

Е64. Водный препарат, содержащий: примерно 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), примерно 20 мМ сукцинатного или гистидинового буфера; примерно 85 мг/мл сахарозы или трегалозы; примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80 или полисорбата 20; примерно 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия или этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA); где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и где препарат имеет рН примерно 5,5 или 5,8.

Е65. Фармацевтический препарат, содержащий: 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 мМ гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и где препарат имеет рН 5,8.

Е66. Фармацевтический препарат, содержащий: 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 мМ гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и где препарат имеет рН 5,8.

Е67. Фармацевтический препарат, содержащий: от примерно 50 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 мМ гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и где препарат имеет pH 5,8.

Е68. Фармацевтический препарат, содержащий: от примерно 50 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 мМ гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и где препарат имеет pH 5,8.

Е69. Фармацевтический препарат, содержащий: 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 10 мМ гистидинового буфера, 64 мг/мл сахарозы, 0,1 мг/мл полисорбата 80, 0,038 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и где препарат имеет pH 6,4.

Е70. Фармацевтический препарат, содержащий: 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 40 мМ гистидинового буфера, 106 мг/мл сахарозы, 0,3 мг/мл полисорбата 80, 0,063 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и где препарат имеет pH 5,2.

Е71. Фармацевтический препарат, содержащий: 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 10 мМ гистидинового буфера, 64 мг/мл сахарозы, 0,1 мг/мл полисорбата 80, 0,038 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

18, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и где препарат имеет pH 5,2.

E72. Фармацевтический препарат, содержащий: 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 mM гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и где препарат имеет pH 5,8.

E73. Фармацевтический препарат в соответствии с E72, где препарат не содержит поверхностно-активное вещество (например полисорбат 80).

E74. Препарат в соответствии с любым из E1-E73, где препарат имеет срок хранения по меньшей мере примерно 1 месяц, примерно 3 месяца, примерно 4 месяца, примерно 6 месяцев, примерно 12 месяцев, примерно 24 месяца, примерно 36 месяцев, примерно 48 месяцев или примерно 60 месяцев (например, при примерно -20°C, при примерно 5°C, при примерно 25°C или при примерно 40°C).

E75. Препарат в соответствии с любым из E1-E74, где препарат представляет собой водный препарат.

E76. Препарат в соответствии с любым из E1-E75, где препарат представляет собой фармацевтический препарат.

E77. Способ сокращения времени кровотечения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества препарата в соответствии с любым из E1-E76.

E78. Способ лечения или предупреждения недостаточности свертывания крови или нарушения свертываемости крови, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества препарата в соответствии с любым из E1-E76.

E79. Способ лечения или предупреждения гемофилии А, В или С, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества препарата в соответствии с любым из E1-E76.

E80. Способ лечения или предупреждения болезни фон Виллебранда (vWD), включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества препарата в соответствии с любым из E1-E76.

Е81. Способ снижения активности TFPI, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества препарата в соответствии с любым из E1-E76.

Е82. Способ в соответствии с любым из E77-E81, где субъект страдает от или подвержен недостаточности свертывания крови или нарушению свертываемости крови.

Е83. Способ в соответствии с любым из E77-E82, где субъект страдает от или подвержен гемофилии А, В или С.

Е84. Способ в соответствии с любым из E77-E83, где субъект страдает от или подвержен гемофилии А или В.

Е85. Способ в соответствии с любым из E77-E82, где субъект страдает от или подвержен болезни фон Виллебранда (vWD).

Е86. Способ в соответствии с любым из E77-E82, где субъект страдает от или подвержен тромбоцитарному расстройству.

Е87. Способ в соответствии с любым из E77-82, где субъект страдает от или подвержен дефициту Фактора VII.

Е88. Способ в соответствии с любым из E77-E82, где субъект страдает от или подвержен дефициту Фактора XI.

Е89. Способ в соответствии с любым из E77-E88, дополнительно включающий введение субъекту свертывающего агента.

Е90. Способ в соответствии с E89, где свертывающий агент выбран из группы, состоящей из Фактора VIIa, Фактора VIII, Фактора IX, транексамовой кислоты и агентов с «шунтирующим» механизмом действия (например, FEIBA).

Е91. Применение препарата в соответствии с любым из E1-E76 в способе в соответствии с любым из E77-E90.

Е92. Препарат в соответствии с любым из E1-E76 для использования в способе в соответствии с любым из E77-E90.

Е93. Препарат, содержащий: 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 mM гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата натрия, для использования в способе в соответствии с любым из E77-E90, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и где препарат имеет pH 5,8.

Е94. Фармацевтический препарат, состоящий из: 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 мМ гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и где препарат имеет pH 5,8.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Здесь раскрыты стабильные водные фармацевтические препараты с увеличенным сроком хранения, содержащие антитело к ингибитору пути тканевого фактора (TFPI). Настоящее изобретение основано на обнаружении того, что препарат, содержащий гистидиновый буфер и имеющий pH 5,8, стабильно поддерживает высокие концентрации антитела к TFPI.

В частности, было продемонстрировано, что антитело против TFPI, хранящееся в забуференном гистидином водном препарате с pH 5,8, имело низкие уровни разложения при измерении % высокомолекулярных форм (% HMMS) с использованием эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) (см. Таблицу 1). Например, при предполагаемых условиях хранения $5\pm3^{\circ}\text{C}$ антитело против TFPI было стабильным в течение вплоть до 24 месяцев с минимальным разложением или без него (% HMMS варьировал от 0,5 до 0,9). Хотя некоторое разложение наблюдалось при хранении в условиях теплового стресса при $40^{\circ}\text{C}/75\%$ -ной относительной влажности (RH) (% HMMS варьировал от 0,9 до 1,2 на момент 1 месяц (т.е. 4 недели) и от 1,5 до 2,4 на момент 3 месяца (т.е. 12 недель)), данное разложение было меньше, чем наблюдаемое для других антител IgG1, таких как антитело против VEGF (см. Таблицу 9; данные для антитела против VEGF получены из Таблицы 11 в US 2018/0000933). В частности, количество высокомолекулярных форм (% HMMS) для антитела против VEGF, хранящегося в забуференном гистидином препарате с pH 5,8 при 40°C в течение 1 месяца (т.е. 4 недель), составляло 3,1 (по сравнению с 0,9-1,2 для антитела против TFPI) и при хранении в течение 3 месяцев (т.е. 12 недель) составляло 5,6 (по сравнению с 1,5-2,4 для антитела против TFPI). Таким образом, забуференный гистидином препарат при pH 5,8 замедляет разложение, снижает образование агрегатов и повышает стабильность антитела против TFPI по сравнению с антителом против VEGF. Этот результат был удивительным и неожиданным.

Соответственно, в одном аспекте предложен препарат, содержащий: от примерно 15 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела к ингибитору пути тканевого фактора (TFPI), буфера, полиола, поверхностно-активного вещества, хелатирующего агента, и где pH препарата составляет от примерно 5,0 до примерно 6,0. Например, в некоторых воплощениях предложен препарат, содержащий: от примерно 15 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела к TFPI (например антитела против TFPI), от примерно 1 мМ до примерно 40 мМ буфера (например гистидинового буфера), от примерно 1 мг/мл до примерно 300 мг/мл полиола (например сахарозы), от примерно 0,01 мг/мл до примерно 10 мг/мл поверхностно-активного вещества (например полисорбата 80), от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50,0 мг/мл хелатирующего агента (например дигидрата эдетата динатрия), где pH препарата составляет от примерно 5,0 до примерно 6,0. В некоторых воплощениях концентрация антитела составляет от примерно 15 мг/мл до примерно 250 мг/мл. В других воплощениях концентрация антитела составляет примерно 100 мг/мл, примерно 115 мг/мл, примерно 150 мг/мл или 158 мг/мл.

Общие методики

В практическом выполнении настоящего изобретения будут использованы, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методики полностью описаны в литературе, такой как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, второе издание (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P.

Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Определения

Следующие термины, если не указано иное, следует понимать как имеющие следующие значения: термин «выделенная молекула» или «очищенная молекула» (где молекула представляет собой, например, полипептид, полинуклеотид или антитело) представляет собой молекулу, которая в силу своего происхождения или источника происхождения: (1) не связана с естественными ассоциированными компонентами, которые сопровождают ее в нативном состоянии, (2) практически не содержит других молекул того же вида, (3) экспрессируется клеткой из другого вида, или (4) не встречается в природе. То есть, молекула, которая химически синтезирована или экспрессируется в клеточной системе, отличной от клетки, из которой она происходит естественным образом, будет «изолирована» от связанных с ней природных компонентов. Молекула также может быть по существу освобождена от природных ассоциированных компонентов путем выделения с использованием методов очистки, хорошо известных в данной области техники. Молекулярная чистота или гомогенность могут быть проанализированы рядом способов, хорошо известных в данной области техники. Например, чистоту образца полипептида можно проанализировать с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания геля с визуализацией полипептида с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Для определенных целей более высокое разрешение может быть обеспечено с помощью ВЭЖХ или других способов очистки, хорошо известных в данной области техники.

Как используют здесь, термин «препарат» применительно к антителу предназначен для описания препарата антитела в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности антитела.

Термины «фармацевтическая композиция» или «фармацевтический препарат» относятся к препаратам антитела в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем/эксципиентом. Как используют здесь, «водный препарат» относится к препарату, который содержит воду в качестве компонента.

«Фармацевтически приемлемые носители/эксципиенты» (наполнители, добавки) представляют собой те вещества, которые можно безопасно вводить субъекту для обеспечения эффективной дозы используемого активного ингредиента. Термин

«эксципиент» или «носитель», как используют здесь, относится к инертному веществу, которое обычно используют в качестве разбавителя, носителя, консерванта, связующего вещества или стабилизатора для лекарственных средств. Композиции, содержащие такие носители, готовят хорошо известными традиционными способами (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; и Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000). Как используют здесь, термин «разбавитель» относится к фармацевтически приемлемому (безопасному и нетоксичному для введения человеку) растворителю и может быть использован для приготовления описанных здесь препаратов. Примеры разбавителей включают, без ограничения, стерильную воду и бактериостатическую воду для инъекций (BWFI).

«Антитело» представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную к специфическому связыванию с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д., через по меньшей мере один сайт распознавания антигена, расположенный в варибельной области молекулы иммуноглобулина. Как используют здесь, этот термин охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также, если не указано иное, любой их антигенсвязывающий фрагмент/участок, которые конкурируют с интактным антителом за специфическое связывание, слитые белки, содержащие антигенсвязывающий участок, и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, содержащую сайт распознавания антигена. Антигенсвязывающие участки включают, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, однодоменные антитела (dAbs, например, антитела акулы и верблюда), фрагменты, включающие области, определяющие комплементарность (CDR), одноцепочечные варибельные фрагменты антител (scFv), макситела, минитела, интратела, диатела, триатела, тетратела, v-NAR и бис-scFv, и полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, достаточную для обеспечения специфического связывания антигена с полипептидом. Антитело включает антитело любого класса, такого как IgG, IgA или IgM (или их подкласс), и антитело не обязательно должно относиться к какому-либо конкретному классу. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей антитела иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2,

IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначают альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю, соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

«Вариабельная область» антитела относится к вариабельной области легкой цепи антитела или вариабельной области тяжелой цепи антитела либо отдельно, либо в комбинации. Как известно в данной области техники, каждая из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей состоит из четырех каркасных областей (FR), соединенных тремя определяющими комплементарность областями (CDR), также известными как гипервариабельные области, и способствует образованию антигенсвязывающего сайта антитела. Если желательны варианты рассматриваемой вариабельной области, в частности, с заменой аминокислотных остатков за пределами CDR (т.е. в каркасной области), подходящая аминокислотная замена, предпочтительно консервативная аминокислотная замена, может быть идентифицирована путем сравнения рассматриваемой вариабельной области с вариабельными областями других антител, которые содержат последовательности CDR1 и CDR2 того же канонического класса, что и рассматриваемая вариабельная область (Chothia and Lesk, *J Mol Biol* 196(4): 901-917, 1987).

В некоторых воплощениях детализированное описание CDR и идентификацию остатков, содержащих сайт связывания антитела, осуществляют путем определения структуры антитела и/или определения структуры комплекса антитело-лиганд. В некоторых воплощениях это может быть выполнено любым из множества методов, известных специалистам в данной области техники, таких как рентгеновская кристаллография. В некоторых воплощениях можно использовать различные методы анализа для идентификации или аппроксимации областей CDR. В некоторых воплощениях можно использовать различные методы анализа для идентификации или аппроксимации областей CDR. Примеры таких методов включают, без ограничения, определение Kabat, определение Chothia, определение AbM, определение контакта и определение конформации.

Определение Kabat является стандартом для нумерации остатков в антителе и обычно используется для идентификации областей CDR. См., например, Johnson & Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 28: 214-8. Определение Chothia подобно определению Kabat, но определение Chothia учитывает положение определенных областей структурной петли.

См., например, Chothia et al., 1986, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-17; Chothia et al., 1989, *Nature*, 342: 877-83. В определении AbM используется интегрированный набор компьютерных программ, разработанных Oxford Molecular Group, которые моделируют структуру антител. См., например, Martin et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 86:9268-9272; “AbM™, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies,” Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd. Определение AbM моделирует третичную структуру антитела исходя из первичной последовательности с использованием комбинации информационных баз данных и неэмпирических методов, таких как описанные Samudrala et al., 1999, “Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach,” in *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3:194-198. Определение контакта основано на анализе имеющихся сложных кристаллических структур. См., например, MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 5:732-45. В другом подходе, называемом здесь «конформационным определением» CDR, положения CDR могут быть идентифицированы как остатки, которые вносят энтальпийные вклады в связывание антигена. См., например, Makabe et al., 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166. Другие определения границ CDR могут не строго следовать одному из вышеперечисленных подходов, но тем не менее будут перекрываться с по меньшей мере частью CDR по Kabat, хотя они могут быть укорочены или удлинены в свете прогнозов или экспериментальных данных о том, что конкретные остатки или группы остатков не оказывают существенного влияния на связывание антигена. Как используют здесь, CDR может относиться к CDR, определенным любым подходом, известным в данной области техники, включая комбинации подходов. В используемых здесь способах могут быть использованы CDR, определенные в соответствии с любым из этих подходов. Для любого данного воплощения, содержащего более одной CDR, CDR могут быть определены в соответствии с любым из определений Kabat, Chothia, расширенных, AbM, контактных и/или конформационных определений.

Как известно в данной области техники, «константная область» антитела относится к константной области легкой цепи антитела или константной области тяжелой цепи антитела либо отдельно, либо в комбинации.

Как используют здесь, «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах.

Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью и направлены против одного антигенного сайта. Более того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты антигена. Модификатор «моноклональный» указывает на то, что антитело получено из по существу однородной популяции антител, и его не следует толковать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены гибридным методом, впервые описанным Kohler и Milstein, 1975, Nature 256:495, или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, такими как описанные в патенте США No. № 4816567. Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек, созданных с использованием методик, описанных в McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554, например.

«Человеческое антитело» представляет собой антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого человеком, и/или было получено с использованием любой из описанных здесь методик получения человеческих антител. Это определение человеческого антитела специально исключает гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки, не являющиеся человеческими. Как используют здесь, термин «человеческое антитело» включает антитела, имеющие переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Это определение человеческого антитела включает антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой цепи человека или по меньшей мере один полипептид легкой цепи человека. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако, термин «человеческое антитело», как используют здесь, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты к человеческим каркасным последовательностям.

Термин «химерное антитело» предназначен для обозначения антител, в которых последовательности вариабельной области происходят от одного вида, а последовательности константной области происходят от другого вида, например антитела, в которых последовательности вариабельной области происходят из мышиного антитела, а последовательности константной области происходят из человеческого антитела.

Как используют здесь, «гуманизированное» антитело относится к формам антител, не являющихся человеческими (например, мышиных), которые представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антиген-связывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, происходящую из иммуноглобулина, не являющегося человеческим. Предпочтительно гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из определяющей комплементарность области (CDR) реципиента заменены остатками из CDR вида, отличного от человека (донорное антитело), такого как мышь, крыса или кролик, имеющие желаемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых случаях остатки каркасной области Fv (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками, не являющимися человеческими. Кроме того, гуманизированное антитело может содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасной области, но включены для дополнительного уточнения и оптимизации характеристик антитела. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все области CDR соответствуют областям иммуноглобулина, не являющимся человеческими, а все или по существу все области FR представляют собой участки консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело оптимально также будет содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Предпочтительными являются антитела, имеющие участки Fc, модифицированные как описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизированных антител имеют одну или более CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2 или CDR H3), которые изменены по сравнению с исходным антителом,

которые также называют одной или более CDR, «происходящими из» одного или более CDR исходного антитела.

Существуют четыре основных этапа гуманизации моноклонального антитела. К ним относятся: (1) определение нуклеотидной и предполагаемой аминокислотной последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепи исходного антитела; (2) конструирование гуманизированного антитела, т.е. принятие решения о том, какую каркасную область антитела использовать в процессе гуманизации; (3) фактические методологии/методы гуманизации и (4) трансфекция и экспрессия гуманизированного антитела. См., например, патенты США № 4816567, 5807715, 5866692, 6331415, 5530101, 5693761, 5693762, 5585089 и 6180370.

Описан ряд «гуманизированных» молекул антител, содержащих антигенсвязывающий сайт, происходящий из иммуноглобулина, не являющегося человеческим, включая химерные антитела, имеющие V-области грызунов или модифицированные области и связанные с ними определяющие комплементарность области (CDR), слитые с константными доменами человека. См., например, Winter et al. *Nature* 349: 293-299 (1991), Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 4220-4224 (1989), Shaw et al. *J Immunol.* 138: 4534-4538 (1987), и Brown et al. *Cancer Res.* 47: 3577-3583 (1987). В других ссылках описаны CDR грызунов, привитые в поддерживающую каркасную область (FR) человека перед слиянием с соответствующим константным доменом человеческого антитела. См., например, Riechmann et al. *Nature* 332: 323-327 (1988), Verhoeven et al. *Science* 239: 1534-1536 (1988), и Jones et al. *Nature* 321: 522-525 (1986). В других ссылках описаны CDR грызунов, поддерживаемые рекомбинантно венированными каркасными областями грызунов. См., например, Европейскую патентную публикацию No. 0519596. Эти «гуманизированные» молекулы предназначены для сведения к минимуму нежелательного иммунологического ответа на молекулы антител грызунов против человека, который ограничивает продолжительность и эффективность терапевтического применения этих группировок у людей-реципиентов. Например, константная область антитела может быть сконструирована таким образом, чтобы она была иммунологически инертной (например, не запускала лизис комплемента). См., например, публикацию PCT-заявки No. WO99/58572; заявку на патент UK No. 9809951.8. Другие способы гуманизации антител, которые могут быть использованы, раскрыты Daugherty et al., *Nucl. Acids Res.* 19: 2471-2476 (1991) и в

патентах США Nos. 6180 377, 6054297, 5997867, 5866692, 6210671 и 6350861, а также в публикации PCT-заявки No. WO 01/27160.

