

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390196** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.09

(22) Дата подачи заявки
2021.07.05

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)

**(54) СОСТАВ С ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ
ФАКТОРА XII**

(31) 20184004.8

(32) 2020.07.03

(33) EP

(86) PCT/AU2021/050714

(87) WO 2022/000046 2022.01.06

(71) Заявитель:
КСЛ ИННОВЕЙШН ПТИ ЛТД (AU)

(72) Изобретатель:
Джонстон Майкл, Гудолл Дайанна
Грейс, Эдвардс Нейтан Аарон (AU)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении описывают жидкий состав, содержащий по меньшей мере 100 мг/мл белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается или специфически связывается с фактором (и/или его активированной формой), буфер с органической кислотой, неионное поверхностно-активное вещество и аминокислотный стабилизатор, причем pH состава составляет от 5,0 до 6,5 и вязкость менее примерно 30 мПа·с при 20°C. Примеры составов содержат специфическое антитело 3F7 к фактору XII вместе с гистидиновым буфером, поверхностно-активное вещество полисорбат 80 и аминокислотные стабилизаторы аргинин и пролин.

A1

202390196

202390196

A1

СОСТАВ С ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ФАКТОРА XII

5

Область техники

Настоящее изобретение относится к высококонцентрированным белковым составам и их применению.

Предшествующий уровень техники

10

Нормальное свертывание крови является весьма консервативным процессом в биологии млекопитающих, включающим сложные физиологические и биохимические процессы, в том числе активацию каскада фактора коагуляции (или фактора свертывания крови), что в конечном итоге приводит к образованию фибрина и агрегации тромбоцитов. Каскад свертывания крови включает «внешний» путь, основные механизмы инициации свертывания, и «внутренний» путь, который способствует стабилизации фибринового сгустка.

15

Большинство факторов свертывания крови, участвующих в каскаде коагуляции, являются предшественниками протеолитических ферментов, известных как зимогены. Эти ферменты циркулируют в крови в неактивированной форме и участвуют в каскаде свертывания только после активации (например, в результате протеолитического расщепления).

20

Фактор XII (FXII, фактор Хагемана) является важным белком свертывания крови для инициации внутреннего каскада свертывания крови. Активация FXII для получения активированного FXII (FXIIa) приводит к активации фактора XI до фактора XIa и эстераз C1 (C1r, C1s), первых компонентов макромолекулярного комплекса C1 и классического пути комплемента. Активация FXI приводит к сериям протеолитических реакций, приводящих к образованию тромбина и гемостатическому пути, в то время как активация системы комплемента приводит к повышению проницаемости сосудов, хемотаксису фагоцитарных клеток, активации воспалительных клеток, опсонизации инородных частиц, прямому уничтожению клеток и повреждению тканей.

25

30

Несмотря на его роль в активации внутреннего каскада свертывания крови и активации классического пути комплемента, дефицит FXII не связан с такими нарушениями как кровотечения. Однако нарушение регуляции этих путей может привести к тяжелым состояниям.

Несмотря на то, что антитела и ингибиторы против FXII и/или FXIIa существуют, при разработке составов у производителей лекарств возникает все больше проблем. Например, идеальный ингибитор FXII/FXIIa не увеличивает риск кровотечения, не является иммуногенным и должен вводиться как можно реже. Кроме того, подкожное введение быстро становится предпочтительной альтернативой внутривенному введению. Подкожная инъекция препарата с использованием средств доставки для самостоятельного введения, таких как автоинжектор, шприц-ручка или предварительно заполненный шприц, не только более удобна для пациента, но и снижает затраты на здравоохранение за счет сведения к минимуму посещений больницы.

Тем не менее, существуют многочисленные проблемы, связанные с разработкой составов с высокой концентрацией антител (например, белка ≥ 100 мг/мл), применимых для подкожного введения. Составы для подкожного введения обычно требуют более высоких концентраций продукта для достижения меньших объемов инъекций, однако повышение концентрации белка часто отрицательно влияет на агрегирование и разрушение белка, растворимость, стабильность и вязкость. В дополнение к изменениям свойств самого белка также существуют производственные проблемы, включая трудности с обработкой и хранением, изменением состава, а также реологических свойств и пригодности для введения разработанного состава шприцом. Например, для введения вязких растворов обычно требуется повышенное давление при инъекции, поэтому также может потребоваться более продолжительное время инъекции, что может вызвать боль и дискомфорт у пациента.

Различные решения для получения составов с высокой концентрацией антител включают лиофилизированные составы для последующего восстановления, составы без буфера и добавление высоких концентраций соли или других добавок для уменьшения агрегирования и/или вязкости состава. Однако использование избыточных количеств таких вспомогательных веществ может привести к гипертоничности препаратов или изменениям ионной силы состава и связанных с этим проблемам агрегации белков.

Таким образом, существует потребность в составах, содержащих белковые терапевтические средства, например антитела, нацеленные на механизм свертывания крови, которые являются стабильными в течение длительного времени и не агрегируют при высоких концентрациях антител.

Краткое описание изобретения

Настоящее описание основано на идентификации фармацевтического состава для белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается или

специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой (т.е. активированным FXII; FXIIa).

При получении подходящих составов в настоящем изобретении было установлено, что можно получать фармацевтические составы, например, жидкие фармацевтические составы, включающие высокие концентрации белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается или специфически связывается с FXII и/или FXIIa (т.е. концентрации, равные по меньшей мере примерно 100 мг/мл), которые остаются растворимыми и сохраняют вязкость, подходящую для инъекции (например, для подкожного введения). Состав с высокой концентрацией по настоящему изобретению содержит органическую кислоту, неионное поверхностно-активное вещество, аминокислотный стабилизатор и необязательно полиол. Следует отметить, что при получении состава по настоящему изобретению было установлено, что дополнительные соли и/или стабилизирующие агенты не требуются. Кроме того, в настоящем изобретении установлено, что повышение концентрации белка в составе, а именно антитела (например, от примерно 100 мг/мл до примерно 170 мг/мл), не всегда требует изменения (т.е. увеличение или уменьшение) концентрации эксципиентов.

Заключения по настоящему изобретению обеспечивают основу для фармацевтического состава, содержащего по меньшей мере около 100 мг/мл белка, включающего антигенсвязывающий домен, который связывается или специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой, при этом состав имеет динамическую (т.е. полную) вязкость менее примерно 30 мПа•с при 20°C. Результаты настоящего изобретения также обеспечивают основу для способов лечения состояния или расстройства, например, тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства у субъекта.

Настоящее изобретение предусматривает жидкий фармацевтический состав, содержащий по меньшей мере примерно 100 мг/мл белка, включающего антигенсвязывающий домен, который связывается или специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой, буфер на основе органической кислоты, неионное поверхностно-активное вещество и аминокислотный стабилизатор, причем состав имеет pH от 5,0 до 6,5 и динамическую вязкость менее примерно 30 мПа•с при 20°C.

В одном из примеров белок по настоящему изобретению содержится в **составе** в концентрации по меньшей мере 100 мг/мл. Например, белок содержится в составе в концентрации от 100 мг/мл до 200 мг/мл. Например, белок содержится в лекарственном

составе в концентрации примерно 100 мг/мл, или примерно 110 мг/мл, или примерно 120 мг/мл, или примерно 130 мг/мл, или примерно 140 мг/мл, или примерно 150 мг/мл, или примерно 160 мг/мл, или примерно 170 мг/мл, или примерно 180 мг/мл, или примерно 190 мг/мл, или примерно 200 мг/мл. В одном из примеров белок содержится

5 в **составе** в концентрации примерно 100 мг/мл, или примерно 120 мг/мл, или примерно 150 мг/мл, или примерно 170 мг/мл. В одном из примеров белок содержится в составе в концентрации примерно 100 мг/мл. В одном из примеров белок содержится в составе в концентрации примерно 150 мг/мл. В одном из примеров белок содержится в составе в концентрации по меньшей мере примерно 150 мг/мл. В одном из примеров белок
10 содержится в составе в концентрации от примерно 160 мг/мл до примерно 180 мг/мл. Например, белок содержится в составе в концентрации примерно 170 мг/мл. В одном из примеров белок содержится в составе в концентрации более 200 мг/мл. Например, белок содержится в составе в концентрации примерно 200 мг/мл, или примерно 210 мг/мл, или примерно 220 мг/мл.

15 В одном из примеров белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается или специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой (фактором XIIa). В одном из примеров белок, который связывается с фактором XII/XIIa, связывается или специфически связывается с фактором XII. В одном из примеров белок, который связывается с фактором XII/XIIa, связывается или
20 специфически связывается с активированным фактором XII (фактором XIIa).

В одном из примеров белок связывается или специфически связывается с фактором XII и противодействует активности фактора XII и/или фактора XIIa. В одном из примеров белок связывается или специфически связывается с фактором XII и противодействует активации фактора XII и/или фактора XIIa. Ссылка в настоящем
25 описании на белок или антитело, которое «связывается с» фактором XII, предусматривает точную поддержку белка или антитела, которое «специфически связывается» с фактором XII.

В одном из примеров белок связывается или специфически связывается с активированным фактором XII (фактором XIIa) и противодействует активности
30 фактора XII и/или фактора XIIa. В одном из примеров белок связывается или специфически связывается с активированным фактором XII и препятствует активации фактора XII и/или фактора XIIa. Ссылка в настоящем изобретении на белок или антитело, которое «связывается с» активированным фактором XIIa, предусматривает

точную поддержку белка или антитела, которое «специфически связывается» с активированным фактором XIIa.

В одном из примеров белок содержит антигенсвязывающий домен антитела. Например, белок содержит по меньшей мере вариабельную область тяжелой цепи (V_H – heavy chain variable region) и вариабельную область легкой цепи (V_L – light chain variable region), где V_H и V_L связываются с образованием F_v , содержащего антигенсвязывающий домен.

В одном из примеров V_H и V_L являются одноцепочечными полипептидами. Например, белок представляет:

- (i) одноцепочечный фрагмент F_v (scFv);
- (ii) димерный scFv (di-scFv); или
- (iii) по меньшей мере один из (i) и/или (ii), связанный с константной областью антитела, F_c или константным доменом тяжелой цепи (CH – heavy chain constant domain) CH2 и/или CH3.

В одном из примеров V_L и V_H представляет отдельные полипептидные цепи. Например, белок представляет:

- (i) диатело,
- (ii) триатело,
- (iii) тетратело,
- (iv) Fab,
- (v) $F(ab')_2$,
- (vi) F_v ; или
- (vii) один из (i)-(vi) связанный с константной областью антитела, F_c или CH2 и/или CH3.

Вышеупомянутые белки (представленные в предыдущих двух перечнях) также могут быть отнесены к антигенсвязывающим доменам антител.

В одном из примеров белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv, содержащий вариабельные области антитела). Примеры антител описаны, например, в WO 2013/014092 и WO 2017/173494, которые включены в настоящее изобретение в качестве ссылки.

В одном из примеров белок содержит scFv. В одном из примеров белок содержит scFv, который связывается или специфически связывается с фактором XII и/или фактором XIIa (и, например, противодействует активности фактора XII и/или фактора XIIa).

В одном из примеров белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с фактором XII и/или фактором XIIa, представляет собой антитело, т.е. полноразмерное антитело. Например, антитело является анти-FXII антителом. В другом примере антитело является анти-FXIIa антителом.

5 В одном из примеров белок является рекомбинантным, химерным, деиммунизированным, гуманизированным, белком человека или приматизированным белком. В одном из примеров белок или антитело являются человеческими. В одном из примеров белок или антитело гуманизированы.

В одном из примеров антитело является моноклональным антителом.

10 В одном из примеров антитело является антителом IgG. Например, антитело является антителом IgG₁, или IgG₂, или IgG₃, или IgG₄.

В одном из примеров антитело является антителом IgG₄.

В одном из примеров антитело является моноклональным антителом IgG₄.

15 В одном из примеров белок содержит область Fc. Например, Fc-область является Fc-областью IgG₁ человека, или Fc-областью IgG₄ человека, или стабилизированной Fc-областью IgG₄ человека. Например, Fc-область представляет собой Fc-область IgG₄ человека. В одном из примеров Fc-область антитела модифицируют для предотвращения димеризации (например, как обсуждается в настоящем описании).

20 В одном из примеров антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область IgG₄.

В одном из примеров константная область IgG₄ представляет собой стабилизированную константную область IgG₄. Например, константная область IgG₄ включает стабилизированную шарнирную область. Например, стабилизированные константные области IgG₄ содержат пролин в положении 241 шарнирной области по системе Kabat (Kabat с соавт., «Sequences of Proteins of Immunological Interest», Вашингтон, округ Колумбия, Министерство здравоохранения и социальных служб США, 1987 г. и/или 1991 г.).

25

30 В одном из примеров белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается или специфически связывается по меньшей мере с фактором XII и/или его активированной формой. Это не означает, что белок по настоящему изобретению не связывается с другими белками, а только то, что белок (или его часть) является специфическим к фактору XII и/или активированному фактору XII и вообще не связывается с белками. Этот термин также не исключает, например, биспецифическое антитело или белок, содержащий его антигенсвязывающие домены, которые могут

специфически связываться с фактором XII и/или активированным фактором XII с помощью одного (или нескольких) связывающих доменов и могут специфически связываться с другим белком с другим связывающим доменом.

5 В одном из примеров белок является моноспецифическим, биспецифическим или мультиспецифическим. Например, белок содержит антигенсвязывающий домен, который может специфически связываться с фактором XII и/или активированным фактором XII, и антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с другим белком.

10 В одном из примеров белок является моноспецифическим, биспецифическим или мультиспецифическим. Например, антигенсвязывающий домен является моноспецифическим. В одном из примеров антигенсвязывающий домен является мультиспецифическим. Например, антигенсвязывающий домен является биспецифическим.

15 В одном из примеров антигенсвязывающий домен является моноспецифическим. В одном из примеров антигенсвязывающий домен не является биспецифическим.

В одном из примеров белок содержит переменную область антитела, которая конкурентно ингибирует связывание антитела 3F7, включающего переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, к фактору XII.

20

В одном из примеров белок содержит переменную область антитела, которая конкурентно ингибирует связывание антитела 3F7 (3F7G), включающего переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, к фактору XII.

25

В одном из примеров белок содержит переменную область антитела, которая конкурентно ингибирует связывание антитела с созревшей аффинностью 3F7 (3F7^{aff}), содержащего переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6, к фактору XII.

30

В одном из примеров белок содержит переменную область антитела, которая конкурентно ингибирует связывание гарадацимаба с фактором XII и/или с активированным фактором XII.

В одном из примеров белок содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

- 5 В одном из примеров белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую определяющую комплементарность области (CDR – complementarity determining region) V_H , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR V_L , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

Например, белок содержит:

- (i) переменную область тяжелой цепи V_H , включающую:
 - (a) определяющую комплементарность область CDR1, содержащую

15 аминокислотную последовательность из аминокислот 25-34 в последовательности SEQ ID NO: 1,
 - (б) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность из аминокислот 49-65 в последовательности SEQ ID NO: 1, и
 - (в) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность из аминокислот 98-108 в последовательности SEQ ID NO: 1, и/или
- (ii) переменную область легкой цепи V_L , включающую:
 - (a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность из аминокислот 23-33 в SEQ ID NO: 2,
 - (б) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность из аминокислот 49-25 55 в SEQ ID NO: 2, и
 - (в) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность из аминокислот 88-96 в SEQ ID NO: 2.

В другом примере белок содержит:

- (i) V_H , содержащую:
 - (a) последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1; или
 - (б) CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; и CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; или

(в) CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; и CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11;

и/или

5 (ii) V_L , включающую:

(а) последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; или

(б) CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; и CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14; или

10 (в) CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; и CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

В одном примере белок является антителом, включающим:

(i) V_H , включающую:

15 (а) CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7;

(б) CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; и

(в) CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9;

и/или

(ii) V_L , включающую:

20 (а) CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;

(б) CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; и

(в) CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

В одном из примеров белок является антителом, включающим:

(i) V_H , включающую:

25 (а) CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7;

(б) CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; и

(в) CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11;

и/или

(ii) V_L , включающую:

30 (а) CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;

(б) CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; и

(в) CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

В одном из примеров белок содержит V_H , содержащую последовательность CDR2, представленную в SEQ ID NO: 10.

В одном из примеров аминокислотная последовательность CDR2 V_H содержит аргинин (R), аспарагин (N) или аспарагиновую кислоту (D) в положении 3, и/или пролин (P), валин (V), изолейцин (I) или метионин (M) в положении 4, и/или серин (S), пролин (P) или аланин (A) в положении 5, и/или глицин (G), лейцин (L), валин (V) или треонин (T) в положении 6, и/или любую аминокислоту в положении 7, и/или треонин (T), глицин (G) или серин (S) в положении 8.

В одном из примеров аминокислотная последовательность V_H CDR2 содержит аспарагин (N) в положении 3 и валин (V) в положении 4, пролин (P) в положении 5 и лейцин (L) в положении 6, тирозин (Y) в положении 7 и глицин (G) в положении 8.

В одном из примеров аминокислотная последовательность V_H CDR2 содержит аспарагин (N) в положении 3 и валин (V) в положении 4, пролин (P) в положении 5 и валин (V) в положении 6, глутамин (Q) в положении 7 и глицин (G) в положении 8.

В одном из примеров аминокислотная последовательность V_H CDR2 содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 3 и изолейцин (I) в положении 4, пролин (P) в положении 5 и треонин (T) в положении 6, лизин (K) в положении 7 и глицин (G) в положении 8.

В одном из примеров аминокислотная последовательность V_H CDR2 содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 3 и метионин (M) в положении 4, пролин (P) в положении 5 и треонин (T) в положении 6, лизин (K) в положении 7 и глицин (G) в положении 8.

В одном из примеров белок является антителом, включающим:

(i) V_H, включающую:

(a) CDR1, представленную в SEQ ID NO: 7;

(б) CDR2, представленную в SEQ ID NO: 10, где X в положении 3 представляет собой D, X в положении 4 представляет собой I, X в положении 5 представляет собой P, X в положении 6 представляет собой T, X в положении 7 представляет собой K, и X в положении 8 представляет собой G; и

(в) CDR3, представленную в SEQ ID NO: 9;

и/или

(ii) V_L, включающую:

(a) CDR1, представленную в SEQ ID NO: 12;

(б) CDR2, представленную в SEQ ID NO: 13; и

(в) CDR3, представленную в SEQ ID NO: 14.

В одном из примеров белок содержит V_H , включающую CDR3, представленную в SEQ ID NO: 11.

В одном из примеров аминокислотная последовательность V_H CDR3 содержит
 5 изолейцин (I), метионин (M) или валин (V) в положении 9, и/или серин (S) или лизин (K) в положении 10, и/или пролин (P), лизин (K), треонин (T) или гистидин (H) в положении 11, и/или гистидин (H), аспарагин (N), глицин (G) или глутамин (Q) в положении 12.

В одном из примеров белок содержит V_L , включающую CDR3, представленную в SEQ ID NO: 15.

10 В одном из примеров аминокислотная последовательность V_L CDR3 содержит аланин (A) или серин (S) в положении 2, и/или аспарагиновую кислоту (D), тирозин (Y), глутаминовую кислоту (E), треонин (T), триптофан (W) или серин (S) в положении 4, и/или аланин (A), аспарагин (N), изолейцин (I), лейцин (L), валин (V), пролин (P), глутамин (Q) или глутаминовую кислоту (E) в положении 5, и/или серин (S),
 15 аспарагиновую кислоту (D), пролин (P), глутаминовую кислоту (E), глутамин (Q) или аргинин (R) в положении 6, и/или лейцин (L) или валин (V) в положении 7, и/или глицин (G), лейцин (L) или лизин (K) в положении 9, и/или валин (V), аланин (A), аспарагиновую кислоту (D), треонин (T), метионин (M) или глицин (G) в положении 10.

В одном из примеров белок содержит переменную область тяжелой цепи (V_H),
 20 содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи V_L , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

В одном из примеров белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий V_H , включающую определяющие
 25 комплементарность области (CDR) V_H , содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и V_L , включающую CDR V_L , содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4. Например, белок содержит:

- (i) V_H , включающую:
- 30 (а) CDR1, содержащую последовательность аминокислот 25-34 в SEQ ID NO: 3;
- (б) CDR2, включающую последовательность аминокислот 49-65 в SEQ ID NO: 3;
- и
- (в) CDR3, содержащую последовательность аминокислот 98-108 в SEQ ID NO: 3;
- и/или

(ii) V_L , включающую:

- (a) CDR1, содержащую последовательность аминокислот 23-33 в SEQ ID NO: 4;
- (b) CDR2, содержащую последовательность аминокислот 49-55 в SEQ ID NO: 4; и
- (в) CDR3, содержащую последовательность аминокислот 88-96 в SEQ ID NO: 4.

5 В одном из примеров белок по настоящему изобретению представляет собой антитело с созревшей аффинностью, химерное антитело, антитело с привитой CDR или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном из примеров белок представляет собой форму антитела 3F7 с созревшей аффинностью. В одном из примеров белок представляет собой гарадацимаб.

10 В одном из примеров белок содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

15 В одном из примеров белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий V_H , включающую определяющие комплементарность области (CDR) V_H , содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и V_L , содержащую CDR V_L , содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

В одном из примеров белок включает:

- 20 (i) V_H , включающую:
- (a) CDR1, содержащую последовательность аминокислот 25-34 в SEQ ID NO: 5;
 - (б) CDR2, содержащую последовательность аминокислот 49-65 в SEQ ID NO: 5; и
 - (в) CDR3, содержащую последовательность аминокислот 98-108 в SEQ ID NO: 5;

и/или

- 25 (ii) V_L , включающую:
- (a) CDR1, содержащую последовательность аминокислот 23-33 в SEQ ID NO: 6;
 - (б) CDR2, содержащую последовательность аминокислот 49-55 в SEQ ID NO: 6; и
 - (в) CDR3, содержащую последовательность аминокислот 88-96 в SEQ ID NO: 6.

В одном из примеров белок включает:

- 30 (i) V_H , включающую:
- (a) CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7;
 - (б) CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16; и
 - (в) CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9;

и/или

(ii) V_L comprising:

- (a) CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;
- (б) CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; и
- (в) CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

5 В одном из примеров белок, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой любую форму белка, антитела или его функционального фрагмента, кодируемую нуклеиновой кислотой.

10 В одном из примеров буфер с органической кислотой выбирают из группы, состоящей из гистидинового буфера, глутаматного буфера, сукцинатного буфера и цитратного буфера. В одном из примеров буфер с органической кислотой выбирают из группы, состоящей из гистидинового буфера и глутаматного буфера.

В одном из примеров буфер с органической кислотой представляет собой аминокислотный буфер. Например, аминокислотный буфер выбирают из группы, состоящей из гистидинового буфера и глутаматного буфера.

15 Преимущественно гистидиновый буфер и глутаматный буфер обладают более высокой стабильностью к температуре и агрегированию (т.е. пониженной склонностью к агрегации) по сравнению с цитратным буфером и/или сукцинатным буфером.

20 В одном из примеров буфер с органической кислотой представляет собой гистидиновый буфер. Подходящие гистидиновые буферы для использования в настоящем изобретении будут очевидны специалисту в данной области и включают, например, буферы на основе гистидинхлорида, гистидинацетата, гистидинфосфата и гистидинсульфата. В одном из примеров гистидиновый буфер представляет собой L-гистидин.

25 В одном из примеров буфер с органической кислотой представляет собой глутаматный буфер. Подходящие глутаматные буферы для использования в настоящем описании будут очевидны специалисту в данной области техники и включают, например, однонатриевую соль глутамата.

30 В одном из примеров буфер с органической кислотой представляет собой сукцинатный буфер. Подходящие сукцинатные буферы для использования в настоящем изобретении будут очевидны специалисту в данной области и включают, например, смесь янтарной кислоты и однонатриевой соли сукцината, смесь янтарной кислоты и гидроксида натрия, смесь янтарной кислоты и двунатриевой соли сукцината.

В одном из примеров буфер с органической кислотой представляет собой цитратный буфер. Подходящие цитратные буферы для использования в настоящем

изобретении будут очевидны специалисту в данной области и включают, например, смесь цитрата натрия и динатриевой соли цитрата, смесь лимонной кислоты и тринатриевой соли цитрата, смесь лимонной кислоты и однатриевой соли цитрата.

5 Специалисту в данной области известно, что буферы, подходящие для использования в настоящем изобретении, будут обеспечивать достаточную буферную емкость для поддержания желаемого pH в диапазоне условий, которым он будет подвергаться во время приготовления и хранения продукта. В одном из примеров состав по настоящему изобретению имеет pH от примерно 5,0 до примерно 7,0. Например, состав имеет pH примерно от 5,0 до 6,5 или pH примерно от 5,8 до примерно 6,4. Например, буфер с органической кислотой представляет собой гистидиновый буфер, имеющий pH от примерно 5,5 до примерно 5,7. В одном из примеров буфер с органической кислотой представляет собой глутаматный буфер, имеющий pH около 5,5. В одном из примеров буфер с органической кислотой представляет собой сукцинатный буфер, имеющий pH около 5,5. В одном из примеров буфер с органической кислотой представляет собой цитратный буфер, имеющий pH около 5,5. В одном из примеров буфер с органической кислотой имеет pH от примерно 5,5 до 6,5, или pH от примерно 5,6 до примерно 6,4, или pH от примерно 5,8 до примерно 6,4. В одном из примеров величина pH препарата составляет от 5,8 до 6,4. Например, состав имеет pH около 5,8, или около 5,9, или около 6,0, или около 6,1, или около 6,2, или около 6,3, или около 6,4. В одном из примеров буфер с органической кислотой представляет собой гистидиновый буфер, и состав имеет pH от примерно 5,8 до примерно 6,4. В одном из примеров буфер с органической кислотой представляет собой глутаматный буфер, и состав имеет pH от примерно 5,8 до примерно 6,4. В одном из примеров буфер с органической кислотой представляет собой сукцинатный буфер, и состав имеет pH от примерно 5,8 до примерно 6,4. В одном из примеров буфер с органической кислотой представляет собой цитратный буфер, и состав имеет pH от примерно 5,8 до примерно 6,4.