Как используют здесь, термин «рекомбинантное антитело» предназначен включать все антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, например, антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина, антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных антител человека, антитела, выделенные из животного (например мыши), трансгенного по генам иммуноглобулина человека, или полученные антитела, такие рекомбинантные антитела человека могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro*.

Термин «эпитоп» относится к части молекулы, способной распознаваться и связываться антителом в одной или более антигенсвязывающих областях антитела. Эпитопы часто состоят из поверхностной группы молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. В некоторых воплощениях эпитоп может представлять собой белковый эпитоп. Белковые эпитопы могут быть линейными или конформационными. В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (например, антителом) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. «Нелинейный эпитоп» или «конформационный эпитоп» включает несмежные полипептиды (или аминокислоты) внутри антигенного белка, с которыми антитело, специфичное к этому эпитопу, связывается. Термин «антигенный эпитоп», как используют здесь, определен как часть антигена, с которой антитело может специфически связываться, что определяется любым методом, хорошо известным в данной области техники, например, с помощью обычных иммуноанализов. После определения желаемого эпитопа на антигене можно получить антитела к этому эпитопу, например, с использованием методов, описанных в настоящем описании. Альтернативно, в процессе открытия образование и характеристика антител могут предоставить информацию о желаемых эпитопах. На основе этой информации затем можно провести конкурентный скрининг антител на связывание с одним и тем же эпитопом. Подход для достижения этого заключается в проведении исследований конкуренции и перекрестной конкуренции для обнаружения антител, которые

конкурируют или перекрестно конкурируют друг с другом за связывание с TFPI, например, антитела конкурируют за связывание с антигеном.

Термин «антагонистическое антитело» относится к антителу, которое связывается с мишенью и предотвращает или снижает биологический эффект этой мишени. В некоторых воплощениях этот термин может означать антитело, снижающее выполнение биологической функции мишени, например, TFPI, с которой оно связано.

Термин «антитело, которое предпочтительно связывается» или «специфически связывается» (используется здесь взаимозаменяемо) с эпитопом, хорошо известен в данной области техники, и способы определения такого специфического или предпочтительного связывания также хорошо известны в данной области техники. Говорят, что молекула проявляет «специфическое связывание» или «предпочтительное связывание», если она реагирует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретной клеткой или веществом, чем с альтернативными клетками или веществами. Антитело «специфически связывается» или «предпочтительно связывается» с мишенью, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами. Например, антитело, которое специфически или преимущественно связывается с эпитопом TFPI, представляет собой антитело, которое связывает эту последовательность эпитопа с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими последовательностями. Из этого определения также понятно, что, например, антитело (или фрагмент или эпитоп), которое специфически или предпочтительно связывается с первой мишенью, может или не может специфически или предпочтительно связываться со второй мишенью. Как таковое, «специфическое связывание» или «предпочтительное связывание» не обязательно требует (хотя может включать) исключительное связывание. Как правило, но не обязательно, ссылка на связывание означает преимущественное связывание.

Для выбора антитела или пептида, которые специфически связываются с интересующей молекулой, можно использовать различные форматы анализа. Например, твердофазный иммуноферментный анализ ELISA, иммунопреципитация, Biacore™ (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), KinExA, флуоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS), Octet™ (FortéBio, Inc., Менло-Парк, Калифорния) и Вестерн-блот-анализ входят в число многих анализов, которые можно использовать для

идентификации антитела, которое специфически реагирует с антигеном или рецептором, или его частью, связывающей лиганд, которое специфически связывается с родственным лигандом или партнером по связыванию. Как правило, специфическая или селективная реакция будет в два раза меньше фонового сигнала или шума, предпочтительно более чем в 10 раз больше фонового, еще более предпочтительно более чем в 50 раз больше фонового, предпочтительно более чем в 100 раз больше фонового, еще более предпочтительно более чем в 500 раз больше фонового, еще более предпочтительно более чем в 1000 раз фонового, и еще более предпочтительно более чем в 10000 раз фонового. Кроме того, говорят, что антитело «специфически связывает» антиген, когда равновесная константа диссоциации (K_D) составляет не более 7 нМ.

Термин «аффинность связывания» используют здесь как меру силы нековалентного взаимодействия между двумя молекулами, например, антителом или его фрагментом и антигеном. Термин «аффинность связывания» используют для описания одновалентных взаимодействий (собственной активности).

Аффинность связывания между двумя молекулами, например, антителом или его фрагментом и антигеном, посредством одновалентного взаимодействия может быть количественно определена путем определения константы диссоциации (K_D). В свою очередь, K_D можно определить путем измерения кинетики комплексообразования и диссоциации с использованием, например, метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (Biacore). Константы скорости, соответствующие ассоциации и диссоциации одновалентного комплекса, называют соответственно константами скорости ассоциации k_a (или k_{on}) и константой скорости диссоциации k_d (или k_{off}). K_D связан с k_a и k_d соотношением $K_D = k_d / k_a$. Значение константы диссоциации может быть определено непосредственно хорошо известными методами и может быть вычислено даже для сложных смесей методами, такими как, например, изложенные в Casacci et al. (1984, Byte 9: 340-362). Например, K_D можно установить с помощью анализа связывания нитроцеллюлозного фильтра с двойным фильтром, такого как описанный Wong & Lohman (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5428-5432). Другие стандартные анализы для оценки связывающей способности лигандов, таких как антитела, в отношении антигенов-мишеней известны в данной области техники, включая, например, ELISA, вестерн-блоты, RIA, анализ проточной цитометрии и другие анализы, приведенные в качестве примеров в других местах настоящего документа. Кинетику связывания и аффинность связывания антитела также можно оценить с помощью стандартных

анализов, известных в данной области техники, таких как поверхностный плазмонный резонанс (ППР), например, с использованием системы Biacore™ или KinExA.

Антитело, которое специфически связывается со своей мишенью, может связываться со своей мишенью с высокой аффинностью, то есть с низкой K_D , как обсуждалось выше, и может связываться с другими молекулами, не являющимися мишенями, с более низкой аффинностью. Например, антитело может связываться с молекулами, не являющимися мишенями, с K_D 1×10^{-6} М или более, более предпочтительно 1×10^{-5} М или более, более предпочтительно 1×10^{-4} М или более, более предпочтительно 1×10^{-3} М или более, еще более предпочтительно 1×10^{-2} М или более. Антитело по настоящему изобретению предпочтительно способно связываться со своей мишенью с аффинностью по меньшей мере в 2 раза, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 200 раз, 500 раз, 1000 раз или 10000 раз больше или более, чем его аффинность связывания с другой молекулой, отличной от TFPI.

Как используют здесь, «иммуноспецифическое» связывание антител относится к антигенспецифичному связывающему взаимодействию, которое происходит между антигенсвязывающим участком антитела и специфическим антигеном, распознаваемым этим антителом (т.е. антитело реагирует с белком в ELISA или другом иммуноанализе и не реагирует обнаружимо с неродственными белками).

Термин «конкурировать», как используют здесь в отношении антитела, означает, что первое антитело или его антигенсвязывающий участок связывается с эпитопом способом, достаточно сходным со связыванием второго антитела или антигенсвязывающего участка, так что результат связывания первого антитела с его родственным эпитопом обнаружимо снижается в присутствии второго антитела по сравнению со связыванием первого антитела в отсутствие второго антитела. Альтернатива, когда связывание второго антитела с его эпитопом также обнаружимо снижается в присутствии первого антитела, может, но не обязательно, иметь место. То есть, первое антитело может ингибировать связывание второго антитела с его эпитопом без того, чтобы это второе антитело ингибировало связывание первого антитела с его соответствующим эпитопом. Однако, если каждое антитело обнаружимо ингибирует связывание другого антитела с родственным ему эпитопом или лигандом в той же, большей или меньшей степени, говорят, что антитела «перекрестно конкурируют» друг с другом за связывание соответствующего(их) эпитопа(ов). Настоящее изобретение охватывает как конкурирующие, так и перекрестно конкурирующие антитела.

Независимо от механизма, с помощью которого происходит такая конкуренция или перекрестная конкуренция (например, стерические затруднения, конформационные изменения или связывание с общим эпитопом или его участком), специалист в данной области техники должен понимать, основываясь на идеях, представленных в настоящем документе, что такие конкурирующие и/или перекрестно-конкурирующие антитела охватываются и могут быть использованы для описанных здесь способов.

Как используют здесь, термин «ингибитор пути тканевого фактора или TFPI» относится к любой форме TFPI и его вариантам, которые сохраняют по меньшей мере часть активности TFPI. TFPI представляет собой мультивалентный домен Кунитца, содержащий ингибитор протеазы. Типичные последовательности TFPI человека, мыши, яванского макака, кролика и крысы представлены в Таблице 20. TFPI человека представляет собой внеклеточный гликопротеин с двумя преобладающими формами, TFPI-альфа и TFPI-бета. TFPI альфа, представляющий собой гликозилированный белок из 276 аминокислот (молекулярная масса 43 кДа), представляет собой наибольшую форму TFPI и состоит из трех Кунитц-подобных доменов и основной карбоксиконцевой области. В результате альтернативного сплайсинга образуется TFPI-бета, который содержит домен Кунитца 1 (K1) и домен Кунитца 2 (K2), но содержит альтернативную С-концевую часть, лишенную домена Кунитца 3 (K3) и основной области. TFPI-бета прикрепляется к клеточным мембранам посредством посттрансляционной модификации с помощью гликозилфосфатидилинозитолового (GPI) якоря.

Первичными мишенями TFPI являются протеазы Фактор Ха (FXa) и Фактор VIIa (FVIIa), которые являются ключевыми факторами на стадии инициации каскада свертывания крови. Биохимический анализ показал, что K2 является ингибитором FXa, тогда как K1 ингибирует комплекс FVIIa-тканевой фактор. Роль K3 неясна, так как он, по-видимому, не обладает прямой ингибирующей активностью в отношении протеаз, но может служить сайтом распознавания кофактора белка S. С-концевой домен, уникальный для TFPI-альфа, может быть вовлечен в распознавание протромбиназы на поверхности тромбоцитов.

Домен Кунитца 1 (K1) соответствует аминокислотным остаткам 26-76 SEQ ID NO: 2, а домен Кунитца 2 (K2) соответствует остаткам 91-147 SEQ ID NO: 2. Домены K1 и K2 других TFPI гомологов, изоформ, вариантов или фрагментов могут быть идентифицированы путем выравнивания последовательностей или структурного выравнивания относительно SEQ ID NO: 2.

TFPI по настоящему изобретению включает любую встречающуюся в природе форму TFPI, которая может иметь происхождение из любого подходящего организма. Например, TFPI может представлять собой TFPI млекопитающих, например человека, мыши, крысы, примата, отличного от человека, крупного рогатого скота, овцы, собаки, кошки или свиньи. В некоторых воплощениях TFPI представляет собой TFPI человека. TFPI может быть зрелой формой TFPI (т.е. белком TFPI, который подвергся посттрансляционному процессингу в подходящей клетке). Такой зрелый белок TFPI может быть, например, гликозилирован.

TFPI по настоящему изобретению включает любые функциональные фрагменты или варианты, происходящие из встречающегося в природе TFPI. Функциональный фрагмент TFPI может представлять собой любую часть или участок TFPI, которые сохраняют активность TFPI, такую как способность ингибировать Фактор Ха (FXa), ингибировать активность комплекса FVIIa-тканевой фактор и/или функционировать как отрицательный регулятор свертывания или гемостаза. Например, функциональный фрагмент может содержать домен Кунитца, такой как домен K1, домен K2 или оба домена K1 и K2 TFPI.

Функциональный вариант может содержать одну или более мутаций по сравнению с встречающимся в природе TFPI и при этом сохранять активность встречающегося в природе TFPI, например, способность ингибировать Фактор Ха (FXa) или способность ингибировать активность комплекса FVIIa-тканевой фактор. Например, вариант может иметь различную степень идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7, например быть на по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичным последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

Фрагменты, варианты, изоформы и гомологи TPFI по изобретению должны сохранять важные остатки эпитопов (такие как Ile105, Arg107 и Leu131, если используют антитела TFPI-23 и TFPI-106), как описано здесь. Кроме того, TFPI может содержать пять или более, восемь или более, десять или более, двенадцать или более или пятнадцать или более доступных для поверхности остатков K2-домена TFPI. Остаток, доступный на поверхности, представляет собой остаток, относительная доступность которого превышает 40%.

Например, для домена K2 TFPI (см., например, SEQ ID NO: 2), следующие остатки аминокислот имеют относительную доступность более 40%: 94-95, 98, 100-110, 118-121, 123-124, 131, 134, 138-142 и 144-145. TFPI может содержать пять или более, восемь или более, десять или более, двенадцать или более или пятнадцать или более таких остатков, например фрагмент TFPI, который включает пять или более, восемь или более, десять или более, двенадцать или более или пятнадцать или более из этих остатков.

Конкретные положения аминокислотных остатков в TFPI пронумерованы в соответствии с SEQ ID NO: 2 (человеческий TFPI α K1K2K3). Однако настоящее изобретение не ограничивается SEQ ID NO: 2. Соответствующие остатки других гомологов, изоформ, вариантов или фрагментов TFPI могут быть идентифицированы в соответствии с выравниванием последовательностей или структурным выравниванием, известным в данной области техники. Например, выравнивание можно выполнить вручную или с помощью хорошо известных программ выравнивания последовательностей, таких как ClustalW2 или «BLAST 2 Sequences», используя параметры по умолчанию. Например, Arg107 SEQ ID NO: 2 соответствует Arg104 мышинного TFPI K1K2 (SEQ ID NO: 4).

Как используют здесь, «антагонистическое антитело к TFPI» (взаимозаменяемо называемое «антитело к TFPI» или «антитело против TFPI») относится к антителу, которое способно связываться с TFPI и ингибировать биологическую активность TFPI и/или нижестоящий(е) путь(и), опосредованный(ые) передачей сигналов TFPI. Антагонистическое антитело к TFPI охватывает антитела, которые блокируют, противодействуют, подавляют или снижают (в том числе значительно) биологическую активность TFPI, включая нижестоящие пути, опосредованные передачей сигналов TFPI, такие как связывание лиганда и/или индуцирование клеточного ответа на TFPI. Для целей настоящего изобретения следует ясно понимать, что термин «антагонистическое антитело к TFPI» охватывает все ранее идентифицированные термины, названия, функциональные состояния и характеристики, посредством которых сам TFPI, биологическая активность TFPI (включая, без ограничения, его способность опосредовать любой аспект свертывания крови) или последствия биологической активности по существу устраняются, уменьшаются или нейтрализуются в любой значимой степени. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело к TFPI связывает TFPI и предотвращает связывание TFPI и/или ингибирование комплекса

тканевого фактора (TF)/Фактора VIIa. В других воплощениях антитело к TFPI связывает TFPI и предотвращает связывание TFPI и/или ингибирование Фактора Ха. Примеры антагонистических антител к TFPI приведены в настоящем описании.

«Эффективное количество» лекарственного средства, препарата, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для достижения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты, такие как облегчение или уменьшение целевого патологического состояния. Эффективное количество можно вводить за один или несколько приемов. Для целей настоящего изобретения эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для лечения, облегчения или снижения интенсивности целевого патологического состояния. Как понятно в клиническом контексте, эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может быть достигнуто или не достигнуто в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, «эффективное количество» может рассматриваться в контексте введения одного или более терапевтических агентов, и один агент может считаться введенным в эффективном количестве, если в сочетании с одним или более другими агентами может быть достигнут или достигается желаемый результат.

«Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному, в дозировках и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемого терапевтического результата, что в контексте антител против TFPI включает лечение или профилактическое предупреждение целевого патологического состояния, например нарушений свертываемости крови, таких как гемофилия А, В или С. Следует отметить, что значения дозировки могут варьировать в зависимости от тяжести состояния, которое необходимо облегчить. Кроме того, следует понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные режимы дозирования должны корректироваться с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным мнением лица, вводящего или контролирующего введение композиций, и что диапазоны дозировок, указанные здесь, являются только примерными и не предназначены для ограничения объема или применения заявленной композиции. Аналогичным образом, терапевтически эффективное количество антитела или фрагмента антитела может варьировать в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса тела индивидуума, способность антитела

или фрагмента антитела вызывать желаемый ответ у индивидуума, и желаемый путь введения препарата антитела. Терапевтически эффективным количеством также является такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела или фрагмента антитела перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

Терапевтически эффективные количества антител против TFPI описаны, например, в документе PCT/IB2019/058597, поданном 9 октября 2019 г. (в котором испрашивается приоритет согласно заявкам США 62/802401 и 62/744481), который включен в настоящий документ ссылкой во все полноте. В некоторых воплощениях терапевтически эффективное количество включает начальную дозу примерно 300 мг с последующими еженедельными (т.е. один раз в неделю) дозами примерно 150 мг. В некоторых воплощениях терапевтически эффективное количество включает начальную дозу примерно 150 мг и последующие еженедельные (т.е. один раз в неделю) дозы примерно 150 мг. В некоторых воплощениях терапевтически эффективное количество включает начальную дозу примерно 300 мг и последующие еженедельные (т.е. один раз в неделю) дозы примерно 300 мг. В некоторых воплощениях терапевтически эффективное количество включает начальную дозу примерно 450 мг и последующие еженедельные (т.е. один раз в неделю) дозы примерно 450 мг.

Как используют здесь, термин «лечение» относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где целью является предотвращение или замедление (уменьшение) целевого патологического состояния (например, любого состояния, при котором лечение антителом принесет пользу). Это включает хронические и острые расстройства или заболевания, включая те патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающего к рассматриваемому расстройству. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет заболевание, а также тех, кто склонен к заболеванию, или тех, у кого это состояние необходимо предотвратить. Как используют здесь, «лечение» представляет собой подход для получения полезных или желаемых клинических результатов, включающий, без ограничения, один или более из следующих: включая уменьшение тяжести, облегчение одного или более симптомов, ассоциированных с патологическим состоянием.

Как используют здесь, термин «субъект» или «индивидуум» для целей лечения включает любого субъекта и предпочтительно является субъектом, нуждающимся в

лечении целевого патологического состояния (например гемофилии). В целях профилактики субъектом является любой субъект, и предпочтительно субъект, подверженный риску или предрасположенный к развитию целевого патологического состояния. Термин «субъект» предназначен включать живые организмы, например, прокариоты и эукариоты. Примеры субъектов включают млекопитающих, например, людей, собак, коров, лошадей, свиней, овец, коз, кошек, мышей, кроликов, крыс и трансгенных животных, отличных от человека. В конкретных воплощениях изобретения субъектом является человек.

Как используют здесь, термин «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота», используемый здесь взаимозаменяемо, означает полимерную форму нуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо дезоксинуклеотидов, или модифицированную форму любого типа нуклеотида и могут быть одноцепочечными и двухцепочечными формами. «Полинуклеотидная» или «нуклеиновокислотная» последовательность охватывает комплементарную ей последовательность, если не указано иное. Как используют здесь, термин «выделенный полинуклеотид» или «выделенная нуклеиновая кислота» означает полинуклеотид геномного, кДНК или синтетического происхождения или некоторую их комбинацию, причем в силу своего происхождения или источника происхождения выделенный полинуклеотид имеет от одного до трех из следующего: (1) не связан со всем или частью полинуклеотида, с которым «выделенный полинуклеотид» встречается в природе, (2) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не встречается в природе как часть более крупной последовательности.

Ссылка на «примерно» для значения или параметра здесь включает (и описывает) воплощения, которые относятся к этому значению или параметру как таковому. Например, описание, относящееся к «примерно X», включает описание «X». Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Вообще говоря, термин «примерно» относится к указанному значению переменной и ко всем значениям переменной, которые находятся в пределах экспериментальной ошибки указанного значения (например, в пределах 95% доверительного интервала для среднего) или в пределах 10 процентов от указанного значения, в зависимости от того, что больше.

В тех случаях, когда аспекты или варианты осуществления изобретения описаны в контексте группы Маркуша или другой группы альтернатив, настоящее изобретение охватывает не только всю группу, указанную в целом, но и каждого члена группы в отдельности и все возможные подгруппы основной группы, а также основную группу

при отсутствии одного или более членов группы. Настоящее изобретение также предусматривает явное исключение одного или более членов группы из заявленного изобретения.

При включении элементов настоящего изобретения или предпочтительного(ых) воплощения(ий) в единственном числе предполагается включение одного или более элементов. Термины «содержащий», «содержать», «содержит», «включающий» и «имеющий» предназначены для включения и означают, что могут быть дополнительные элементы, отличные от перечисленных элементов. Следует понимать, что везде, где воплощения описаны здесь с использованием формулировки «содержащий», также предложены аналогичные воплощения, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

Если не указано иное, все используемые здесь технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. В случае противоречий, настоящая заявка, включая определения, будет иметь преимущество. Если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число.

Примеры методов и материалов описаны здесь, хотя методы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь, также могут быть использованы при практическом применении или тестировании настоящего изобретения. Материалы, методы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Препарат антитела против TFPI

Настоящая заявка основана на удивительном и неожиданном наблюдении, что препарат, содержащий гистидиновый буфер и имеющий pH 5,8, замедляет разложение, снижает образование агрегатов и улучшает стабильность антитела против TFPI по сравнению с другими антителами IgG1, такими как антитело против VEGF.

Соответственно, в одном аспекте здесь предложен препарат, содержащий: от примерно 15 мг/мл до примерно 250 мг/мл ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), буфер, полиол, поверхностно-активное вещество, хелатирующий агент, и где pH препарата составляет от примерно 5,0 до примерно 6,0. В некоторых воплощениях препарат содержит: от примерно 15 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого

фактора (TFPI), буфер, полиол, поверхностно-активное вещество, хелатирующий агент, где pH препарата составляет от примерно 5,0 до примерно 6,0, и где эпитоп содержит остатки Ile105, Arg107 и Leu131, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2. Описанные здесь препараты имеют увеличенный срок хранения, предпочтительно по меньшей мере примерно 1 месяц, примерно 4 месяца, примерно 6 месяцев, примерно 12 месяцев, примерно 24 месяца, примерно 36 месяцев, примерно 48 месяцев или примерно 60 месяцев (например, при примерно -70°C, при примерно -20°C, при примерно 5°C, при примерно 25°C или при примерно 40°C).

В некоторых воплощениях препарат содержит по меньшей мере одно антагонистическое антитело к TFPI (т.е. антитело против TFPI). Примеры антагонистических антител к TFPI включают, без ограничения, описанные в WO 2017/029583, WO 2010/017196, WO 2011/109452, WO 2014/144577, WO 2010/072687, WO 2012/001087, WO 2014/140240 и WO 2015/007880, каждая из которых включена в настоящее описание ссылкой во всей ее полноте.

В некоторых воплощениях антагонистическое антитело к TFPI выбрано из группы, состоящей из TFPI 106 (также известно как PF-06741086), TFPI-23, TFPI-107, конкизумаба (также известно как mAb-2021, hz4F36), 2A8 и 2A8-200 (см., например, US20170073428).

В некоторых воплощениях может присутствовать более одного антитела. Может присутствовать по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или более разных антител. Как правило, два или более разных антител обладают взаимодополняющими активностями, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Антитело или антитела можно также использовать в сочетании с другими агентами, которые служат для усиления и/или дополнения эффективности антител.

В некоторых воплощениях антитело специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), где эпитоп содержит остатки Ile105, Arg107 и Leu131, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях антитело против TFPI не связывается с доменом Кунитца 1 (K1) TFPI. В некоторых воплощениях эпитоп дополнительно содержит остатки Cys106, Gly108, Cys130, Leu131 и Gly132, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях эпитоп дополнительно содержит Asp102, Arg112, Tyr127, Gly129, Met134 и Glu138, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2. В некоторых

воплощениях эпитоп не содержит: E100, E101, P103, Y109, T111, Y113, F114, N116, Q118, Q121, C122, E123, R124, F125, K126 и L140, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях эпитоп не содержит: D31, D32, P34, C35, K36, E100, E101, P103, Y109, K126 и G128, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую:

(а) определяющую комплементарность область 1 VH (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,

(б) определяющую комплементарность область 2 VH (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и

(в) определяющую комплементарность область 3 VH (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых воплощениях антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 18 и 20. В некоторых воплощениях антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 18 и 20. В некоторых воплощениях антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых воплощениях антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В некоторых воплощениях антитело содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую:

(а) определяющую комплементарность область 1 VL (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, (б) определяющую комплементарность область 2 VL (CDR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и (в) определяющую комплементарность область 3 VL (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых воплощениях антитело содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 11. В некоторых воплощениях антитело содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В некоторых воплощениях антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых воплощениях антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых воплощениях антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых воплощениях антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В некоторых воплощениях антитело содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую: (а) CDR-H1 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, (б) CDR-H2 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и (в) CDR-H3 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и

(2) переменную область легкой цепи (VL), содержащую: (а) CDR-L1 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, (б) CDR-L2 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и (в) CDR-L3 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых воплощениях антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых воплощениях антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Иллюстративные антитела по настоящему изобретению были депонированы в Американской Коллекции Типовых Культур, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, USA, 22 июля 2015 года. Плазмидный вектор mAb-TFPI-106 VH, имеющий номер доступа ATCC No. PTA-122329, содержит ДНК-вставку, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела TFPI-106, и плазмидный вектор mAb-TFPI-106 VL, имеющий номер доступа ATCC No. PTA-122328, содержит ДНК-вставку, кодирующую переменную область легкой цепи антитела TFPI-106.

В некоторых воплощениях антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых воплощениях антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и

содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В некоторых воплощениях антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых воплощениях антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В некоторых воплощениях антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых воплощениях антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

В некоторых воплощениях антитело имеет время полужизни в сыворотке крови по меньшей мере 25 часов, по меньшей мере 29 часов, по меньшей мере 30 часов, по меньшей мере 35 часов, по меньшей мере 40 часов, по меньшей мере 50 часов, по меньшей мере 55 часов, по меньшей мере 60 часов, по меньшей мере 65 часов, по меньшей мере 70 часов, по меньшей мере 75 часов, по меньшей мере 80 часов, по меньшей мере 85 часов, по меньшей мере 90 часов, по меньшей мере 95 часов, по меньшей мере 100 часов, по меньшей мере 105 часов, по меньшей мере 110 часов, по меньшей мере 115 часов, по меньшей мере 120 часов или по меньшей мере 125 часов. В некоторых воплощениях антитело имеет время полужизни в сыворотке крови по меньшей мере 25 часов, по меньшей мере 29 часов или по меньшей мере 30 часов. В некоторых воплощениях антитело имеет время полужизни в сыворотке крови по меньшей мере 29 часов. В некоторых воплощениях антитело имеет время полужизни в сыворотке крови по меньшей мере 30 часов. В некоторых воплощениях антитело имеет время полужизни в сыворотке крови по меньшей мере 115 часов, по меньшей мере 120 часов или по меньшей мере 125 часов.

В некоторых воплощениях антитело имеет аффинность связывания (K_D) от примерно 5×10^{-7} М до примерно 5×10^{-11} М. В некоторых воплощениях антитело имеет K_D от примерно 1×10^{-8} М до примерно 1×10^{-10} М (от 0,1 до 10 нМ). В некоторых воплощениях антитело имеет $K_D \leq 1$ нМ, ≤ 500 пМ, ≤ 250 пМ, ≤ 200 пМ, ≤ 100 пМ, ≤ 50 пМ,

≤ 20 пМ или ≤ 10 пМ. В некоторых воплощениях антитело не имеет K_D в низком пМ диапазоне (т.е. ≤ 100 пМ). В некоторых аспектах K_D измеряют поверхностным плазмонным резонансом. В некоторых аспектах поверхностный плазмонный резонанс может быть измерен с использованием Biacore. В некоторых аспектах ППР может быть измерен с использованием Biacore с иммобилизованным антителом и человеческим TFPI в жидкой фазе.

В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 10% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 15% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 20% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 25% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 27% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 30% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 35% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 40% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 50% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 60% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 70% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 80% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 90% относительно биодоступности при внутривенном введении. В некоторых аспектах

биодоступность антитела при подкожном введении может составлять по меньшей мере 99% относительно биодоступности при внутривенном введении.

Антитело может присутствовать в препарате в концентрации в диапазоне от примерно 0,1 мг/мл до примерно 250 мг/мл, от примерно 15 мг/мл до 250 мг/мл, от примерно 20 мг/мл до примерно 175 мг/мл или от примерно 25 мг/мл до примерно 160 мг/мл. Например, в некоторых воплощениях концентрация антитела составляет примерно 0,5 мг/мл, примерно 1 мг/мл, примерно 2 мг/мл, примерно 2,5 мг/мл, примерно 3 мг/мл, примерно 3,5 мг/мл, примерно 4 мг/мл, примерно 4,5 мг/мл, примерно 5 мг/мл, примерно 5,5 мг/мл, примерно 6 мг/мл, примерно 6,5 мг/мл, примерно 7 мг/мл, примерно 7,5 мг/мл, примерно 8 мг/мл, примерно 8,5 мг/мл, примерно 9 мг/мл, примерно 9,5 мг/мл, примерно 10 мг/мл, примерно 11 мг/мл, примерно 12 мг/мл, примерно 13 мг/мл, примерно 14 мг/мл, примерно 15 мг/мл, примерно 16 мг/мл, примерно 17 мг/мл, примерно 18 мг/мл, примерно 19 мг/мл, примерно 20 мг/мл, примерно 21 мг/мл, примерно 22 мг/мл, примерно 23 мг/мл, примерно 24 мг/мл, примерно 25 мг/мл, примерно 26 мг/мл, примерно 27 мг/мл, примерно 28 мг/мл, примерно 29 мг/мл, примерно 30 мг/мл, примерно 31 мг/мл, примерно 32 мг/мл, примерно 33 мг/мл, примерно 34 мг/мл, примерно 35 мг/мл, примерно 36 мг/мл, примерно 37 мг/мл, примерно 38 мг/мл, примерно 39 мг/мл, примерно 40 мг/мл, примерно 41 мг/мл, примерно 42 мг/мл, примерно 43 мг/мл, примерно 44 мг/мл, примерно 45 мг/мл, примерно 46 мг/мл, примерно 47 мг/мл, примерно 48 мг/мл, примерно 49 мг/мл, примерно 50 мг/мл, примерно 51 мг/мл, примерно 52 мг/мл, примерно 53 мг/мл, примерно 54 мг/мл, примерно 55 мг/мл, примерно 56 мг/мл, примерно 57 мг/мл, примерно 58 мг/мл, примерно 59 мг/мл, примерно 60 мг/мл, примерно 70 мг/мл, примерно 80 мг/мл, примерно 90 мг/мл, примерно 100 мг/мл, примерно 101 мг/мл, примерно 102 мг/мл, примерно 102,5 мг/мл, примерно 103 мг/мл, примерно 103,5 мг/мл, примерно 104 мг/мл, примерно 104,5 мг/мл, примерно 105 мг/мл, примерно 105,5 мг/мл, примерно 106 мг/мл, примерно 106,5 мг/мл, примерно 107 мг/мл, примерно 107,5 мг/мл, примерно 108 мг/мл, примерно 108,5 мг/мл, примерно 109 мг/мл, примерно 109,5 мг/мл, примерно 110 мг/мл, примерно 111 мг/мл, примерно 112 мг/мл, примерно 113 мг/мл, примерно 114 мг/мл, примерно 115 мг/мл, примерно 116 мг/мл, примерно 117 мг/мл, примерно 118 мг/мл, примерно 119 мг/мл, примерно 120 мг/мл, примерно 121 мг/мл, примерно 122 мг/мл, примерно 123 мг/мл, примерно 124 мг/мл, примерно 125 мг/мл, примерно 126 мг/мл, примерно 127 мг/мл, примерно 128 мг/мл, примерно 129 мг/мл,

примерно 130 мг/мл, примерно 131 мг/мл, примерно 132 мг/мл, примерно 133 мг/мл, примерно 134 мг/мл, примерно 135 мг/мл, примерно 136 мг/мл, примерно 137 мг/мл, примерно 138 мг/мл, примерно 139 мг/мл, примерно 140 мг/мл, примерно 141 мг/мл, примерно 142 мг/мл, примерно 143 мг/мл, примерно 144 мг/мл, примерно 145 мг/мл, примерно 146 мг/мл, примерно 147 мг/мл, примерно 148 мг/мл, примерно 149 мг/мл, примерно 150 мг/мл, примерно 151 мг/мл, примерно 152 мг/мл, примерно 153 мг/мл, примерно 154 мг/мл, примерно 155 мг/мл, примерно 156 мг/мл, примерно 157 мг/мл, примерно 158 мг/мл, примерно 159 мг/мл, примерно 160 мг/мл, примерно 170 мг/мл, примерно 180 мг/мл, примерно 190 мг/мл, примерно 200 мг/мл, примерно 210 мг/мл, примерно 220 мг/мл, примерно 230 мг/мл, примерно 240 мг/мл или примерно 250 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация антитела в препарате составляет примерно 100 мг/мл, примерно 115 мг/мл, примерно 150 мг/мл или примерно 158 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация антитела в препарате составляет 150 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация антитела в препарате составляет 155 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация антитела в препарате составляет 158 мг/мл.

В соответствии с настоящим изобретением буфер (например гистидиновый или сукцинатный буфер) обеспечивает препарату pH, близкий к физиологическому, для снижения риска боли или анафилактоидных побочных эффектов при инъекции и обеспечивает повышенную стабильность антител и устойчивость к агрегации, окислению и фрагментации.

Буфер может быть, например, без ограничения, ацетатом, сукцинатом (например гексагидрат сукцинат динатрия), глюконатом, цитратом, гистидином, уксусной кислотой, фосфатом, фосфорной кислотой, аскорбатом, винной кислотой, малеиновой кислотой, глицином, лактатом, молочной кислотой, аскорбиновой кислотой, имидазолом, бикарбонатом и угольной кислотой, янтарной кислотой, бензоатом натрия, бензойной кислотой, глюконатом, эдетатом, ацетатом, малатом, имидазолом, трис, фосфатом и их смесями. В некоторых воплощениях буфер представляет собой гистидиновый или сукцинатный. В некоторых воплощениях сукцинатный буфер содержит гексагидрат сукцината динатрия (основная форма) и/или янтарную кислоту или их смесь. Предпочтительно буфер представляет собой гистидин, где гистидиновый буфер содержит L-гистидин, моногидрохлорид L-гистидина (также называемый моногидратом моногидрохлорида L-гистидина и/или моногидратом гидрохлорида L-гистидина) или их смесь.

Концентрация буфера может находиться в диапазоне от примерно 0,1 миллимолярной (мМ) до примерно 100 мМ. Предпочтительно концентрация буфера составляет от примерно 0,5 мМ до примерно 50 мМ, более предпочтительно от примерно 1 мМ до примерно 30 мМ, более предпочтительно от примерно 1 мМ до примерно 25 мМ. Предпочтительно концентрация буфера составляет примерно 1 мМ, примерно 2 мМ, примерно 3 мМ, примерно 4 мМ, примерно 5 мМ, примерно 6 мМ, примерно 7 мМ, примерно 8 мМ, примерно 9 мМ, примерно 10 мМ, примерно 11 мМ, примерно 12 мМ, примерно 13 мМ, примерно 14 мМ, примерно 15 мМ, примерно 16 мМ, примерно 17 мМ, примерно 18 мМ, примерно 19 мМ, примерно 20 мМ, примерно 21 мМ, примерно 22 мМ, примерно 23 мМ, примерно 24 мМ, примерно 25 мМ, примерно 30 мМ, примерно 35 мМ, примерно 40 мМ, примерно 45 мМ, примерно 50 мМ, примерно 55 мМ, примерно 60 мМ, примерно 65 мМ, примерно 70 мМ, примерно 75 мМ, примерно 80 мМ, примерно 85 мМ, примерно 90 мМ, примерно 95 мМ или примерно 100 мМ. В некоторых воплощениях буфер представляет собой гистидин в концентрации примерно 20 мМ. В некоторых воплощениях буфер представляет собой сукцинат в концентрации примерно 20 мМ.