В одном из примеров концентрация буфера с органической кислотой в фармацевтическом составе по настоящему изобретению составляет от примерно 2 мМ до 120 мМ. В одном из примеров буфер с органической кислотой содержит не менее 2 мМ. Например, буфер с органической кислотой содержится в концентрации от примерно 2 мМ до примерно 10 мМ. Например, буфер с органической кислотой содержится в концентрации примерно 2 мМ, или примерно 3 мМ, или примерно 4 мМ, или примерно 5 мМ, или примерно 6 мМ, или примерно 7 мМ, или примерно 8 мМ, или

примерно 9 мМ, или примерно 10 мМ. В одном из примеров буфер с органической кислотой содержит по меньшей мере примерно 10 мМ. Например, буфер с органической кислотой содержится в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 30 мМ. Например, буфер с органической кислотой содержится в концентрации

5 примерно 10 мМ, или примерно 12 мМ, или примерно 14 мМ, или примерно 16 мМ, или примерно 18 мМ, или примерно 20 мМ, или примерно 25 мМ, или примерно 30 мМ. В одном из примеров буфер с органической кислотой содержится в концентрации от примерно 12 мМ до примерно 25 мМ. Например, буфер с органической кислотой содержится в концентрации примерно 20 мМ. Например, буфер с органической

10 кислотой содержится в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 60 мМ. Например, буфер с органической кислотой содержится в концентрации примерно 10 мМ, или примерно 15 мМ, или примерно 20 мМ, или примерно 25 мМ, или примерно 30 мМ, или примерно 35 мМ, или примерно 40 мМ, или примерно 45 мМ, или примерно 50 мМ, или примерно 55 мМ, или примерно 60 мМ. В одном из примеров

15 буфер с органической кислотой содержится в концентрации примерно 20 мМ. В одном из примеров буфер с органической кислотой содержится в концентрации примерно от 60 мМ до примерно 120 мМ. Например, буфер с органической кислотой содержится в концентрации примерно 60 мМ, или примерно 65 мМ, или примерно 70 мМ, или примерно 75 мМ, или примерно 80 мМ, или примерно 85 мМ, или примерно 90 мМ,

20 или примерно 95 мМ или примерно 100 мМ, или примерно 105 мМ, или примерно 110 мМ, или примерно 115 мМ, или примерно 120 мМ. В одном из примеров буфер с органической кислотой содержится в концентрации примерно 100 мМ.

В одном из примеров буфер с органической кислотой является буфером с L-гистидином, который содержится в концентрации примерно от 12 мМ до примерно 25

25 мМ. В одном из примеров буфер с органической кислотой является буфером с L-гистидином, который содержится в концентрации примерно 20 мМ.

В одном из примеров неионное поверхностно-активное вещество выбирают из группы, состоящей из сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (например, полисорбата 20 и полисорбата 80), сополимеров полиэтилена и

30 полипропилена, полиэтиленполипропиленгликолей, полиоксиэтиленстеаратов, полиоксиэтиленалкиловых эфиров, например, полиоксиэтиленамонолаурилового эфира, алкилфенилполиоксиэтиленовых эфиров (Тритон-Х), сополимера полиоксиэтилена и полиоксипропилена (полосамер, плуроник), додецилсульфата натрия (SDS – sodium dodecyl sulphate). Например, неионное поверхностно-активное

вещество выбирают из группы, состоящей из сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот и сополимеров полиоксиэтилена и полиоксипропилена.

В одном из примеров неионное поверхностно-активное вещество выбирают из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 80 и полоксамера 188. Например, неионное поверхностно-активное вещество является полисорбатом 80.

В одном из примеров концентрация неионного поверхностно-активного вещества в фармацевтическом составе по настоящему изобретению составляет от примерно 0,01% (мас./об.) до примерно 1,00% (мас./об.). В одном из примеров содержание неионного поверхностно-активного вещества составляет по меньшей мере примерно 0,01 % (мас./об.). Например, содержание неионное поверхностно-активного вещества составляет от примерно 0,01 % (масса/объем) до примерно 0,10 % (мас./об.). Например, неионное поверхностно-активное вещество содержится в концентрации примерно 0,01 % (мас./об.), или примерно 0,02 % (мас./об.), или примерно 0,03 % (мас./об.), или примерно 0,04 % (мас./об.), или примерно 0,05 % (мас./об.), или примерно 0,06 % (мас./об.), или примерно 0,07 % (мас./об.), или примерно 0,08 % (мас./об.), или примерно 0,09 % (мас./об.), или примерно 0,10 % (мас./об.). В одном из примеров, неионное поверхностно-активное вещество содержится в концентрации примерно 0,02 % (мас./об.) или примерно 0,05 % (мас./об.). Например, неионное поверхностно-активное вещество содержится в концентрации примерно 0,02 % (мас./об.). В другом примере неионное поверхностно-активное вещество содержится в концентрации примерно 0,05% (мас./об.). В одном из примеров неионное поверхностно-активное вещество содержится в концентрации от примерно 0,01 % (мас./об.) до примерно 0,03 % (мас./об.). В одном из примеров неионное поверхностно-активное вещество является полисорбатом 80 и содержится в концентрации от примерно 0,01 % (мас./об.) до примерно 0,03 % (мас./об.). В одном из примеров неионное поверхностно-активное вещество является полисорбатом 80 и содержится в концентрации примерно 0,02 % (мас./об.).

В одном из примеров фармацевтический состав содержит аминокислотный стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, треонина, фенилаланина, тирозина, серина, цистеина, гистидина, триптофана, пролина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аргинина, лизина, орнитина и аспарагина. Например, аминокислотный стабилизатор выбирают из группы, состоящей из пролина, аргинина, их солей и их комбинации. В

одном из примеров аминокислотный стабилизатор представляет собой рассматриваемую в настоящем изобретении форму соли аминокислоты.

В одном из примеров аминокислотным стабилизатором является пролин. В одном из примеров аминокислотным стабилизатором является L-пролин.

5 В одном из примеров аминокислотным стабилизатором является аргинин. В одном из примеров аминокислотным стабилизатором является L-аргинин. В одном из примеров аминокислотным стабилизатором является L-аргинин моногидрохлорид.

В одном из примеров состав включает пролин и аргинин. Например, состав включает L-пролин и L-аргинин или L-аргинин моногидрохлорид.

10 Преимущественно пролин оказывает значительное влияние на термическую стабильность и устойчивость к агрегированию (т.е. снижает склонность к агрегированию) по сравнению с фенилаланином, аргинином и сорбитом.

В одном из примеров концентрация аминокислотного стабилизатора в фармацевтическом составе по настоящему изобретению составляет от примерно 50 мМ
15 и примерно до 250 мМ. В одном из примеров аминокислотный стабилизатор содержится в концентрации от примерно 90 мМ до примерно 200 мМ. Например, аминокислотный стабилизатор содержится в концентрации примерно 90 мМ, или примерно 100 мМ, или примерно 110 мМ, или примерно 120 мМ, или примерно 130 мМ, или примерно 140 мМ, или примерно 150 мМ, или примерно 160 мМ, или
20 примерно 170 мМ, или примерно 180 мМ, или примерно 190 мМ, или примерно 200 мМ. В одном из примеров аминокислотный стабилизатор содержится в концентрации от примерно 100 мМ до примерно 160 мМ. В другом примере аминокислотный стабилизатор содержится в концентрации от примерно 90 мМ до примерно 150 мМ. Например, аминокислотный стабилизатор содержится в концентрации примерно 140
25 мМ. В другом примере аминокислотный стабилизатор содержится в концентрации примерно 150 мМ.

Обсуждение вышеуказанных концентраций также относится к солевой форме аминокислотного стабилизатора, и указанная в настоящем описании концентрация является концентрацией солевой формы аминокислоты, а не концентрацией самой
30 аминокислоты.

В одном из примеров состав содержит пролин в концентрации от 110 мМ и до 170 мМ, например в концентрации примерно 140 мМ или примерно 150 мМ. В другом примере состав содержит пролин в концентрации от 90 мМ до 150 мМ, например в концентрации примерно 140 мМ.

В одном из примеров состав дополнительно содержит аргинин в концентрации от 110 мМ до 170 мМ, например, в концентрации примерно 150 мМ. В другом примере состав дополнительно содержит аргинин в концентрации от 100 мМ до 160 мМ, например, в концентрации примерно 150 мМ. В одном из примеров аргинин
5 представлен в форме соли аргинина, например, аргинина моногидрохлорида, и указанная в настоящем изобретении концентрация представляет собой концентрацию формы соли аргинина, а не концентрацию самого аргинина.

В одном из примеров состав содержит пролин в концентрации от 90 мМ до 150 мМ и аргинин в концентрации от 100 мМ до 160 мМ. Например, состав содержит 140
10 мМ L-пролина и 150 мМ L-аргинина моногидрохлорида.

В одном из примеров фармацевтический состав дополнительно содержит полиол. Например, полиол выбирают из сахара, сахарного спирта и сахарной кислоты (т.е. альдаровой кислоты).

В одном из примеров полиол является сахаром. Например, сахар является
15 восстанавливающим или невосстанавливающим сахаром. В одном из примеров полиол является невосстанавливающим сахаром, выбранным из группы, состоящей из фруктозы, маннозы, мальтозы, лактозы, арабинозы, ксилозы, рибозы, рамнозы, галактозы и глюкозы. В одном из примеров полиол является восстанавливающим сахаром, выбранным из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, сорбозы,
20 мелецитозы и раффинозы.

В одном из примеров полиол представляет собой сахарный спирт. Например, сахарный спирт выбирают из группы, состоящей из маннита, ксилита, эритрита, треитола, сорбита и глицерина. В одном из примеров сахарный спирт представляет собой сорбит.

25 В одном из примеров полиол представляет собой сахарную кислоту, такую как L-глюконовая кислота и ее металлическую соль.

В одном из примеров концентрация полиола в фармацевтическом составе по настоящему изобретению составляет от примерно 50 мМ до примерно 250 мМ. В одном из примеров полиол содержится в концентрации от примерно 60 мМ до примерно 140
30 мМ. Например, полиол содержится в концентрации примерно 60 мМ, или примерно 70 мМ, или примерно 80 мМ, или примерно 90 мМ, или примерно 100 мМ, или примерно 110 мМ, или примерно 120 мМ, или примерно 130 мМ, или примерно 140 мМ. В одном из примеров полиол содержится в концентрации примерно 80 мМ.

В одном из примеров состав не содержит полиола. Например, состав не содержит сахара, сахарного спирта или сахарной кислоты.

В одном из примеров состав не содержит соли. Например, состав не содержит, например, хлорида натрия, хлорида кальция и/или хлорида калия. Обсуждение вышеизложенного не относится к предусмотренной в настоящем изобретении солевой форме аминокислот.

В одном из примеров состав имеет динамическую (то есть полную) вязкость, составляющую менее примерно 30 мПа•с при 20°C. Например, состав имеет динамическую вязкость примерно 30 мПа•с, или примерно 28 мПа•с, или примерно 26 мПа•с, или примерно 24 мПа•с, или примерно 22 мПа•с, или примерно 20 мПа•с при 20°C. В одном из примеров состав имеет динамическую (то есть полную) вязкость менее примерно 20 мПа•с при 20°C. Например, состав имеет динамическую вязкость примерно 20 мПа•с, или примерно 19 мПа•с, или примерно 18 мПа•с, или примерно 17 мПа•с, или примерно 16 мПа•с, или примерно 15 мПа•с при 20°C. В одном из примеров состав имеет динамическую вязкость менее примерно 15 мПа•с при 20°C. Например, состав имеет динамическую вязкость примерно 15 мПа•с, или примерно 14 мПа•с, или примерно 13 мПа•с, или примерно 12 мПа•с, или примерно 11 мПа•с, или примерно 10 мПа•с при 20°C. В одном из примеров состав имеет динамическую вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C. Например, состав имеет динамическую вязкость примерно 10 мПа•с, или примерно 9, или примерно 8 мПа•с, или примерно 7 мПа•с, или примерно 6 мПа•с, или примерно 5 мПа•с, или примерно 4 мПа•с, или примерно 3 мПа•с, или примерно 2 мПа•с при 20°C. В одном из примеров состав имеет динамическую вязкость от примерно 3,0 мПа•с до примерно 4,0 мПа•с при 20°C. Например, состав имеет динамическую вязкость около 3,3 мПа•с при 20°C. В другом понимании состав имеет динамическую вязкость от примерно 8,0 мПа•с до примерно 10,0 мПа•с при 20°C. Например, состав имеет динамическую вязкость около 8,9 мПа•с при 20°C. В одном из примеров состав имеет динамическую вязкость около 9 мПа•с при 20°C.

В одном из примеров состав содержит белок или антитело в количестве примерно 100 мг/мл и имеет динамическую вязкость менее примерно 10,0 мПа•с при 20°C. Например, такой состав имеет динамическую вязкость около 3,3 мПа•с при 20°C.

В одном из примеров состав содержит белок или антитело в количестве примерно 170 мг/мл и имеет динамическую вязкость менее примерно 10,0 мПа•с при 20°C. Например, такой состав имеет динамическую вязкость примерно 8,9 мПа•с при 20°C.

В одном из примеров состав имеет динамическую (то есть полную) вязкость менее примерно 30 мПа•с при 25°C. Например, состав имеет динамическую вязкость примерно 30 мПа•с, или примерно 28 мПа•с, или примерно 26 мПа•с, или примерно 24 мПа•с, или примерно 22 мПа•с, или примерно 20 мПа•с при 25°C. В одном из примеров

5 состав имеет динамическую (то есть полную) вязкость менее примерно 20 мПа•с при 25°C. Например, состав имеет динамическую вязкость примерно 20 мПа•с, или примерно 19 мПа•с, или примерно 18 мПа•с, или примерно 17 мПа•с, или примерно 16 мПа•с, или примерно 15 мПа•с при 25°C. В одном из примеров состав имеет динамическую вязкость менее примерно 15 мПа•с при 25°C. Например, состав имеет

10 динамическую вязкость примерно 15 мПа•с, или примерно 14 мПа•с, или примерно 13 мПа•с, или примерно 12 мПа•с, или примерно 11 мПа•с, или примерно 10 мПа•с при 25°C. В одном из примеров состав имеет динамическую вязкость менее примерно 10 мПа•с при 25°C. Например, состав имеет динамическую вязкость около 10 мПа•с, или около 9 мПа•с, или около 8 мПа•с, или около 7 мПа•с, или около 6 мПа•с, или около 5

15 мПа•с, или около 4 мПа•с, или около 3 мПа•с, или около 2 мПа•с при 25°C. В одном из примеров состав имеет динамическую вязкость от примерно 2 мПа•с до примерно 9 мПа•с при 25°C. В одном из примеров состав имеет динамическую вязкость от примерно 1,0 мПа•с до примерно 3,0 мПа•с при 25°C. Например, состав имеет динамическую вязкость около 2,8 мПа•с при 25°C. В общем случае состав имеет

20 динамическую вязкость от примерно 7,0 мПа•с до примерно 8,0 мПа•с при 25°C. Например, состав имеет динамическую вязкость около 7,5 мПа•с при 25°C.

В одном из примеров состав содержит белок или антитело в количестве примерно 100 мг/мл и имеет динамическую вязкость менее примерно 10,0 мПа•с при 25°C. Например, такой состав имеет динамическую вязкость около 2,8 мПа•с при 25°C.

25 В одном из примеров состав содержит белок или антитело в количестве примерно 170 мг/мл и имеет динамическую вязкость менее примерно 10,0 мПа•с при 25°C. Например, такой состав имеет динамическую вязкость около 7,5 мПа•с при 25°C.

Методы оценки вязкости могут быть известны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящем изобретении. Например, вязкость можно оценить с

30 помощью микровискозиметра, такого как вискозиметр с катящимся шариком. Вискозиметр с катящимся шариком измеряет время качения шарика через прозрачные и непрозрачные жидкости в соответствии с принципом падающего шарика Гепплера. Примером вискозиметра с катящимся шариком является микровискозиметр Anton Par Lovis 2000 M.

В одном из примеров состав имеет плотность от примерно 1,00 до примерно 1,10 г/см³ при 20°C. Например, плотность состава составляет около 1,01 г/см³, или около 1,02 г/см³, или около 1,03 г/см³, или около 1,04 г/см³, или около 1,05 г/см³, или около 1,06 г/см³, или примерно 1,07 г/см³, или примерно 1,08 г/см³, или примерно 1,09 г/см³,
 5 или примерно 1,10 г/см³ при 20°C. В одном из примеров плотность состава составляет примерно 1,04 г/см³, или примерно 1,05 г/см³, или примерно 1,06 г/см³, или примерно 1,07 г/см³. Например, плотность состава составляет около 1,06 г/см³. Методы оценки плотности состава будут понятны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящем изобретении. В одном из примеров плотность определяется с
 10 помощью плотномера, например, Mettler Toledo DA-100M Density Meter.

В одном из примеров настоящее изобретение относится к фармацевтическому составу, содержащему белок, включающий антигенсвязывающий домен, который связывается или специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой, буфер с органической кислотой, выбранный из группы, состоящей из
 15 гистидинового буфера и глутаматного буфера, аминокислотный стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из пролина, аргинина, их солей и их комбинации, полисорбата 80 в качестве неионного поверхностно-активного вещества, при этом состав имеет вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C.

В одном из примеров состав содержит белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается или специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой, гистидиновый буфер или глутаматный буфер, пролин и полисорбат 80. Например, состав содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, гистидиновый буфер, пролин и полисорбат 80. В другом примере состав
 20 содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, глутаматный буфер, пролин и полисорбат 80. Необязательно, состав дополнительно содержит аргинин или сорбит.

В настоящем изобретении предусматривают жидкий фармацевтический состав, содержащий примерно 170 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, гистидиновый буфер, полисорбат 80 и пролин в качестве стабилизатора, при этом
 30 состав имеет pH от 5,5 до 6,5 и вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C. Например, состав содержит около 20 mM L-гистидинового буфера с pH от 5,8 до 6,4, 0,02 % (мас./об.) полисорбата 80 и 140 mM или 150 mM L-пролина. В одном из примеров состав дополнительно содержит 150 mM моногидрохлорида L-аргинина. В другом примере состав дополнительно содержит 80 mM сорбита.

Настоящее изобретение предусматривает жидкий фармацевтический состав, содержащий от примерно 100 мг/мл до примерно 110 мг/мл белка, содержащего антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению, L-гистидиновый буфер, полисорбат 80 и L-пролин и L-аргинин моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, при этом состав имеет рН от 5,5 до 6,5 и вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C.

Настоящее изобретение предусматривает жидкий фармацевтический состав, содержащий от примерно 160 мг/мл до примерно 180 мг/мл белка, содержащего антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению, L-гистидиновый буфер, полисорбат 80, L-пролин и L-аргинин моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, при этом состав имеет рН от 5,5 до 6,5 и вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C.

В настоящем изобретении также предусматривают фармацевтический состав, содержащий примерно 170 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении, глутаматный буфер, полисорбат 80 и пролин в качестве стабилизатора, где состав имеет рН от 5,5 до 6,5 и вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C. Например, состав содержит примерно 100 мМ глутаматного буфера с рН 5,5, 0,05 % (мас./об.) полисорбата 80 и 150 мМ пролина.

В настоящем изобретении предусматривают фармацевтический состав с рН от 5,5 до 6,5, который содержит от примерно 160 мг/мл до примерно 180 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении, гистидиновый буфер, полисорбат 80, пролин и аргинин моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, при этом состав имеет вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C и 25°C. Например, состав имеет рН от 5,8 до 6,4 и содержит от примерно 12 до примерно 25 мМ L-гистидинового буфера, от 0,01 % до 0,03 % (мас./об.) полисорбата 80, от 110 мМ до 170 мМ L-пролина и от 110 мМ до 170 мМ L-аргинина. В одном из примеров состав содержит от 12 до 25 мМ L-гистидинового буфера с рН от 5,8 до 6,4, от 0,01 % до 0,03 % (мас./об.) полисорбата 80, от 90 мМ до 150 мМ L-пролина и от 100 мМ до 160 мМ L-аргинина. В одном из примеров осмоляльность состава составляет около 430-530 мОсм/кг, например, примерно 450 мОсм/кг. В одном из примеров антитело содержит V_H , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и V_L , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому составу, имеющему рН от 5,5 до 6,5 и содержащему около 170 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении, гистидиновый буфер, полисорбат 80,

а также пролин и аргинин в качестве стабилизаторов, при этом состав имеет вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C и 25°C. Например, состав имеет рН от 5,8 до 6,4 и содержит около 20 мМ L-гистидинового буфера, 0,02 % (масса/объем) полисорбата 80, 140 мМ L-пролина и 150 мМ L-аргинина. В одном из примеров осмоляльность

5 препарата составляет около 450 мОсм/кг. В одном из примеров антитело содержит V_H , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и V_L , включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому составу, имеющему рН от 5,5 до 6,5 и содержащему около 100 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего

10 фрагмента, описанного в настоящем изобретении, гистидиновый буфер, полисорбат 80, а также пролин и аргинин в качестве стабилизаторов, при этом состав имеет вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C и 25°C. Например, состав имеет рН от 5,8 до 6,4 и содержит от 12 до 25 мМ L-гистидинового буфера, от 0,01 до 0,03 % (масса/объем) полисорбата 80, от 110 до 170 мМ пролина и от 110 до 170 мМ аргинина. В одном из

15 примеров осмоляльность препарата составляет около 430 мОсм/кг. В одном из примеров антитело содержит V_H , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и V_L , включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому составу, содержащему

20 около 100 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении, гистидиновый буфер с рН от 5,5 до 6,5, полисорбат 80, а также пролин и аргинин в качестве стабилизаторов, при этом состав имеет вязкость менее примерно 5 мПа•с при 20°C и 25°C. Например, состав содержит примерно 20 мМ гистидинового буфера с рН от 5,8 до 6,4, 0,02 % (масса/объем) полисорбата 80, 140 мМ

25 пролина и 150 мМ аргинина. В одном из примеров осмоляльность состава составляет около 430 мОсм/кг. В одном из примеров антитело содержит V_H , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и V_L , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому составу, имеющему рН

30 от 5,5 до 6,5 и содержащему примерно от 100 мг/мл до примерно 170 мг/мл белка, содержащего антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем изобретении, гистидиновый буфер, полисорбат 80, а также пролин и аргинин моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, при этом состав имеет вязкость менее примерно 30 мПа•с при 20°C, причем белок содержит V_H , включающую аминокислотную последовательность,

указанную в SEQ ID NO: 5, и V_L , включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6. Например, состав имеет pH от 5,8 до 6,4 и содержит около 20 mM L-гистидинового буфера, 0,02% (масса/объем) полисорбата 80, 140 mM L-пролина и 150 mM L-аргинина моногидрохлорида. В одном из примеров осмоляльность

5 состава составляет от примерно 430 до примерно 450 мОсм/кг.

В настоящем изобретении также предусмотрен фармацевтический состав, имеющий pH от 5,5 до 6,5 и содержащий от примерно 100 мг/мл до примерно 170 мг/мл белка, включающего антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению, гистидиновый буфер, полисорбат 80, а также пролин и аргинин моногидрохлорид в

10 качестве стабилизаторов, при этом состав имеет вязкость менее примерно 30 мПа•с при 20°C, причем белок содержит:

(i) V_H , включающую CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16; и CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и

15 (ii) V_L , включающую CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; и CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

В одном из примеров состав с высокой концентрацией по настоящему изобретению является стабильным составом. Например, состав физически и/или

20 термически стабилен.

В одном из примеров состав по настоящему изобретению представляет собой жидкий состав. Например, состав является водным составом.

В одном из примеров состав предварительно не подвергался лиофилизации. В одном из примеров состав не является восстановленным составом. Например, состав

25 представляет собой жидкий состав.

Методы оценки термической стабильности известны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящем изобретении. В одном из примеров устойчивость к термической агрегации определяют с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF – differential scanning fluorimetry). Например,

30 изменения присущей белку флуоресценции отслеживают в диапазоне температур (например, 20–95°C; при скорости повышения температуры, например, 0,5°C/мин) для определения средней точки теплового перехода (T_m ; температура плавления) и температуры начала плавления (T_{onSet}). Также отслеживают статическое светорассеяние при 266 нм и 473 нм для определения температуры начала агрегации (T_{agg}).

В одном из примеров T_m состава, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, составляет от примерно 55,0°C до примерно 70,0°C, например, от примерно 59°C до примерно 67°C. Например, T_m состава составляет примерно 59,0°C, или примерно 60,0°C, или примерно 61,0°C, или примерно 62,0°C, или примерно 63,0°C, или примерно 64,0°C, или примерно 65,0°C, или примерно 66,0°C или примерно 67°C.

В одном из примеров T_{onSet} состава, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, находится в диапазоне от примерно 55,0°C до примерно 70,0°C, например, от примерно 58,0°C до 63,0°C. Например, T_{onSet} состава составляет примерно 58,0°C, или примерно 59,0°C, или примерно 60,0°C, или примерно 61,0°C, или примерно 62,0°C, или примерно 63,0°C.

В одном из примеров T_{agg} состава, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии при 266 нм, находится в диапазоне от примерно 56,0°C до примерно 65,0°C. Например, T_{agg} состава при 266 нм составляет примерно 56,0°C, или примерно 57,0°C, или примерно 58,0°C, или примерно 60,0°C, или примерно 61,0°C, или примерно 62,0°C, или примерно 63,0°C, или примерно 64,0°C, или примерно 65,0°C.

В одном из примеров T_{agg} состава, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии при 473 нм, составляет от примерно 58,0°C до примерно 64,0°C. Например, T_{agg} состава при 473 нм составляет примерно 58,0°C, или примерно 60,0°C, или примерно 61,0°C, или примерно 62,0°C, или примерно 63,0°C, или примерно 64,0°C.

В одном из примеров образование агрегатов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (т.е. распределение частиц по размерам) оценивают с помощью динамического рассеяния света (DLS – dynamic light scattering). Например, измеряют флуктуацию интенсивности света с помощью цифрового коррелятора (например, программного обеспечения Malvern Zetasizer) и определяют Z-средний гидродинамический диаметр и индекс полидисперсности (с использованием, например, анализа кумулянтов). В одном из примеров буфер с органической кислотой существенно не изменяет (т.е. не увеличивает или не уменьшает) Z-средний гидродинамический диаметр антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Стабильность состава можно также оценить путем измерения общего содержания агрегатов и/или мономеров. Методы оценки накопления агрегатов и мономеров в составе очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящем

изобретении. В одном из примеров общий процент агрегатов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в составе определяют с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC или SE-HPLC). В другом примере процентное содержание мономера антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в составе определяют с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC или SE-HPLC). Например, состав по настоящему изобретению содержит не менее 90% мономерного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или менее (т.е. не более) 10 % агрегата и/или разрушенного (например, фрагментированного) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном из примеров состав по настоящему изобретению содержит не менее 95% мономерного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или менее (т. е. не более) 5% агрегата и/или разрушенного (например, фрагментированного) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном из примеров состав содержит менее примерно 10% от общего количества агрегатов антитела. Например, состав содержит менее примерно 10%, или менее примерно 9%, или менее примерно 8%, или менее примерно 7%, или менее примерно 6%, или менее примерно 5%, или менее примерно 4% или менее примерно 3%, или менее примерно 2%, или менее примерно 1% от общего количества агрегатов. Например, агрегаты в составе являются частицами с высокой молекулярной массой и/или разрушенными антителами или их антигенсвязывающими фрагментами.