Концентрация буфера может также находиться в диапазоне от примерно 0,01 мг/мл до примерно 30 мг/мл, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 5 мг/мл или от примерно 0,5 мг/мл до примерно 4 мг/мл. Например, концентрация буфера составляет примерно 0,01 мг/мл, 0,02 мг/мл, 0,03 мг/мл, примерно 0,04 мг/мл, примерно 0,05 мг/мл, примерно 0,06 мг/мл, примерно 0,07 мг/мл, 0,08 мг/мл, 0,09 мг/мл, примерно 0,10 мг/мл, 0,11 мг/мл, 0,12 мг/мл, 0,13 мг/мл, примерно 0,14 мг/мл, примерно 0,15 мг/мл, примерно 0,16 мг/мл, примерно 0,17 мг/мл, 0,18 мг/мл, 0,19 мг/мл примерно 0,20 мг/мл, примерно 0,25 мг/мл, примерно 0,3 мг/мл, примерно 0,4 мг/мл, примерно 0,5 мг/мл, примерно 0,6 мг/мл, примерно 0,7 мг/мл, примерно 0,8 мг/мл, примерно 0,9 мг/мл, примерно 1,0 мг/мл, примерно 2,0 мг/мл, примерно 3,0 мг/мл, примерно 4,0 мг/мл, примерно 5,0 мг/мл, примерно 6,0 мг/мл, примерно 7,0 мг/мл, примерно 8,0 мг/мл, примерно 9,0 мг/мл, примерно 10,0 мг/мл, примерно 11,0 мг/мл, примерно 12,0 мг/мл, примерно 13,0 мг/мл, примерно 14,0 мг/мл, примерно 15,0 мг/мл, примерно 16,0 мг/мл, примерно 17,0 мг/мл, примерно 18,0 мг/мл, примерно 19,0 мг/мл, примерно 20 мг/мл, примерно 21,0 мг/мл, примерно 22,0 мг/мл, примерно 23,0 мг/мл, примерно 24,0 мг/мл, примерно 25,0 мг/мл, примерно 26,0 мг/мл, примерно 27,0 мг/мл, примерно 28,0 мг/мл, примерно 29,0 мг/мл или примерно 30 мг/мл. В некоторых воплощениях препарат содержит примерно 0,5-5,0 мг/мл гистидинового буфера. В некоторых воплощениях буфер представляет собой

гистидиновый буфер, содержащий примерно 0,1-1,5 мг/мл L-гистидина и примерно 1-3 мг/мл моногидрохлорида L-гистидина. В некоторых воплощениях буфер представляет собой гистидиновый буфер, содержащий 1,12 мг/мл L-гистидина и 2,67 мг/мл моногидрохлорида L-гистидина. В некоторых воплощениях буфер представляет собой сукцинатный буфер, содержащий примерно 0,5-5,0 мг/мл гексагидрата сукцината динатрия и примерно 0,1-1,0 мг/мл янтарной кислоты. В некоторых воплощениях буфер представляет собой сукцинатный буфер, содержащий примерно 4,08 мг/мл гексагидрата сукцината динатрия и примерно 0,58 мг/мл янтарной кислоты. В некоторых воплощениях буфер представляет собой сукцинатный буфер, содержащий примерно 2,362 мг/мл янтарной кислоты.

В некоторых воплощениях полиол может иметь молекулярную массу, которая, например, без ограничения, составляет менее чем примерно 600 кДа (например, в диапазоне от примерно 120 до примерно 400 кДа), и содержит множество гидроксильных групп, включая сахара (например восстанавливающие и невосстанавливающие сахара или их смеси, сахарид или углевод), сахарные спирты, сахарные кислоты или их соли или их смеси. Примеры невосстанавливающих сахаров включают, без ограничения, сахарозу, трегалозу и их смеси. В некоторых воплощениях полиол представляет собой маннит, трегалозу, сорбит, эритрит, изомальт, лактит, мальтит, ксилит, глицерин, лактит, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, инозитол или их смеси. В других воплощениях полиол может представлять собой, например, без ограничения, моносахарид, дисахарид или полисахарид или смеси любого из вышеперечисленных. Сахарид или углевод может представлять собой, например, без ограничения, фруктозу, глюкозу, маннозу, сахарозу, сорбозу, ксилозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрины, растворимый крахмал, гидроксиэтилкрахмал, водорастворимые глюканы или их смеси.

В некоторых воплощениях полиол выбран из группы, состоящей из маннита, трегалозы, сорбита, эритрита, изомальта, лактита, мальтита, ксилита, глицерина, лактита, пропиленгликоля, полиэтиленгликоля, инозита, фруктозы, глюкозы, маннозы, сахарозы, сорбозы, ксилозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, декстрана, пуллулана, декстрина, циклодекстринов, растворимого крахмала, гидроксиэтилкрахмала, водорастворимых глюканов или их смесей. В некоторых воплощениях полиол представляет собой сахарозу или трегалозу. В некоторых воплощениях полиол представляет собой сахарозу.

Концентрация полиола в препарате находится в диапазоне от примерно 1 мг/мл до примерно 300 мг/мл, от примерно 1 мг/мл до примерно 200 мг/мл или от примерно 1 мг/мл до примерно 120 мг/мл. Предпочтительно концентрация полиола в препарате составляет от примерно 50 мг/мл до примерно 120 мг/мл, от примерно 60 мг/мл до примерно 110 мг/мл или от примерно 80 мг/мл до примерно 90 мг/мл. Например, концентрация полиола в препарате составляет примерно 0,5 мг/мл, примерно 1 мг/мл, примерно 2 мг/мл, примерно 2,5 мг/мл, примерно 3 мг/мл, примерно 3,5 мг/мл, примерно 4 мг/мл, примерно 4,5 мг/мл, примерно 5 мг/мл, примерно 5,5 мг/мл, примерно 6 мг/мл, примерно 6,5 мг/мл, примерно 7 мг/мл, примерно 7,5 мг/мл, примерно 8 мг/мл, примерно 8,5 мг/мл, примерно 9 мг/мл, примерно 9,5 мг/мл, примерно 10 мг/мл, примерно 11 мг/мл, примерно 12 мг/мл, примерно 13 мг/мл, примерно 14 мг/мл, примерно 15 мг/мл, примерно 16 мг/мл, примерно 17 мг/мл, примерно 18 мг/мл, примерно 19 мг/мл, примерно 20 мг/мл, примерно 21 мг/мл, примерно 22 мг/мл, примерно 23 мг/мл, примерно 24 мг/мл, примерно 25 мг/мл, примерно 26 мг/мл, примерно 27 мг/мл, примерно 28 мг/мл, примерно 29 мг/мл, примерно 30 мг/мл, примерно 31 мг/мл, примерно 32 мг/мл, примерно 33 мг/мл, примерно 34 мг/мл, примерно 35 мг/мл, примерно 36 мг/мл, примерно 37 мг/мл, примерно 38 мг/мл, примерно 39 мг/мл, примерно 40 мг/мл, примерно 41 мг/мл, примерно 42 мг/мл, примерно 43 мг/мл, примерно 44 мг/мл, примерно 45 мг/мл, примерно 46 мг/мл, примерно 47 мг/мл, примерно 48 мг/мл, примерно 49 мг/мл, примерно 50 мг/мл, примерно 51 мг/мл, примерно 52 мг/мл, примерно 53 мг/мл, примерно 54 мг/мл, примерно 55 мг/мл, примерно 56 мг/мл, примерно 57 мг/мл, примерно 58 мг/мл, примерно 59 мг/мл, примерно 60 мг/мл, примерно 65 мг/мл, примерно 70 мг/мл, примерно 75 мг/мл, примерно 80 мг/мл, примерно 81 мг/мл, примерно 82 мг/мл, примерно 83 мг/мл, примерно 84 мг/мл, примерно 85 мг/мл, примерно 86 мг/мл, примерно 87 мг/мл, примерно 88 мг/мл, примерно 89 мг/мл, примерно 90 мг/мл, примерно 91 мг/мл, примерно 92 мг/мл, примерно 93 мг/мл, примерно 94 мг/мл, примерно 95 мг/мл, примерно 96 мг/мл, примерно 97 мг/мл, примерно 98 мг/мл, примерно 99 мг/мл, примерно 100 мг/мл, примерно 101 мг/мл, примерно 102 мг/мл, примерно 103 мг/мл, примерно 104 мг/мл, примерно 105 мг/мл, примерно 106 мг/мл, примерно 107 мг/мл, примерно 108 мг/мл, примерно 109 мг/мл, примерно 110 мг/мл, примерно 111 мг/мл, примерно 112 мг/мл, примерно 113 мг/мл, примерно 114 мг/мл, примерно 115 мг/мл, примерно 116 мг/мл, примерно 117 мг/мл, примерно 118 мг/мл, примерно 119 мг/мл,

примерно 120 мг/мл, примерно 121 мг/мл, примерно 122 мг/мл, примерно 123 мг/мл, примерно 124 мг/мл, примерно 125 мг/мл, примерно 126 мг/мл, примерно 127 мг/мл, примерно 128 мг/мл, примерно 129 мг/мл, примерно 130 мг/мл, примерно 131 мг/мл, примерно 132 мг/мл, примерно 133 мг/мл, примерно 134 мг/мл, примерно 135 мг/мл, примерно 136 мг/мл, примерно 137 мг/мл, примерно 138 мг/мл, примерно 139 мг/мл, примерно 140 мг/мл, примерно 141 мг/мл, примерно 142 мг/мл, примерно 143 мг/мл, примерно 144 мг/мл, примерно 145 мг/мл, примерно 146 мг/мл, примерно 147 мг/мл, примерно 148 мг/мл, примерно 149 мг/мл или примерно 150 мг/мл.

В некоторых воплощениях полиол представляет собой сахарозу в концентрации от примерно 1 мг/мл до примерно 300 мг/мл, от примерно 1 мг/мл до примерно 200 мг/мл или от примерно 1 мг/мл до примерно 120 мг/мл. Предпочтительно концентрация сахарозы в препарате составляет примерно от 50 мг/мл до примерно 120 мг/мл, от примерно 60 мг/мл до примерно 110 мг/мл или от примерно 80 мг/мл до примерно 90 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахарозы в препарате составляет примерно 85 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахарозы в препарате составляет примерно 84 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация сахарозы в препарате составляет примерно 90 мг/мл. В некоторых воплощениях полиол представляет собой трегалозу в концентрации примерно 84 мг/мл или примерно 85 мг/мл или примерно 90 мг/мл.

Поверхностно-активные вещества, используемые в настоящем изобретении, могут изменять поверхностное натяжение жидкого препарата антител. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество снижает поверхностное натяжение жидкого препарата антител. В других воплощениях поверхностно-активное вещество может способствовать улучшению стабильности любого антитела в препарате. Поверхностно-активное вещество также может снижать агрегацию антитела в приготовленном препарате (например, при транспортировке и хранении) и/или минимизировать образование частиц в препарате и/или уменьшать адсорбцию (например, адсорбцию на контейнере). Например, поверхностно-активное вещество может также улучшать стабильность антител во время и после цикла замораживания/оттаивания. Поверхностно-активное вещество может представлять собой, например, без ограничения, полисорбат, полоксамер, тритон, додецилсульфат натрия, лаурилсульфат натрия, октилгликозид натрия, лаурил-сульфобеттаин, миристил-сульфобеттаин, линолеил-сульфобеттаин, стеарил-сульфобеттаин, лаурил-саркозин,

миристил-саркозин, линолеил-саркозин, стеарил-саркозин, линолеил-бетаин, миристил-бетаин, цетил-бетаин, лауроамидопропил-бетаин, кокамидопропил-бетаин, линолеамидопропил-бетаин, миристамидопропил-бетаин, пальмидопропил-бетаин, изостеарамидопропил-бетаин, миристамидопропил-диметиламин, пальмидопропил-диметиламин, изостеарамидопропил-диметиламин, метилкокоил-таурат натрия, метилолеил-таурат динатрия, дигидроксипропил-PEG 5 линолеаммония хлорид, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль и их смеси. Поверхностно-активное вещество может представлять собой, например, без ограничения, полисорбат 20, полисорбат 21, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 61, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81, полисорбат 85, PEG3350 и их смеси.

Концентрация поверхностно-активного вещества обычно находится в диапазоне от примерно 0,01 мг/мл до примерно 10 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 5,0 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 2,0 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1,5 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1,0 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 0,5 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 0,4 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 0,3 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 0,2 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 0,15 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 0,1 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 0,05 мг/мл, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 1 мг/мл, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 0,5 мг/мл или от примерно 0,1 мг/мл до примерно 0,3 мг/мл. Кроме того, предпочтительно концентрация поверхностно-активного вещества составляет примерно 0,05 мг/мл, примерно 0,06 мг/мл, примерно 0,07 мг/мл, примерно 0,08 мг/мл, примерно 0,09 мг/мл, примерно 0,1 мг/мл, примерно 0,15 мг/мл, примерно 0,2 мг/мл, примерно 0,3 мг/мл, примерно 0,4 мг/мл, примерно 0,5 мг/мл, примерно 0,6 мг/мл, примерно 0,7 мг/мл, примерно 0,8 мг/мл, примерно 0,9 мг/мл или примерно 1 мг/мл.

В некоторых воплощениях полисорбат представляет собой полисорбат 80 в концентрации в диапазоне от примерно 0,1 мг/мл до примерно 0,3 мг/мл, например, 0,2 мг/мл.

Хелатирующие агенты, используемые в настоящем изобретении, снижают образование восстановленных кислородных форм, уменьшают образование кислотных форм (например, дезамидирование), уменьшают агрегацию антител и/или уменьшают фрагментацию антител и/или уменьшают окисление антител в препарате по настоящему изобретению. Например, хелатирующий агент может представлять собой

мультидентатный лиганд, который образует по меньшей мере одну связь (например ковалентную, ионную или иную) с ионом металла и действует как стабилизатор комплекса с формами, которые могут иным образом способствовать нестабильности.

В некоторых воплощениях хелатирующий агент может быть выбран из группы, состоящей из аминополикарбоновых кислот, гидроксикарбоновых кислот, N-замещенных глицинов, 2-(2-амино-2-оксоэтил)аминоэтансульфоновой кислоты (BES), дефероксамина (DEF), лимонной кислоты, ниацинамида и дезоксихолатов и их смесей. В некоторых воплощениях хелатирующий агент выбран из группы, состоящей из этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), диэтилентриаминпентауксусной кислоты 5 (DTPA), нитрилотриуксусной кислоты (NTA), N-2-ацетамидо-2-иминодиуксусной кислоты (ADA), бис(аминоэтил)гликолевого эфира, N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (EGTA), транс-диаминоциклогексантетрауксусной кислоты (DCTA), глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, N-гидроксиэтилиминодиуксусной кислоты (HIMDA), N,N-бис-гидроксиэтилглицина (бицина) и N-(трисгидроксиметилметил) 10 глицина (трицина), глицилглицина, дезоксихолата натрия, этилендиамина, пропилендиамина, диэтилентриамина, триэтилентетраамина (триена), дигидрата эдетата динатрия (или дигидрата динатрия EDTA или динатриевой соли EDTA), кальций-EDTA щавелевой кислоты, малеата, лимонной кислоты, моногидрата лимонной кислоты и дигидрата цитрата тринатрия, 8-гидроксихинолата, аминокислот, гистидина, цистеина, метионина, пептидов, полипептидов и белков и их смесей. В некоторых воплощениях хелатирующий агент выбран из группы, состоящей из солей EDTA, включая, без ограничения, эдетат дикалия, эдетат динатрия, эдетат кальция динатрия, эдетат натрия, эдетат тринатрия и эдетат калия; и подходящая соль дефероксамина (DEF) представляет собой мезилат дефероксамина (DFM) или их смеси. Хелатирующие агенты, используемые в изобретении, могут присутствовать, где возможно, в форме свободной кислоты или свободного основания или в солевой форме соединения, а также в безводной, сольватированной или гидратированной форме соединения или соответствующей соли.

В некоторых воплощениях хелатирующий агент представляет собой EDTA. В некоторых воплощениях хелатирующий агент представляет собой соль EDTA. В некоторых воплощениях хелатирующий агент представляет собой дигидрат эдетата динатрия.

Концентрация хелатирующего агента обычно находится в диапазоне от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 10,0 мг/мл, от примерно 5 мг/мл до примерно 15,0 мг/мл, от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1,0 мг/мл, от примерно 0,02 мг/мл до примерно 0,5 мг/мл, от примерно 0,025 мг/мл до примерно 0,075 мг/мл. Также предпочтительно, концентрация хелатирующего агента обычно находится в диапазоне от примерно 0,01 мМ до примерно 2,0 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 1,5 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,5 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,4 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,3 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,2 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,15 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,1 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,09 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,08 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,07 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,06 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,05 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,04 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,03 мМ, от примерно 0,01 мМ до примерно 0,02 мМ, от примерно 0,02 или от примерно 0,05 мМ до примерно 0,01 мМ. Предпочтительно концентрация хелатирующего агента может составлять примерно 0,01 мг/мл, примерно 0,02 мг/мл, примерно 0,025 мг/мл, примерно 0,03 мг/мл, примерно 0,04 мг/мл, примерно 0,05 мг/мл, примерно 0,06 мг/мл, примерно 0,07 мг/мл, примерно 0,075 мг/мл, примерно 0,08 мг/мл, примерно 0,09 мг/мл, примерно 0,10 мг/мл или примерно 0,20 мг/мл. Также предпочтительно концентрация хелатирующего агента составляет примерно 0,025 мг/мл, примерно 0,03 мг/мл, примерно 0,035 мг/мл, примерно 0,04 мг/мл, примерно 0,045 мг/мл, примерно 0,05 мг/мл, примерно 0,055 мг/мл, примерно 0,06 мг/мл, примерно 0,065 мг/мл, примерно 0,07 мг/мл или примерно 0,075 мг/мл. Наиболее предпочтительно концентрация хелатирующего агента составляет примерно 0,05 мг/мл.

В некоторых воплощениях хелатирующий агент представляет собой дигидрат эдетата натрия в концентрации примерно 0,05 мг/мл. В некоторых воплощениях хелатирующий агент представляет собой этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) в концентрации примерно 0,05 мг/мл.