В одном из примеров состав содержит от примерно 0,5% до примерно 3,0% общего количества агрегатов после 4-5 недель хранения при 5°C. Например, состав содержит примерно 0,5%, или примерно 1,0%, или примерно 1,5%, или примерно 2,0%, или примерно 2,5%, или примерно 3,0% от общего количества агрегатов после 4-5 недель хранения при 5°C. В одном из примеров состав содержит от примерно 1,5% до примерно 2,0% общего количества агрегатов после 4-5 недель хранения при 5°C. Например, состав содержит около 1,7 % от общего количества агрегатов после 4-5 недель хранения при 5°C.

В одном из примеров состав содержит менее примерно 10% от общего количества агрегатов антитела после 24 месяцев хранения при 5°C. Например, состав содержит менее примерно 10%, или менее примерно 9%, или менее примерно 8%, или менее примерно 7%, или менее примерно 6%, или менее примерно 5%, или менее примерно 4% или менее примерно 3%, или менее примерно 2%, или менее примерно 1% от общего количества агрегатов после 24 месяцев хранения при 5°C. В одном из примеров

состав содержит от примерно 1,5% до примерно 2,0% общего количества агрегатов после 24 месяцев хранения при 5°C. Например, состав содержит около 2,0% от общего количества агрегатов после 24 месяцев хранения при 5°C. Например, агрегаты в составе являются частицами с высокой молекулярной массой и/или разрушенными антителами или их антигенсвязывающими фрагментами.

В одном из примеров состав содержит от примерно 2,0% до примерно 7,0% общего количества агрегатов после 4-5 недель хранения при температуре 35-40°C. Например, состав содержит примерно 2,0% или примерно 2,5%, или примерно 3,0%, или примерно 3,5%, или примерно 4,0%, или примерно 4,5%, или примерно 5,0%, или примерно 5,5%, или примерно 6,0%, или примерно 6,5%, или примерно 7,0 от общего количества агрегатов антитела после 4-5 недель хранения при 35-40°C.

В одном из примеров состав содержит менее примерно 10% от общего количества агрегатов антитела после 24 месяцев хранения при 25°C. Например, состав содержит менее примерно 10%, или менее примерно 9%, или менее примерно 8%, или менее примерно 7%, или менее примерно 6%, или менее примерно 5%, или менее примерно 4% или менее примерно 3%, или менее примерно 2%, или менее примерно 1% от общего количества агрегатов после 24 месяцев хранения при 5°C. В одном из примеров состав содержит от примерно 1,5% до примерно 3,5% общего количества агрегатов после 24 месяцев хранения при 25°C. Например, состав содержит около 3,1% общего количества агрегатов после 24 месяцев хранения при 25°C. Например, агрегаты в составе являются частицами с высокой молекулярной массой и/или разрушенными антителами или их антигенсвязывающими фрагментами.

В одном из примеров состав содержит менее примерно 10% от общего количества агрегатов антитела после 36 месяцев хранения при 25°C. Например, состав содержит менее примерно 10%, или менее примерно 9%, или менее примерно 8%, или менее примерно 7%, или менее примерно 6%, или менее примерно 5%, или менее примерно 4% или менее примерно 3% после 36 месяцев хранения при 25°C. В одном из примеров состав содержит от примерно 1% до примерно 5% общего количества агрегатов после 24 месяцев хранения при 25°C. Например, состав содержит примерно 2,4% общего количества агрегатов после 24 месяцев хранения при 25°C. Например, агрегаты в составе являются частицами с высокой молекулярной массой и/или разрушенными антителами или их антигенсвязывающими фрагментами.

В одном из примеров по меньшей мере около 90% антител в составе представляют собой мономер. Например, по меньшей мере примерно 90%, или

примерно 91%, или примерно 92%, или примерно 93%, или примерно 94%, или примерно 95%, или примерно 96%, или примерно 97%, или примерно 98%, или примерно 99% или примерно 99,5% антитела в составе представляют собой мономер. В одном из примеров по меньшей мере примерно 95% антител в составе являются мономером.

В одном из примеров по меньшей мере примерно 95% антител в составе представляют собой мономер после 4-5 недель хранения при 5°C. Например, по меньшей мере примерно 95%, или примерно 95,5%, или примерно 96%, или примерно 96,5%, или примерно 97%, или примерно 97,5%, или примерно 98%, или примерно 98,5%, или примерно 99%, или примерно 99,5% антител в препарате представляет собой мономер после 4-5 недель хранения при 5°C. В одном из примеров от примерно 98% до примерно 99% антитела в составе представляют собой мономер после 4-5 недель хранения при 5°C. Например, около 98,3% антител в составе представляют собой мономер после 4-5 недель хранения при 5°C. В одном из примеров около 98% антител в препарате представляют собой мономер после 24 месяцев хранения при 5°C.

В одном из примеров по меньшей мере примерно 92% антител в составе представляет собой мономер после 4-5 недель хранения при 35-40°C. Например, по меньшей мере примерно 92%, или примерно 92,5%, или примерно 93%, или примерно 93,5%, или примерно 94%, или примерно 94,5%, или примерно 95%, или примерно 95,5%, или примерно 96%, или примерно 96,5%, или примерно 97%, или примерно 97,5%, или примерно 98%, или примерно 98,5%, или примерно 99%, или примерно 99,5% антитела в препарате представляют собой мономер после 4-5 недель хранения при 35-40°C.

В одном из примеров по меньшей мере примерно 96% антител в составе представляет собой мономер после 24 месяцев хранения при 25°C. Например, по меньшей мере примерно 96%, или примерно 96,5%, или примерно 97%, или примерно 97,5%, или примерно 98%, или примерно 98,5%, или примерно 99%, или примерно 99,5% антитела в составе представляют собой мономер после 24 месяцев хранения при 25°C. Например, примерно 96,9% антител в составе представляют собой мономер после 24 месяцев хранения при 25°C.

В одном из примеров осмоляльность состава составляет от примерно 150 мОсм/кг до примерно 550 мОсм/кг. Например, осмоляльность препарата составляет примерно 150 мОсм/кг, или примерно 175 мОсм/кг, или примерно 200 мОсм/кг, или примерно 225 мОсм/кг, или примерно 250 мОсм/кг, или примерно 275 мОсм/кг, или примерно

300 мОсм/кг, или примерно 325 мОсм/кг, или примерно 350 мОсм/кг, или примерно 375 мОсм/кг, или примерно 400 мОсм/кг, или примерно 425 мОсм/кг, или примерно 450 мОсм/кг, или примерно 475 мОсм/кг, или примерно 500 мОсм/кг, или примерно 550 мОсм/кг. В одном из примеров осмоляльность состава составляет от примерно 400 мОсм/кг до примерно 550 мОсм/кг. Например, осмоляльность состава составляет примерно 400 мОсм/кг, или примерно 410 мОсм/кг, или примерно 420 мОсм/кг, или примерно 430 мОсм/кг, или примерно 440 мОсм/кг, или примерно 450 мОсм/кг, или примерно 460 мОсм/кг, или примерно 470 мОсм/кг, или примерно 480 мОсм/кг, или примерно 490 мОсм/кг, или примерно 500 мОсм/кг, или примерно 550 мОсм/кг. В одном из примеров осмоляльность составляет от примерно 400 мОсм/кг до примерно 500 мОсм/кг. Например, осмоляльность составляет примерно 430 мОсм/кг. В одном из примеров осмоляльность состава составляет примерно 450 мОсм/кг.

В одном из примеров в настоящем изобретении предусматривают фармацевтический состав по настоящему изобретению для применения при лечении или профилактике заболевания или состояния у субъекта.

В одном из примеров настоящего изобретения предусматривают фармацевтический состав по настоящему изобретению для применения в качестве антагониста активности фактора XII и/или активированного фактора XII у субъекта.

В одном из примеров в настоящем изобретении предусматривают фармацевтический состав по настоящему изобретению для применения в качестве антагониста активации фактора XII и/или активированного фактора XII у субъекта.

В настоящем изобретении также предусматривает способ лечения или профилактики заболевания или состояния у субъекта, включающий введение высококонцентрированного состава по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предложен способ антагонистической активности фактора XII и/или активированного фактора XII у субъекта, включающий введение высококонцентрированного состава по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предложен способ противодействия активации фактора XII и/или активированного фактора XII у субъекта, включающий введение высококонцентрированного состава по настоящему изобретению.

В одном из примеров настоящего изобретения предусматривают применение фармацевтического состава по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или состояния у субъекта.

В одном из примеров настоящего изобретения предусматривают применение фармацевтического состава по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для противодействия активации фактора XII и/или активированного фактора XII у субъекта.

5 В одном из примеров субъект нуждается в лечении фармацевтическим составом по настоящему изобретению (т.е. нуждается в нем).

В одном из примеров заболевание или состояние представляет собой тромботическое расстройство, воспалительное расстройство и/или
10 тромбовоспалительное заболевание. Например, у субъекта имеется тромботическое заболевание, воспалительное заболевание и/или тромбовоспалительное заболевание, или у него риск развития такого заболевания.

В одном из примеров у субъекта имеется тромботическое заболевание, воспалительное заболевание и/или тромбовоспалительное заболевание. В одном из
15 примеров у субъекта диагностировано тромботическое заболевание, воспалительное заболевание и/или тромбовоспалительное заболевание. В одном из примеров у субъекта лечат тромботическое расстройство, воспалительное расстройство и/или тромбо-воспалительное расстройство.

В одном из примеров любого способа, описанного в настоящем изобретении, фармацевтический состав по настоящему изобретению вводят до или после развития
20 заболевания или состояния, например, тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства. В одном из примеров любого способа, описанного в настоящем изобретении, фармацевтический состав по настоящему изобретению вводят до развития заболевания или состояния. В одном из
25 примеров любого способа, описанного в настоящем изобретении, фармацевтический состав по настоящему изобретению вводят после развития заболевания или состояния.

В одном из примеров фармацевтический состав вводят до или после появления симптомов заболевания или состояния, например, тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства. В одном из
30 примеров фармацевтический состав вводят до появления симптомов заболевания или состояния, например, тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства. В одном из примеров фармацевтический состав вводят в дозе, которая облегчает или уменьшает один или несколько симптомов заболевания или состояния, например, тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства.

Симптомы тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства очевидны специалисту в данной области техники и зависят от состояния пациента. К примерам симптомов состояния или расстройства относятся, например:

- 5
 - Рецидивирующая инфекция,
 - Воспаление суставов,
 - Мышечная слабость,
 - Сыпь или изменение цвета кожи,
 - Отек, особенно на конечностях (например, на ногах или руках, включая ступни
- 10 и кисти рук) или глазах,
 - Боль в животе,
 - Боль, отек и болезненность в области заболевания,
 - Тупая или сильная боль в области заболевания,
 - Разогрев кожи в области тромба,
- 15
 - Покраснение кожи,
 - Грудная боль,
 - Затрудненное дыхание (например, одышка и/или стеснение в груди),
 - Внезапная потеря прочности в одной руке или ноге,
 - Тошнота,
- 20
 - Усталость,
 - Гематурия,
 - Частичный или полный паралич,
 - Плохие когнитивные способности.

В одном из примеров тромботическое расстройство, воспалительное расстройство и/или тромбовоспалительное расстройство выбирают из группы, состоящей из образования венозных, артериальных или капиллярных тромбов (таких как инсульт, инфаркт миокарда, тромбоз глубоких вен (ТГВ), тромбоз воротной вены, тромбоз почечной вены, тромбоз яремной вены, тромбоз мозгового синуса, синдром Бадда-Киари, болезнь Педжета-Шреттера или тихая ишемия головного мозга),

30 тромбообразование в сердце, тромбоэмболия, тромбообразование при и/или после контакта крови человека или животного с искусственными поверхностями, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови (ДВС), мерцательная аритмия, острый коронарный синдром (ОКС), атеросклеротическая болезнь, ишемический инсульт с реперфузией, заболевание, связанное с ишемическим

реперфузионным повреждением (ИРП, например, травма, трансплантация органа), нейротравматическое расстройство (например, черепно-мозговая травма, повреждение спинного мозга), неврологическое воспалительное заболевание (например, рассеянный склероз), интерстициальное заболевание легких (например, идиопатический легочный фиброз (ИЛФ)), пневмония, фибринолиз, заболевание, связанное с FXII/FXIIa-индуцированным образованием кининов (например, наследственный ангионевротический отек (НАО)), сепсис, заболевание, связанное с FXII/FXIIa-опосредованной активацией комплемента, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), трансплантация органов и клеток, серповидно-клеточная анемия и состояние, связанное с повышенной проницаемостью сосудов, фибринолиз, и состояние, связанное с повышенной проницаемостью сосудов.

В одном из примеров заболевание или состояние представляет собой венозный, артериальный или капиллярный тромб. Например, венозный или артериальный тромб связан с заболеванием или состоянием, выбранным из группы, состоящей из инсульта, инфаркта миокарда, тромбоза глубоких вен (ТГВ), тромбоза воротной вены, тромбоза тромбоземболии, тромбоза почечной вены, тромбоза яремной вены, тромбоза церебрального венозного синуса, синдрома Бадда-Киари, тихой ишемии головного мозга и болезни Педжета-Шреттера.

В одном из примеров заболевание или состояние представляет собой тромбообразование во время и/или после контакта крови субъекта с искусственными поверхностями. В одном из примеров образование тромба происходит во время и/или после контакта крови субъекта-человека или животного с искусственными поверхностями во время и/или после медицинской процедуры, произведенный с субъектом, причем состав по настоящему изобретению вводят до и/или во время и/или после указанной медицинской процедуры. В одном из примеров образование тромба происходит во время и/или после контакта крови субъекта, человека или животного, с искусственными поверхностями во время и/или после медицинской процедуры, выполненной на субъекте, причем состав по настоящему изобретению вводят до, и/или во время, и/или после указанной медицинской процедуры. Например, у пациентов с заменой клапана, стентом, чрескожным коронарным вмешательством (ЧКВ), экстракорпоральной мембранной оксигенацией (ЭКМО) или операцией по искусственному кровообращению (хирургия искусственного кровообращения).

В одном из примеров заболевание или состояние является хронической и/или острой тромбоземболией. Например, хроническая и/или острая тромбоземболия

представляет собой легочную эмболию, церебральную тромбоэмболию после образования тромба, вызванного фибрилляцией предсердий (например, профилактика инсульта при фибрилляции предсердий (SPAF – stroke prevention in atrial fibrillation)).

В одном из примеров удар является тромботическим инсультом. В другом
5 примере удар – это профилактика инсульта при мерцательной аритмии (SPAF).

В одном из примеров заболевание или состояние представляет собой ишемический инсульт с реперфузией. Например, заболевание или состояние является вторичным аспектом инсульта (например, вторичными аспектами ишемического или геморрагического инсульта).

10 В одном из примеров заболевание или состояние является нейротравматическим расстройством. Например, нейротравматическое расстройство представляет собой травматическое повреждение центральной нервной системы (ЦНС), включая повреждение спинного мозга и черепно-мозговую травму. В одном из примеров
заболевание или состояние представляет собой травму спинного мозга. В общем
15 примере болезнь или состояние представляет собой черепно-мозговую травму.

В одном из примеров заболевание или состояние представляет собой ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП). Например, ИРП вызвано естественным явлением (например, восстановлением кровотока после инфаркта миокарда), травмой или одной или несколькими хирургическими процедурами
20 (например, трансплантацией органов) или другими терапевтическими вмешательствами, которые восстанавливают кровоток к ткани или органу, подвергшимся уменьшенному кровоснабжению. Такие хирургические процедуры могут включать, например, аортокоронарное шунтирование, коронарную ангиопластику, хирургию по пересадке органов, плановую хирургию,
25 реконструктивную хирургию, сосудистую хирургию, кардиохирургию, травматологическую хирургию, хирургию в случае аварии или раздавливания, хирургию рака, ортопедическую хирургию, трансплантацию или малоинвазивную хирургию. В одном из примеров хирургическая процедура может включать введение устройства для доставки фармакологически активного вещества, такого как
30 тромболитический агент или сосудорасширяющее средство, или устройство для механического устранения полной или частичной закупорки, например закупорки кровеносных сосудов.

В одном из примеров тромбоэмболия представляет собой тромбоэмболию легочной артерии. В общем случае тромбоэмболия – это системная эмболия. В другом

примере тромбоэмболия представляет собой хроническую тромбоэмболическую легочную гипертензию.

В одном из примеров заболевание или состояние представляет собой контактно-опосредованное тромбовоспаление.

5 В одном из примеров заболеванием или состоянием является мерцательная аритмия.

В одном из примеров заболевание или состояние представляет собой острый коронарный синдром (ОКС).

10 В одном из примеров заболевание или состояние представляет собой интерстициальное заболевание легких (ИЗЛ).

Например, интерстициальное заболевание легких является фибропролиферативным и/или идиопатическим легочным фиброзом. В одном из случаев заболевание или состояние представляет собой идиопатический легочный фиброз (ИЛФ). Например, субъект страдает идиопатическим легочным фиброзом (ИЛФ).

15

В одном из примеров заболевание или состояние представляет собой воспалительное расстройство. Например, воспалительное заболевание — это неврологическое воспалительное заболевание (или нейровоспалительное заболевание). В одном из примеров неврологическое воспалительное заболевание представляет собой травму спинного мозга (ТСМ), инсульт, черепно-мозговую травму (ЧМТ), вторичный отек головного мозга, отек центральной нервной системы, рассеянный склероз (РС), поперечный миелит или оптический нейромиелит (болезнь Девика). В одном из примеров воспалительное заболевание является пневмонией.

20

В одном из примеров заболевание или состояние представляет собой фибринолиз.

25 В одном из примеров заболевание или состояние представляет собой ангиогенез.

В одном из примеров заболевание или патологическое состояние представляет собой заболевание, связанное с FXII/FXIIa-индуцированным образованием кинина. Например, заболевание или состояние выбирают из группы, состоящей из наследственного ангионевротического отека (НАО), бактериальных инфекций легких, трипаносомных инфекций, гипотензивного шока, панкреатита, болезни Шагаса, суставной подагры, артрита, диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдрома) и сепсиса.

30

В одном из примеров заболевание или состояние представляет собой наследственный ангионевротический отек (НАО). Например, у субъекта наследственный ангионевротический отек (НАО).

5 В одном из примеров состав по настоящему изобретению вводят подкожно нуждающемуся в этом субъекту. В другом примере состав по настоящему изобретению вводят внутривенно нуждающемуся в этом субъекту.

В одном из примеров состав по настоящему изобретению предназначен для самостоятельного введения.

10 В одном из примеров состав по настоящему изобретению предназначен для самостоятельного подкожного введения.

В одном из примеров состав по настоящему изобретению предусмотрен в предварительно заполненном шприце.

15 В одном из примеров состав по настоящему изобретению предназначен для самостоятельного подкожного введения и содержится в предварительно заполненном шприце.

В одном из примеров описанного любого из способов по настоящему изобретению субъектом является млекопитающее, например, примат, например, человек.

20 Способы лечения, описанные в настоящем изобретении, могут дополнительно включать введение дополнительного соединения для уменьшения, лечения или предотвращения эффекта тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства.

25 В настоящем изобретении предусматривают набор, содержащий по меньшей мере один фармацевтический состав по настоящему изобретению, упакованный с инструкциями по применению в отношении антагонистической активности и/или антагонистической активации фактора XII и/или его активированной формы у субъекта. Необязательно набор также содержит дополнительное терапевтически активное соединение или лекарство.

30 В настоящем изобретении также предусматривают набор, содержащий по меньшей мере один фармацевтический состав по настоящему изобретению, упакованный с инструкциями по применению для лечения или профилактики расстройства у субъекта. Необязательно набор также содержит дополнительное терапевтически активное соединение или лекарство.

В настоящем изобретении также предусматривают набор, содержащий по меньшей мере один фармацевтический состав по настоящему изобретению, упакованный с инструкциями по введению конъюгата или состава субъекту, который болеет или подвергается риску заболевания, необязательно в комбинации с

5 дополнительным терапевтически активным соединением или лекарственным средством.

В одном из примеров лекарственная форма находится во флаконе, шприце или автоинжекторе. Например, шприц предусматривают в виде предварительно заполненного шприца.

10 В настоящем изобретении предусматривают флакон, содержащий фармацевтический состав по настоящему изобретению. Например, флакон одноразовый.

Настоящее изобретение предусматривает шприц, содержащий фармацевтический состав по настоящему изобретению.

15 В настоящем изобретении также предложено автоинжекторное устройство, содержащее фармацевтический состав по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение предусматривает предварительно заполненный шприц, содержащий фармацевтический состав, включающий примерно 170 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении,

20 гистидиновый буфер с pH от 5,5 до 6,5, полисорбат 80 и пролин и аргинин моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, причем состав имеет вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C и 25°C. Например предварительно заполненный шприц содержит состав, содержащий от 12 mM до 25 mM гистидинового буфера с pH от 5,8 до 6,4, от 0,01% до 0,03% (масса/объем) полисорбата 80, от 110 mM до 170 mM пролина и

25 от 110 mM до 170 mM аргинина. В одном из примеров осмоляльность состава равна примерно 450 мОсм/кг. В одном из примеров антитело содержит V_H , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и V_L , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6. В одном из примеров объем предварительно заполненного шприца составляет от 0,5 мл

30 до 2 мл.

Настоящее изобретение предусматривает предварительно заполненный шприц, содержащий фармацевтический состав, включающий примерно от 160 мг/мл до 180 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении, гистидиновый буфер с pH от 5,5 до 6,5, полисорбат 80 и пролин и аргинин

моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, причем состав имеет вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C и 25°C. Например предварительно заполненный шприц содержит состав, содержащий от 12 мМ до 25 мМ гистидинового буфера с pH от 5,8 до 6,4, от 0,01% до 0,03% (масса/объем) полисорбата 80, от 90 мМ до 150 мМ пролина и от 100 мМ до 160 мМ аргинина. В одном из примеров осмоляльность состава равна примерно от 430 до 530 мОсм/кг. В одном из примеров антитело содержит V_H , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и V_L , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6. В одном из примеров объем предварительно заполненного шприца составляет от 0,5 мл до 2 мл.

Настоящее изобретение предусматривает предварительно заполненный шприц, содержащий фармацевтический состав, включающий примерно 170 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении, гистидиновый буфер с pH от 5,5 до 6,5, полисорбат 80, а также пролин и аргинин моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, причем состав имеет вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C и 25°C. Например предварительно заполненный шприц содержит состав, содержащий примерно 20 мМ гистидиновый буфер с pH от 5,8 до 6,4, 0,02% (масса/объем) полисорбата 80, 140 мМ пролина и 150 мМ аргинина. В одном из примеров осмоляльность состава равна примерно 450 мОсм/кг. В одном из примеров антитело содержит V_H , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и V_L , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6. В одном из примеров объем предварительно заполненного шприца составляет от 0,5 мл до 2 мл.

Настоящее изобретение предусматривает флакон, содержащий фармацевтический состав, включающий примерно 100 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении, гистидиновый буфер с pH от 5,5 до 6,5, полисорбат 80, а также пролин и аргинин моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, причем состав имеет вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C и 25°C. Например флакон содержит состав, включающий примерно от 12 до 25 мМ гистидиновый буфер с pH от 5,8 до 6,4, от 0,01 до 0,03% (масса/объем) полисорбата 80, от 90 до 150 мМ пролина и от 100 до 160 мМ аргинина. В одном из примеров осмоляльность состава составляет примерно 450 мОсм/кг. В одном из примеров антитело содержит V_H , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и V_L , включающую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6. В одном из примеров объем флакона составляет 2 мл.

Настоящее изобретение предусматривает флакон, содержащий фармацевтический состав, включающий примерно 100 мг/мл антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем изобретении, гистидиновый буфер с pH от 5,5 до 6,5, полисорбат 80, а также пролин и аргинин моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, причем состав имеет вязкость менее примерно 5 мПа•с при 20°C и 25°C. Например флакон содержит состав, включающий примерно 20 мМ гистидиновый буфер с pH от 5,8 до 6,4, 0,02% (масса/объем) полисорбата 80, 140 мМ пролина и 150 мМ аргинина. В одном из примеров осмоляльность состава составляет примерно 450 мОсм/кг. В одном из примеров антитело содержит V_H , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и V_L , включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6. В одном из примеров объем флакона составляет 2 мл.

Типичные результаты действия фармацевтического состава по настоящему изобретению представлены в настоящем описании и должны применяться с соответствующими изменениями в отношении примеров по настоящему изобретению, изложенных в предыдущих абзацах.

Пояснение к перечню последовательностей

- SEQ ID NO: 1 аминокислотная последовательность 3F7 V_H
- SEQ ID NO: 2 аминокислотная последовательность 3F7 V_L
- SEQ ID NO: 3 аминокислотная последовательность 3F7G V_H
- SEQ ID NO: 4 аминокислотная последовательность 3F7G V_L
- SEQ ID NO: 5 аминокислотная последовательность 3F7 V_H со зрелой аффинностью
- SEQ ID NO: 6 аминокислотная последовательность 3F7 V_L со зрелой аффинностью
- SEQ ID NO: 7 аминокислотная последовательность 3F7 V_H CDR1
- SEQ ID NO: 8 аминокислотная последовательность 3F7 V_H CDR2
- SEQ ID NO: 9 аминокислотная последовательность 3F7 V_H CDR3
- SEQ ID NO: 10 аминокислотная последовательность 3F7 вариант V_H CDR2
- SEQ ID NO: 11 аминокислотная последовательность 3F7 вариант V_H CDR3
- SEQ ID NO: 12 аминокислотная последовательность 3F7 V_L CDR1
- SEQ ID NO: 13 аминокислотная последовательность 3F7 V_L CDR2

SEQ ID NO: 14 аминокислотная последовательность 3F7 V_L CDR3

SEQ ID NO: 15 аминокислотная последовательность 3F7 вариант V_L CDR3

SEQ ID NO: 16 аминокислотная последовательность V_H CDR2 антитела 3F7 со зрелой аффинностью

5 SEQ ID NO: 17 аминокислотная последовательность от фактора XII человека

Подробное описание изобретения

Общие положения

В данном описании, если специально не указано иное или если контекст не требует иного, ссылка на одну стадию, компонент состава, группу стадий или группу
10 компонентов составов следует понимать как охватывающую один и множество (т.е. одного представителя или несколько) из этих стадий, составов, групп стадий или групп компонентов составов.

Специалистам в данной области известно, что настоящее изобретение допускает вариации и модификации, отличные от конкретно описанных. Следует учитывать, что
15 настоящее изобретение включает все подобные варианты и модификации. Настоящее изобретение также включает все стадии, свойства, составы и соединения, упомянутые или указанные в данном описании, по отдельности или вместе, а также все любые комбинации или любые две или более из указанных стадий или свойств.

Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными
20 примерами, приведенными в настоящем описании, которые предназначены только для иллюстрации. Функционально эквивалентные продукты, композиции и способы очевидно входят в рамки охвата настоящего изобретения.

Любой пример по настоящему изобретению, приведенный в настоящем описании, следует рассматривать как применимый с соответствующими изменениями к любому
25 другому примеру по настоящему изобретению, если специально не указано иное. То есть, любой конкретный пример в настоящем описании может быть объединен с любым другим конкретным примером (за исключением взаимоисключающих).

Любой пример по настоящему изобретению, раскрывающий конкретное свойство, или группу свойств, или способ, или стадии способа, будет учитываться для
30 обеспечения однозначной поддержки отказа от конкретного свойства или группы свойств, или способа, или стадий способа.

Если специально не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, должны иметь то же значение, которое обычно

понимается специалистом в данной области (например, в области культуры клеток, молекулярной генетики, иммунологии, иммуногистохимии, химии белков и биохимии).

Если не указано иное, рекомбинантный белок, культура клеток и иммунологические методы, используемые в настоящем изобретении, являются стандартными процедурами, хорошо известными специалистам в данной области.

Такие методы описаны и объяснены в литературе в следующих публикациях: в кн.: «A Practical Guide to Molecular Cloning», 1984, под ред. J. Perbal, изд-во John Wiley and Sons; в кн.: J. Sambrook с соавт. «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 1989, изд-во Cold Spring Harbour Laboratory Press; в кн.: «Essential Molecular Biology: A Practical Approach», 1991, под ред. T.A. Brown, т. 1 и 2, изд-во IRL Press; в кн.: «DNA Cloning: A Practical Approach», 1995-1996, под ред. D.M. Glover и B.D. Hames, т. 1-4; в кн.: «Current Protocols in Molecular Biology», 1988 (включая все последующие дополненные издания), под ред. F.M. Ausubel с соавт., изд-во Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; в кн.: «Antibodies: A Laboratory Manual», 1988, под ред. Ed Harlow и David Lane, изд-во Cold Spring Harbour Laboratory; в кн.: «Current Protocols in Immunology», 1988 (включая все последующие дополненные издания), под ред. J.E. Coligan с соавт., изд-во John Wiley & Sons.

Описание и определения переменных областей и их частей, антител и их фрагментов, приведенных в настоящем изобретении, могут быть дополнительно разъяснены в обсуждении в кн.: Kabat «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 1987 и 1991, издание National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд.

Термин «система нумерации ЕС по Kabat» означает нумерацию тяжелой цепи антитела в соответствии с индексом ЕС, как указано в кн.: Kabat с соавт. «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 1991, 5-е издание, изд-во United States Public Health Service, National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд. Индекс ЕС основан на нумерации остатков антитела человека IgG₁ EU.

Термин «и/или», например, «X и/или Y» означает либо «X и Y», либо «X или Y», и его следует рассматривать как явную поддержку обоих значений или любого значения из них.

В настоящем описании слово «содержать» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий», означает включение указанного элемента, целого числа или стадии, или группы элементов, целых чисел или стадий, но не исключает любой другой элемент, целое число или стадию, или группы элементов, целых чисел или стадий.

В настоящем описании термин «полученный из» означает, что указанное целое число может быть получено из конкретного источника, хотя и не обязательно непосредственно из этого источника.

Отдельные определения

5 Коагуляционный фактор XII, также известный как фактор Хагемана или FXII, представляет собой белок плазмы. Это зимогенная форма фактора XIIa, фермента класса сериновых протеаз (или сериновых эндопептидаз). У человека фактор XII кодируется геном *F12*. Только в целях номенклатуры, а не ограничения, типичные последовательности фактора XII человека приведены в базе данных NCBI Reference
10 Sequence: NP_000496.2; в NCBI protein accession number NP_000496 и как SEQ ID NO: 17. Дополнительные последовательности фактора XII могут быть определены с использованием последовательностей, представленных в настоящем описании, и/или в общедоступных базах данных, и/или определены с использованием стандартных методов (например, как описано в кн.: «Current Protocols in Molecular Biology», 1988
15 (включая все последующие дополненные издания), под ред. Ausubel с соавт., изд-во Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; или в кн.: Sambrook с соавт. «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 1989, изд-во Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Используемый в настоящем изобретении термин «ингибитор фактора XII», или «FXII-ингибитор», или «ингибитор FXII» относится к ингибитору одного или обоих
20 факторов XII (до активации, т.е. его зимогена) и активированного фактора XII (FXIIa), а также к активации FXII. Таким образом, термин «ингибитор (ингибиторы) FXII» может включать ингибиторы одного или обоих факторов FXII и FXIIa (также называемого αFXIIa), а также ингибиторы активации FXII, включая продукты расщепления FXIIa, а именно FXIIa альфа и FXIIa бета (также называемый FXII_f). Ингибиторы FXII
25 охватывают функциональные варианты и фрагменты ингибитора дикого типа. Функциональный вариант или фрагмент представляет собой молекулу, которая сохраняет по меньшей мере 50% (например, около 50%, или около 60%, или около 70%, или около 80%, или около 90%, или около 95%, или около 99% или около 100%) способности молекулы дикого типа ингибировать FXII, FXIIa или активацию FXII. В
30 одном из примеров ингибиторы FXII являются не эндогенными ингибиторами; то есть они не являются ингибиторами, естественным образом встречающимися в организме человека или животного.

Термин «амидолитическая активность» относится к способности белка по настоящему изобретению катализировать гидролиз по меньшей мере одной пептидной

связи в другом полипептиде. Термин «буфер с органической кислотой» относится к обычным буферам из органических кислот и солей.

Термин «неионное поверхностно-активное вещество», используемый в настоящем изобретении, относится к любому детергенту, имеющему незаряженную полярную головку.

Термин «стабильный» состав представляет собой состав, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по существу сохраняют свою физическую стабильность, и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность при хранении.

В контексте настоящего изобретения термин «мономер» или «мономерный» относится к правильно свернутому антителу или его антигенсвязывающему фрагменту. Например, мономер антитела в соответствии с настоящим изобретением относится к стандартному тетрамерному антителу, содержащему две идентичные гликозилированные тяжелые и легкие цепи, соответственно. Тогда «агрегат» представляет собой неспецифическую ассоциацию двух молекул антител (например, высокомолекулярных соединений).

Используемый в настоящем изобретении термин «аминокислотный стабилизатор» относится к аминокислоте или ее производному, которые улучшают или иным образом повышают стабильность состава.

Используемый в настоящем изобретении термин «полиол» относится к веществу, имеющему большое количество гидроксильных групп.

Термин «динамическая вязкость» или «полная вязкость» относится к свойственному сопротивлению течению, проявляемому жидкостью при определенной температуре (например, 20°C), отношению напряжения сдвига к скорости сдвига.

Жидкость имеет динамическую вязкость в один пуаз, если сила в 1 дин/см² заставляет две параллельные поверхности жидкости площадью в один квадратный сантиметр и на расстоянии в один квадратный сантиметр друг от друга двигаться относительно друг друга со скоростью 1 см/сек. Один пуаз равен ста сантипуазам (сП), а один сантипуаз равен одному миллипаскалю за секунду (мПа•с) в единицах Международной системы единиц (СИ).

Используемый в настоящем изобретении термин «плотность» состава относится к объемной массовой плотности или массе на единицу объема (г/см³).

Используемый в настоящем изобретении термин «осмоляльность» представляет собой меру осмолей (осм) растворенного вещества на килограмм растворителя (осмоль/кг или осм/кг).

Используемый в настоящем изобретении термин «связывает» по отношению к взаимодействию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном означает, что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) на антигене. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознает и связывается с определенной белковой структурой, а не с белками вообще. Если антитело связывается с эпитопом «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп «А» (или свободного, немеченого «А»), в реакции, содержащей меченый «А» и белок, уменьшит количество меченого «А», связанного с антителом.

Используемый в настоящем изобретении термин «специфически связывается» означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент реагирует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью к конкретному антигену или клетке, экспрессирующей то же, что и альтернативные антигены или клетки. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с FXII (или FXIIa) с существенно большей аффинностью (например, в 1,5, или 2, или 5, или 10, или 20, или 40, или 60, или 80-100 раз, или в 150 или 200 раз), чем в отношении других факторов свертывания крови или антигенов, обычно распознаваемых полиреактивными природными антителами (т.е. встречающимися в природе антителами, о которых известно, что они связывают различные антигены, встречающиеся в норме у людей). Как правило, но не обязательно, ссылка на связывание означает конкретное связывание, и каждый термин следует понимать как обеспечивающий явную поддержку другого термина.

Под термином «рекомбинантный» следует понимать продукт искусственной генетической рекомбинации. Соответственно, в контексте антитела или его антигенсвязывающего фрагмента этот термин не охватывает антитело, встречающееся в природе в организме субъекта, которое является продуктом естественной рекомбинации, происходящей во время созревания В-клеток. Однако, если такое антитело выделено, его следует рассматривать как выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен антитела. Аналогичным образом, если нуклеиновая кислота, кодирующая белок, выделена и экспрессирована с использованием рекомбинантных средств, полученный белок представляет собой рекомбинантный

белок, содержащий антигенсвязывающий домен антитела. Рекомбинантный белок также включает белок, экспрессируемый искусственными рекомбинантными средствами, когда он находится внутри клетки, ткани или субъекта, например, в котором он экспрессируется.

- 5 Термин «белок» относится к одной полипептидной цепи, т.е. ряду смежных аминокислот, связанных пептидными связями, или к ряду полипептидных цепей, ковалентно или нековалентно связанных друг с другом (т.е. к полипептидному комплексу). Например, ряд полипептидных цепей может быть ковалентно связан с помощью подходящего химического соединения или дисульфидной связи. Примеры
10 нековалентных связей включают водородные связи, ионные связи, силы Ван-дер-Ваальса и гидрофобные взаимодействия.

Термин «полипептид» или «полипептидная цепь» следует понимать из предшествующего абзаца как обозначающий ряд смежных аминокислот, связанных пептидными связями.

- 15 Для целей настоящего описания термин «антитело» включает белок, способный специфически связываться с одним или несколькими близкими антигенами (например, фактором свертывания крови) благодаря антигенсвязывающему домену, содержащемуся в Fv. Этот термин включает четырехцепочечные антитела (например, две легкие цепи и две тяжелые цепи), рекомбинантные или модифицированные
20 антитела (например, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, антитела с привитыми CDR, приматизированные антитела, деиммунизированные антитела, сингуманизированные антитела, полуантитела, биспецифические антитела). Антитела могут принадлежать любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или
25 подклассу. В одном из примеров антитело является антителом грызуна (мыши или крысы) или антителом примата (например, человека). В одном из примеров в тяжелой цепи антитела отсутствует С-концевой остаток лизина. В одном из примеров антитело является гуманизированным, сингуманизированным, химерным, CDR-привитым или деиммунизированным.

- 30 «Анти-FXII антитело» означает антитела, которые связываются и/или ингибируют один или оба из зимогена FXII и активированного белка (FXIIa), включая фрагменты расщепления FXIIa альфа и FXIIa бета. В некоторых примерах антитело специфически связывается с FXIIa или фрагментами альфа- или бета-цепи FXIIa.

Используемый в настоящем изобретении термин «антитело зародышевой линии» относится к антителу, в котором некоторые или все соматические мутации, внесшие изменения в остатки каркаса, реверсированы в исходную последовательность, присутствующую в геноме, например, в геноме человека. В связи с этим не все

5 изменения должны быть реверсированы в антителе зародышевой линии.

Используемый в настоящем изобретении термин «вариабельная область» относится к частям легкой и/или тяжелой цепей антитела по настоящему изобретению, которые способны специфически связываться с антигеном, и включает аминокислотные последовательности областей, определяющих комплементарность

10 (CDR), т.е., CDRI, CDR2 и CDR3 и каркасные области (FR).

В контексте настоящего изобретения термин «области, определяющие комплементарность» (CDR, т.е. CDRI, CDR2 и CDR3) относится к аминокислотным остаткам вариабельной области антитела, присутствие которых вносит основной вклад в специфическое связывание антигена. Каждая вариабельная область обычно имеет три

15 области CDR, идентифицированные как CDRI, CDR2 и CDR3. В примерах положения аминокислот, отнесенные к CDR и FR, определяют в соответствии с публикацией Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 и 1991 (также упоминаемой в настоящем описании как «система нумерации по Kabat»). По системе нумерации Kabat V_H FR и CDR располагаются следующим

20 образом: остатки 1-30 (FR1), 31-35 (CDR1), 36-49 (FR2), 50-65 (CDR2), 66- 94 (FR3), 95-102 (CDR3) и 103-113 (FR4). Согласно системе нумерации Kabat V_L FR и CDR расположены следующим образом: остатки 1-23 (FR1), 24-34 (CDR1), 35-49 (FR2), 50-56 (CDR2), 57-88 (FR3), 89-97 (CDR3) и 98-107 (FR4).

«Каркасные области» (далее «FR») представляют собой те остатки вариабельного домена, которые не являются остатками CDR.

25

«Антигенсвязывающий фрагмент» антитела содержит одну или несколько вариабельных областей интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител, полуантитела и мультиспецифические антитела,

30 образованные из фрагментов антител.

Используемый в настоящем изобретении термин «Fv» означает любой белок, независимо от того, состоит ли он из нескольких полипептидов или одного полипептида, в котором вариабельная область легкой цепи (V_L – light chain) и вариабельная область тяжелой цепи (V_H – heavy chain) связывает и образует комплекс,

имеющий антигенсвязывающий домен, т.е. способный специфически связываться с антигеном. V_H и V_L , которые образуют антигенсвязывающий домен, могут находиться в одной полипептидной цепи или в разных полипептидных цепях. Кроме того, F_v по настоящему изобретению (а также любой белок по настоящему изобретению) может

5 иметь несколько антигенсвязывающих доменов, которые могут связывать или не связывать один и тот же антиген. Следует учитывать, что этот термин охватывает фрагменты, непосредственно полученные из антитела, а также белки, соответствующие такому фрагменту, полученному с использованием рекомбинантных средств. Примеры полипептидов или белков, содержащих F_v , включают Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент,

10 F(ab')-фрагмент, scFv, диатело, триантитело, тетратело или комплекс более высокого порядка, или любое из вышеперечисленного, связанное с константной областью, или его домен, например, домен CH2 или CH3, например, минитело. «Fab-фрагмент» состоит из моновалентного антигенсвязывающего фрагмента иммуноглобулина и может быть получен расщеплением целого антитела ферментом папаином с

15 получением фрагмента, состоящего из интактной легкой цепи и части тяжелой цепи, или может быть получен с использованием рекомбинантных средств. «Fab¹-фрагмент» антитела можно получить путем обработки целого антитела пепсином с последующим восстановлением с получением молекулы, состоящей из интактной легкой цепи и части тяжелой цепи, содержащей V_H и один константный домен. Получают два Fab'-

20 фрагмента на антитело, обработанное таким образом. Фрагмент Fab' также может быть получен рекомбинантными способами. Фрагмент F(ab')₂ антитела состоит из димера двух фрагментов Fab', соединенных вместе двумя дисульфидными связями, и его получают путем обработки целой молекулы антитела ферментом пепсином без последующего восстановления. Фрагмент «Fab₂» представляет собой рекомбинантный

25 фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных с использованием, например, лейциновой молнии или домена CH3. «Одноцепочечный F_v » или «scFv» представляет собой рекомбинантную молекулу, содержащую фрагмент вариабельной области (F_v) антитела, в котором вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи ковалентно связаны подходящим гибким полипептидным линкером.

30 Термин «кристаллизующийся фрагмент» или «Fc», или «Fc-область», или «Fc-фрагмент» (которые могут использоваться здесь взаимозаменяемо) относится к области антитела, содержащей по меньшей мере один константный домен и которая обычно (хотя и не обязательно) гликозилирована и способна связываться с одним или несколькими рецепторами Fc и/или компонентами каскада комплемента. Константная

область тяжелой цепи может быть выбрана из любого из пяти изотипов: α , δ , ϵ , γ и μ . Кроме того, тяжелые цепи разных подклассов (таких как подклассы тяжелых цепей IgG) отвечают за различные эффекторные функции, и, таким образом, путем выбора нужной константной области тяжелой цепи можно получить белки с желаемой

5 эффекторной функцией. Примерами константных областей тяжелой цепи являются гамма 1 (IgG₁), гамма 2 (IgG₂), гамма 3 (IgG₃) и гамма 4 (IgG₄) или их гибриды.

Термин «константная область», используемый в настоящем изобретении, относится к части тяжелой цепи или легкой цепи антитела, отличной от вариабельной области. В тяжелой цепи константная область обычно содержит множество

10 константных доменов и шарнирную область, например, константная область IgG содержит следующие связанные компоненты: константную тяжелую цепь (CH) CH1, линкер, CH2 и CH3. В тяжелой цепи константная область содержит Fc. В легкой цепи константная область обычно содержит один константный домен (C_L1).

Термин «стабилизированная константная область IgG₄» означает константную

15 область IgG₄, которая была модифицирована для уменьшения замены плеча Fab, или склонности к замене плеча Fab, или образования полуантитела, или склонности к образованию полуантитела. «Замена плеча Fab» относится к типу модификации белка IgG₄ человека, при котором тяжелая цепь IgG₄ и присоединенная легкая цепь (половина молекулы) заменяются на пару тяжелая-легкая цепь из другой молекулы IgG₄. Таким

20 образом, молекулы IgG₄ могут приобретать два разных плеча Fab, распознающих два разных антигена (что приводит к биспецифическим молекулам). Обмен плечами Fab происходит естественным образом *in vivo* и может быть индуцирован *in vitro* очищенными клетками крови или восстанавливающими агентами, такими как восстановленный глутатион.

Используемый в настоящем изобретении термин «моноспецифический» относится к связывающему домену, содержащему один или несколько

25 антигенсвязывающих сайтов, которые имеют одинаковую эпитопную специфичность. Таким образом, домен моноспецифического связывания может содержать один сайт связывания антигена (например, Fv, scFv, Fab и т.д.) или может содержать несколько

30 сайтов связывания антигена, которые распознают один и тот же эпитоп (например, идентичны друг другу), например, диатело или антители. Требование, чтобы область связывания была «моноспецифичной», не означает, что она связывается только с одним антигеном, поскольку несколько антигенов могут иметь общие или очень сходные эпитопы, которые могут быть связаны одним сайтом связывания антигена. О

моноспецифическом связывающем домене, который связывается только с одним антигеном, говорят, что он «исключительно связывается» с этим антигеном.

Термин «мультиспецифический» относится к связывающему домену, содержащему два или более антигенсвязывающих сайта, каждый из которых связывается с отдельным эпитопом, например, каждый из которых связывается с отдельным антигеном. Например, мультиспецифический связывающий домен может включать сайты связывания антигена, которые распознают два или более разных эпитопа одного и того же белка (например, фактора свертывания крови) или которые могут распознавать два или более разных эпитопа разных белков (т. е. разных факторов свертывания крови). В одном из примеров связывающий домен может быть «биспецифическим», то есть он включает два сайта связывания антигена, которые специфически связывают два разных эпитопа. Например, биспецифический связывающий домен специфически связывается или обладает специфичностью в отношении двух разных эпитопов одного и того же белка. В другом понимании, биспецифический связывающий домен специфически связывает два разных эпитопа на двух разных белках.

Используемый в настоящем изобретении термин «связывает» по отношению к взаимодействию соединения или его антигенсвязывающего сайта с антигеном означает, что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) на антигене. Например, антитело распознает и связывается с определенной белковой структурой, а не с белками в целом. Если антитело связывается с эпитопом «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп «А» (или свободного, немеченого «А») в реакции, содержащей меченый «А» и белок, уменьшит количество меченого «А», связанного с антителом.

Используемый в настоящем изобретении термин «специфически связывается» означает, что белок по настоящему изобретению реагирует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным антигеном или клеткой, экспрессирующей его, чем с альтернативными антигенами или клетками. Например, конъюгат, содержащий Fc антитела, которое связывается с фактором XII (например, фактором XII человека) с существенно большей аффинностью (например, в 20, 40, 60, 80, 100, 150 или 200 раз), чем воздействует на другой цитокиновый рецептор или на антигены, обычно распознаваемые полиреактивными природными антителами (т.е. встречающимися в природе антителами, о которых известно, что они связывают различные антигены, встречающиеся естественным

образом у людей). Как правило, но не обязательно, ссылка на связывание подразумевает специфическое связывание, и каждый термин следует понимать как обеспечивающий явную поддержку другого термина.

Термин «конкурентно ингибирует» следует понимать как означающий, что белок по настоящему изобретению (или его антигенсвязывающий сайт) снижает или предотвращает связывание указанного антитела или белка с фактором XII и/или фактором XIIIa. Это может быть связано с тем, что белок (или сайт связывания антигена) и антитело связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом. Из вышеизложенного следует, что белку не обязательно полностью ингибировать связывание антитела, скорее, он должен лишь снижать связывание на статистически значимую величину, например, по меньшей мере примерно на 10 %, или 20 %, или 30 %, или 40 %, или 50 %. % или 60 % или 70 % или 80 % или 90 % или 95 %.

Предпочтительно белок снижает связывание антитела по меньшей мере примерно на 30 %, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 50 %, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 70 %, еще более предпочтительно по меньшей мере примерно на 75 %, еще более предпочтительно за счет по меньшей мере примерно на 80% или 85% и еще более предпочтительно по меньшей мере примерно на 90%.

Способы определения конкурентного ингибирования связывания известны в данной области и/или описаны в настоящем изобретении. Например, антитело подвергается воздействию фактора XII в присутствии или в отсутствие белка. Если в присутствии белка связывается меньше антител, чем в отсутствие белка, считается, что белок конкурентно ингибирует связывание антитела. В одном из примеров конкурентное ингибирование не связано со стерическими затруднениями.

«Перекрывание» в контексте двух эпитопов означает, что два эпитопа имеют достаточное количество общих аминокислотных остатков, чтобы позволить белку (или его антигенсвязывающему сайту), который связывается с одним эпитопом, конкурентно ингибировать связывание белка (или сайт связывания антигена), который связывается с другим эпитопом. Например, «перекрывающиеся» эпитопы имеют по крайней мере 1, или 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10 аминокислот.

Фраза «консервативная аминокислотная замена» относится к замене или замещению аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь, и/или гидропатичность, и/или гидрофильность. В данной области определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые

цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), b-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Гидропатические индексы описаны, например, в публикации Kyte и Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 1982, 157 105-132, а гидрофильные индексы описаны, например, в US 4554101.

Используемые в настоящем изобретении термины «заболевание», «расстройство» или «состояние» относятся к нарушению нормальной функции, и их не следует ограничивать каким-либо конкретным состоянием, относящимся к заболеваниям или расстройствам.

Используемый в настоящем изобретении термин «тромботическое расстройство» относится к состоянию, которое характеризуется образованием кровяных сгустков или возможностью образования кровяных сгустков. Кровяные сгустки также называют «тромбами» или «тромбозами».

Используемый в настоящем изобретении термин «воспаление» относится к расстройству, которое характеризуется развитием воспаления или возможностью развития воспаления.

Используемый в настоящем изобретении термин «тромбо-воспалительное расстройство» относится к любому состоянию, которое характеризуется склонностью, как к воспалению, так и к тромбообразованию.

Используемая в настоящем изобретении фраза «тромботическое расстройство, воспалительное расстройство и/или тромбовоспалительное расстройство» относится к заболеваниям или состояниям, которые классифицируются как одно или несколько из тромботического расстройства, воспалительного расстройства или тромбовоспалительного расстройства.

Используемые в настоящем изобретении термины «лечение» или «лечить» включают введение белка, описанного в настоящем изобретении, для уменьшения или устранения по меньшей мере одного симптома определенного заболевания или состояния или для замедления прогрессирования заболевания или состояния.

Используемые в настоящем изобретении термины «предупреждение», «предотвращение» или «профилактика» включают обеспечение профилактики в

отношении возникновения или рецидива определенного заболевания или состояния у индивидуума.

Индивидуум может быть предрасположенным или подверженным риску развития заболевания или рецидива заболевания, но у него еще не было диагностировано заболевание или рецидив.

В настоящем изобретении субъект, «подверженный риску» развития заболевания или состояния, или его рецидива, или возможного рецидива, может иметь или не иметь поддающееся обнаружению заболевание или симптомы заболевания, а также может иметь или не иметь поддающееся обнаружению заболевание или симптомы заболевания до лечения по настоящему изобретению. Понятие «в группе риска» означает наличие у субъекта одного или нескольких факторов риска, которые представляют собой измеримые параметры, коррелирующие с развитием заболевания или состояния, как известно в данной области техники и/или описано в настоящем изобретении.

Понятие «эффективное количество» относится по меньшей мере к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата. Например, желаемый результат может быть терапевтическим или профилактическим. Эффективное количество может быть предусмотрено в виде одного или несколько введений. В некоторых примерах настоящего описания термин «эффективное количество» означает количество, необходимое для осуществления лечения заболевания или состояния, согласно описанному выше. В некоторых примерах настоящего описания термин «эффективное количество» означает количество, необходимое для изменения фактора, связанного с заболеванием или состоянием, как описано выше. Эффективное количество может варьироваться в зависимости от заболевания или состояния, подлежащего лечению, или фактора, подлежащего изменению, а также в зависимости от массы тела, возраста, расовой принадлежности, пола, состояния здоровья и/или физического состояния и других факторов, относящихся к млекопитающему, подвергаемому лечению. Как правило, эффективное количество находится в пределах относительно широкого диапазона (например, диапазона «дозировки»), который может быть определен практикующим врачом в ходе рутинных испытаний и экспериментов. Соответственно, этот термин не следует толковать как ограничивающий раскрытие определенным количеством, например, массой или числом. Эффективное количество можно вводить в виде разовой дозы или в виде дозы, повторяемой один или несколько раз в течение периода лечения.

Понятие «терапевтически эффективное количество» представляет собой по меньшей мере минимальную концентрацию, необходимую для осуществления измеримого улучшения конкретного заболевания или состояния. Терапевтически эффективное количество в настоящем изобретении может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес пациента, а также способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела или его антигенсвязывающего фрагмента перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

Используемый в настоящем изобретении термин «субъект» означает любое животное, включая человека, например млекопитающее. Типичные субъекты включают, но ими перечень не ограничивается, людей и приматов, отличных от человека. Например, субъектом является человек.

Белки фармацевтического состава

В настоящем описании обсуждается предусматриваемый в настоящем изобретении жидкий фармацевтический состав, включающий по меньшей мере 100 мг/мл белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается или специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой (т.е. активированным FXII; FXIIa).

Белки, содержащие антигенсвязывающие домены

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому составу, включающему белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается или специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой.

Например, белок содержит по меньшей мере V_H и V_L , где V_H и V_L связываются с образованием F_v , содержащим антигенсвязывающий домен.