В некоторых воплощениях pH может находиться в диапазоне от примерно pH 5,0 до примерно 6,6, предпочтительно примерно от pH 5,0 до 6,5 или примерно от 5,0 до 6,0, и наиболее предпочтительно от pH 5,2 до 5,8. В некоторых воплощениях pH препарата по настоящему изобретению может находиться в диапазоне, выбранном от любого из pH примерно 5,2, 5,3, 5,4, 5,5 или 5,6 до любого из примерно pH 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9,

5,8 или 5,7. В некоторых воплощениях рН может быть выбран из значений рН из любого из примерно рН 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 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, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 или 7,5. В некоторых воплощениях рН составляет рН 5,8 $\pm$ 0,5, и в некоторых воплощениях рН составляет рН 5,8 $\pm$ 0,3.

В некоторых воплощениях препарат может содержать консервант. Предпочтительно консервант выбран из фенола, *мета*-крезола, бензилового спирта, хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, феноксиэтанола и метилпарабена.

Концентрация консерванта обычно находится в диапазоне от примерно 0,001 мг/мл до примерно 50 мг/мл, от примерно 0,005 мг/мл до примерно 15,0 мг/мл, от примерно 0,008 мг/мл до примерно 12,0 мг/мл или от примерно 0,01 мг/мл до примерно 10,0 мг/мл. Предпочтительно концентрация консерванта может составлять примерно 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, примерно 0,4 мг/мл, примерно 0,5 мг/мл, примерно 0,6 мг/мл, примерно 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл, примерно 1,0 мг/мл, 2,0 мг/мл, 3,0 мг/мл, примерно 4,0 мг/мл, примерно 5,0 мг/мл, примерно 6,0 мг/мл, примерно 7,0 мг/мл, 8,0 мг/мл, 9,0 мг/мл, примерно 9,1 мг/мл, примерно 9,2 мг/мл, 9,3 мг/мл, 9,4 мг/мл, 9,5 мг/мл, 9,6 мг/мл, 9,7 мг/мл, 9,8 мг/мл, 9,9 мг/мл, 10,0 мг/мл. Более предпочтительно концентрация консерванта составляет примерно 0,1 мг/мл или 9,0 мг/мл.

В некоторых воплощениях препарат не содержит консервант.

В некоторых воплощениях антитело может быть выбрано из группы, состоящей из моноклональных антител, поликлональных антител, фрагментов антител (например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, ScFv и т.д.), химерных антител, биспецифических антител, гетероконъюгированных антител, одноцепочечных (ScFv), их мутантов, слитых белков, содержащих фрагмент антитела (например, домен антитела), гуманизированных антител, человеческих антител и любой другой модифицированной конфигурации молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена требуемой специфичности, включая варианты гликозилирования антител, варианты аминокислотной последовательности антител и ковалентно модифицированные антитела. Антитело может быть мышино, крысиного, человеческого или любого другого происхождения (включая химерные или гуманизированные антитела). В некоторых воплощениях антитело является человеческим. Предпочтительно антитело является выделенным, более предпочтительно оно является по существу чистым. Когда антитело представляет собой фрагмент антитела, оно предпочтительно сохраняет

функциональные характеристики исходного антитела, то есть связывание лиганда и/или антагонистическую или агонистическую активность.

В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи антитела может быть константной областью любого типа, например IgG, IgM, IgD, IgA и IgE; и любого изотипа, например IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Предпочтительно антитело представляет собой антитело IgG1.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен препарат, содержащий или состоящий из: от примерно 15 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела к ингибитору пути тканевого фактора (TFPI); от примерно 1 мМ до примерно 100 мМ буфера; от примерно 1 мг/мл до примерно 300 мг/мл полиола; от примерно 0,01 мг/мл до примерно 10 мг/мл поверхностно-активного вещества; от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50,0 мг/мл хелатирующего агента; и где pH препарата составляет от примерно 5,0 до примерно 6,0. В некоторых воплощениях антитело содержит (1) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VH (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; (б) определяющую комплементарность область 2 VH (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и (в) определяющую комплементарность область 3 VH (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и (2) переменную область легкой цепи (VL), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VL (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (б) определяющую комплементарность область 2 VL (CDR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и (в) определяющую комплементарность область 3 VL (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях антитело против TFPI содержит VH область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых воплощениях антитело против TFPI представляет собой TFPI-106 (также известно как PF-06741086 или марстацимаб). В некоторых воплощениях буфер представляет собой гистидиновый буфер, полиол представляет собой сахарозу или трегалозу, поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат (например полисорбат 80), и/или хелатирующий агент представляет собой EDTA или дигидрат эдетата натрия. В некоторых воплощениях буфер представляет собой гистидиновый буфер, полиол

представляет собой сахарозу, поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80, и хелатирующий агент представляет собой дигидрат эдетата динатрия.

В некоторых воплощениях препарат лекарственного вещества антитела против TFPI, описанный здесь, может храниться в стерилизованных этиленвинилацетатных (EVA) пакетах с поверхностью, контактирующей с продуктом из этиленвинилацетатного мономатериала (EVAM). В некоторых воплощениях препарат лекарственного вещества антитела против TFPI, описанный здесь, может храниться в бутылках из стерилизованного полиэтилена высокой плотности (HDPE). В некоторых воплощениях препарат лекарственного вещества антитела против TFPI, описанный здесь, может храниться в контейнере из нержавеющей стали. В некоторых воплощениях препарат лекарственного продукта антитела против TFPI, раскрытого здесь, может храниться в стерилизованном флаконе или предварительно заполненном шприце (PFS). В некоторых воплощениях препарат лекарственного препарата антитела против TFPI, описанный здесь, может храниться в предварительно заполненной шприц-ручке (PFP).

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложен препарат, содержащий или состоящий из: примерно 100 мг/мл, примерно 110 мг/мл, примерно 115 мг/мл, примерно 120 мг/мл, примерно 130 мг/мл, примерно 140 мг/мл, примерно 150 мг/мл, примерно 158 мг/мл, примерно 160 мг/мл или примерно 200 мг/мл антитела к ингибитору пути тканевого фактора (например, антитела против человеческого TFPI); от примерно 1 мМ до примерно 100 мМ буфера; от примерно 1 мг/мл до примерно 300 мг/мл полиола; от примерно 0,01 мг/мл до примерно 10 мг/мл поверхностно-активного вещества; от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1,0 мг/мл хелатирующего агента; и где pH препарата составляет от примерно 5,0 до примерно 6,0. В некоторых воплощениях антитело содержит (1) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VH (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; (б) определяющую комплементарность область 2 VH (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и (в) определяющую комплементарность область 3 VH (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и (2) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VL (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (б) определяющую комплементарность область 2 VL (CDR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и (в)

определяющую комплементарность область 3 VL (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях антитело против TFPI представляет собой TFPI-106 (также известно как PF-06741086 или марстацимаб).

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложен препарат, содержащий или состоящий из: от примерно 50 мг/мл до примерно 160 мг/мл антитела к ингибитору пути тканевого фактора (например, антитела против человеческого TFPI); примерно 20 mM буфера; от примерно 1 мг/мл до примерно 120 мг/мл полиола; от примерно 0,1 мг/мл до примерно 0,3 мг/мл поверхностно-активного вещества; от примерно 0,025 мг/мл до примерно 0,075 мг/мл хелатирующего агента; и где pH препарата составляет от примерно 5,0 до примерно 6,0. В некоторых воплощениях антитело содержит (1) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VH (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; (б) определяющую комплементарность область 2 VH (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и (в) определяющую комплементарность область 3 VH (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и (2) переменную область легкой цепи (VL), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VL (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (б) определяющую комплементарность область 2 VL (CDR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и (в) определяющую комплементарность область 3 VL (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях антитело против TFPI содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых воплощениях антитело против TFPI представляет собой TFPI-106 (также известно как PF-06741086 или марстацимаб). В некоторых воплощениях буфер представляет собой гистидиновый буфер, полиол представляет собой сахарозу, хелатирующий агент представляет собой дигидрат эдетата натрия, и/или поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80. В некоторых воплощениях концентрация антитела составляет 100 мг/мл, 115 мг/мл, 150 мг/мл или 158 мг/мл.

В некоторых воплощениях предложен водный препарат, содержащий или состоящий из: примерно 150 мг/мл антитела к ингибитору пути тканевого фактора (например, антитела против человеческого TFPI); примерно 20 мМ гистидинового буфера; примерно 85 мг/мл сахарозы; примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80; примерно 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия; и где препарат имеет рН при примерно 5,8. В некоторых воплощениях антитело содержит (1) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VH (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; (б) определяющую комплементарность область 2 VH (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и (в) определяющую комплементарность область 3 VH (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и (2) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VL (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (б) определяющую комплементарность область 2 VL (CDR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и (в) определяющую комплементарность область 3 VL (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях антитело против TFPI содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых воплощениях антитело против TFPI содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В некоторых воплощениях антитело против TFPI представляет собой TFPI-106 (также известно как PF-06741086 или марстацимаб).

В некоторых воплощениях описанный здесь препарат имеет срок хранения по меньшей мере или более чем примерно 1 месяц, примерно 3 месяца, примерно 6 месяцев, примерно 12 месяцев, примерно 18 месяцев, примерно 24 месяца, примерно 30 месяцев, примерно 36 месяцев, примерно 42 месяца, примерно 48 месяцев или примерно 60 месяцев (например, при -20°C, при 5°C, 25°C или 40°C). Например, в некоторых воплощениях препарат по настоящему изобретению имеет срок хранения по меньшей мере примерно 1 месяц, примерно 3 месяца, примерно 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 13 месяцев, 14 месяцев, 15 месяцев, 16 месяцев, 17 месяцев, 18 месяцев, 19 месяцев, 20 месяцев, 21 месяц, 22 месяца, 23 месяца,

24 месяца, 25 месяцев, 26 месяцев, 27 месяцев, 28 месяцев, 29 месяцев, 30 месяцев, 31 месяц, 32 месяца, 33 месяца, 34 месяца, 35 месяцев, 36 месяцев, 37 месяцев, 38 месяцев, 39 месяцев, 40 месяцев, 41 месяц, 42 месяца, 43 месяца, 44 месяца, 45 месяцев, 46 месяцев, 47 месяцев, 48 месяцев, 49 месяцев, 50 месяцев, 51 месяц, 52 месяца, 53 месяца, 54 месяца, 55 месяцев, 56 месяцев, 57 месяцев, 58 месяцев, 59 месяцев или 60 месяцев (например, при -20°C , при 5°C , 25°C или 40°C). В некоторых воплощениях описанный здесь препарат имеет срок хранения по меньшей мере примерно 24 месяца при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

В некоторых воплощениях описанный здесь препарат имеет менее чем примерно 7% HMMS при $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$ в течение вплоть до 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев или 6 месяцев (например, при измерении посредством эксклюзионной ВЭЖХ). В некоторых воплощениях описанный здесь препарат имеет менее чем примерно 3% HMMS при 40°C в течение вплоть до 1 месяца, 2 месяцев или 3 месяцев (например, при измерении посредством эксклюзионной ВЭЖХ). В некоторых воплощениях описанный здесь препарат имеет менее чем примерно 2% HMMS при 40°C в течение вплоть до 1 месяца (например, при измерении посредством эксклюзионной ВЭЖХ).

В некоторых воплощениях описанный здесь препарат имеет менее чем примерно 2% HMMS при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение вплоть до 24 месяцев (например, при измерении посредством эксклюзионной ВЭЖХ). В некоторых воплощениях описанный здесь препарат имеет менее чем примерно 1% HMMS при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение вплоть до 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев (например, при измерении посредством эксклюзионной ВЭЖХ). В некоторых воплощениях описанный здесь препарат имеет менее чем примерно 2% фрагментов при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение вплоть до 24 месяцев (например, при измерении посредством капиллярного гель-электрофореза).

Если не указано иное, перечисленные здесь концентрации представляют собой указанные концентрации в условиях окружающей среды, т.е. при 25°C и атмосферном давлении.

Способы использования препарата антитела против TFPI

Описанные здесь препараты являются полезными при различных применениях, включая, без ограничения, способы терапевтического лечения. Терапевтический способ включает введение препарата по изобретению нуждающемуся в этом субъекту.

Примеры терапевтического применения препарата по изобретению включают сокращение времени кровотечения у субъекта, нуждающегося в этом, лечение или предупреждение недостаточности свертывания крови или нарушений свертываемости крови (например, гемофилии А, гемофилии В, гемофилии С, болезни фон Виллебранда (vWD), дефицита Фактора VII, Фактора VIII, Фактора IX или Фактора XI), лечение или предупреждение тромбоцитопении и лечение или предупреждение тромбоцитарных расстройств (нарушения функции или количества тромбоцитов). Описанные здесь препараты также могут быть использованы для лечения неконтролируемого кровотечения (например, неконтролируемого кровотечения при таких показаниях, как травма и геморрагический инсульт). Описанные здесь препараты также могут быть использованы в профилактическом лечении (например, для лечения или предупреждения кровотечений перед операциями).

В частности, препараты, описанные здесь, могут быть использованы для лечения недостаточности или дефектов свертывания крови или нарушений свертываемости крови. Например, описанные здесь препараты могут быть использованы для уменьшения или ингибирования взаимодействия TFPI с FXa или для снижения зависимость от TFPI ингибирования активности TF/FVIIa/FXa.

Соответственно, в некоторых воплощениях субъект страдает от или подвержен недостаточности свертывания крови или нарушению свертываемости крови, таким как указано ниже. В некоторых воплощениях субъект страдает от или подвержен гемофилии А, В или С. В некоторых воплощениях субъект страдает от или подвержен гемофилии А или В. В некоторых воплощениях субъект страдает от или подвержен гемофилии А и имеет нейтрализующие антитела (т.е. ингибиторы) против Фактора свертывания крови VIII. В некоторых воплощениях субъект страдает от или подвержен гемофилии В и имеет нейтрализующие антитела (т.е. ингибиторы) против Фактора свертывания крови IX. В некоторых воплощениях субъект страдает от или подвержен гемофилии С и имеет нейтрализующие антитела (т.е. ингибиторы) против Фактора свертывания крови XI. В некоторых воплощениях субъект страдает от или подвержен болезни фон Виллебранда (vWD). В некоторых воплощениях субъект страдает от или подвержен тромбоцитарному расстройству. В некоторых воплощениях субъект страдает от или подвержен дефициту Фактора VII. В некоторых воплощениях субъект страдает от или подвержен дефициту Фактора XI.

Препараты, содержащие антагонистические антитела к TFPI или антигенсвязывающие фрагменты, описанные здесь, могут быть использованы в комбинации со свертывающим агентом. Настоящее изобретение обеспечивает раздельное, одновременное или последовательное введение препаратов по изобретению со свертывающим агентом. В некоторых воплощениях описанных здесь препаратов дополнительно содержится свертывающий агент. Примеры свертывающего агента включают, без ограничения, Фактор VIIa, Фактор VIII, Фактор IX, транексамовую кислоту и агенты с «шунтирующим» механизмом действия (например, антиингибиторный коагулянтный комплекс или FEIBA).

В некоторых воплощениях предусмотрено применение препарата по настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для сокращения времени кровотечения.

В некоторых воплощениях препарат по настоящему изобретению можно вводить непосредственно в кровоток, в мышцу, в ткань, в жировую ткань или во внутренний орган субъекта. Подходящие средства для парентерального введения включают внутривенное, внутриглазное, интравитреальное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, подоболочечное, внутрижелудочковое, внутриуретральное, внутригрудинное, внутричерепное, внутримышечное, внутрикостное, внутрикожное и подкожное. К подходящим устройствам для парентерального введения относятся игольные (включая микроиглы, микропроекторы, растворимые иглы и другие методики формирования микропор), инъекторы, безыгольные инъекторы и инфузионные методики. В некоторых воплощениях препарат по настоящему изобретению вводят субъекту внутривенно или подкожно. В некоторых воплощениях препарат по настоящему изобретению вводят субъекту подкожно. В некоторых воплощениях препарат по настоящему изобретению вводят субъекту внутривенно.

В некоторых воплощениях схема введения препарата по настоящему изобретению включает введение дозы препарата один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в пять недель, один раз в шесть недель, один раз в семь недель, один раз в восемь недель, один раз в девять недель, один раз в десять недель, один раз в пятнадцать недель, один раз в двадцать недель, один раз в двадцать пять недель или один раз в двадцать шесть недель. В некоторых воплощениях описанный здесь препарат вводят один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз в три месяца, один раз в четыре месяца, один раз в пять месяцев или

один раз в шесть месяцев. В некоторых воплощениях описанные здесь препараты вводят ежедневно или еженедельно (т.е. один раз в неделю). Ход этой терапии легко контролировать с помощью обычных методов и анализов. Режим дозирования может варьировать с течением времени.

В некоторых воплощениях препарат, описанный здесь, вводят в начальной дозе антитела примерно 300 мг с последующими еженедельными (т.е. один раз в неделю) дозами примерно 150 мг. В некоторых воплощениях описанный здесь препарат вводят еженедельно (т.е. один раз в неделю) в дозе антитела примерно 150 мг. В некоторых воплощениях описанный здесь препарат вводят еженедельно (т.е. один раз в неделю) в дозе антитела примерно 300 мг. В некоторых воплощениях описанный здесь препарат вводят еженедельно (т.е. один раз в неделю) в дозе антитела примерно 450 мг.

Для целей настоящего изобретения подходящая дозировка лекарственного средства будет зависеть от используемого антитела, типа и тяжести заболевания, подлежащего лечению, от того, вводится ли средство в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на средство, и усмотрение лечащего врача. Как правило, лечащий врач будет вводить лекарственное средство до тех пор, пока не будет достигнута дозировка, обеспечивающая желаемый результат. Дозировки могут быть определены эмпирически.

Следующие примеры предложены только для иллюстративных целей и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые показаны и описаны здесь, станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Исследования стабильности антитела против TFPI

Этот пример иллюстрирует стабильность препарата, содержащего антитело против TFPI, в бутылках из полиэтилена высокой плотности (HDPE), флаконах и предварительно заполненных шприцах.

Антитело против TFPI в концентрациях 100 мг/мл, 115 мг/мл и 150 мг/мл готовили в 20 мМ гистидина, 85 мг/мл сахарозы, 0,05 мг/мл эдетата дигидрата динатрия, 0,2 мг/мл полисорбата 80 при pH 5,8. В этом примере используемое антитело против TFPI имеет переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.

Антитело против TFPI в концентрации 115 мг/мл помещали в HDPE-бутыли и хранили при температуре $-20\pm5^{\circ}\text{C}$ и $5\pm3^{\circ}\text{C}$ в течение по меньшей мере 3 месяцев (т.е. 12 недель).