В одном из примеров антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой и противодействует активности фактора XII и/или активированного фактора XII. Например, белок связывается или специфически связывается с фактором XII и противодействует активности фактора XII. В другом примере белок связывается или специфически связывается с активированным фактором XII (FXIIa) и противодействует активности фактора XIIa.

В одном из примеров антигенсвязывающий домен связывается или специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой и препятствует активации фактора XII и/или активированного фактора XII. Например, белок связывается или специфически связывается с фактором XII и ингибирует активацию фактора XII в фактор XIIa.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты

В одном из примеров белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается или специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой, представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Например, белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с фактором XII и/или активированным фактором XII (FXIIa). Например, белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с фактором XII. В другом примере белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с активированным фактором XII (FXIIa).

Способы получения антител известны в данной области и/или описаны в кн. «Antibodies: A Laboratory Manual», 1988, под ред. Harlow и Lane, изд-во Cold Spring Harbour Laboratory. Как правило, в таких способах фактор XII (например, hFXII) или его область (например, внеклеточный домен), или его иммуногенный фрагмент, или эпитоп, или клетка, экспрессирующая и экспонирующая его (т.е. иммуноген), необязательно вводятся в состав с любым подходящим или желательным носителем, адъювантом или фармацевтически приемлемым эксципиентом, с введением животному, но не человеку, например, мыши, курице, крысе, кролику, морской свинке, собаке, лошади, корове, козе или свинье. Иммуноген можно вводить интраназально, внутримышечно, подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутрибрюшинно или другим известным способом.

Моноклональные антитела представляют собой пример формы антитела, рассматриваемого в настоящем изобретении. Термин «моноклональное антитело» или «mAb – monoclonal antibody» относится к гомогенной популяции антител, способных связываться с одним и тем же антигеном (антигенами), например, с одним и тем же эпитопом внутри антигена. Этот термин не предназначен для ограничения в отношении источника антитела или способа его получения.

Для получения mAb можно использовать любой из ряда известных методов, например, приведенных в качестве примера в US 4196265 или в публикации Harlow и Lane (1988), см. выше.

В другом варианте технологию ABL-MYC (NeoClone, Madison WI 53713, USA) используют для получения клеточных линий, секретирующих MAb (например, как описано в публикации Largaespada с соавт., *J. Immunol. Methods.*, 1996, 197: 85-95).

Антитела также могут быть получены или выделены путем скрининга библиотеки дисплеев, например библиотеки фагового дисплея, например, как описано в US 6300064 и/или US 5885793. Например, авторы настоящего изобретения выделили антитела, являющиеся полностью антителами человека, из библиотеки фагового дисплея.

Антитело по настоящему изобретению может быть синтетическим антителом. Например, антитело представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело, антитело человека или деиммунизированное антитело.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут быть гуманизированными.

Термин «гуманизированное антитело» следует понимать как относящийся к белку, содержащему вариабельную область антитела человека, которая включает области CDR из антитела вида, отличного от человека (например, мыши или крысы, или примата, отличного от человека), привитые или инсертированные в FR из антитела человека (этот тип антител также называют «антителом с привитой CDR»).

Гуманизированные антитела также включают антитела, в которых один или несколько остатков белка человека модифицированы одной или несколькими аминокислотными заменами и/или одним или несколькими остатками FR антитела человека, которые заменены соответствующими остатками, не относящимися к антителу человека.

Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, которые не обнаружены ни в антителе человека, ни в антителе от другого вида. Любые дополнительные области антитела (например, Fc-область) обычно происходят от антитела человека.

Гуманизирование может быть выполнено с использованием метода, известного в данной области техники и описанного, например, в US5225539, US6054297, US7566771 или US5585089. Термин «гуманизированное антитело» также включает супергуманизированное антитело, например, описанное в US 7732578. Аналогичное значение применимо к термину «гуманизированный антигенсвязывающий фрагмент».

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут быть человеческими антителами или их антигенсвязывающими фрагментами. Термин «антитело человека», используемый в настоящем изобретении, относится к антителам, имеющим переменные и, необязательно, константные области антител, обнаруженные у людей, например, в зародышевой линии или в соматических клетках человека, или из библиотек, полученных с использованием таких областей. Термин «антитела человека» могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека, например, мутации, вызванные случайными или сайт-направленными мутациями *in vitro* (в частности, мутации, которые включают консервативные замены или мутации в небольшом числе остатков белка, например, в 1, 2, 3, 4 или 5 остатках белка). Такие «антитела человека» не обязательно должны быть получены в результате иммунного ответа человека, скорее, они могут быть получены с использованием рекомбинантных средств (например, скрининга библиотеки фагового дисплея) и/или трансгенных животных (например, мышей), содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую константные и/или переменные области антитела человека, и/или с использованием направленной селекции (например, как описано в US 5565332). Этот термин также охватывает формы подобных антител с созревшей аффинностью. Для целей настоящего изобретения антитело человека также можно рассматривать как включающее белок, содержащий FR из антитела человека, или FR, содержащие последовательности из консенсусной последовательности FR человека, и в котором одна или несколько CDR являются случайными или наполовину случайными, например, как описано в US6300064 и/или US6248516. Аналогичное значение будет применяться к термину «антигенсвязывающий фрагмент человека».

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут представлять собой сингуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Термин «сингуманизированное антитело» относится к антителу, полученному способом, описанным в WO 2007019620. Сингуманизированное антитело включает переменную область антитела, причем переменная область содержит FR из переменной области антитела приматов Нового Света и CDR из переменной области антител приматов, не происходящих из Нового Света.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть приматизированы. «Приматизированное антитело» содержит переменную область (области) из антитела, полученного после иммунизации примата, отличного от человека (например, яванского макака). Необязательно переменные области антитела

примата, отличного от человека, связываются константными областями человека для получения приматизированного антитела. Примеры способов получения приматизированных антител описаны в US 6113898.

В одном примере антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по
5 настоящему изобретению представляет собой химерное антитело или его фрагмент. Термин «химерное антитело» или «химерный антигенсвязывающий фрагмент» относится к антителу или фрагменту, в котором один или несколько переменных доменов происходят от определенного вида (например, грызуна, такого как мышь или крыса) или принадлежат конкретному классу или подклассу антител, в то время как
10 оставшаяся часть антитела или фрагмента принадлежат другому виду (например, человеку или примату, отличному от человека) или принадлежат к другому классу или подклассу антител. В одном из примеров химерное антитело, содержащее V_H и/или V_L из антитела, не являющегося антителом человека (например, антитела мыши), а остальные области антитела происходят из антитела человека. Получение таких
15 химерных антител и их антигенсвязывающих фрагментов известно в данной области и может быть достигнуто стандартными средствами (как описано, например, в US 6331415; US 5807715; US 4816567 и US 4816397).

Настоящее изобретение также предусматривает деиммунизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например, как описано в WO 2000034317 и
20 WO 2004108158. Деиммунизированные антитела и фрагменты имеют один или несколько эпитопов, например, эпитопов В-клеток или эпитопов Т-клеток, удаленных (т.е. мутированных), чтобы тем самым уменьшить вероятность того, что субъект вызовет иммунный ответ против антитела или белка. Например, антитело по настоящему изобретению анализируют для идентификации одного или нескольких В-
25 или Т-клеточных эпитопов, и один или несколько аминокислотных остатков в эпитопе мутируют, тем самым снижая иммуногенность антитела.

Примеры антител человека, описанные в настоящем изобретении, включают 3F7, 3F7G и 3F7 со зрелой аффинностью и/или их переменные области. Еще одним характерным примером антитела является анти-FXII антитело гарадацимаб. Такие
30 антитела человека обеспечивают преимущество пониженной иммуногенности у человека по сравнению с антителами, не являющимися антителами человека. Примеры антител описаны в WO 2013/014092 и WO 2017/173494, которые включены в настоящее изобретение в виде ссылки. Дополнительные антитела и белки, содержащие

вариабельные области, описаны в WO 2006/066878 и публикации Ravon с соавт., *Blood*, 1995, 86: 4134-4143.

Биспецифические антитела

В одном из примеров белок по настоящему изобретению может представлять собой биспецифическое антитело или его фрагмент. Например, антитело или его фрагмент могут связываться с фактором XII и/или его активированной формой и другой мишенью. Биспецифическое антитело представляет собой молекулу, состоящую из двух типов антител или фрагментов антител (например, двух половинных антител), обладающих специфичностью в отношении разных антигенов или эпитопов. Примеры биспецифических антител связываются с двумя разными эпитопами одного и того же белка. В другом варианте биспецифическое антитело связывается с двумя разными эпитопами на двух разных белках.

Примеры биспецифических белков типа «ключ и замочная скважина» или «выступ и впадина» приведены в US 5731168. В одном из примеров константная область (например, константная область IgG₄) включает мутацию T366W (или выступ) и константная область (например, константная область IgG₄) содержит мутацию (или впадину) T366S, L368A и Y407V. В другом примере первая константная область включает мутации T350V, T366L, K392L и T394W (выступ), а вторая константная область включает мутации T350V, L351Y, F405A и Y407V (впадина).

Методы получения биспецифических антител известны в данной области, и примеры этих методов описаны в настоящем изобретении.

В одном из примеров биспецифическое антитело типа IgG вырабатывается гибридной гибридомой (квадромой), образованной путем слияния двух типов гибридом, продуцирующих антитела IgG (Milstein C., с соавт., *Nature*, 1983, 305: 537-540). В другом примере антитело может быть секретировано путем введения в клетки генов L-цепей и H-цепей, которые составляют два представляющих интерес IgG для коэкспрессии (Ridgway J.B. с соавт., *Protein Engineering*, 1996, 9: 617-621; Merchant A.M. с соавт., *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 677-681).

В одном из примеров фрагмент биспецифического антитела получают химическим перекрестным связыванием Fab, полученных из разных антител (Keler T. с соавт., *Cancer Research*, 1997, 57: 4008-4014).

В одном из примеров лейциновая молния, полученная из Fos и Jun или т.п., используют для образования фрагмента биспецифического антитела (Kostelny S.A. с соавт., *J. of Immunology*, 1992, 148: 1547-1553).

В одном из примеров фрагмент биспецифического антитела получают в форме диатела, содержащего два перекрестных фрагмента scFv (Holliger P. с соавт., *Proc. of the National Academy of Sciences of the USA*, 1993, 90: 6444-6448).

Фрагменты антитела

Как описано в настоящем изобретении, белок по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий фрагмент, связанный с константной областью антитела, Fc или константным доменом тяжелой цепи CH2 и/или CH3. Примеры антигенсвязывающих фрагментов для применения в настоящем изобретении описаны ниже.

Однодоменные антитела

В некоторых примерах антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению представляет собой или содержит однодоменное антитело (которое используется взаимозаменяемо с термином «доменное антитело» или «dAb – domain antibody»). Однодоменное антитело представляет собой одну полипептидную цепь, содержащую весь или часть вариабельного домена тяжелой цепи антитела.

Диатела, Триатела, Тетратела

В некоторых примерах антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой или содержит диатело, триантитело, тетратело или белковый комплекс более высокого порядка, например, описанные в W098/044001 и/или W094/007921.

Например, диатело представляет собой белок, состоящий из двух связанных полипептидных цепей, причем каждая полипептидная цепь имеет структуру V_L -X- V_H или V_H -X- V_L , где X представляет собой линкер, содержащий недостаточное количество остатков для нахождения V_H и V_L в одной полипептидной цепи для связывания (или образования Fv) или отсутствует, и где V_H одной полипептидной цепи связывается с V_L другой полипептидной цепи с образованием сайта связывания антигена, т.е. с образованием молекулы Fv, способной специфически связываться с одним или несколькими антигенами. V_L и V_H могут быть одинаковыми в каждой полипептидной цепи, или V_L и V_H могут быть разными в каждой полипептидной цепи, чтобы образовать биспецифическое диатело (т.е. содержащее два Fv-фрагмента, имеющих разную специфичность).

Фрагменты одноцепочечного Fv (scFv)

Специалисту в данной области известно, что scFv содержат области V_H и V_L в одной полипептидной цепи и полипептидный линкер между V_H и V_L , который

позволяет scFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена (т.е. для V_H и V_L одной полипептидной цепи связываться друг с другом с образованием Fv).

Например, линкер содержит более 12 аминокислотных остатков, причем (Gly4Ser)₃ является одним из наиболее предпочтительных линкеров для scFv.

5 В одном из примеров линкер включает последовательность
SGGGGSGGGGSGGGGS.

Настоящее изобретение также рассматривает стабилизированный дисульфидом Fv-фрагмент (или diFv, или dsFv), в котором один цистеиновый остаток введен в FR V_H и FR V_L , и цистеиновые остатки связаны дисульфидной связью с получением
10 стабильного Fv-фрагмента.

В другом варианте или дополнительно настоящее изобретение охватывает димерный scFv, т.е. белок, содержащий две молекулы scFv, связанные нековалентной или ковалентной связью, например, доменом лейциновой молнии (например, полученным из Fos или Jun). В другом варианте два scFv связаны пептидным линкером
15 достаточной длины, чтобы оба scFv могли образовываться и связываться с антигеном, например, как описано в US 20060263367.

Антитела исключительно с тяжелой цепью

В некоторых примерах антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой или содержит антитело с тяжелой цепью. Антитела с тяжелой цепью структурно отличаются от многих других форм антител, поскольку они содержат тяжелую цепь, но не содержат легкую цепь. Соответственно, эти антитела также называют «антитела только с тяжелой цепью». Антитела с тяжелой цепью обнаружены, например, у верблюдовых и хрящевых рыб (их также обозначают «IgNAR»). Общее описание антител исключительно с тяжелой цепью из верблюдовых и их вариабельных областей, а также способов их получения, и/или выделения, и/или применения можно найти среди прочего в следующих публикациях: WO 94/04678, WO 97/49805 и WO 97/49805.
25

Полуантитела

В некоторых примерах антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой половину антитела или половину молекулы.
30 Специалисту в данной области известно, что полуантитело относится к белку, содержащему одну тяжелую цепь и одну легкую цепь. Термин «половина антитела» также включает белок, содержащий легкую цепь антитела и тяжелую цепь антитела, причем тяжелая цепь антитела мутирована для предотвращения ассоциации с тяжелой

цепью другого антитела. В одном из примеров полуантитело образуется, когда антитело диссоциирует с образованием двух молекул, каждая из которых содержит одну тяжелую цепь и одну легкую цепь.

Методы получения половинных антител известны в данной области, и в настоящем изобретении описаны примеры методов.

В одном из примеров полуантитело может быть секретировано путем введения в клетки генов одной тяжелой цепи и одной легкой цепи, которые составляют IgG, представляющий интерес для экспрессии. В одном из примеров константная область (например, константная область IgG₄) содержит мутацию «ключ или скважина» (или «выступ или впадина») для предотвращения образования гетеродимера. В одном из примеров константная область (например, константная область IgG₄) содержит мутацию T366W (или выступ). В другом понимании константная область (например, константная область IgG₄) содержит мутацию (или впадину) T366S, L368A и Y407V. В другом примере константная область включает мутации T350V, T366L, K392L и T394W (выступ). В другом примере константная область включает мутации T350V, L351Y, F405A и Y407V (впадина). Примеры аминокислотных замен константной области пронумерованы в соответствии с системой нумерации ЕС.

Другие антитела и фрагменты антител

Настоящее изобретение также рассматривает другие антитела и фрагменты антител, такие как:

- (i) минитела, например, описанные в US 5837821;
- (ii) гетероконъюгированные белки, например, описанные в US 4676980;
- (iii) гетероконъюгированные белки, полученные с использованием химического сшивающего агента, например, как описано в US 4676980; и
- (iv) Fab3 (например, описанные в EP 19930302894).

Стабилизированные белки

Белки по настоящему изобретению могут содержать константную область IgG₄ или стабилизированную константную область IgG₄. Термин «стабилизированная константная область IgG₄» означает константную область IgG₄, которая была модифицирована для уменьшения замены плеча Fab, или склонности к замене плеча Fab, или образования полуантитела, или склонности к образованию полуантитела. «Замена плеча Fab» относится к типу модификации белка IgG₄ человека, при котором тяжелая цепь IgG₄ и присоединенная легкая цепь (половина молекулы) заменяются на пару тяжелая-легкая цепь из другой молекулы IgG₄. Таким образом, молекулы IgG₄

могут приобретать два разных плеча Fab, распознающих два разных антигена (что приводит к биспецифическим молекулам). Обмен плечами Fab происходит естественным образом *in vivo* и может быть индуцирован *in vitro* очищенными клетками крови или восстанавливающими агентами, такими как восстановленный глутатион.

В одном из примеров стабилизированная константная область IgG₄ содержит пролин в положении 241 шарнирной области по системе нумерации Kabat (Kabat с соавт. в кн.: «Sequences of Proteins of Immunological Interest», Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 и/или 1991). Это положение соответствует положению 228 шарнирной области в соответствии с системой нумерации EC (Kabat с соавт. в кн.: «Sequences of Proteins of Immunological Interest», Washington DC United States Department of Health and Human Services, 2001; Edelman с соавт., Proc. Natl. Acad. USA, 1969, 63, 78-85). В IgG₄ человека этот остаток обычно представляет собой серин. После замены серина на пролин шарнирная область IgG₄ содержит последовательность CPPC. Специалистам в данной области известно, что «шарнирная область» представляет собой обогащенную пролином часть константной области тяжелой цепи антитела, которая связывает области Fc и Fab, что придает подвижность двум плечам Fab антитела. Шарнирная область включает остатки цистеина, которые участвуют в дисульфидных связях между тяжелыми цепями. Обычно её определяют как удлинение от Glu226 до Pro243 IgG₁ человека в соответствии с системой нумерации Kabat. Шарнирные области других изотипов IgG можно выровнять с последовательностью IgG₁, поместив первый и последний остатки цистеина, формируя дисульфидные связи между тяжелыми цепями (S-S) в одних и тех же положениях (см., например, WO2010080538).

Приготовление фармацевтического состава

Настоящее изобретение предусматривает жидкий фармацевтический состав, содержащий по меньшей мере 100 мг/мл белка, включающего антигенсвязывающий домен, который связывается или специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой (т.е. активированным FXII, FXIIa), буфер с органической кислотой, неионное поверхностно-активное вещество и аминокислотный стабилизатор, при этом состав имеет pH от 5,0 до 6,5 и вязкость менее примерно 30 мПа•с при 20°C.

Приготовление фармацевтического состава осуществляют в соответствии со стандартными методами, известными в данной области техники, и/или в соответствии со способами, описанными в настоящем изобретении.

Буферы с органическими кислотами

В одном из примеров в настоящем описании предусматривают фармацевтический состав, включающий по меньшей мере 100 мг/мл белка по настоящему изобретению и буфер с органической кислотой, имеющий рН от 5,0 до 6,5.

5 Специалисту в данной области техники известно, что буферы на основе органических кислот, подходящие для использования в настоящем изобретении, содержат одну или несколько карбоновых кислот или кислых фенольных групп без основных аминогрупп. В дополнение к буферной способности, обеспечиваемой кислотными группами, такие органические буферы, используемые в настоящем
10 изобретении, могут содержать дополнительную функциональность по ионизации, например, аминогруппы.

Специалисту в данной области известно, что буферы, подходящие для использования в настоящем изобретении, будут стабильными и эффективными при
15 желаемом рН и будут обеспечивать достаточную буферную емкость для поддержания желаемого рН в диапазоне условий, которым они будут подвергаться во время составления состава и хранения продукта. Например, стабильный буфер обеспечивает устойчивость к термической агрегации (например, при замораживании/оттаивании или
20 повышенных температурах), не подвергается влиянию окисления или физической деградации (например, образование нерастворимых частиц) и обеспечивает желаемую полидисперсность (т.е. распределение частиц). Например, стабильный буфер обеспечивает устойчивость к термической агрегации (например, при
25 замораживании/оттаивании или повышенных температурах), не подвергается влиянию окисления или физической деградации (например, образование нерастворимых частиц) и обеспечивает желаемую полидисперсность (т.е. распределение частиц). Подходящие буферы не будут образовывать вредных комплексов с ионами металлов, не будут
30 токсичными, недолжным образом проникать, растворяться или абсорбироваться на мембранах или других поверхностях. Кроме того, специалист в данной области поймет, что такие буферы не должны взаимодействовать с другими компонентами композиции каким-либо образом, если снижается их доступность или эффективность. Кроме того, буферный агент фармацевтического состава должен быть безопасным для введения, совместимым с другими компонентами композиции в течение срока годности продукта и приемлемым для введения субъекту.

Подходящие буферы с органическими кислотами для использования в настоящем изобретении будут очевидны специалисту в данной области техники и включают,

например, гистидиновые буферы (например, содержащие гистидинхлорид, гистидинацетат, гистидинфосфат, гистидинсульфат и т.д.), глутаматные буферы (например, содержащие глутамат натрия и т.д.), цитратные буферы (например, содержащие смесь цитрата натрия и цитрата натрия, смесь лимонной кислоты и цитрата натрия, смесь лимонной кислоты и цитрата натрия и т.д.), сукцинатные буферы (например, содержащие смесь янтарной кислоты и цитрата натрия, смесь янтарной кислоты и гидроксида натрия, смесь янтарной кислоты и янтарнокислого натрия и т.д.), тартратные буферы (например, содержащие смесь винной кислоты и тартрата натрия, смесь винной кислоты и виннокислого калия, смесь винной кислоты и гидроксида натрия и т.д.), фумаратные буферы (например, содержащие смесь фумаровой кислоты и динатриевой соли фумаровой кислоты, смесь фумаровой кислоты и моноватриевой соли фумаровой кислоты, смесь моноватриевой и динатриевой солей фумаровой кислоты и т.д.), глюконатные буферы (например, смесь глюконовой кислоты и глюконата натрия, смесь глюконовой кислоты и гидроксида натрия, смесь глюконовой кислоты и глюконата калия и т.д.), оксалатные буферы (например, смесь щавелевой кислоты и оксалата натрия, смесь щавелевой кислоты и гидроксида натрия, смесь щавелевой кислоты и оксалата калия и т.д.), лактатные буферы. (например, смесь молочной кислоты и лактата натрия, смесь молочной кислоты и гидроксида натрия, смесь молочной кислоты и лактата калия и т.д.) и ацетатные буферы (например, смесь уксусной кислоты и ацетата натрия, смесь уксусной кислоты и гидроксида натрия и т.д.).

В одном из примеров настоящего изобретения буфер с органической кислотой выбирают из группы, состоящей из гистидинового буфера, глутаматного буфера, сукцинатного буфера и цитратного буфера. Например, буфер с органической кислотой представляет собой глутаматный буфер. Например, буфер с органической кислотой представляет собой гистидиновый буфер. Например, буфер с органической кислотой представляет собой L-гистидиновый буфер.

Методы оценки пригодности буферов будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящем изобретении и включают, например, дифференциальную сканирующую флуориметрию и динамическое светорассеяние.

Неионные поверхностно-активные вещества

В одном из примеров настоящее изобретение предусматривает фармацевтический состав, содержащий по меньшей мере 100 мг/мл белка согласно настоящему изобретению и неионогенное поверхностно-активное вещество.

Количество поверхностно-активного вещества, добавляемого в фармацевтический состав, будет очевидным для специалиста в данной области и составляет такое количество, чтобы оно подавляло агрегацию (например, путем предотвращения поверхностной денатурации), увеличивало стабилизацию (например, при термическом и/или физическом стрессе), сводило к минимуму образование частиц в составе (например, образование невидимых частиц), уменьшало поверхностную адсорбцию и/или способствовало повторному сворачиванию белка.

Подходящие неионные поверхностно-активные вещества для применения в настоящем изобретении будут очевидны специалисту в данной области техники и включают, например, полиоксиэтиленсорбитановые сложные эфиры жирных кислот (например, полисорбат 20 и полисорбат 80), сополимеры полиэтилена и полипропилена, полиэтиленгликоли и полиоксиэтиленстеараты, полиоксиэтиленалкиловые эфиры, например полиоксиэтиленмонолауриловый эфир, алкилфенилполиоксиэтиленовые эфиры (Triton-X), полиоксиэтилен-полиоксипропиленовый сополимер (полосамер, плуроник), додецилсульфат натрия (SDS).

В одном из примеров настоящего изобретения неионное поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот и сополимеров полиоксиэтилена и полиоксипропилена. Например, сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана и жирной кислоты представляет собой моноолеат полиоксиэтиленсорбитана (т.е. полисорбат 80) или монолаурат полиоксиэтиленсорбитана (полисорбат 20).

Аминокислотные стабилизаторы

В одном из примеров настоящего изобретения предусматривают фармацевтический состав, содержащий по меньшей мере 100 мг/мл белка по настоящему изобретению и аминокислотный стабилизатор.

Количество аминокислотного стабилизатора, добавляемого в фармацевтический состав, должно быть очевидным для специалиста в данной области техники, и составляет такое количество, которое снижает термический и/или физический стресс (например, замораживание/оттаивание или перемешивание), и/или придает или усиливает стабильность белка.

Подходящие аминокислоты для использования в настоящем изобретении очевидны для специалиста и включают, например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, треонин, фенилаланин, тирозин, серин, цистеин, гистидин,

триптофан, пролин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аргинин, лизин, орнитин и аспарагин, а также их соли.

В одном из примеров настоящего изобретения аминокислота выбрана из группы, состоящей из пролина, аргинина и метионина. Например, аминокислотным стабилизатором является пролин или его соль. Например, аминокислотным стабилизатором является аргинин или его соль. Например, аминокислотными стабилизаторами являются пролин и аргинин или их соли.

Полиолы

В одном из примеров настоящее изобретение предусматривает фармацевтический состав, содержащий по меньшей мере 100 мг/мл белка согласно настоящему изобретению и полиол.

Количество полиола, добавляемого к фармацевтическому составу, должно быть очевидным для специалиста в данной области, и оно находится в количестве, эффективном для снижения агрегации и увеличения стабилизации антитела или его фрагмента. Например, полиол для использования в настоящем изобретении помогает поддерживать антитело или его фрагмент в компактном состоянии (например, уменьшает разворачивание и/или агрегацию).

Подходящие полиолы для использования в настоящем изобретении будут очевидны специалисту в данной области техники и включают, например, сахар (восстанавливающий или невосстанавливающий сахар), сахарный спирт и сахарную кислоту. «Восстанавливающий сахар» означает сахар, способный восстанавливать ионы металлов, или сахар, содержащий полуацетальную группу, способную ковалентно реагировать с лизином в белке и другими аминокислотными группами. Примеры восстанавливающего сахара включают, например, фруктозу, маннозу, мальтозу, лактозу, арабинозу, ксилозу, рибозу, рамнозу, галактозу и глюкозу.