Антитело против TFPI в концентрации 100 мг/мл и 150 мг/мл помещали в стеклянные флаконы I типа, герметично закрывали пробками с покрытием, закрывали алюминиевыми крышками и хранили в перевернутом положении при $5\pm3^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C}/60\%$ относительной влажности (RH) и $40^{\circ}\text{C}/75\%$ относительной влажности (RH) в течение по меньшей мере 3 месяцев (т.е. 12 недель). Кроме того, антитело против TFPI в концентрации 150 мг/мл также помещали в предварительно заполненные стеклянные шприцы (PFS) I типа объемом 2,25 мл и 1 мл, закрывали плунжерной пробкой с покрытием и хранили в горизонтальном положении при $5\pm3^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C}/60\%$ RH и $40^{\circ}\text{C}/75\%$ RH в течение по меньшей мере 3 месяцев (т.е. 12 недель).

Затем образцы анализировали на показатели качества, которые обычно используют для мониторинга разложения белка. Например, анализ состоял из эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) для оценки высокомолекулярных форм (HMMS), капиллярного гель-электрофореза (CGE) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях для оценки чистоты и фрагментации, а также капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (iCE) для оценки неоднородности заряда, такого как кислотные, основные и преобладающие формы. Анализ также включал оценку относительной эффективности антитела против TFPI с использованием анализа ингибирования.

Для оценки характеристик, чистоты и относительной эффективности антитела против TFPI использовали специальные аналитические процедуры, включая справочные и несправочные методы. Описание аналитических процедур представлено ниже. Результаты суммированы в Таблицах 1-8.

Внешний вид (прозрачность и окраска): Лекарственное вещество оценивают на прозрачность и окраску в соответствии с действующей процедурой Европейской фармакопеи, Ph. Eur. 2.2.1 и Ph. Eur. 2.2.2, соответственно.

pH: Лекарственное вещество анализируют на pH в соответствии с действующей процедурой Фармакопеи США <791>.

Концентрация белка с помощью УФ: Используя спектрофотометр, поглощение при 280 нм используют для определения концентрации тестируемого образца. Удельный коэффициент поглощения или абсорбционную способность (a_{280}) для PF-06741086 (приведено ниже) используют для расчета концентрации.

$$a_{280} = 1,45 \text{ мл мг}^{-1} \text{ см}^{-1}$$

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование с визуализацией (iCE): метод капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (iCE) используют для оценки неоднородности заряда. В iCE разделяют белковые формы на основе различий их зарядов в градиенте pH, генерируемом амфолитами под действием электрического поля, и используют его для мониторинга неоднородности заряда продукта. Белковые заряженные формы фокусируются внутри капилляра под постоянным напряжением и обнаруживаются при 280 нм при визуализации всего капилляра.

Эксклюзионная ВЭЖХ (SE-HPLC): Метод SE-HPLC используют для определения чистоты продукта. Исследуемые образцы разбавляют и вводят в колонку для эксклюзионной хроматографии. Содержание высокомолекулярных форм (HMMS) и мономера регистрируют в виде процента от общей площади всех пиков, относящихся к белку.

Капиллярный гель-электрофорез в восстанавливающих условиях (CGE): Этот метод используют для определения чистоты восстановленного белка. Образцы денатурируют с помощью SDS и нагревают в присутствии восстановителя. Белок восстанавливается до тяжелых и легких цепей, которые электрофоретически разделяются в капилляре, содержащем среду для гель-фильтрации, и обнаруживаются с помощью УФ-спектроскопии. Разделение позволяет количественно определить разделенные тяжелые и легкие цепи, а также сопутствующие по размеру примеси. Чистоту регистрируют в виде общего процента тяжелых и легких цепей.

Капиллярный гель-электрофорез в невосстанавливающих условиях (CGE): этот метод используют для определения чистоты интактного белка. Образцы денатурируют с помощью SDS и нагревают в присутствии алкилирующего агента. Белок разделяют электрофоретически в капилляре, содержащем среду для гель-фильтрации, и обнаруживают с помощью УФ-спектроскопии. Разделение позволяет количественно определить выделенный интактный IgG, а также сопутствующие по размеру примеси. Чистоту регистрируют в виде процента IgG.

Картирование лизил-эндопротеиназы (Lys-C): Этот метод используют для определения процента окисления в антителе против TFPI, локализованного в Fc-пептиде, содержащем остаток метионина. Образцы антитела против TFPI расщепляют на пептидные фрагменты с использованием лизил-эндопротеиназы (Lys-C). Полученные пептидные фрагменты разделяют с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой. Разделение Fc-пептида и окисленного Fc-пептида позволяет определить процент окисления и контролировать антитело против TFPI.

Биологическая активность по анализу ингибирования: Метод анализа ингибирования используют для оценки биологической активности PF-06741086 *in vitro*. Анализ ингибирования показывает, что PF-06741086 способно ингибировать образование комплекса TFPI:FXa, что приводит к увеличению свободного человеческого фактора свертывания крови Ха (FXa), что, в свою очередь, приводит к образованию свободного FXa, доступного для свертывающей активности.

TFPI добавляют в планшет для микротитрования. Разведения эталонного материала PF-06741086 и испытуемых образцов добавляют в планшет для микротитрования, чтобы обеспечить связывание антитела с его мишенью. Затем в планшет для микротитрования добавляют FXa, который связывает доступный TFPI, не связанный с PF-06741086, и образует комплекс TFPI:FXa. Свободный FXa определяют с помощью хромогенного субстрата Spectrozyme FXa. После добавления субстрата колориметрический отклик измеряют спектрофотометрически.

Метод анализа данных включает подбор нелинейной кривой и оценку параллелизма между эталонной кривой и кривой образца. Активность образца определяют по сдвигу в IC50 между параллельными кривыми. Удельную активность образца, выраженную в единицах на PF-06741086, рассчитывают путем умножения значения относительной активности на количество единиц, присвоенное одному миллиграмму (мг) эталонного материала.

Таблица 1

Результаты SE-HPLC для высокомолекулярных форм (% HMMS)								
		HMMS (%)						
Конфигурация	Температура хранения	0 мес.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
115 мг/мл, HDPE-бутыль	-20±5°C	NMT 0,5	NMT 0,5	NMT 0,5	NS	NMT 0,5	NMT 0,5	0,3

115 мг/мл, HDPE-бутыль	5±3°C	NMT 0,5	NMT 0,5	0,5	NS	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		0,6	0,7	0,7	0,7	0,8	NS	0,9
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		0,5	0,5	0,5	0,7	0,7	0,4	0,7
150 мг/мл, 1 мл PFS		0,5	0,5	0,5	0,7	0,6	0,4	0,7
150 мг/мл, флакон	25°C/60% RH	0,6	0,8	0,9	1,1	1,4	NS	2,2
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		0,5	0,6	0,7	1,0	1,1	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		0,5	0,7	0,7	1,0	1,2	NS	NS
100 мг/мл, флакон	40°C/75% RH	0,5	1,1	1,5	NS	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		0,6	1,2	2,1	5,2	15,8	NS	NS
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		0,5	0,9	2,1	4,4	NS	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		0,5	1,0	2,4	6,3	NS	NS	NS

NMT - не более чем

NS - не включено

Таблица 2

Результаты CGE (восстанавливающие условия) для тяжелой цепи + легкой цепи (%)								
Конфигурация	Температура хранения	Тяжелая цепь + легкая цепь (%)						
		0 мес.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
115 мг/мл, HDPE-бутыль	-20±5°C	98,5	98,2	98,6	98,6	98,6	98,4	98,5
115 мг/мл, HDPE-бутыль	5±3°C	98,5	98,5	98,7	98,5	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		97,9	98,0	97,6	97,4	98,7	NS	97,4
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		97,4	97,2	97,4	97,2	97,1	97,3	97,2
150 мг/мл, 1 мл PFS		97,6	96,8	97,7	97,7	97,1	97,2	97,3
150 мг/мл, флакон	25°C/60% RH	97,9	97,9	96,9	96,9	96,0	NS	92,7
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		97,4	97,2	96,4	96,1	95,2	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		97,6	97,2	96,4	96,2	94,6	NS	NS
100 мг/мл, флакон	40°C/75% RH	98,3	97,5	94,1	NS	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		97,9	97,6	93,8	89,9	76,4	NS	NS
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		97,4	96,0	93,2	89,5	NS	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		97,6	96,2	92,9	89,2	NS	NS	NS

NS - не включено

Таблица 3

Результаты CGE (восстанавливающие условия) для фрагментов (%)								
		Фрагмент (%)						
Конфигурация	Температура хранения	0 мес.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
115 мг/мл, HDPE-бутыль	-20±5°C	NMT 0,3	NMT 0,3	NMT 0,3	NMT 0,3	NMT 0,3	NMT 0,3	NMT 0,3
115 мг/мл, HDPE-бутыль	5±3°C	NMT 0,3	NMT 0,3	NMT 0,3	NMT 0,3	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		0,4	NMT 0,3	0,6	0,8	0,3	NS	0,8
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		NMT 0,3	0,7	0,4	0,7	1,2	0,9	0,8
150 мг/мл, 1 мл PFS		NMT 0,3	1,1	0,3	0,5	1,1	1,0	0,8
150 мг/мл, флакон	25°C/60% RH	0,4	NMT 0,3	0,9	1,3	1,9	NS	5,4
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		NMT 0,3	0,8	1,0	1,9	3,1	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		NMT 0,3	0,9	1,1	1,8	3,4	NS	NS
100 мг/мл, флакон	40°C/75% RH	< 0,3	1,0	4,2	NS	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		0,4	0,6	3,8	7,6	19,3	NS	NS
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		NMT 0,3	1,8	4,3	8,0	NS	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		NMT 0,3	1,6	4,6	8,0	NS	NS	NS

NMT - не более чем

NS - не включено

Таблица 4

Результаты CGE (невосстанавливающие условия) для интактного IgG (%)								
		Интактный IgG (%)						
Конфигурация	Температура хранения	0 мес.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.

115 мг/мл, HDPE-бутыль	-20±5°C	96,0	NS	NS	NS	NS	NS	95,8
115 мг/мл, HDPE-бутыль	5±3°C	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		97,0	97,9	97,9	97,7	97,3	NS	97,9
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		97,5	98,1	97,0	97,9	97,5	97,6	98,1
150 мг/мл, 1 мл PFS		97,4	97,8	97,2	97,8	97,4	97,7	97,8
150 мг/мл, флакон	25°C/60% RH	97,0	96,9	96,9	95,7	91,9	NS	90,3
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		97,5	97,7	96,0	95,8	93,0	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		97,4	97,4	95,8	95,5	92,3	NS	NS
100 мг/мл, флакон	40°C/75% RH	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		97,0	94,8	89,6	81,1	60,1	NS	NS
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		97,5	95,6	89,1	83,2	NS	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		97,4	95,3	87,9	80,7	NS	NS	NS

NS - не включено

Таблица 5

Результаты iCE для кислотных форм (%)								
		Кислотные (%)						
Конфигурация	Температура хранения	0 мес.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
115 мг/мл, HDPE-бутыль	-20±5°C	19,8	23,7	19,3	20,0	19,8	19,7	18,9
115 мг/мл, HDPE-бутыль	5±3°C	19,8	22,9	20,3	21,4	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		22,7	21,2	24,6	23,2	21,2	NS	22,3
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		22,3	23,2	22,9	22,5	24,4	22,7	22,9
150 мг/мл, 1 мл PFS		21,3	22,4	24,5	22,2	24,2	22,3	23,0
150 мг/мл, флакон	25°C/60% RH	22,7	23,3	29,7	34,3	42,9	NS	59,1
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		22,3	25,3	28,5	34,5	43,8	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		21,3	24,6	28,9	33,9	45,0	NS	NS
100 мг/мл, флакон	40°C/75% RH	18,5	34,9	58,2	NS	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		22,7	38,0	64,6	82,4	96,0	NS	NS
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		22,3	40,4	62,0	80,8	NS	NS	NS

150 мг/мл, 1 мл PFS		21,3	39,9	62,4	84,1	NS	NS	NS
---------------------	--	------	------	------	------	----	----	----

NS - не включено

Таблица 6

Результаты iCE для основных форм (%)								
		Основные (%)						
Конфигурация	Температура хранения	0 мес.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
115 мг/мл, HDPE-бутыль	-20±5°C	7,6	8,5	7,3	7,3	6,9	8,9	8,7
115 мг/мл, HDPE-бутыль	5±3°C	7,6	7,4	7,0	8,8	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		8,0	6,0	4,7	7,1	5,4	NS	6,5
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		7,8	6,7	6,6	6,2	7,9	5,3	5,5
150 мг/мл, 1 мл PFS		6,6	5,5	7,0	6,3	7,8	5,2	6,4
150 мг/мл, флакон	25°C/60% RH	8,0	6,8	5,9	7,7	7,7	NS	9,3
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		7,8	6,6	7,2	7,7	9,9	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		6,6	7,0	8,3	8,1	9,6	NS	NS
100 мг/мл, флакон	40°C/75% RH	13,3	11,9	10,0	NS	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		8,0	8,9	6,2	3,3	0,0	NS	NS
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		7,8	9,4	7,7	5,2	NS	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		6,6	9,1	8,5	4,3	NS	NS	NS

NS - не включено

Таблица 7

Результаты iCE для преобладающих форм (%)								
		Преобладающие (%)						
Конфигурация	Температура хранения	0 мес.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
115 мг/мл, HDPE-бутыль	-20±5°C	72,6	67,8	73,4	72,7	73,3	71,4	72,4
115 мг/мл, HDPE-бутыль	5±3°C	72,6	69,6	72,8	69,8	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		69,3	72,8	70,6	69,7	73,4	NS	71,2

150 мг/мл, 2,25 мл PFS		69,9	70,2	70,5	71,3	67,7	72,0	71,5
150 мг/мл, 1 мл PFS		72,1	72,1	68,5	71,4	68,0	72,4	70,6
150 мг/мл, флакон	25°C/60% RH	69,3	70,0	64,4	58,0	49,4	NS	31,5
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		69,9	68,1	64,3	57,8	46,3	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		72,1	68,3	62,8	58,0	45,4	NS	NS
100 мг/мл, флакон	40°C/75% RH	68,3	53,1	31,8	NS	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		69,3	53,1	29,2	14,4	4,0	NS	NS
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		69,9	50,2	30,3	14,0	NS	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		72,1	51,0	29,1	11,6	NS	NS	NS

NS - не включено

Таблица 8

Результаты ингибирующего анализа для относительной эффективности (%)								
		Относительная эффективность (%)						
Конфигурация	Температура хранения	0 мес.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
115 мг/мл, HDPE-бутыль	-20±5°C	118	109	109	106	101	107	109
115 мг/мл, HDPE-бутыль	5±3°C	118	111	111	105	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		98	99	97	106	99	NS	107
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		108	111	102	99	94	106	106
150 мг/мл, 1 мл PFS		106	120	115	99	108	103	104
150 мг/мл, флакон	25°C/60% RH	98	96	95	96	91	NS	97
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		108	110	110	100	87	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		106	122	109	98	99	NS	NS
100 мг/мл, флакон	40°C/75% RH	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
150 мг/мл, флакон		98	NS	NS	NS	83	NS	NS
150 мг/мл, 2,25 мл PFS		108	106	95	NS	NS	NS	NS
150 мг/мл, 1 мл PFS		106	106	96	NS	NS	NS	NS

NS - не включено

Данные этого исследования показывают, что антитело против TFPI в высокой концентрации (от 100 мг/мл до 150 мг/мл) является стабильным в 20 мМ гистидина, 85

мг/мл сахарозы, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, 0,2 мг/мл полисорбата 80 при pH препарата 5,8. Результаты также показывают, что различные системы контейнеров/упаковочных средств (HDPE-бутыль, флакон, PFS) не влияют на стабильность антитела против TFPI.

В данном исследовании оценивали предполагаемые условия хранения при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, ускоренные условия хранения при $25^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RH}$ и условия хранения при тепловом стрессе при $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$. Показано, что в условиях длительного хранения при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ антитело против TFPI остается стабильным в течение вплоть до 24 месяцев без существенных различий, наблюдаемых для любого из показателей качества продукта.

Небольшое увеличение в % HMMS наблюдается через 3 месяца при $25^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RH}$ и 1 месяц при $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$. Разложение наблюдалось через 3 месяца при $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$, однако его величина была меньше, чем у других антител IgG1, таких как антитело против VEGF. В Таблице 9 сравниваются данные по % HMMS при $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$ для антител против TFPI и антител против VEGF. Соответствующие продукту специфические методы SE-HPLC использовали для количественного определения % HMMS для каждого антитела.

Таблица 9

Сравнение результатов SE-HPLC антитела против TFPI и антитела против VEGF в отношении высокомолекулярных форм (% HMMS) при 40°C			
Конфигурация	0 месяцев (0 недель)	1 месяц (4 недели)	3 месяца (12 недель)
Антитело против VEGF в гистидине 5,8 DP*	2,1	3,1	5,6
Антитело против TFPI 100 мг/мл, флакон	0,5	1,1	1,5
Антитело против TFPI 150 мг/мл, флакон	0,6	1,2	2,1
Антитело против TFPI 150 мг/мл, 2,25 мл PFS	0,5	0,9	2,1
Антитело против TFPI 150 мг/мл, 1 мл PFS	0,5	1,0	2,4

* Данные для антитела против VEGF получены из Таблицы 11 в US 2018/0000933; DP – лекарственный продукт

Хотя наблюдается разложение, антитело против TFPI сохраняет активность вплоть до 24 месяцев при $25^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RH}$ и 12 месяцев при $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$ в 20 мМ

гистидина, 85 мг/мл сахарозы, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, 0,2 мг/мл полисорбата 80 при pH препарата 5,8.

Пример 2. Исследование стабильности и устойчивости препарата антитела против TFPI

Этот пример иллюстрирует стабильность 150 мг/мл антитела против TFPI в целевом препарате (контрольном препарате) и антитела против TFPI, приготовленного либо с высокими, либо с низкими уровнями эксципиента и pH. Оцениваемые препараты показаны в Таблице 10. Концентрация каждого компонента была подтверждена аналитическим тестированием. В этом примере используемое антитело против TFPI (TFPI-106) имеет вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

Таблица 10. Диапазоны уровней эксципиента и pH, оцениваемые в исследовании устойчивости препарата

Компоненты	Диапазон тестирования	Целевые DP препараты ¹					
		A	B	C	D	E	F
Название препарата (Эксципиент/pH)	N/A	Целевой	Низ./ Выс.	Выс./ Низ.	Низ./ Низ.	Низ./ Низ.	Целевой, без PS80
Гистидин (мМ)	+100% / -50%	20	10	40	10	40	20
Сахароза (мг/мл)	±25%	85	64	106	64	106	85
EDTA динатрия (мг/мл)	±25%	0,05	0,038	0,063	0,038	0,063	0,05
PS80 (мг/мл)	±50%	0,2	0,1	0,3	0,1	0,3	N/A
pH	±0,6	5,8	6,4	5,2	5,2	6,4	5,8

¹ Каждый препарат содержит 150 мг/мл антитела против TFPI

Препараты хранили при предполагаемых условиях хранения 5±3°C, условиях ускоренного хранения 25°C/60% RH и условиях хранения при тепловом стрессе 40°C/75% RH в течение 6 месяцев. Затем образцы анализировали на показатели качества, которые обычно используют для мониторинга разложения белка с использованием

описанных здесь способов. Например, анализ состоял из эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) для оценки высокомолекулярных форм (HMMS), капиллярного гель-электрофореза (CGE) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях для оценки чистоты и фрагментации, а также капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (iCE) для оценки неоднородности заряда, такого как кислотные, основные и преобладающие формы. Анализ также включал оценку относительной эффективности антитела против TFPI с использованием анализа ингибирования. Для оценки характеристик, чистоты и относительной эффективности антитела против TFPI использовали специальные аналитические процедуры, включая справочные и несправочные методы. Результаты суммированы в Таблицах 11-19.

Таблица 11. Результаты pH вплоть до 6 месяцев на основании данных при 5°C, 25°C и 40°C

Препарат	Показатель		5°C	25°C	40°C
		0 месяцев	6 месяцев	6 месяцев	6 месяцев
A	pH	5,8	5,8	5,8	5,8
B	pH	6,5	6,6	6,6	6,6
C	pH	5,2	5,3	5,3	5,3
D	pH	5,4	5,5	5,5	5,5
E	pH	6,5	6,5	6,5	6,5
F	pH	5,9	5,8	5,8	5,8

Таблица 12. Результаты концентрации белка по УФ вплоть до 6 месяцев на основании данных при 5°C, 25°C и 40°C

Препарат	Показатель		5°C	25°C	40°C
		0 месяцев	6 месяцев	6 месяцев	6 месяцев
A	мг/мл	153,7	154,8	155,9	157,2
B	мг/мл	152,6	161,9	158,5	160,4
C	мг/мл	152,4	160,4	159,3	159,3
D	мг/мл	153,4	155,7	153,8	158,3
E	мг/мл	150,2	158,3	156,5	160,0
F	мг/мл	152,1	156,3	157,8	157,5

Таблица 13. Результаты SE-HPLC вплоть до 6 месяцев на основании данных при 5°C, 25°C и 40°C

Препарат	Показатель		5°C	25°C	40°C
		0 месяцев	6 месяцев	6 месяцев	6 месяцев
А	% мономера	99,4	99,3	97,3	84,0
	% HMMS	0,5	0,6	0,9	6,1
	% LMMS	NMT 0,2	NMT 0,2	1,8	9,9
В	% мономера	99,2	99,0	96,3	79,0
	% HMMS	0,7	0,9	1,5	7,5
	% LMMS	NMT 0,2	NMT 0,2	2,2	13,5
С	% мономера	99,4	99,4	96,9	80,5
	% HMMS	0,5	0,5	0,9	8,0
	% LMMS	NMT 0,2	NMT 0,2	2,2	11,6
D	% мономера	99,3	99,3	97,2	84,6
	% HMMS	0,6	0,7	1,0	5,5
	% LMMS	NMT 0,2	NMT 0,2	1,9	9,9
Е	% мономера	99,3	99,3	96,7	83,5
	% HMMS	0,6	0,7	1,1	5,5
	% LMMS	NMT 0,2	NMT 0,2	2,1	11,0
F	% мономера	99,3	99,4	97,4	85,0
	% HMMS	0,5	0,6	0,9	5,3
	% LMMS	NMT 0,2	NMT 0,2	1,7	9,6

Таблица 14. Результаты CGE в невосстанавливающих условиях вплоть до 6 месяцев на основании данных при 5°C, 25°C и 40°C

Препарат	Показатель		5°C	25°C	40°C
		0 месяцев	6 месяцев	6 месяцев	6 месяцев
А	% IgG	98,4	98,2	95,7	71,3
	% фрагментов	1,6	1,8	4,3	26,6
В	% IgG	98,6	97,9	95,4	67,4
	% фрагментов	1,4	2,1	4,2	30,8
С	% IgG	98,0	97,8	95,9	66,2

Препарат	Показатель		5°C	25°C	40°C
		0 месяцев	6 месяцев	6 месяцев	6 месяцев
	% фрагментов	2,0	2,2	4,1	30,9
D	% IgG	98,0	97,8	96,4	72,1
	% фрагментов	2,0	2,2	3,6	26,5
E	% IgG	97,8	97,6	95,4	74,0
	% фрагментов	2,2	2,4	4,6	24,6
F	% IgG	97,8	97,5	96,3	72,2
	% фрагментов	2,2	2,5	3,7	25,6

Таблица 15. Результаты CGE в восстанавливающих условиях вплоть до 6 месяцев на основании данных при 5°C, 25°C и 40°C

Препарат	Показатель		5°C	25°C	40°C
		0 месяцев	6 месяцев	6 месяцев	6 месяцев
A	% тяжелой+легкой цепи	98,2	97,0	95,6	85,7
	% фрагментов	NMT 0,3	0,7	2,1	10,7
B	% тяжелой+легкой цепи	98,2	97,4	94,4	81,5
	% фрагментов	NMT 0,3	0,4	2,4	10,8
C	% тяжелой+легкой цепи	98,2	97,4	95,2	85,2
	% фрагментов	0,8	NMT 0,3	2,5	12,3
D	% тяжелой+легкой цепи	98,2	97,4	95,4	85,9
	% фрагментов	NMT 0,3	0,4	2,3	11,2
E	% тяжелой+легкой цепи	97,4	96,9	95,0	83,4
	% фрагментов	0,8	0,8	2,0	10,1
F	% тяжелой+легкой цепи	98,2	97,2	95,6	86,5
	% фрагментов	NMT 0,3	0,7	2,2	10,3

Таблица 16. Результаты iCE вплоть до 6 месяцев на основании данных при 5°C, 25°C и 40°C

Препарат	Показатель		5°C	25°C	40°C
		0 месяцев	6 месяцев	6 месяцев	6 месяцев
А	% преобладающих	73,8	70,7	57,5	12,9
	% кислотных	19,6	23,5	34,1	82,7
	% основных	6,6	5,7	8,4	4,3
В	% преобладающих	73,7	69,8	54,5	12,7
	% кислотных	20,9	24,3	38,7	82,6
	% основных	5,4	5,9	6,8	4,8
С	% преобладающих	72,8	70,0	53,6	11,6
	% кислотных	20,7	23,9	35,4	83,3
	% основных	6,5	6,1	10,9	5,1
D	% преобладающих	72,4	70,9	56,8	14,6
	% кислотных	20,2	22,9	33,7	80,3
	% основных	7,4	6,2	9,5	5,1
Е	% преобладающих	71,8	69,2	53,6	9,6
	% кислотных	22,3	25,1	39,6	86,9
	% основных	5,8	5,8	6,8	3,5
F	% преобладающих	73,1	72,5	57,4	13,2
	% кислотных	20,2	21,6	35,0	81,9
	% основных	6,7	5,9	7,6	4,9

Таблица 17. Результаты окисления метионина вплоть до 6 месяцев на основании данных при 5°C, 25°C и 40°C

Препарат	Показатель		5 °C	25 °C	40 °C
		0 месяцев	6 месяцев	6 месяцев	6 месяцев
А	% окисления	2,0	1,5	2,7	12,3
В	% окисления	1,0	1,3	2,6	7,4
С	% окисления	1,1	1,4	2,7	19,5
D	% окисления	1,2	1,3	2,1	10,7
Е	% окисления	1,2	1,5	3,4	8,8
F	% окисления	1,3	1,3	3,0	12,3

Таблица 18. Результаты внешнего вида** вплоть до 6 месяцев на основании данных при 5°C, 25°C и 40°C

Препарат	Показатель		5°C	25°C	40°C
		0 месяцев	6 месяцев	6 месяцев	6 месяцев
А	Цвет	≤B7	≤B6	≤B6	≤BY2
	Прозрачность†	≤Ref. II	≤Ref. III	≤Ref. III	≤Ref. III
	Видимые частицы	EFVP*	EFVP	EFVP	EFVP
В	Цвет	≤B7	≤B6	≤B6	≤BY4
	Прозрачность†	≤Ref. III	≤Ref. II	≤Ref. III	≤Ref. III
	Видимые частицы	EFVP	EFVP	2 небольшие белые частицы	1 средняя белая частица
С	Цвет	≤B7	≤B6	≤B6	≤BY1
	Прозрачность†	≤Ref. II	≤Ref. III	≤Ref. III	≤Ref. III
	Видимые частицы	EFVP	EFVP	EFVP	EFVP
D	Цвет	≤B7	≤B6	≤B6	≤BY4
	Прозрачность†	≤Ref. II	≤Ref. III	≤Ref. III	≤Ref. III
	Видимые частицы	EFVP	1 мелкая белая частица	1 мелкая белая частица	2 мелкие белые частицы
Е	Цвет	≤B7	не тестировали	≤B6	≤BY1
	Прозрачность†	≤Ref. II	≤Ref. III	≤Ref. III	≤Ref. III
	Видимые частицы	EFVP	EFVP	1 небольшая белая частица	1 небольшая частица
F	Цвет	≤B7	≤B6	≤B6	≤BY3
	Прозрачность†	≤Ref. II	≤Ref. IV	≤Ref. IV	≤Ref. III
	Видимые частицы	EFVP	Множество мелких белых частиц	Множество мелких белых частиц	Множество частиц, но не так много, как при 5 и 25°C

* EFVP: по существу свободны от видимых частиц

** Прозрачность и окраску оценивали в соответствии с действующими методиками Европейской Фармакопеи, Ph. Eur. 2.2.1 и Ph. Eur. 2.2.2, соответственно

† Ref. II, Ref. III и Ref. IV эквивалентны 6 NTU (нефелометрическая единица мутности), 18 NTU и 30 NTU, соответственно

Таблица 19. Результаты анализа ингибирования вплоть до 6 месяцев на основании данных при 5°C, 25°C и 40°C

Препарат	Показатель		5 °C	25 °C	40 °C
		0 месяцев	6 месяцев	6 месяцев	6 месяцев
A	% относительной эффективности	108	104	97	86
B	% относительной эффективности	102	110	106	97
C	% относительной эффективности	101	110	109	86
D	% относительной эффективности	101	108	90	88
E	% относительной эффективности	102	101	111	93
F	% относительной эффективности	99	99	114	93

Данные, представленные в Таблицах 11-19 и описанные ниже, демонстрируют, что препараты антител против TFPI, содержащие либо высокие, либо низкие уровни эксципиентов или pH, являются стабильными через 6 месяцев в обоих условиях стабильности в реальном времени.

Внешний вид

После 6 месяцев хранения при 2-8°C и 25°C (Таблица 18) существенных изменений цвета, прозрачности и видимых частиц не наблюдалось для большинства препаратов (A-E). После 6 месяцев хранения при 2-8°C и 25°C наблюдалось значительное увеличение количества видимых частиц для препарата F, не содержащего PS80.

После 6 месяцев хранения при 40°C значительные изменения цвета раствора наблюдались для всех препаратов (A-F). Этот результат ожидается при хранении в ускоренных стрессовых условиях на основе предшествующих исследований стабильности. Эти эффекты были наиболее выражены для препаратов C и E, которые

содержали более высокие концентрации эксципиента по сравнению с целевым препаратом. Никаких существенных изменений прозрачности раствора не наблюдалось. Для препарата А-Е иногда наблюдались видимые частицы, однако они могут обнаруживаться при обращении с пробой. После 6 месяцев при 40°C наблюдалось значительное увеличение количества видимых частиц для препарата F, не содержащего PS80, хотя было отмечено, что это увеличение было менее резким, чем в условиях хранения при 2-8°C и 25°C. Это обнаружение подчеркивает важность включения PS80 в состав лекарственного продукта.

pH

После 6 месяцев хранения при 2-8°C, 25°C и 40°C (Таблица 11) никаких существенных изменений pH не наблюдалось для всех препаратов (A-F).

Концентрация белка по УФ

После 6 месяцев хранения при 2-8°C, 25°C и 40°C (Таблица 12) концентрация белка сохранялась в пределах 150 мг/мл $\pm$ 15 мг/мл. Для большинства препаратов и условий хранения наблюдалось незначительное увеличение концентрации белка, что может указывать на вариабельность анализа.

Эксклюзионная хроматография (SE-HPLC)

После 6 месяцев хранения при 2-8°C (Таблица 13), никаких существенных изменений в % HMMS и % мономера не наблюдалось для всех препаратов (A-F). Было отмечено, что пики, соответствующие низкомолекулярным формам, наблюдались непоследовательным образом во время хранения 2-8°C для всех препаратов.

После 6 месяцев хранения при 25°C минимальное увеличение в 1-2% в обоих показателях % HMMS и % LMMS и соответствующее уменьшение в % мономера наблюдалось для всех препаратов (A-F). Все результаты % HMMS сохранялись на уровне ниже допустимой нормы 5%.

После 6 месяцев хранения при 40°C значительное увеличение в % HMMS и % LMMS и соответствующее уменьшение в % мономера наблюдалось для всех препаратов (A-F). Препараты В (низкий уровень эксципиента/высокий уровень pH) и С (высокий уровень эксципиента/низкий уровень pH) проявляли наибольшее увеличение в % мономера, примерно 20%. Эти результаты ожидаемы при хранении в ускоренных стрессовых условиях на основе предшествующих исследований стабильности.

Капиллярный гель-электрофорез в невозстанавливающих условиях (nrCGE)

После 6 месяцев хранения при 2-8°C (Таблица 14) никаких существенных изменений в % IgG, % фрагментов и % других примесей не наблюдалось для всех препаратов (A-F).

После 6 месяцев хранения при 25°C минимальное увеличение в 2-3% фрагментов и соответствующее уменьшение в % IgG наблюдалось для всех препаратов (A-F). Никаких существенных изменений в % других примесей не наблюдалось.

После 6 месяцев хранения при 40°C значительное увеличение, >25% фрагментов, и соответствующее уменьшение в % IgG наблюдалось для всех препаратов (A-F). Наибольшее увеличение в % фрагментов, >30%, наблюдалось для препаратов В (низкий уровень эксципиента/высокий уровень pH) и С (высокий уровень эксципиента/низкий уровень pH). Этот результат согласуется с результатами SE-HPLC. Незначительное увеличение в % других примесей наблюдалось для всех препаратов.

Капиллярный гель-электрофорез в восстанавливающих условиях (rCGE)

После 6 месяцев хранения при 2-8°C (Таблица 15) никаких существенных изменений в % тяжелой цепи + легкой цепи (HC+LC), % фрагментов и % других примесей не наблюдалось для всех препаратов (A-F).

После 6 месяцев хранения при 25°C минимальное увеличение в 1-2% фрагментов и соответствующее уменьшение в % HC+LC наблюдалось для всех препаратов (A-F). Минимальное увеличение в 1% других примесей наблюдалось только для препарата В и Е.

После 6 месяцев хранения при 40°C значительное увеличение приблизительно в 10% фрагментов и соответствующее уменьшение в % HC+LC наблюдалось для всех препаратов (A-F). Наибольшее увеличение в % фрагментов наблюдалось для препарата С (высокий уровень эксципиента/низкий уровень pH). Большинство препаратов (А, С, D и F) показало минимальное увеличение в 2-3% других примесей. В противоположность этому, значительное увеличение в % других примесей, т.е. 7-8%, наблюдалось для препаратов В и Е.

Капиллярный электрофорез с изoeлектрическим фокусированием (iCE)

После 6 месяцев хранения при 2-8°C (Таблица 16) небольшое увеличение в % кислых и соответствующее уменьшение в % преобладающих наблюдалось для всех препаратов (A-F), в то время как никаких изменений в % основных не наблюдалось.

После 6 месяцев хранения при 25°C значительное увеличение, 10-20% кислых, и соответствующее уменьшение в % преобладающих наблюдалось для всех препаратов.

Минимальное увеличение в 2-3% основных наблюдалось для большинства препаратов. Препараты В и Е с высоким рН показали наибольшее увеличение в % кислых, примерно 18%. Это обнаружение можно объяснить рН-зависимостью дезамидирования аспарагина, подробно описанное в литературе⁹.

После 6 месяцев хранения при 40°C значительное увеличение, примерно 60% кислых, и соответствующее уменьшение в % преобладающих наблюдалось для всех препаратов. Наибольшее увеличение в % кислых наблюдалось для препарата Е, что можно объяснить рН-зависимостью дезамидирования аспарагина. Чистое снижение в % основных наблюдалось для всех препаратов при сравнении образцов Т=0 и Т=6 месяцев.

Окисление метионина

После 6 месяцев хранения при 2-8°C (Таблица 17) для всех препаратов (А-Е) не наблюдалось никакого значительного изменения в % MetOx. После 6 месяцев хранения при 25°C минимальное увеличение в 1-2% MetOx наблюдалось для всех препаратов (А-Е). После 6 месяцев хранения при 40°C значительное увеличение, примерно 10% MetOX, наблюдалось для всех препаратов. Наибольшее увеличение в % MetOX наблюдалось для препарата С (высокий уровень эксципиента/низкий уровень рН), примерно 20%.

Биоанализ ингибирования

После 6 месяцев хранения при 2-8°C и 25°C (Таблица 19) никаких существенных изменений в % относительной эффективности не наблюдалось во всех препаратах. После 6 месяцев хранения при 40°C тенденция к снижению относительной активности наблюдалась для препаратов А, С, D и Е, однако все результаты оставались в пределах допустимых норм.

Таким образом, несмотря на то, что наблюдается разложение, антитело против TFPI сохраняет активность при ускоренном хранении при 25°C/60% RH и в условиях термического стресса при хранении при 40°C/75% RH в течение 6 месяцев во всех препаратах (Таблица 19).