«Невосстанавливающий сахар» такими свойствами не обладает. Примеры невосстанавливающего сахара включают, например, сахарозу, трегалозу, сорбозу, меллицитозу и раффинозу. Примеры сахарного спирта включают маннит, ксилит, эритрит, трейтол, сорбит и глицерин. В одном из примеров настоящего изобретения полиол представляет собой сорбит. Примеры сахарной кислоты включают L-глюконовую кислоту и ее металлическую соль.

Анализ фармацевтического состава и белков по настоящему изобретению

Фармацевтические составы и белки в высокой концентрации по настоящему изобретению легко подвергаются скринингу на физическую и биологическую

активность и/или стабильность с использованием методов, известных в данной области, и/или как описано ниже.

Связывание с фактором XII и/или фактором XIIa

Для специалиста в данной области техники из настоящего описания будет очевидно, что белок по настоящему изобретению связывается (или специфически связывается) с лиганд-связывающим доменом фактора XII и/или активированного фактора XII (т.е. фактора XIIa). Методы оценки связывания с белком известны в данной области, например, описанные в Scopes (в кн.: «Protein Purification: Principles and Practice», 3е изд., изд-во Springer Verlag, 1994). Такой метод обычно включает мечение белка и контактирование его с иммобилизованным соединением. После промывки для удаления неспецифически связанного белка определяют количество метки и, как следствие, связанного белка. Конечно, белок можно иммобилизовать и пометить соединение, которое связывается с фактором XII и/или фактором XIIa. Также можно использовать анализы типа пэннинга. В качестве альтернативы или дополнительно можно использовать метод поверхностного плазмонного резонанса.

Описанные выше методы также можно использовать для определения уровня связывания белка по настоящему изобретению с фактором XII и/или фактором XIIa или их лиганд-связывающим доменом. Способы определения уровня связывания будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящем изобретении. Например, уровень связывания определяют с помощью биосенсора.

Измерение активности фактора XII/XIIa

Методы оценки антагонистической активности белка известны в данной области и включают, например, хромогенный анализ. Хромогенные анализы для измерения ингибирующей активности известны в данной области (например, Chromogenix S-2302™; фирма Diapharma).

В одном из примеров буфер для анализа предварительно смешивают с фактором XIIa. Конъюгат по настоящему изобретению добавляют с последующим добавлением хромогенного субстрата. После прекращения хромогенной реакции оценивают ингибирующую активность конъюгата.

Определение конкурентного связывания

Анализы для определения белка, который конкурентно ингибирует связывание антител 3F7 и/или 3F7G (или любого другого описанного в настоящем изобретении антитела), будут очевидны для специалиста в данной области. Например, 3F7 или 3F7G конъюгированы с обнаруживаемой меткой, например, флуоресцентной меткой или

радиоактивной меткой. Затем меченое антитело и тестируемый белок смешивают и приводят в контакт с фактором XII или его областью, или экспрессирующей его клеткой. Затем определяют уровень меченого 3F7 или 3F7G и сравнивают с уровнем, определяемым при контакте меченого антитела с фактором XII, областью или клетками в отсутствие белка. Если уровень меченого 3F7 или 3F7G снижается в присутствии тестируемого белка по сравнению с отсутствием белка, считают, что белок конкурентно ингибирует связывание 3F7 или 3F7G с фактором XII.

Необязательно тестируемый белок конъюгирован с меткой, отличной от 3F7 или 3F7G. Такая альтернативная маркировка позволяет определить уровень связывания тестируемого белка с фактором XII или его областью или клеткой.

В другом примере допускают связывание белка с фактором XII, или его областью, или с экспрессирующей его клеткой, до контакта фактора XII, области или клетки с 3F7 или 3F7G. Снижение количества связанного 3F7 или 3F7G в присутствии белка по сравнению с отсутствием белка указывает на то, что белок конкурентно ингибирует связывание 3F7 или 3F7G с фактором XII. Можно также провести обратный анализ с использованием меченого белка и сначала допустить связывание 3F7 или 3F7G с фактором XII. В этом случае уменьшенное количество меченого белка, связанного с фактором XII в присутствии 3F7 или 3F7G, по сравнению с отсутствием 3F7 или 3F7G, указывает на то, что белок конкурентно ингибирует связывание 3F7 или 3F7G с фактором XII.

Амидолитическая активность FXIIa

В одном из примеров белки по настоящему изобретению ингибируют амидолитическую активность фактора XIIa человека. Способы определения амидолитической активности конъюгатов согласно настоящему изобретению будут очевидны специалисту в данной области техники и/или представлены в настоящем описании.

В одном из примеров анализ *in vitro* используют для определения уровня амидолитической активности FXIIa. Например, амидолитическая активность может быть измерена путем анализа расщепления FXII в присутствии конъюгата по настоящему изобретению и буфера. Например, FXII инкубируют в присутствии или отсутствии конъюгата по настоящему изобретению или контроля. После инкубирования и добавления субстрата для обнаружения амидолитическую активность определяют спектрофотометрически по изменению оптической плотности (т.е. по изменению цвета). Выявленные белки, которые эффективно ингибируют

амидолитическую активность, идентифицируют как белки, ингибирующие активность FXII.

Визуальная оценка

Фармацевтические составы, охватываемые настоящим изобретением, оценивают по внешнему виду для определения, например, цвета и прозрачности.

Динамическое рассеяние света

В одном из примеров распределение частиц по размерам оценивают с помощью динамического рассеяния света (DLS – dynamic light scattering). DLS измеряет свет, рассеянный частицами на основе броуновского движения, и оценивают разницу в индексе отражения между частицами и составом. Например, измеряют флуктуация интенсивности света с помощью цифрового коррелятора. Функции корреляции вносят в аналитическую программу (например, программное обеспечение Malvern Zetasizer) для расчета распределения частиц по размерам. Для определения Z-среднего гидродинамического диаметра используют анализ кумулянтов и уравнение Стокса-Эйнштейна с учетом, например, вязкости воды (0,8872 мПа•с) при 25°C. Индекс полидисперсности также может быть получен из того же анализа кумулянтов. Модальность соответствия оценивают на основе графиков зависимости распределения размера от интенсивности: модальность может быть описана как мономодальная (т.е. один пик) или мультимодальная (т.е. два или более пика).

Визуализация микропотоков

В одном из примеров невидимые частицы оценивают с помощью визуализации микропотоков (MFI – micro-flow imaging). Например, цифровые изображения частиц, суспендированных в жидкости, захватываются и автоматически анализируются по параметрам частиц, таким как соотношение сторон (AR – aspect ratio) и интенсивность. Также можно определить размер (например, в мкм) и количество (т.е. количество частиц в мл). В соответствии с этим методом данные морфологически классифицируются как белковые (т. е. круглые) и небелковые (т.е. небелковые частицы, такие как пузырьки или капельки силиконовой смазки) и отношение небелковых частиц к белковым частицам может быть определено. Низкое значение круглой фракции указывает на то, что испытуемый образец состоит в основном из некруглых, вероятно, белковых частиц.

Эксклюзионная хроматография

В одном из примеров растворимые агрегаты оценивают с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC или SE-HPLC), которая разделяет варианты белка

с более низкой и более высокой молекулярной массой, а также любые примеси.

Согласно этому методу результаты описывают как суммирование пиков агрегации (AP – aggregation peak) и суммирование пиков разрушения (DP – degradation peak).

Например, идентичность фармацевтического состава по настоящему изобретению

5 определяют путем сравнения хроматографического времени удерживания основных пиков со временем удерживания основного пика эталонного стандарта.

Дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF)

В одном из примеров термостабильность фармацевтического состава по настоящему изобретению оценивают с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). DSF представляет собой анализ на основе флуоресценции, использующий ПЦР реального времени для мониторинга термически индуцированной денатурации белка путем измерения изменений флуоресценции красителя, который связывается преимущественно с развернутым белком. Например, термическое разворачивание и агрегацию контролируют по изменениям собственной флуоресценции белка и статического светорассеяния, соответственно, в зависимости от температуры. В соответствии с этим методом среднюю точку теплового перехода (T_m) и начальную температуру плавления (T_{onset}) определяют путем наблюдения за собственной флуоресценцией. Температуру начала агрегации (T_{agg}) определяют путем мониторинга статического светорассеяния, например, при 266 нм и 473 нм. Образцы фармацевтического состава можно оценивать в диапазоне температур (например, 20-95°C) со скоростью повышения температуры, например, 0,5°C/мин.

Капиллярный гель-электрофорез

В одном из примеров фармацевтический состав по настоящему изобретению оценивают по стабильности и/или общему накоплению примесей с использованием капиллярного гель-электрофореза (CGE – capillary gel electrophoresis). Например, может выполняться как восстановительный CGE (R-CGE – reduced-CGE), так и не восстановительный CGE (NR-CGE – non-reduced-CGE). В одном из примеров R-CGE и NR-CGE проводят с использованием системы капиллярного электрофореза (например, Beckman P/ACE MDQ или PA800) с длиной капилляра, например, 20,2 см и 10 см, соответственно, от входа до окна обнаружения, с контролем температуры, например, от 20 до 40 °C (± 2 °C) и детектором при возбуждении, например, при 488 нм.

Катион-обменная хроматография

В одном из примеров фармацевтический состав по настоящему изобретению оценивают по общему количеству заряженных вариантов с использованием

катионообменной (CEX – cation exchange) хроматографии. Хроматография CEX разделяет белки в соответствии с их общим зарядом в нативных условиях. Анализ CEX используют для определения чистоты продукта путем разделения кислотных и основных вариантов. Представляющий интерес белок должен иметь заряд, противоположный заряду функциональной группы, присоединенной к смоле колонки, для связывания. Элюирование белка достигают за счет увеличения ионной силы, разрывающей ионное взаимодействие между белком и смолой. Представляющие интерес пики просматривают в УФ при 288 нм, причем первыми элюируются кислые варианты, за которыми следуют нейтральные и основные варианты. В одном из примеров хроматографию CEX проводят с использованием системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC – high performance liquid chromatography), например Dionex UltiMate 3000 BioRS (U) HPLC.

Сводная энергия Гиббса (ΔG_{trend} , HUNK)

В одном из примеров химическую стабильность и характер агрегации фармацевтического состава по настоящему изобретению оценивают по изменению свободной энергии Гиббса или анализу ΔG_{trend} (HUNK). В анализе ΔG_{trend} измеряют взаимосвязь между ΔG разворачивания белка и агрегацией белка в зависимости от концентрации белка. В отсутствие агрегации ΔG разворачивания белка представляет собой мономолекулярный процесс, не зависящий от концентрации белка. Если наблюдают изменение ΔG в зависимости от концентрации белка, это свидетельствует о наличии агрегации. Согласно этому методу, существует два возможных соотношения между ΔG разворачивания белка и концентрацией белка, если происходит агрегация:

1. ΔG_{trend} повышается вместе с концентрацией белка: эта взаимосвязь указывает на наличие агрегации в нативном состоянии – ΔG разворачивания белка увеличивается (становится более положительным) в зависимости от концентрации белка (т.е. концентрация агрегатов нативного белка увеличивается в зависимости от концентрации белка); или

2. ΔG_{trend} уменьшается вместе с концентрацией белка: эта взаимосвязь указывает на наличие агрегации в денатурированном состоянии – ΔG разворачивания белка уменьшается (становится менее положительным) в зависимости от концентрации белка (т.е. концентрация агрегатов денатурированного белка увеличивается в зависимости от концентрации белка).

В эксперименте HUNK показатель ΔG разворачивания белка определяют изотермически путем измерения изменений в собственном спектре флуоресценции

белка (т.е. излучения остатков триптофана) по мере того, как он разворачивается в присутствии возрастающих количеств денатурирующего агента.

В одном из примеров ΔG_{trend} определяют путем измерения ΔG разворачивающегося белка при различных концентрациях (например, 0,25, 0,6, 2,5, 6,0, 25,0 мг/мл), разведенных до целевой концентрации в буфере фармацевтического состава по настоящему изобретению. Каждый уровень концентрации титруют с увеличением концентрации денатурирующего агента (например, 32-точечная кривая, охватывающая концентрацию мочевины 2,00-8,74 М), в то время как спектры флуоресценции измеряют в диапазоне 300-500 нм (возбуждение 280 нм) с шириной щели 10 нм. Соотношение длин волн спектра излучения 350 нм/330 нм наносят на график в зависимости от концентрации мочевины для каждого уровня концентрации образца, а ΔG разворачивания белка определяют с использованием 2 стадии модели подгонки (т.е. с одним переходом). Определенные значения ΔG наносят на график в зависимости от концентрации образца для определения ΔG_{trend} .

Осмоляльность

В одном из примеров оценивают осмоляльность фармацевтического состава по настоящему изобретению.

Оценка мутности по поглощению при 550 нм

В одном из примеров оценивают мутность фармацевтического состава по настоящему изобретению. Например, мутность оценивают с помощью спектрофотометра и измерения оптической плотности при 550 нм.

Возможность шприцевания

В одном из примеров оценивают пригодность для шприцевания фармацевтического состава по настоящему изобретению. Например, состав выталкивают с помощью шприца на 2 мл, шприца на 10 мл или оставляют без обработки в качестве контроля до выталкивания. В соответствии с этим методом поршень шприца проталкивают через шприцы на 2 мл с линейной скоростью 0,2 дюйма/мин и через шприцы на 10 мл со скоростью 0,6 дюйма/мин до тех пор, пока поршень не достигнет дна и не достигнет силы 30 Н. Разрывную силу (РС) и силу скольжения (СС) измеряют во время выталкивания поршня и используют для оценки пригодности применения. Разрывная сила описывает усилие, необходимое для начала движения поршня (начальное значение 0,3 мм для шприца на 2 мл и 0,5 мм для шприца на 10 мл). Сила скольжения относится к максимальной силе трения, необходимой для поддержания движения поршня. Максимальное значение силы измеряют от конца

области разрыва до конца области силы скольжения (26 мм для шприца на 2 мл и 24 мм для шприца на 10 мл) до точки, в которой сила достигает 30 Н).

Применение фармацевтического состава

В обсуждении настоящего изобретения рассматривают способ лечения или профилактики заболевания или состояния у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтического состава согласно настоящему изобретению. В одном из примеров настоящее изобретение предусматривает способ лечения или профилактики заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта.

Настоящее изобретение также обеспечивает применение фармацевтического состава по настоящему изобретению для лечения или профилактики заболевания или состояния у субъекта, включающее введение субъекту фармацевтического состава по настоящему изобретению. В одном из примеров настоящее изобретение обеспечивает применение фармацевтического состава согласно настоящему изобретению для лечения или профилактики заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта.

В настоящем изобретении также предложен способ антагонистической активности фактора XII и/или активированного фактора XII у субъекта, включающий введение субъекту состава с высокой концентрацией согласно настоящему изобретению. В одном из примеров в настоящем изобретении предложен способ противодействия активности фактора XII и/или активированного фактора XII у субъекта, нуждающегося в этом.

В одном примере заболевание или состояние представляет собой тромботическое заболевание, воспалительное заболевание и/или тромбовоспалительное заболевание.

В одном из примеров субъект страдает тромботическим заболеванием, воспалительным заболеванием и/или тромбовоспалительным заболеванием. Тромботическое расстройство, воспалительное расстройство и/или тромбовоспалительное расстройство может быть наследственным или приобретенным. Например, субъект, страдающий тромботическим заболеванием, воспалительным заболеванием и/или тромбовоспалительным заболеванием имеет симптомы тромботического нарушения, воспалительного заболевания и/или тромбовоспалительного заболевания.

В одном из примеров тромботическое расстройство, воспалительное расстройство и/или тромбовоспалительное расстройство выбирают из группы, состоящей из венозного, артериального или капиллярного тромбообразования (например, при

инсульте, инфаркте миокарда, тромбозе глубоких вен (ТГВ), тромбозе воротной вены, тромбозе почечной вены, тромбозе яремной вены, тромбозе мозгового синуса, синдроме Бадда-Киари, болезни Педжета-Шреттера или немой ишемии головного мозга), тромбообразования в сердце, тромбоэмболии, тромбообразования при и/или

5 после контакта с кровью человека или животного лиц с искусственными поверхностями, диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром), фибрилляции предсердий, острых коронарных синдромов (ОКС), атеросклеротической болезни, ишемического инсульта с реперфузией, заболевания, связанных с

10 ишемически-реперфузионным повреждением (ИПП, таким как травма, трансплантация органов), нейротравматических расстройств (например, черепно-мозговой травмы, повреждения спинного мозга), неврологического воспалительного заболевания (например, рассеянного склероза), интерстициального заболевания легких (такого как идиопатический легочный фиброз (ИЛФ)), пневмонии, фибринолиза, заболевания, связанного с FXII/FXI 1a-индуцированным образованием кинина (например,

15 наследственного ангионевротического отека (НАО)), сепсиса, заболевания, связанного с FXII/FXIIa-опосредованной активацией комплемента, острого респираторного дистресс-синдром (ОРДС), трансплантации органов и клеток, серповидно-клеточной анемии и состояния, связанного с повышенной проницаемостью сосудов.

В одном из примеров фармацевтический состав по настоящему изобретению

20 вводят субъекту в количестве, позволяющем уменьшить тяжесть заболевания или состояния у субъекта.

В одном из примеров субъект подвержен риску развития тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства. Субъект находится в группе риска, если у него более высокий риск

25 развития тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства, чем в контрольной популяции. Контрольная популяция может включать одного или нескольких субъектов, выбранных случайным образом из общей популяции (например, совпадающих по возрасту, полу, расе и/или этнической принадлежности), которые не болели или не имели в семейном анамнезе

30 тромботических заболеваний, воспалительных заболеваний и/или тромбовоспалительных заболеваний. Таким образом, субъекта можно считать подверженным риску развития тромботического заболевания, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства, даже если исследования, идентифицирующие возможные факторы риска, не включали субъекта конкретно.

В одном из примеров субъект подвержен риску развития тромботического заболевания, воспалительного заболевания и/или тромбовоспалительного расстройства, и фармацевтический состав по настоящему изобретению вводят до или после появления симптомов тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного заболевания. В одном из примеров фармацевтический состав по настоящему изобретению вводят до или после появления симптомов тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного заболевания. В одном из примеров фармацевтический состав по настоящему изобретению вводят до проявления симптомов тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного заболевания. В одном из примеров фармацевтический состав по настоящему изобретению вводят в дозе, которая облегчает или уменьшает один или несколько симптомов тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства у субъекта, подверженного риску. В одном из примеров фармацевтический состав вводят после появления симптомов тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства. В одном из примеров фармацевтический состав по настоящему изобретению вводят в дозе, которая облегчает или уменьшает один или несколько симптомов тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства у субъекта, подверженного риску.

Способы по настоящему изобретению могут быть легко применены к любой форме тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства у субъекта.

В одном из примеров способ по настоящему изобретению уменьшает любой симптом тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства, известного в данной области техники и/или описанного в настоящем изобретении.

Специалисту в данной области техники понятно, что «уменьшение» симптома расстройства у субъекта будет сравнимо с состоянием другого субъекта, который так же болен, но его не лечили способом по настоящему изобретению. Это не обязательно требует параллельного сравнения двух субъектов. Скорее можно полагаться на популяционные данные. Например, популяцию субъектов, страдающих тромботическим заболеванием, воспалительным заболеванием и/или тромбовоспалительным заболеванием, в которой не лечили описанным в настоящем

изобретении способом (не обязательно, популяцию субъектов, сходных с пролеченным субъектом, например, по возрасту, весу, расе), оценивают и средние значения сравнивают с результатами субъекта или популяции субъектов, получавших лечение с помощью способа, описанного в настоящем изобретении.

5 Способ по настоящему изобретению может также включать совместное введение фармацевтического состава по настоящему изобретению вместе с введением другого терапевтически эффективного средства для профилактики или лечения тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства.

10 В одном из примеров фармацевтический состав по настоящему изобретению используют в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным известным соединением или терапевтическим белком, который в настоящее время используют или разрабатывают для профилактики или лечения тромботических заболеваний, воспалительных заболеваний и/или тромбовоспалительных заболеваний, или

15 антагонистической активности фактора XII и/или его активированной формы. Соединения, используемые в настоящее время для лечения тромботических заболеваний, воспалительных заболеваний и/или тромбовоспалительных заболеваний, известны в данной области и включают, например, антагонисты витамина К (например, варфарин), гепарин (например, нефракционированный или низкомолекулярный

20 гепарин), синтетические пентасахариды (например, фондапаринукс и идрапаринукс), прямые ингибиторы фактора Ха и тромбина (например, ривароксабан, лепирудин, десирудин и дабигатран), ингибиторы циклооксигеназы (например, аспирин, рофекоксиб и вальдекоксиб), антагонисты АДФ-рецепторов (клопидогрель, прасугрел), ингибиторы активируемого протеазой рецептора-1 (т.е. PAR1), ингибиторы $\alpha_{IIb}\beta_3$ -

25 интегрина (например, абциксимаб и эптифибатид) и статины (например, ловастатин, правастатин, розувастатин, симвастатин, аторвастатин и флувастатин).

 Из вышеизложенного следует, что настоящее изобретение обеспечивает способы сопутствующего терапевтического лечения субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества первого агента и второго агента, где

30 первый агент представляет собой фармацевтическую композицию по настоящему описанию, и второй агент также предназначен для профилактики или лечения тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного расстройства.

В настоящем изобретении термин «сопутствующий», как и во фразе «сопутствующее терапевтическое лечение», включает введение первого агента в присутствии второго агента. Сопутствующее терапевтическое лечение включает способы, при которых первое, второе, третье или дополнительные средства вводят совместно. Сопутствующее терапевтическое лечение также включает способы, в которых первый или дополнительные агенты вводят в присутствии второго или дополнительного агента, при этом второй или дополнительный агент, например, может быть введен ранее. Сопутствующее терапевтическое лечение может осуществляться поэтапно разными субъектами. Например, один действующий субъект может вводить субъекту первый агент, а второй действующий субъект может вводить субъекту второй агент, и этапы введения могут выполняться в одно и то же время, или почти в одно и то же время, или в отдаленные моменты времени, если как первый агент (и/или дополнительные агенты) после введения в присутствии второго агента (и/или дополнительных агентов). Действующее лицо и субъект могут быть одним и тем же лицом (например, человеком).

Наборы и другие составы вещества

В другом примере по настоящему изобретению предусматривают наборы, содержащие фармацевтический состав по настоящему изобретению, полезный для лечения или профилактики заболевания или состояния, согласно описанному выше.

В одном из примеров набор включает (а) контейнер, содержащий фармацевтический состав по настоящему изобретению, и (б) листок-вкладыш с инструкциями по лечению или профилактике заболевания или состояния у субъекта.

В одном из примеров набор содержит (а) по меньшей мере один фармацевтический состав по настоящему изобретению, (б) инструкции по применению набора для лечения или профилактики заболевания или состояния у субъекта, и (в) необязательно по меньшей мере еще одно терапевтически активное соединение или лекарственное средство.

В соответствии с этим примером описания вкладыш в упаковку находится на контейнере или связан с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая эффективна для лечения или профилактики нарушения свертывания крови, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для

подкожных инъекций). На этикетке или листке-вкладыше указано, что состав предназначен для лечения субъекта, которому это лечение показано, например, субъекта, страдающего или предрасположенного к развитию тромботического расстройства, воспалительного расстройства и/или тромбовоспалительного

расстройства, с конкретными указаниями относительно количества доз и интервалов подачи фармацевтической композиции и любого другого лекарственного средства.

Набор может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая фильтры, иглы и шприцы. В некоторых примерах настоящего изобретения состав может находиться в

инъекционном устройстве (например, в инъекционном шприце, например, в предварительно заполненном инъекционном шприце). Шприц может быть адаптирован для индивидуального введения, например, в виде системы с одним флаконом, включающей автоинжектор (например, устройство ручка-инжектор). В одном из примеров инъекционное устройство представляет собой предварительно заполненную шприц-ручку или другое подходящее устройство для самоинъекции, необязательно с инструкцией по применению и введению.

Набор необязательно дополнительно содержит контейнер, содержащий второе лекарственное средство, где фармацевтический состав представляет собой первое лекарственное средство, и указанный предмет дополнительно содержит инструкции на листке-вкладыше для лечения субъекта вторым лекарственным средством в эффективном количестве. Второе лекарственное средство может представлять собой терапевтический белок, описанный выше.

В одном из примеров в описании предложен предварительно заполненный шприц или автоинжектор, содержащий состав по настоящему изобретению. В одном из примеров предварительно заполненный шприц представляет собой стеклянный люэровский шприц с поршнем.

В одном из примеров в настоящем описании предусматривают флакон, содержащий состав по настоящему изобретению.

Настоящее описание включает следующие примеры, которые не ограничивают рамки охвата настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Физическая и химическая стабильность эксципиентов в составе

Для оценки эксципиентов в составе проводят биофизическое и скрининговое исследование эксципиентов и растворимости. Эксперименты по приготовлению

состава проводят с использованием моноклонального анти-фактор XII антитела (3F7 или 3F7^{aff} с созревшей аффинностью, как описано в настоящем изобретении).

Базовое биофизическое скрининговое исследование

5 Оценивают физическую и термическую стабильность антитела к фактору XII в десяти типах буферов (F1-F10, табл. 1). Используя объемное разведение и коррекцию базовой линии 320 нм, для каждого состава достигают целевой концентрации 100 мг/мл.

Концентрации белка в препаратах определяют путем измерения поглощения (A280/320); pH оценивают с использованием калиброванного pH-метра.

10 В случае замены буфера на 20 mM глутаматного буфера с pH 5,5 (F1) было замечено, что раствор антитела, приготовленный с концентрацией 100 мг/мл, не достигает целевого значения pH (измеренный pH составляет 5,65) даже после обширных замен буфера.

15 Распределение частиц и термостабильность растворов антител исследуют методами динамического рассеяния света (DLS – dynamic light scattering) и дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF – and differential scanning fluorimetry).

Динамическое светорассеяние выполняют с использованием не менее 100 pi неразбавленного образца в пластиковой кювете оптического качества. Для каждого измерения образца получают пять последовательных сканирований при 25°C (с использованием настройки автоматического выбора затухания Malvern) с 3-минутным уравниванием в начале каждого измерения. Алгоритм анализа белков (программное обеспечение Malvern Zetasizer) используют в качестве модели для обработки данных. Z-средний гидродинамический диаметр рассчитывают из кумулянтного анализа и уравнения Стокса-Эйнштейна с использованием вязкости воды (0,8872 мПа•с) при 25°C. Индекс полидисперсности (PDI) получают из того же анализа кумулянтов. Модальность соответствия оценивают на основе графиков зависимости распределения размера от интенсивности: модальность может быть описана как мономодальная (т.е. один пик) или мультимодальная (т.е. два или более пика).