Исследование встряхивания

Было проведено исследование встряхивания путем заполнения 1 мл препаратов А-Е в длинные шприцы объемом 1 мл с вставленными иглами. Затем шприцы подвергали стрессу встряхивания в течение 48 часов. Исследование встряхивания проводили при комнатной температуре окружающей среды (примерно 22°C) со шприцами, помещенными в горизонтальное положение и взбалтываемыми с помощью орбитального

шейкера, установленного на 300 об/мин. Контрольный образец Time Zero (T0) не подвергали встряхиванию.

После 48 часов встряхивания при 300 об/мин никаких существенных изменений не наблюдалось во всех препаратах (A-F) в анализах SE-HPLC, nrCGE, rCGE, iCE и окисления метионина. Значительное увеличение количества видимых частиц наблюдалось для препарата F, не содержащего PS80, что подтверждает важность PS80 в DP препарате. Никаких изменений внешнего вида не наблюдалось для большинства препаратов (A-E).

Заключение

Задача данного исследования состояла в том, чтобы установить тестируемую область параметров и продемонстрировать, что качество продукта устойчиво к изменениям в составе препарата и встряхиванию. После 6 месяцев хранения изменения в препарате оказали минимальное влияние на стабильность DP при предполагаемой температуре хранения 2-8°C для большинства препаратов (A-E). Значительное увеличение количества видимых и невидимых невооруженным глазом частиц наблюдалось для препарата без PS80 (F), что подтверждает важность PS80 в препарате DP. При 25°C и 40°C изменения качества продукта наблюдались начиная с 3 месяцев для 25°C и 1 месяца для 40°C, которые ожидаются в условиях ускоренного стресса на основании предыдущих исследований стабильности. Результаты хранения при 40°C показывают, что агрегация белка достигает максимума при крайних значениях тестируемой области параметров (B и C) и что дезамидирование достигает максимума при высоких значениях pH (B и E). Все препараты продемонстрировали устойчивость к стрессу при встряхивании, за исключением препарата F, не содержащего PS80. Эти результаты демонстрируют устойчивость DP к изменениям уровней эксципиента за пределами того, что ожидается в процессе. Оцененные препараты сравнимы с препаратом, содержащим целевые уровни эксципиентов (контрольный препарат A), что свидетельствует об устойчивости препарата.

Таблица 20. Последовательности

SEQ ID	Описание	Последовательность
1	TFPI α K1K2 человека (Номер доступа #P10646, остатки 29-177)	DSEED EENTI ITDTELPPLK LMHSFCAFKA DDGPCKAIMK RFFFNIFTRQ CEEFIYGGCE GNQNR FESLE ECKKMCTRDN ANRIIKTTLQ QEKPDFCFLE EDPGICRGYI TRYFYNNQTK QCERFKYGGC LGNMNNFETL EECKNICED

2	TFPI α K1K2K3 человека (Номер доступа #P10646, остатки 29-282)	DSEEDDEHTI ITDTELPPLK LMHSFCAFKA DDGPCKAIMK RFFFNIFTRQ CEEFIYGGCE GNQNRFSLE ECKKMCTRDN ANRIKTTLQ QEKPDFCFLE EDPGICRGYI TRYFYNNQTK QCERFKYGGC LGNMNNFETL EECKNICEDG PNGFQVDNYG TQLNAVNSL TPQSTKVPSL FEFHGPSWCL TPADRGLCRA NENRFYNSV IGKCRPFKYS GCGGNENNFT SKQECLRACK KGFIQRISKGLIK
3	TFPI2 K1K2K3 человека (Номер доступа # P48307.1, остатки 23-211)	DAAQEPTGNN AEICLLPLDY GPCRALLRY YYDRYTQSCR QFLYGGCEGN ANNFYTWEAC DDACWRIEKV PKVCRLQVSV DDQCEGSTEK YFFNLSSMTC EKFFSGGCHR NRIENRFPDE ATCMGFCAPK KIPSFCYSPK DEGLCSANVT RYYFNPRYRT CDAFTYTGCG GNDNNFVSRE DCKRACAKA
4	TFPI K1K2 мыши (Номер доступа #O54819, остатки 29-174)	LSEEADDTDS ELGSMKPLHT FCAMKADDGP CKAMIRSYFF NMYTHQCEEF IYGGCEGNEN RFDTL EECKK TCIPGYEKTA VKAASGAERP DFCFLEEDPG LCRGYMKRYL YNNQTKQCER FVYGGCLGNR NNFETLDECK KICENP
5	TFPI K1K2 яванского макака (Номер доступа #Q2PFV4, остатки 29- 177)	DSEEDDEEYTI ITDTELPPLK LMHSFCAFKP DDGPCKAIMK RFFFNIFTRQ CEEFIYGGCG GNQNRFSME ECKKVCTRDN VNRIQTALQ KEKPDFCFLE EDPGICRGYI TRYFYNNQSK QCERFKYGGC LGNMNNFETL EECKNTCED
6	TFPI K1K2 кролика (Номер доступа #P19761, остатки 29-173)	AAEEDDEFTN ITDIKPPLQK PTHSFCAMKV DDGPCRAYIK RFFFNILTHQ CEEFIYGGCE GNENRFESLE ECKEKCARDY PKMTTKLTFQ KGKPDFCFLE EDPGICRGYI TRYFYNNQSK QCERFKYGGC LGNLNNFESL EECKNTCEN
7	TFPI K1K2 крысы (Номер доступа #Q02445, остатки 29-176)	LPEEDDDTIN TDSEL RPMKP LHTFCAMKAE DGPCAMIRS YYFNMNSHQE EEFIYGGCRG NKNRFDTL EE CRKTCIPGYK KTIKTTSGA EKPDFCFLEE DPGICRGFMT RYFYNNQSKQ CEQFKYGGCL GNSNNFETLE ECRNTCED
8	mAb-TFPI-23 LC CDR1 mAb-TFPI-106 LC CDR1 mAb-TFPI-107 LC CDR1	TGSSSNIGAG YDVH
9	mAb-TFPI-23 LC CDR2 mAb-TFPI-106 LC CDR2 mAb-TFPI-107 LC CDR2	GNSNRPS
10	mAb-TFPI-23 LC CDR3 mAb-TFPI-106 LC CDR3 mAb-TFPI-107 LC CDR3	QSYDSSLSGS GV
11	mAb-TFPI-23 VL mAb-TFPI-106 VL mAb-TFPI-107 VL	QSVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGSSSNIG AGYDVHWHYQQ LPGTAPKLLI YGNSNRPSGV PDRFSGSKSG TSASLAITGL QAEDEADYYC QSYDSSLSGS GVFGGGTKLT VLG

	CDR1, CDR2, CDR3 подчеркнуты	
12	mAb-TFPI-23 LC mAb-TFPI-106 LC mAb-TFPI-107 LC CDR1, 2, 3 подчеркнуты. Последовательность вариабельной области отмечена курсивом	<i>QSVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGSSSNIG</i> <i>AGYDVHWYQQ LPGTAPKLLI YGNSNRPSGV</i> <i>PDRFSGSKSG TSASLAITGL QAEDEADYYC</i> <i>QSYDSSLSGS GVFGGGTKLT VLGQPKAAPS</i> VTLFPPSSEE LQANKATLVC LISDFYPGAV TVAWKADSSP VKAGVETTTP SKQSNNKYAA SSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQ VTHEGSTVEK TVAPTECS
13	mAb-TFPI-23 HC CDR1 mAb-TFPI-106 HC CDR1 mAb-TFPI-107 HC CDR1	GFTFSSYAMS
14	mAb-TFPI-23 HC CDR2 mAb-TFPI-106 HC CDR2 mAb-TFPI-107 HC CDR2	AISGSGGSTY YADSVKG
15	mAb-TFPI-23 HC CDR3 mAb-TFPI-106 HC CDR3 mAb-TFPI-107 HC CDR3	LGATSLSAFD I
16	mAb-TFPI-23 VH CDR1, CDR2, CDR3 подчеркнуты	<i>QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS</i> <i>SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY</i> <i>ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED</i> <i>TAVYYCAILG ATSLSAFDIW GQGTMTVTVSS</i>
17	mAb-TFPI-23 HC CDR1, CDR2 и CDR3 подчеркнуты. Последовательность вариабельной области отмечена курсивом. Мутации с эффекторной функцией выделены жирным шрифтом.	<i>QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS</i> <i>SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY</i> <i>ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED</i> <i>TAVYYCAILG ATSLSAFDIW GQGTMTVTVSS</i> ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGA PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
18	mAb-TFPI-106 VH CL лямбда Ig человека с Q1E, V5L мутациями, выделенными жирным шрифтом	<i>EVQLLES</i> <i>GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS</i> <i>SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY</i> <i>ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED</i> <i>TAVYYCAILG ATSLSAFDIW GQGTMTVTVSS</i>
19	mAb-TFPI-106 HC CDR1, CDR2 и CDR3 подчеркнуты. Последовательность вариабельной области отмечена курсивом.	<i>EVQLLES</i> <i>GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS</i> <i>SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY</i> <i>ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED</i> <i>TAVYYCAILG ATSLSAFDIW GQGTMTVTVSS</i> ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

	Q1E, V5L мутации выделены жирным шрифтом. Мутации с эффекторной функцией выделены жирным шрифтом.	GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPE AAGA PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
20	mAb-TFPI-107 VH CL лямбда Ig человека с Q1E, V5L, I94K мутациями, выделенными жирным шрифтом	<u>EVQLLES</u> GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS <u>SYAMSWVRQA</u> PGKGLEWVSA <u>ISGSGGSTYY</u> <u>ADSVKGRFTI</u> SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCA KL G <u>ATSLSAFDIW</u> GQGTMTVTVSS
21	mAb-TFPI-107 HC CDR1, CDR2 и CDR3 подчеркнуты. Последовательность вариабельной области отмечена курсивом. Q1E, V5L, I94K мутации выделены жирным шрифтом. Мутации с эффекторной функцией выделены жирным шрифтом.	<i><u>EVQLLES</u>GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS <u>SYAMSWVRQA</u> PGKGLEWVSA <u>ISGSGGSTYY</u> <u>ADSVKGRFTI</u> SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKLG <u>ATSLSAFDIW</u> GQGTMTVTVSS</i> ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPE AAGA PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
22	2A8-200 LC CDR1, CDR2, CDR3 подчеркнуты. Последовательность вариабельной области отмечена курсивом	<i><u>DIELTQPPSV</u> <u>SVAPGQTARI</u> <u>SCSGDNLRLNY</u> <u>YAHWYQQKPG</u> <u>QAPVVVIFYD</u> <u>VNRPSGIPER</u> <u>FSGSNSGNTA</u> <u>TLTISGTQAE</u> <u>DEADYYCQSW</u> <u>WDGVPVFGGG</u> TKLTVLGQPK AAPSVTLFPP SSEELQANKA TLVCLISDFY PGAVTVAWKA DSSPVKAGVE TTPPSKQSNN KYAASSYLSL TPEQWKSHRS YSCQVTHEGS TVEKTVAPTE CS</i>
23	2A8-200 HC CDR1, CDR2, CDR3 подчеркнуты. Последовательность вариабельной области отмечена курсивом	<i><u>QVQLVES</u>GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFR <u>SYGMDWVRQA</u> PGKGLEWVSS <u>IRGSRSSSTYY</u> <u>ADSVKGRFTI</u> SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARLY <u>RYWFDYWGQG</u> TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGAPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK</i>

		NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
24	hz4F36 LC CDR1, CDR2, CDR3 подчеркнуты. Последовательность вариабельной области отмечена курсивом	<i><u>DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL</u></i> <i><u>ESDGKTYLNW YLQKPGQSPQ LLIYLVSILD</u></i> <i><u>SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV</u></i> <i><u>YYCLOATHFP QTFGGGTVKE IKRTVAAPSV</u></i> FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
25	hz4F36 HC CDR1, CDR2, CDR3 подчеркнуты. Последовательность вариабельной области отмечена курсивом	<i><u>EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS</u></i> <i><u>NYAMSWVRQT PEKRLEWVAT ISRSGSYSYF</u></i> <i><u>PDSVQGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED</u></i> <i><u>TAVYYCARLG GYDEGDAMDS WGQGTTVTVS</u></i> SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYPFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK

Различные признаки и воплощения настоящего изобретения, упомянутые в отдельных разделах выше, применимы, при необходимости, к другим разделам с соответствующими изменениями. Следовательно, признаки, указанные в одном разделе, могут быть объединены с признаками, указанными в других разделах, как подходит. Все ссылки, цитируемые в настоящем документе, включая патенты, патентные заявки, статьи, учебные руководства, цитируемые номера доступа последовательностей, а также ссылки, цитируемые в них, настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте. В случае, если одна или несколько из включенной литературы и аналогичных материалов отличаются или противоречат настоящей заявке, включая, без ограничения, определенные термины, использование терминов, описанные методики и тому подобное, эта заявка имеет преимущество.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Препарат, содержащий: от примерно 15 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), буфер, полиол, поверхностно-активное вещество и хелатирующий агент, где pH препарата составляет от примерно 5,0 до примерно 6,0, и где эпитоп содержит остатки Ile105, Arg107 и Leu131, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2.

2. Препарат по п. 1, где буфер представляет собой гистидиновый или сукцинатный буфер.

3. Препарат по п. 1 или 2, где концентрация буфера составляет от примерно 0,1 mM до примерно 100 mM.

4. Препарат по любому из пп. 1-3, где полиол представляет собой сахарозу.

5. Препарат по любому из пп. 1-4, где концентрация полиола составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 300 мг/мл.

6. Препарат по любому из пп. 1-5, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат.

7. Препарат по п. 6, где полисорбат представляет собой полисорбат 80 (PS80).

8. Препарат по любому из пп. 1-7, где концентрация поверхностно-активного вещества составляет от примерно 0,01 мг/мл до примерно 10 мг/мл.

9. Препарат по любому из пп. 1-8, где хелатирующий агент представляет собой дигидрат эдетата динатрия или этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA).

10. Препарат по любому из пп. 1-9, где концентрация хелатирующего агента составляет от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1,0 мг/мл.

11. Препарат по любому из пп. 1-10, где антитело содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VH (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; (б) определяющую комплементарность область 2 VH (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и (в) определяющую комплементарность область 3 VH (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и

(2) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VL (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (б) определяющую комплементарность область 2 VL (CDR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и (в) определяющую комплементарность область 3 VL (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

12. Препарат по любому из пп. 1-11, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

13. Препарат по любому из пп. 1-12, где антитело содержит последовательность VH, кодируемую вставкой, присутствующей в плазмиде, депонированной под номером доступа No. PTA-122329 в Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC), и последовательность VL, кодируемую вставкой, присутствующей в плазмиде, депонированной под номером доступа No. PTA-122328 в ATCC.

14. Препарат по любому из пп. 1-13, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

15. Препарат, содержащий:

от примерно 15 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI),

от примерно 1 мМ до примерно 40 мМ буфера;

от примерно 1 мг/мл до примерно 120 мг/мл полиола;

от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1 мг/мл поверхностно-активного вещества;

от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1,0 мг/мл хелатирующего агента; и

где pH препарата составляет от примерно 5,0 до примерно 6,0,

где эпитоп содержит остатки Ile105, Arg107 и Leu131, в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 2.

16. Препарат, содержащий:

от примерно 15 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI),

от примерно 1 мМ до примерно 40 мМ буфера;

от примерно 1 мг/мл до примерно 120 мг/мл полиола;

от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1 мг/мл поверхностно-активного вещества;

от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1,0 мг/мл хелатирующего агента; и

где рН препарата составляет от примерно 5,0 до примерно 6,0,

где антитело содержит (1) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VH (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; (б) определяющую комплементарность область 2 VH (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и (в) определяющую комплементарность область 3 VH (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и (2) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую: (а) определяющую комплементарность область 1 VL (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (б) определяющую комплементарность область 2 VL (CDR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и (в) определяющую комплементарность область 3 VL (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

17. Препарат по любому из пп. 1-16, где концентрация антитела составляет примерно 100 мг/мл, примерно 115 мг/мл, примерно 150 мг/мл или примерно 158 мг/мл.

18. Фармацевтический препарат, содержащий: 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 мМ гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и где препарат имеет рН 5,8.

19. Фармацевтический препарат, содержащий: 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 мМ гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и где препарат имеет pH 5,8.

20. Фармацевтический препарат, содержащий: 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 мМ гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и где препарат имеет pH 5,8.

21. Фармацевтический препарат, содержащий: 150 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 мМ гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и где препарат имеет pH 5,8.

22. Фармацевтический препарат, содержащий: от примерно 50 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 мМ гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и где препарат имеет pH 5,8.

23. Фармацевтический препарат, содержащий: от примерно 50 мг/мл до примерно 250 мг/мл антитела, которое специфично связывается с эпитопом в домене Кунитца 2 (K2) ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), 20 мМ гистидинового буфера, 85 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл дигидрата эдетата динатрия, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и где препарат имеет pH 5,8.

24. Препарат по любому из пп. 1-23, имеющий срок хранения по меньшей мере примерно 24 месяца при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

25. Препарат по любому из пп. 1-23, имеющий менее чем примерно 7% высокомолекулярных форм (HMMS) при 40°C/75% относительной влажности (RH) в течение вплоть до 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев или 6 месяцев (например, при измерении посредством эксклюзионной высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ)).

26. Препарат по любому из пп. 1-23, имеющий менее чем примерно 3% HMMS при 40°C в течение вплоть до 1 месяца, 2 месяцев или 3 месяцев (например, при измерении посредством эксклюзионной ВЭЖХ).

27. Препарат по любому из пп. 1-23, имеющий менее чем примерно 2% HMMS при 40°C в течение вплоть до 1 месяца (например, при измерении посредством эксклюзионной ВЭЖХ).

28. Способ сокращения времени кровотечения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества препарата по любому из пп. 1-27.

29. Способ лечения или предупреждения недостаточности свертывания крови или нарушения свертываемости крови, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества препарата по любому из пп. 1-27.

30. Способ лечения или предупреждения гемофилии А, В или С, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества препарата по любому из пп. 1-27.

31. Способ лечения или предупреждения болезни фон Виллебранда (vWD), включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества препарата по любому из пп. 1-27.

32. Способ снижения активности TFPI, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества препарата по любому из пп. 1-27.

33. Способ по любому из пп. 28-32, где препарат вводят субъекту подкожно или внутривенно.

34. Способ по любому из пп. 28-33, где субъект представляет собой человека.

35. Применение препарата по любому из пп. 1-27 для изготовления лекарственного средства для лечения нарушения свертываемости крови у субъекта.

36. Применение препарата по любому из пп. 1-27 для изготовления лекарственного средства для лечения гемофилии А, В или С у субъекта.