30 В исследовании DLS составы сравнивают по Z-среднему диаметру и PDI (табл. 1). Четкие тенденции, связанные с pH, наблюдают для Z-среднего значения в сукцинатном (F2-F4) и цитратном буферах (F8-F10), где Z-среднее значение увеличивается с увеличением pH. Однако тенденция, наблюдаемая для Z-средних значений, не соответствует изменениям PDI, что позволяет предположить, что повышенные

значения Z-средних связаны с более сильными неспецифическими электростатическими взаимодействиями между молекулами антител при более высоких значениях pH. В отличие от образцов, приготовленных в сукцинатном и цитратном буферах, для PDI в гистидиновом буфере (F5-F7) наблюдают небольшую восходящую тенденцию в зависимости от pH без изменений Z-средних значений, которые ниже по сравнению с сукцинатным и цитратным составами. Результаты, аналогичные результатам для гистидинового буфера, наблюдают для глутаматного буфера (F1), где измерения показывают повышенный PDI (по сравнению с сукцинатным и цитратным буферами) и низкое Z-среднее значение.

Эксперименты методом DSF проводят с использованием Unchained Labs UNit. Испытываемые составы проверяют на термическую стабильность и образование растворимых агрегатов. Термическое разворачивание и агрегацию контролируют по изменениям собственной флуоресценции белка и статического светорассеяния, соответственно, в зависимости от температуры. Середину термического перехода (T_m) и температуру начала плавления (T_{onSet}) определяют путем мониторинга собственной флуоресценции. Температуру начала агрегации (T_{agg}) определяют путем мониторинга статического светорассеяния при 266 нм и 473 нм. Каждый анализ DSF проводят в трех повторах с использованием 8,8 мкл при концентрации белка 100 мг/мл. Образцы анализируют в диапазоне температур (20-95°C) со скоростью повышения температуры 0,5°C/мин.

При анализе DSF оценивают термическую стабильность и образование растворимых агрегатов. Значения T_m , T_{onset} и T_{agg} , определенные для всех испытанных составов, показаны в табл. 1. Значения T_{onset} и T_m , полученные для глутаматного и гистидинового буферов, несколько выше по сравнению с сукцинатным и цитратным буферами и указывают на более высокую термостабильность составов F1 и F5-F7. Существенных различий в термостабильности при различных значениях pH не наблюдают. Температуры начала агрегации и статическая интенсивность светорассеяния при 266 нм и 473 нм показывают более высокие значения T_{agg} и более низкие интенсивности SLS для глутаматного (F1) и гистидинового буферов (F5-F7) по сравнению с сукцинатным (F2-F4) и цитратным (F8-F10) буферами и указывают на более высокую термоагрегационную стабильность антитела. Существенных различий в термоагрегационной стабильности при различных значениях pH в данном буфере не наблюдают.

Таблица 1. Сводка результатов базового биофизического скрининга

Состав	Буфер	pH	Анализ DLS		Анализ DSF			
			Z-средний диаметр (нм)	Средняя полидисперсность	Средняя T_m (°C)	Средняя T_{onset} (°C)	Средняя T_{agg} (°C) (473 нм)	Средняя T_{agg} (°C) (266 нм)
F1	20 mM глутамат	5.5	19.05	0.078	65.7	60.3	61.5	62.5
F2	20 mM сукцинат	5.5	10.28	0.129	62.2	59.7	60.8	59.8
F3	20 mM сукцинат	6.0	24.04	0.082	61.1	59.0	59.9	59.0
F4	20 mM сукцинат	6.5	34.64	0.070	61.3	58.5	59.1	58.8
F5	20 mM гистидин	5.5	48.09	0.091	64.5	58.6	60.6	61.4
F6	20 mM гистидин	6.0	11.21	0.116	65.0	60.1	62.0	60.4
F7	20 mM гистидин	6.5	13.68	0.149	54.4	60.2	61.1	61.3
F8	20 mM цитрат	5.5	12.69	0.216	59.6	57.5	58.0	56.6
F9	20 mM цитрат	6.0	37.87	0.057	60.1	57.6	58.3	58.8
F10	20 mM цитрат	6.5	40.72	0.068	60.4	57.8	58.5	57.7

По результатам DLS и DSF препараты, содержащие глутамат и гистидин при pH 5,5, проявляют наиболее положительное влияние на термическую и агрегативную стабильность анти-FXII антитела.

Скрининг эксципиентов

5 На основе базового биофизического скрининга двенадцать составов оценивают для определения влияния четырех различных наполнителей (фенилаланин, пролин, аргинин и сорбит) в трех разных буферах (глутамат, сукцинат и гистидин) при pH 5,5 на стабильность антитела при концентрации 100 мг/мл (F11-F22, табл. 2). Кроме того, оценивают состав, содержащий глутамат и гистидин при pH 5,5 (F23). Влияние пяти
10 различных эксципиентов на стабильность антител анализируют с помощью DLS и DSF с использованием методов, описанных выше.

В исследовании DLS не наблюдают существенных различий Z-среднего значения и PDI между составами с вспомогательным веществом ($\pm$) и без него (табл. 2). Точно так же не наблюдают заметных различий между протестированными буферами.

15 Наиболее заметное влияние на Z-среднее и PDI наблюдают для аргинина в сукцинатном буфере (F17), где оба параметра снижены по сравнению с другими эксципиентами. В целом, существенных различий в распределении частиц по размерам между испытанными составами не наблюдают.

Значения T_{onset} и T_m , определенные для тестируемых составов с помощью DSF,
20 показаны в табл. 2. Сравнение значений T_{onset} и T_m показывает сравнимую термостабильность для всех составов, содержащих фенилаланин, пролин и сорбит. Аналогичную стабильность наблюдают для состава F23, содержащего гистидин и глутамат. Наименьшая термостабильность отмечают у составов, содержащих аргинин. Сравнение полученных результатов показывает повышенную термическую агрегацию
25 антител во всех препаратах, содержащих сукцинат и/или аргинин, по сравнению с другими протестированными составами. Аналогичный результат получен для состава F23, содержащего гистидин и глутамат.

По результатам DLS и DSF сукцинатный буфер исключают из дальнейшего исследования из-за повышенной склонности к агрегации развернутого белка при
30 повышенной температуре. Наличие сорбита и фенилаланина в тестируемых составах не оказывает значительного влияния на стабильность антител по сравнению с пролином, поэтому оба вспомогательных вещества были исключены из дальнейшего исследования.

Таблица 2. Сводка результатов по скринингу эксципиентов

Состав	Буфер	Эксципиент	pH	Анализ DLS		Анализ DSF			
				Z-средний диаметр (нм)	Средняя полидисперсность	Средняя T_m (°C)	Средняя T_{onset} (°C)	Средняя T_{agg} (°C) (473 нм)	Средняя T_{agg} (°C) (266 нм)
F11	20 mM глутамат	50 mM фенилаланин	5,5	11,72	0,157	64,9	60,5	61,7	63,2
F12	20 mM глутамат	150 mM пролин	5,5	10,57	0,143	65,9	61,0	62,4	64,6
F13	20 mM глутамат	150 mM аргинин	5,5	16,42	0,090	61,3	58,9	60,0	59,7
F14	20 mM глутамат	250 mM сорбит	5,5	12,88	0,192	66,6	62,2	63,3	64,2
F15	20 mM сукцинат	50 mM фенилаланин	5,5	21,72	0,081	61,6	59,2	60,2	58,9
F16	20 mM сукцинат	150 mM пролин	5,5	21,38	0,072	62,7	60,2	61,2	60,6
F17	20 mM сукцинат	150 mM аргинин	5,5	16,04	0,051	60,8	58,6	59,8	59,1
F18	20 mM сукцинат	250 mM сорбит	5,5	24,95	0,084	63,2	61,0	62,0	61,2
F19	20 mM гистидин	50 mM фенилаланин	5,5	11,35	0,114	63,8	58,7	60,4	62,3
F20	20 mM гистидин	150 mM пролин	5,5	10,97	0,134	64,6	59,4	60,0	62,0
F21	20 mM гистидин	150 mM аргинин	5,5	15,65	0,045	60,8	58,0	59,4	58,6
F22	20 mM гистидин	250 mM сорбит	5,5	12,76	0,202	65,2	61,2	61,6	63,1
F23	20 mM гистидин 150 mM глутамат		5,5	18,16	0,061	63,4	61,0	61,9	61,2

Изучение растворимости

- На основании результатов по скринингу эксципиентов оценивают шесть составов для оценки растворимости антитела в концентрации 200 мг/мл. Два из испытанных составов содержат 150 mM глутаматного буфера при pH 5,5, с 20 mM гистидина (F23) и без 20 mM гистидина (F24). Четыре других состава содержат глутаматный или гистидиновый буфер с pH 5,5 с пролином или аргинином в качестве эксципиента (F12, F13, F20, F21; табл. 3). Подготавливают два набора образцов и оценивают визуально.
- Первый набор из шести контрольных образцов концентрируют до 100 мг/мл. Второй набор из шести образцов растворимости концентрируют до 200 мг/мл антитела.

Внешний вид (т.е. цвет, прозрачность и наличие твердых частиц) оценивают в соответствии с GTM-0033-03 «Внешний вид по визуальной оценке». Тип наблюдаемых частиц определяют как относящихся к продукту или не относящихся к продукту.

Контрольные растворы (т.е. 100 мг/мл) имеют небольшую желтую окраску, а концентрированные растворимые растворы (т.е. 200 мг/мл) из-за высокой концентрации белка имеют слабую коричневую окраску. Контрольный и концентрированный растворимый растворы слегка мутные и мутные жидкие, соответственно, и не содержат видимых частиц, связанных с продуктом. После проведения проверки внешнего вида концентрированные растворы растворимости (200 мг/мл) разводят в соответствующих буферах до 100 мг/мл (растворы растворимости) и тестируют с контрольными образцами методами ДРС, как описано выше, и методами эксклюзионной хроматографии (SEC), описанными ниже.

Анализ DLS проводят для каждого набора контролей и растворов для определения растворимости; результаты показаны в табл. 3. Результаты, полученные для всех контролей и растворов для определения растворимости, показывают сравнимые значения Z-среднего значения и индекса полидисперсии (ИПД) ($\leq 0,13$).

Эксклюзионную хроматографию (SEC) проводят путем разделения высокомолекулярных частиц (ВМЧ), основного мономера и фрагментов в нативных условиях с использованием системы ВЭЖХ Dionex UltiMate 3000 BioRS. Как показано в табл. 3, наблюдают небольшое увеличение растворимости высокомолекулярных соединений в растворах на 0,4-1,0% по сравнению с контролями. Никаких существенных изменений процентного содержания фрагментов между растворимостью и контрольными образцами не наблюдается.

Таким образом, концентрированные образцы (≥ 200 мг/мл) остаются растворимыми, и для всех тестируемых составов не наблюдают отрицательного влияния на стабильность антител.

Таблица 3. Сводка результатов по скринингу растворителей

Состав	Буфер	Экципиент	pH	Анализ DLS		Анализ SEC		
				Z-средний диаметр (нм)	Средняя полидисперсность	ВМЧ, %	Основной мономерный пик, %	НМЧ, %
F12 (контроль)	20 мМ глутамат	150 мМ пролин	5.5	11.90	0.100	2.0	97.2	0.8
F12 (раств.)	20 мМ глутамат	150 мМ пролин	5.5	12.34	0.133	3.0	96.2	0.8
F13 (контроль)	20 мМ глутамат	150 мМ аргинин	5.5	15.51	0.030	1.4	97.8	0.8
F13 (раств.)	20 мМ глутамат	150 мМ аргинин	5.5	16.29	0.046	2.1	97.1	0.8
F20 (контроль)	20 мМ гистидин	150 мМ пролин	5.5	11.88	0.115	1.6	97.6	0.8
F20 (раств.)	20 мМ гистидин	150 мМ пролин	5.5	10.80	0.128	2.3	96.9	0.8
F21 (контроль)	20 мМ гистидин	150 мМ аргинин	5.5	15.96	0.046	1.3	98.0	0.8
F21 (раств.)	20 мМ гистидин	150 мМ аргинин	5.5	15.88	0.042	1.7	97.5	0.8
F23 (контроль)	20 мМ гистидин 150 мМ глутамат		5.5	19.05	0.069	1.4	97.8	0.7
F23 (раств.)	20 мМ гистидин 150 мМ глутамат		5.5	18.79	0.058	1.9	97.4	0.8
F24 (контроль)	150 мМ глутамат		5.5	18.85	0.056	1.6	97.6	0.8
F24 (раств.)	150 мМ глутамат		5.5	17.92	0.044	2.1	97.2	0.8

Скрининг поверхностно-активного вещества (ПАВ)

Защитное действие неионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) на образование растворимых и нерастворимых агрегатов антител оценивают для полисорбата 80 (PS-80), полисорбата 20 (PS-20) и полоксамера 188 в исследованиях замораживания-оттаивания и перемешивания. Всего было проверено четырнадцать составов с концентрацией антител 100 мг/мл в исследованиях замораживания-оттаивания и перемешивания (F21 и F24-F36; табл. 4). Для исследования замораживания-оттаивания все составы подвергают 3 циклам замораживания-оттаивания при температуре $-75 \pm 10^\circ\text{C}$. Образцы хранят при температуре $-75 \pm 10^\circ\text{C}$ в течение как минимум 1 ч, а затем оттаивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Соответствующие контрольные образцы готовят путем инкубации при $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Для исследования перемешивания составы перемешивали на лабораторном роторе (~ 50 об/мин) в течение примерно 50 ч при комнатной температуре. Соответствующие контрольные образцы готовят путем инкубации при $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Все образцы анализируют по внешнему виду, методами эксклюзионной хроматографии и дифференциального светорассеяния, как описано выше.

Как в исследованиях с замораживанием-оттаиванием, так и в исследованиях с перемешиванием все образцы, подвергнутые стрессу, остаются неизменными с точки зрения цвета (т.е. слегка желтые), прозрачности (т. е. прозрачные) и содержания частиц (т. е. отсутствие видимых частиц) по сравнению с контрольными образцами.

Результаты DLS показывают увеличение PDI в препаратах с гистидином и глутаматом без поверхностно-активного вещества, которые подвергали стрессам замораживанию-оттаиванию и перемешиванию, по сравнению с контрольными образцами. Наибольшее увеличение PDI (на 0,09) наблюдают для перемешиваемого образца F21 по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о присутствии частиц в подвергнутом стрессу образце. Подобных различий не наблюдают ни для одного из образцов замораживания-оттаивания и перемешивания, содержащего поверхностно-активное вещество. Z-среднее значение и величина PDI, измеренные для образцов, подвергнутых стрессу, сопоставимы с контрольными значениями.

Никаких существенных изменений в концентрации агрегатов не обнаружено методом SEC для замораживания-оттаивания и перемешивания образцов по сравнению с соответствующими контролями. Площадь мономерного пика колеблется от 97,5% до

98,4 %, площадь высокомолекулярных частиц в процентах колеблется от 1,0 % до 1,9%, а площадь низкомолекулярных частиц в процентах колеблется от 0,6% до 0,8%.

Невидимые частицы измеряют с помощью визуализации микропотоков (MFI – Micro-Flow Imaging) с использованием MFI 5200 с автоматизированной системой дозирования для характеристики размера, концентрации и морфологии частиц, присутствующих в образцах. Анализы выполняют с однократными измерениями с использованием 700 или 1000 мкл чистого образца и определяют кумулятивное количество на мл для частиц размером ≥ 2 мкм, ≥ 5 мкм, ≥ 10 мкм и ≥ 25 мкм (для частиц размером 1-100 мкм). Кроме того, частицы размером ≥ 5 мкм с соотношением сторон (AR – aspect ratio) $\geq 0,85$ обрабатывают с использованием параметров морфологической категоризации в программном обеспечении MFI (MVAS) для определения фракции круглых частиц. Низкое значение фракции круглых частиц указывает на то, что испытуемое изделие состоит в основном из некруглых, вероятно, белковых частиц.

Отсутствие поверхностно-активного вещества в контрольных образцах (F21 и F24), подвергнутых замораживанию-оттаиванию и перемешиванию, оказало значительное влияние на образование невидимых частиц. Увеличение числа частиц наблюдают для обоих составов, не содержащих поверхностно-активное вещество. Единственным исключением является состав F24, подвергнутый стрессу при перемешивании, который показывает количество частиц, сравнимое с контрольным образцом. В отличие от результатов, полученных для контрольных образцов, любой тип поверхностно-активного вещества, присутствующий в образцах, подвергнутых замораживанию-оттаиванию и перемешиванию, значительно подавляет образование невидимых частиц. Эффект подавления одинаков для всех тестируемых поверхностно-активных веществ; однако уменьшение количества частиц, наблюдаемое для составов, содержащих PS-80, наиболее полезно. Кроме того, наблюдаемый защитный эффект немного лучше для концентрации PS-80 0,05 %, чем для 0,02 %.

Таблица 4. Составы, используемые в исследованиях замораживания-оттаивания и перемешивания

Состав	Буфер	Экспципиент	ПАВ	pH
F21	20 мМ гистидин	150 мМ аргинин		5.5
F24	150 мМ глутамат			5.5
F25	20 мМ гистидин	150 мМ аргинин	0.05% PS-80	5.5
F26	150 мМ глутамат		0.05% PS-80	5.5
F27	20 мМ гистидин	150 мМ аргинин	0.02% PS-80	5.5
F28	150 мМ глутамат		0.02% PS-80	5.5
F29	20 мМ гистидин	150 мМ аргинин	0.05% PS-20	5.5
F30	150 мМ глутамат		0.05% PS-20	5.5
F31	20 мМ гистидин	150 мМ аргинин	0.02% PS-20	5.5
F32	150 мМ глутамат		0.02% PS-20	5.5
F33	20 мМ гистидин	150 мМ аргинин	0.05% Poloxamer 188	5.5
F34	150 мМ глутамат		0.05% Poloxamer 188	5.5
F35	20 мМ гистидин	150 мМ аргинин	0.02% Poloxamer 188	5.5
F36	150 мМ глутамат		0.02% Poloxamer 188	5.5

Пример 2. План экспериментального исследования

- 5 Результаты базового биофизического скрининга, скрининга экспципиентов, исследований растворимости и скрининга поверхностно-активных веществ используют для разработки буферов для составов по настоящему изобретению. Всего протестировано 30 составов на повышенную стабильность антитела (табл. 5). В качестве центральной точки выбран состав F_{DOE12} (100 мг/мл антитела, 20 мМ глутамата, 100 мМ аргинина, 0,05% PS-80, pH 5,5). Кроме того, в качестве контроля используют исходный состав (F_{original}). Образцы хранят при 5°C и 40°C и анализируют в нулевое время, через две недели и через четыре недели.
- 10

Таблица 5. Составы, используемые при планировании экспериментальных исследований

Состав	Антитело (мг/мл)	PS-80 (%)	Глутамат (мМ)	Гистидин (мМ)	Пролин (мМ)	Аргинин (мМ)	pH
F _{DOE1}	100	0.05	20				5.0
F _{DOE2}	100	0.05	20				5.3
F _{DOE3}	100	0.05	20				5.5
F _{DOE4}	100	0.05	20		100		5.0
F _{DOE5}	100	0.05	20		100		5.3
F _{DOE6}	100	0.05	20		100		5.5
F _{DOE7}	100	0.05	20		200		5.0
F _{DOE8}	100	0.05	20		200		5.3
F _{DOE9}	100	0.05	20		200		5.5
F _{DOE10}	100	0.05	20			100	5.0
F _{DOE11}	100	0.05	20			100	5.3
F _{DOE12}	100	0.05	20			100	5.5
F _{DOE13}	100	0.05	20			200	5.0
F _{DOE14}	100	0.05	20			200	5.3
F _{DOE15}	100	0.05	20			200	5.5
F _{DOE16}	100	0.05		20			5.5
F _{DOE17}	100	0.05		20			5.7
F _{DOE18}	100	0.05		20			6.0
F _{DOE19}	100	0.05		20	100		5.5
F _{DOE20}	100	0.05		20	100		5.7
F _{DOE21}	100	0.05		20	100		6.0
F _{DOE22}	100	0.05		20	200		5.5
F _{DOE23}	100	0.05		20	200		5.7
F _{DOE24}	100	0.05		20	200		6.0
F _{DOE25}	100	0.05		20		100	5.5
F _{DOE26}	100	0.05		20		100	5.7
F _{DOE27}	100	0.05		20		100	6.0
F _{DOE28}	100	0.05		20		200	5.5
F _{DOE29}	100	0.05		20		200	5.7
F _{DOE30}	100	0.05		20		200	6.0
F _{original}	100	0.02		20	140	150	6.1

- 5 На отобранных образцах проводят следующие анализы:
- Нулевое время: осмоляльность, pH, УФ, внешний вид и анализ ΔG_{trend} HUNK
 - Через две недели: эксклюзионная хроматография (SEC), капиллярный гель-электрофорез (восстановленный (R-CGE) и невосстановленный (NR-CGE))

- Через четыре недели: динамическое светорассеяние (DLS), микропотоковая визуализация (MFI), SEC, катионообменная хроматография (CEX), pH, R-CGE, NR-CGE и внешний вид

Осмоляльность выбранных составов (F_{DOE9} , F_{DOE15} , F_{DOE19} и F_{DOE25})

5 определяют перед хранением, и осмоляльность выбранных составов составляла 296 мОсм/кг (F_{DOE9}), 435 мОсм/кг (F_{DOE15}), 154 мОсм/кг (F_{DOE19}) и 240 мОсм/кг (F_{DOE25}).

Химическую стабильность и агрегационное поведение антитела в различных составах (F_{DOE3} , F_{DOE6} , F_{DOE9} , F_{DOE12} и F_{DOE15}) также оценивают перед хранением с использованием анализа ΔG_{trend} (HUNK).

10 ΔG_{trend} определяют путем измерения разворачивания ΔG при концентрациях 0,25, 0,6, 2,5, 6,0, 25,0 мг/мл. Все образцы разводят до целевой концентрации в буфере состава. Каждый уровень концентрации титруют с возрастающей концентрацией денатуранта (32-точечная кривая, охватывающая концентрацию мочевины 2,00-8,74 М), в то время как спектры флуоресценции измеряют в диапазоне 300-500 нм

15 (возбуждение 280 нм) с шириной щели 10 нм. Усиление регулируют в зависимости от концентрации образца, чтобы обеспечить максимальный сигнал без насыщения детектора (100 для 0,25 и 0,6 мг/мл; 10 для 2,5 и 6,0 мг/мл; 1 для 25,0 мг/мл). Спектр эмиссии при 350 нм/330 нм наносят на график в зависимости от концентрации мочевины для каждого уровня концентрации образца, ΔG разворачивания белка

20 определяют с использованием модели подгонки с 2 состояниями (т.е. с одним переходом). Определенные значения ΔG наносят на график относительно концентрации образца для определения ΔG_{trend} , с положительным значением ΔG_{trend} (т.е. повышение ΔG при повышении концентрации образца), указывающим на самоассоциацию нативного состояния, и отрицательным значением ΔG_{trend} (т.е.

25 понижение ΔG при понижении концентрации образца), указывающим на агрегирование из денатурированного состояния.

Анализ ΔG_{trend} , выполненный для состава F_{DOE3} , показывает постепенное увеличение ΔG с повышением концентрации антител и предполагает образование агрегатов нативного белка в тестируемом образце. Наблюдаемый эффект значительно

30 снижен после добавления пролина к F_{DOE3} (F_{DOE6} и F_{DOE9}). Величина ΔG_{trend} , наблюдаемая для составов F_{DOE6} (со 100 мМ пролина) и F_{DOE9} (с 200 мМ пролина), не зависит от концентрации антител и показывает отсутствие образования агрегатов. Интересно, что добавление аргинина к F_{DOE3} (F_{DOE12} и F_{DOE15}) показывает постепенное снижение ΔG со снижением концентрации антител. Эффект снижения был резким для

F_{DOE}15 (с 200 мМ аргинина) и свидетельствует об образовании агрегатов денатурированного белка в тестируемом образце. Этот результат хорошо согласуется с данными дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), полученными в исследовании скрининга эксципиентов, где термическая агрегация антител

5 наблюдалась для всех составов, содержащих аргинин.

Измеряют pH образцов в начальной (т.е. до хранения) временной точке и через четыре недели. Для образцов, хранившихся в течение четырех недель при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ и 40°C при относительной влажности 75% (RH – relative humidity), измеренный pH находится в пределах 0,11 единиц pH от исходного значения для соответствующего состава.

10 Внешний вид начальных образцов и образцов, полученных через четыре недели, оценивают по цвету, прозрачности и содержанию частиц, как описано выше. Образцы, хранившиеся в течение четырех недель при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ и 40°C при относительной влажности 75%, не отличаются от образцов в начальный момент времени. Каждый образец представляет собой бледно желтую прозрачную жидкость без видимых частиц,

15 связанных с белком.

Визуализацию микропотоков (MFI) осуществляют согласно описанному выше и результаты, полученные для образцов, хранившихся при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ и 40°C при 75% относительной влажности, не показали каких-либо четких тенденций кумулятивного количества частиц в зависимости от температуры хранения, типа буфера или

20 наполнителя. Заметная тенденция накопления частиц в зависимости от pH наблюдается для всех исследованных составов. В целом, наименьшая разница в количестве частиц для образцов, хранившихся при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ и 40°C при 75% относительной влажности, наблюдается при pH 5,5 для глутаматных буферов и pH 5,5 и pH 5,7 для гистидиновых буферов, для частиц всех размеров.

25 Результаты, полученные методами R-CGE, NR-CGE, SEC, DLS и CEX, анализируют статистически с помощью Stat-Ease, Inc. Design-Expert® версии 7.0.3. Значимость ответов оценивают с использованием метода ANOVA при доверительном интервале 95% (значения p ниже 0,05 указывают на статистически значимую корреляцию). Ответы, которые соответствуют этому порогу значимости, анализируют с

30 помощью программного обеспечения в режиме линейного проектирования. Расчеты проводят с использованием трех факторов: pH, концентрации пролина и аргинина и четырех ответов: суммарное накопление примесей (R-CGE), суммарное накопление примесей (SEC), различие индексов полидисперсии (PDI) методом динамического светорассеяния (DLS) и накопление общих заряженных вариантов методом

катионообменной хроматографии (CEX). Значения p , полученные с помощью программы ANOVA для общего процента примесей, определенного с помощью NR-CGE, были статистически незначимыми (значение $p = 0,34$ для глутаматных и $0,47$ для гистидиновых буферов), и поэтому данные были исключены из дальнейшего анализа.

5 Модели, созданные для накопления общих примесей (разница между общими примесями, полученными для образцов, хранившихся при $5 \pm 3^\circ\text{C}$ и 40°C при 75% относительной влажности), обнаруженные методами R-CGE и SEC для глутаматных буферов $\pm$ пролин, проявляют тенденцию к прогрессирующему снижению содержания примесей в зависимости от pH. Различий в накоплении примесей между глутаматными
10 буферами $\pm$ пролин не наблюдают при всех исследованных значениях pH.

В анализе R-CGE модели, созданные для гистидинового буфера и пролина, проявляют несущественную тенденцию к уменьшению примесей в зависимости от pH, в то время как в анализе SEC модели, созданные для гистидинового буфера и пролина, не проявляют тенденции к уменьшению количества примесей в зависимости от pH. В
15 отличие от глутамата наличие пролина в гистидиновом буфере незначительно уменьшает накопление примесей, наблюдаемое в основном при pH 5,5 и pH 5,7. При pH 5,5 накопление примесей сопоставимо между глутаматным и гистидиновым буферами с пролином и без него, соответственно.

В анализах R-CGE и SEC модели, созданные для накопления общего количества примесей в глутаматном буфере $\pm$ аргинин, показывают прогрессивную тенденцию к
20 уменьшению примесей в зависимости от pH, аналогичную эффектам, наблюдаемым для глутаматного буфера $\pm$ пролин. По сравнению с пролином присутствие аргинина в глутаматном буфере увеличивает накопление общих примесей при всех испытанных уровнях pH.

25 В анализе методом R-CGE гистидинового буфера $\pm$ аргинина наблюдают незначительную зависимость снижения содержания примесей от pH. Существенных различий в накоплении примесей между гистидиновыми буферами $\pm$ аргинин не наблюдают при всех протестированных значениях pH. При pH 5,5 накопление примесей сопоставимо между глутаматным и гистидиновым буферами с аргинином и
30 без него, соответственно. Напротив, анализ SEC показал, что в моделях, созданных для гистидинового буфера $\pm$ аргинина, не наблюдают тенденция к накоплению примесей, зависящая от pH. В отличие от пролина наличие аргинина в гистидиновом буфере увеличивает накопление суммарных примесей при всех исследованных значениях pH.

При pH 5,5 накопление примесей сопоставимо между глутаматным и гистидиновым буферами с аргинином и без него, соответственно.

5 Модели, созданные для индексов полидисперсности (PDI) (разница между PDI, полученными для образцов, хранящихся при $5 \pm 3^\circ\text{C}$ и 40°C при 75% относительной влажности), определенные методом DLS для глутаматного буфера $\pm$ пролин, показывают несущественную тенденцию к снижению значений PDI как функции pH. Существенных различий в значениях PDI между глутаматными буферами $\pm$ пролин не наблюдают при всех протестированных уровнях pH. Точно так же модели, созданные для PDI в глутаматном буфере $\pm$ аргинин, показывают несущественную тенденцию к
10 снижению значений PDI в зависимости от pH. В отличие от пролина, присутствие аргинина в глутаматном буфере значительно увеличивает значения PDI при всех испытанных уровнях pH.

Модели, созданные для гистидинового буфера $\pm$ пролина, показывают несущественную тенденцию к увеличению значений PDI в зависимости от pH.

15 Существенных различий в значениях PDI не наблюдают между гистидиновыми буферами $\pm$ пролин при всех протестированных уровнях pH. Точно так же модели, созданные для PDI в гистидиновом буфере $\pm$ аргинин, показали негущественную тенденцию к увеличению значений PDI в зависимости от pH. В отличие от пролина присутствие аргинина в гистидиновом буфере значительно увеличивает значения PDI
20 при всех протестированных значениях pH.

При pH 5,5 значения PDI сопоставимы между глутаматным и гистидиновым буферами с пролином и без него, соответственно, а также с аргинином и без него.

Модели, созданные для накопления общих заряженных вариантов (разница между общими заряженными вариантами, полученными для образцов, хранившихся при $5 \pm$
25 3°C и 40°C при 75% относительной влажности), при анализе методом CEX для глутаматного буфера $\pm$ пролин, показывают прогрессивную тенденцию к снижению вариантов заряда в зависимости от pH. Небольшое положительное влияние пролина на восстановление заряженных вариантов наблюдают при всех испытанных уровнях pH. Точно так же модели, созданные для накопления заряженных вариантов в глутаматном
30 буфере $\pm$ аргинин, показывают прогрессивную тенденцию к уменьшению примесей в зависимости от pH.

Модели, созданные для гистидинового буфера $\pm$ пролин, показывают тенденцию к увеличению накопления заряженных вариантов в зависимости от pH. Подобно глутаматному буферу, наличие пролина в гистидиновом буфере уменьшает накопление

заряженных вариантов при всех протестированных уровнях pH. Подобно пролину, но, что более важно, присутствие аргинина уменьшает накопление всех заряженных вариантов при всех протестированных уровнях pH. Модели, созданные для гистидинового буфера $\pm$ аргинин, показывают восходящую тенденцию накопления

5 заряженных вариантов в зависимости от pH. Различий в накоплении примесей между гистидиновыми буферами $\pm$ аргинин не наблюдают при всех испытанных значениях pH.

Наименьшее накопление заряженных вариантов наблюдают при pH 5,5 для всех испытываемых составов. Не наблюдают существенных различий при pH 5,5 между

10 содержащим пролин и не содержащим пролина глутаматным и гистидиновым буферами, соответственно, а также при pH 5,5 между глутаматным и гистидиновым буферами с аргинином и без него, соответственно. Единственным исключением был глутаматный буфер без аргинина, в котором концентрация заряженных частиц была заметно выше по сравнению с гистидиновым буфером с аргинином.

15 Результаты этого исследования показывают наиболее благоприятное влияние пролина на стабильность антител в глутаматном буфере при pH 5,5 и в гистидиновом буфере при pH 5,5-5,7. Защитный эффект аргинина наблюдают только для анализа СЕХ. Результаты, полученные методами DLS, SEC и R-CGE, показывают, что присутствие аргинина в глутаматном и гистидиновом буферах (засвидетельствованные

20 диапазоны pH) могут снижать стабильность белка.

Пример 3. Определение пригодности высококонцентрированного состава для шприцевания

Оценивают пригодность составов с антителами F37 и F38 для получения и клинического применения в виде жидкого состава в концентрации 100 мг/мл. Растворы

25 плацебо (составы F37 и F38 без активного фармацевтического ингредиента) тестируют одновременно в рамках исследований по перекачиванию, совместимости с фильтрами и возможности применения в шприцах.

Состав 37: 100 мг/мл антитела; 100 мМ глутамата при pH 5,6; 150 мМ пролина и 0,05% PS-80.

30 Состав 38: 100 мг/л антитела; 20 мМ гистидина при pH 5,8; 150 мМ пролина, 80 мМ сорбита и 0,05% PS-80.

Исследование перекачивания

Исследование перекачивания проводят для оценки того, могут ли изменения в агрегации или деградации происходить во время физического процесса перекачивания

материала, содержащего антитела, при его обработке в ходе определенных процессов получения. Для оценки стабильности каждого состава собирают начальную (нулевую) временную точку (ТО) и сравнивают с образцами, взятыми после 60 и 120 мин перекачивания в сериях аналитических тестов.

5 *Внешние признаки*

Внешние признаки, как плацебо, так и содержащих антитело образцов, оценивают по цвету, прозрачности и относительному количеству видимых частиц. Все образцы, содержащие антитела, оцененные через 60 и 120 мин, не показывают различий в цвете и прозрачности по сравнению с образцами в начальный момент времени. Каждый образец плацебо выглядит как прозрачная бесцветная жидкость, а каждый образец, содержащий антитело, выглядит как слегка желтоватая, слегка опалесцирующая жидкость. Во всех образцах плацебо, а также содержащих антитела образцах, не наблюдают частиц, в том числе частиц, не связанных с продуктом.

15 *Оценка мутности путем поглощения при 550 нм*

Мутность составов, содержащих антитела, и составов плацебо оценивают путем измерения оптической плотности при 550 нм. Значения мутности для всех образцов, содержащих антитела или плацебо, не свидетельствуют о различиях по сравнению со значениями в исходный контрольный момент времени. A550 был менее 0,07 AU во все моменты времени для всех образцов.

20 *Эксклюзионная хроматография*

Влияние перекачивания на образование растворимых частиц с высокой и низкой молекулярной массой в содержащих антитела образцах каждого состава оценивают с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEC), как описано выше. Между начальной и 120-минутной временной точкой для образцов в любом составе не наблюдалось значительных изменений в общем процентном соотношении площадей пиков видов с повышенной или пониженной молекулярной массой. Состав F38 содержит повышенную фракцию высокомолекулярных видов, чем состав F37 (2,5% против 1,5%), а фракция видов с меньшей молекулярной массой существенно не различается между образцами двух составов (0,7 % против 0,7 %). Эта разница по общей площади пика соединений с более высокой молекулярной массой постоянна и наблюдается во всех образцах, полученных в исследованиях перекачивания, совместимости фильтров и шприцевания.

Динамическое рассеяние света

Распределение частиц в содержащих антитела образцах исследуют методом DLS, как описано выше, для оценки влияния стресса при перекачивании. Составы сравнивают по Z-среднему гидродинамическому диаметру, средней полидисперсности (PDI) и модальности соответствия. Наблюдают изменение модальности соответствия (по оценке на основе графиков распределения размеров по интенсивности). Образцы для обоих составов являются мономодальными в начальной временной нулевой точке (ТО), однако через 60 мин образец F38 является мультимодальным, а через 120 мин оба образца F37 и F38 являются мультимодальными. Значения Z-среднего диаметра сопоставимы для всех протестированных образцов обоих составов и показывают небольшую тенденцию к увеличению в зависимости от времени стресса. Аналогичная, но еще более выраженная тенденция к увеличению наблюдается для значений PDI, полученных для образцов обоих испытываемых составов. Для состава F37 значение PDI повышено с 0,087 (при ТО) до 0,120 и 0,136 после перекачивания в течение 60 и 120 мин (увеличение приблизительно в 1,4 и 1,6 раза, соответственно). Полученные значения PDI для F38 увеличиваются с 0,129 (при ТО) до 0,238 и 0,242 после перекачивания в течение 60 и 120 мин (увеличение примерно в 1,8 и 1,9 раза, соответственно). Вместе напряжение при прокачивании оказало незначительное влияние на распределение частиц в F37 и F38.

Эксперименты с визуализацией микропотоков (MFI) для описания размера и концентрации частиц, присутствующих в содержащих антитела образцах, в ходе исследования перекачивания. Не наблюдают четких тенденций в накоплении невидимых частиц для плацебо F37 и F38 с течением времени. Напротив, прогрессирующие тенденции увеличения концентрации невидимых частиц наблюдают для составов F37 и F38 на протяжении перекачивания. Увеличение невидимых частиц сопоставимо для обоих составов.

В целом, полученные результаты не показывают увеличения количества видимых или невидимых частиц в F37 и F38, подвергнутых стрессу в виде перекачивания.

Исследование совместимости фильтров

Исследование совместимости фильтров разработано для оценки совместимости и эффективности фильтрующих материалов для окончательных составов API. Образцы составов плацебо и содержащих антитела, пропускают через фильтр PES 0,22 мкм, фильтр PVDF 0,22 мкм или оставляют нефильтрованными в качестве контроля. Затем

проводят аналитические тесты для оценки совместимости и эффективности фильтрации.

Внешние признаки

Внешний вид образца оценивают по физическому состоянию, цвету, прозрачности и относительному количеству видимых частиц, как описано выше. Образцы, отфильтрованные через фильтр PES или фильтр PVDF, не показывают различий в цвете и прозрачности по сравнению с нефильтрованными контрольными образцами. Каждый образец плацебо рассматривают как прозрачную бесцветную жидкость, а каждый образец, содержащий антитело, рассматривают как желтоватую, слегка опалесцирующую жидкость. Во всех образцах не наблюдают частиц, в том числе частиц, не связанных с продуктом.

Мутность

Мутность образца оценивают, как описано выше. Значения мутности для всех содержащих антитела образцов и образцов плацебо не отличаются при сравнении с состоянием в исходный контрольный момент времени. Значение A550 составляет менее 0,05 AU во все моменты времени для всех образцов. Для образцов плацебо не наблюдают четких тенденций в отношении момента времени или состава.

Эксклюзионная хроматография

Влияние фильтрации на образование растворимых частиц с высокой и низкой молекулярной массой в образцах, содержащих антитела, для каждого состава оценивают методом SEC, как описано выше. Никаких существенных изменений процентной площади пиков соединений с более высокой или низкой молекулярной массой между нефильтрованным контролем и образцами, прошедшими мембранную фильтрацию, не наблюдают ни в одном из составов.

Динамическое рассеяние света и визуализация микропотоков

DLS выполняют, как описано выше, и результаты показывают, что фильтрация не изменяет модальности соответствия ни в одном из составов, независимо от материала фильтра, а различия в среднем Z-диаметре контрольных образцов и отфильтрованных образцов незначительны. Значения PDI для состава F37 снизились с 0,106 для контроля до 0,049 и 0,050 для образцов, отфильтрованных PES и PVDF, соответственно. Значения PDI рецептуры F38 снизились с 0,087 для контрольного образца до 0,081 и 0,063 для образцов, отфильтрованных PES и PVDF, соответственно.

Эксперименты MFI проводят, как описано выше, чтобы охарактеризовать размер и концентрацию частиц, присутствующих в образцах, содержащих антитела, взятых из

исследования совместимости фильтров. Не наблюдают существенных различий в кумулятивных количествах частиц между отфильтрованными и контрольными образцами плацебо для обоих составов. Образцы антител в обоих составах F37 и F38 показывают общее снижение кумулятивного количества частиц всех размеров в отфильтрованных образцах по сравнению с контрольным образцом. Наблюдаемое уменьшение количества частиц в составе F37 больше при фильтрации PVDF, чем при фильтрации PES. Напротив, общее снижение количества частиц в образцах, содержащих антитела, в составе F38 незначительно больше для одного фильтрующего материала, чем для другого.

Общие изменения в распределении частиц, наблюдаемые при анализе DLS и MFI, показывают, что фильтрация антитела полезна для снижения потенциальной агрегации во время обработки материала, что моделируется исследованием совместимости фильтров. В целом одинаковое снижение наблюдалось в обоих составах и для обоих фильтрующих материалов.

Оценка возможности шприцевания

Исследование пригодности шприцев разработано для имитации применения лекарственного препарата в окончательном составе и определения пригодности каждого состава для введения лекарственного препарата с помощью шприцев Injekt Solo двух разных размеров. Образцы плацебо и состава, содержащего антитела, выдавливают шприцами на 2 мл и на 10 мл или оставляют без обработки в качестве контроля состояния до выдавливания. Для этого поршень шприца проталкивают через шприцы на 2 мл с линейной скоростью 0,2 дюйма/мин и через шприцы на 10 мл со скоростью 0,6 дюйма/мин до тех пор, пока поршень не достигал дна и не достигал силы 30 Н.

Сила

Силы отрыва (BF – Break-loose force) и скольжения (GF – glide force) измеряют во время выдавливания и используют для оценки пригодности применения. Сила отрыва описывает усилие, необходимое для начала движения поршня (начальное значение 0,3 мм для шприца на 2 мл и 0,5 мм для шприца на 10 мл). Сила скольжения Max относится к максимальной силе трения, необходимой для поддержания движения плунжера. Максимальное значение силы измеряют от конца области отрыва до конца области силы скольжения (26 мм для шприца на 2 мл и 24 мм для шприца на 10 мл) до точки, в которой сила достигает 30 Н).

Во всех условиях тестирования пиковая величина BF и максимальная величина GF, необходимые для выдавливания образцов, содержащих антитела или плацебо, составляют менее 12Н, а пиковая величина BF меньше максимальной GF: это показатели того, что оба состава в любом шприце могут быть пригодны для применения, что смоделировано в исследовании пригодности шприцов. Сравнение условий испытаний показывает, что значения BF и GF были выше при выталкивании через шприц на 10 мл по сравнению со шприцем на 2 мл, независимо от состава.

Внешние признаки

Внешние признаки, как плацебо, так и образцов, содержащих антитела, до и после выдавливания оценивают по цвету, прозрачности и относительному количеству видимых частиц. Заметных различий между контрольными образцами и образцами после выдавливания не наблюдают. Все образцы плацебо представляют прозрачные бесцветные жидкости, а все образцы, содержащие антитела, представляют слегка желтые, опалесцирующие жидкости. Во всех образцах не наблюдают никаких частиц или частиц, не связанных с продуктом.

Мутность

Мутность образца оценивают, как описано выше. Поглощение при 550 нм составляет менее 0,05 AU для всех образцов, за исключением контрольного образца антитела в составе F37, который составляет 0,137 AU. Четких тенденций не наблюдают для образцов плацебо или содержащих антитела в отношении состояния или состава.

Эксклюзионная хроматография

Влияние прохождения образцов, содержащих антитела, через шприц на образование растворимых частиц с высокой и низкой молекулярной массой оценивают с помощью SEC. Никаких существенных изменений в общем процентном соотношении площадей пиков частиц с повышенной или пониженной молекулярной массой не наблюдается между контрольным образцом и образцом после вытеснения в любом из составов.

Динамическое рассеяние света

DLS используют для оценки распределения частиц в образцах, содержащих антитела, до и после выдавливания из шприцов разного размера (объемом 2 и 10 мл). Образцы сравнивают по Z-среднему диаметру, средней полидисперсности (PDI) и модальности соответствия. Выдавливание из шприца не изменило модальности соответствия ни в одном из составов, и не было никаких существенных различий в Z-

среднем диаметре и PDI контрольных образцов и образцов из шприцев с любым из составов.

Визуализация микропотоков (MFI)

Эксперименты MFI проводят чтобы охарактеризовать размер и концентрацию частиц в образцах. Образцы плацебо составов F37 и F38 демонстрируют увеличение кумулятивного количества частиц в образцах после выдавливания по сравнению с контрольными образцами, и увеличение было больше в образцах из шприцов объемом 10 мл по сравнению с образцами из шприцов объемом 2 мл. Контрольное антитело и образцы из шприцов объемом 2 мл в составе F37 не проявляют существенной разницы, однако образцы из шприцов объемом 10 мл в целом показывают небольшое увеличение кумулятивного количества частиц.

Образцы антител в составе F38 проявляют более выраженный ответ на применение шприца. Образцы, пропущенные через шприц на 2 мл, показывают увеличение кумулятивного количества в 2,7-3,6 раза по сравнению с контролем, а образцы, пропущенные через шприц на 10 мл, показывают увеличение кумулятивного количества в 10-12 раз.

Результаты, полученные в исследовании возможности шприцевания, показывают отсутствие влияния напряжения сдвига на агрегацию антител. Повышенная концентрация невидимых частиц была обнаружена только с помощью MFI в F38.

Пример 4. Приготовление состава с повышенной концентрацией

Фильтрация тангенциальным потоком (ФТП) используют для концентрации состава с антителом, содержащего приблизительно 116 мг/мл антитела, 20 мМ гистидина, 140 мМ пролина, 150 мМ аргинина и 0,02 % (мас./об.) полисорбата 80, до состава, содержащего приблизительно 200 мг/мл антитела. («Высокая концентрация 2»). Во время ФТП готовят состав с промежуточной высокой концентрацией, примерно равной 150 мг/мл («Высокая концентрация 1»). Состав («Высокая концентрация 2» разбавляют для приготовления состава, содержащего 100 мг/мл антитела («тест DP»). Исходный первоначальный материал также разбавляют для приготовления состава, содержащего 100 мг/мл антитела («контроль лекарственного препарата»).

После концентрирования оценивают концентрацию, плотность и вязкость каждого состава, как показано в табл. 6. Вязкость сравнивают с очищенными препаратами антител в 20 мМ гистидине, 140 мМ пролине и 150 мМ аргинине, но без полисорбата 80.

Таблица 6. Характеристики составов антител

Состав	Концентрация антитела (мг/мл)	Вязкость при 20°C (мПа•с)	Плотность при 20°C (г/см ³)
Очищенный состав (без полисорбата 80)	73.5	2.2	
	99.3	2.9	
	110.8	3.3	
	139.9	5.0	
	154.1	6.7	
	171.8	9.4	
	194.6	13.7	
	215.6	24.1	
Контроль лекарственного препарата (пре-ФТП)	100	3.05	1.04
DP-тест	114.9	3.81	1.04
Высокая концентрация 1	148.8	6.63	1.05
Высокая концентрация 2	215.4	26.90	1.07

- 5 Стабильность к стрессу составов с высокой концентрацией (контроль лекарственного препарата, тест на лекарственный препарат («Высокая концентрация 1» и («Высокая концентрация 2» оценивают путем воздействия на составы температуры 35°C на срок до 5 недель, как в стеклянных флаконах, так и в предварительно наполненных стеклянных шприцах (PFS). Отсутствует воздействие на концентрацию
- 10 белка или pH (pH 6,1) ни в шприцах, ни во флаконах через 5 недель при 35°C.

Используют описанную выше визуализацию микропотоков (MFI) для характеристики размера, концентрации и морфологии частиц, присутствующих в образцах. Никаких существенных различий не отмечают в размере, количестве и/или морфологии частиц, присутствующих в составах с разной концентрацией через 5

15 недель при 35°C.

Процент высокомолекулярных частиц и мономера определяют с использованием сканирующей электронной микроскопии (SEC), как описано выше. Составы оценивают в нулевое время и через 5 недель пребывания при 5°C или 35°C; результаты представлены в табл. 7.

Таблица 7. Процентное содержание мономера и высокомолекулярных частиц в составах с высокой концентрацией

Образец	Анализ	Контроль лекарственного средства (100 мг/мл)		Контроль лекарственного средства (100 мг/мл)		Контроль лекарственного средства (150 мг/мл)		Контроль лекарственного средства (200 мг/мл)	
		СФ	ЗСШ	СФ	ЗСШ	СФ	ЗСШ	СФ	ЗСШ
0	Мономеры, %	99.2	99.2	99.1	99.1	99.1	99.0	98.9	98.9
	ВМЧ, %	0.6	0.6	0.7	0.7	0.8	0.8	1.0	1.0
5 недель при 5°C	Мономеры, %	N/A	98.5	N/A	98.4	N/A	98.2	N/A	97.9
	ВМЧ, %	N/A	0.9	N/A	1.0	N/A	1.2	N/A	1.6
5 недель при 35°C	Мономеры, %	97.4	97.5	97.3	97.3	96.8	96.9	96.1	96.2
	ВМЧ, %	1.9	1.8	2.1	2.1	2.5	2.5	3.3	3.2

Примечание: СФ – стеклянный флакон; ЗСШ – заполненный стеклянный шприц; ВМЧ – высокомолекулярные частицы; N/A – нет данных.

- 5 Как показано выше, составы антител с высокой концентрацией проявляют долговременную термическую стабильность.

Пример 5. Долговременная стабильность составов с высокой концентрацией, помещенных во флаконы

- 10 Долговременную стабильность контрольного состава DP высокой концентрации из примера 4 анализируют, используя описанную выше методологию, путем выдерживания состава при 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) или 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) на протяжении 36 месяцев и 24 месяцев, соответственно. Результаты представлены в табл. 8 и 9.

Таблица 8. Долговременная стабильность контрольного состава лекарственного препарата через 36 месяцев при 5°C $\pm 3^\circ\text{C}$

- 15 NS: не запланировано; НТ: не проверено.

CEX-HPLC	≤ 30% кислого типа	8	8	8	8	7	7	8	7	7	7
	≥ 60% главного типа	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
	≤ 30% основного типа	8	7	8	7	7	7	7	7	8	8
SDS-PAGE (восстанови – тельный)	≥ 95% суммы легкой и тяжелой цепей	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Полоса тяжелой цепи ~ 54 кДа и легкой цепи ~26 кДа в исследуемом образце по совпадению подвижности стандарта	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит
SDS-PAGE (не восстановительный)	≥ 85% основной полосы	97	94	97	94	98	98	99	100	100	98
CE-SES (восстановительный)	Лимит не указан. % суммы тяжелой и легкой цепей	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	98	98	98
CE-SES (не восстановительный)	Лимит не указан. % главного типа	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	98	99	98
	Лимит не указан. % фрагментов	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	< 2	1	<2
Относительная активность	60-150% активности относительно стандарта	94	105	94	105	107	108	101	98	110	103
	Положительно для ингибирования FXIIa	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит
Эндотоксин	≤ 25,00 ИФА ед./мл	< 2.50	NS	< 2.50	NS	NS	NS	< 2.50	NS	< 2.50	<2.5
Стерильность	Микробный рост не обнаружен	Проходит	NS	Проходит	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: не запланировано; НТ: не проверено; 1°: первичные пределы, актуальные в нулевое время; 2°: вторичные пределы, действующие после нулевого времени

Таблица 9. Долговременная стабильность контрольного состава лекарственного препарата через 24 месяца при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Тест	Условные ограничения	Продолжительность (месяцы)							
		0	3	6	9	12	18	24	
Проходит контроль, если флакон цел	Проходит контроль, если флакон цел	Проходит	NS	Проходит	NS	Проходит	Проходит	Проходит	
Динамическое рассеяние света	Z-среднее (лимит не указан)	10.2	NS	10.4	NS	10.9	11.1	11.4	
	Полидисперсность (лимит не указан)	0.044	NS	0.062	NS	0.097	0.128	0.153	
	≥ 2 мкм на контейнер	3980	6010	10772	18615	6787	1798	3272	
	≥ 5 мкм на контейнер	548	1430	2180	9258	2275	390	817	
Подсчет невидимых частиц (малый объем)	≤ 6000 частиц >10 мкм на контейнер	68	318	297	4162	618	53	160	
	≤ 600 частиц ≥10 мкм на контейнер	2	17	5	337	40	2	5	
	1°: от легкой опалесценции до прозрачности жидкости, от желтого до бесцветного Нет видимых частиц.	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	
Описание	2°: от легкой опалесценции до прозрачности жидкости; от желтого до бесцветного могут быть частицы.	Нет частиц	Нет видимых частиц	Нет частиц	Нет частиц	Нет частиц	Нет частиц	Нет видимых частиц	
	pH	5.9	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	
Общая концентрация белка	90-110 мг/мл	98	98	99	97	99	98	99	
	≤ 5,0% с выгокой М.м.	1.2	1.7	2.0	2.2	2.2	2.3	2.4	
	≥ 95% мономера	98.3	97.8	97.6	97.4	97.3	97.0	96.9	
SE-HPLC	≤ 5,0% фрагментов	0.5	0.5	0.4	0.4	0.5	0.7	0.7	

CEX-HPLC	≤ 30% кислого типа	8	7	8	9	8	10	11
	≥ 60% главного типа	85	84	84	84	84	83	82
	≤ 30% основного типа	7	8	8	7	8	7	7
SDS-PAGE (восстановительный)	≥ 95% суммы легкой и тяжелой цепей	100	100	100	99	100	98	100
	Полоса тяжелой цепи ~ 54 кДа и легкой цепи ~ 26 кДа в исследуемом образце по совпадению подвижности стандарта	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит
	≥ 85% основной полосы	94	96	91	94	93	88	85
CE-SES (восстановительный)	Лимит не указан. % суммы тяжелой и легкой цепей	NS	NS	NS	NS	NS	95	93
	Лимит не указан. % главного типа	NS	NS	NS	NS	NS	89	88
	Лимит не указан. % фрагментов	NS	NS	NS	NS	NS	10	12
Относительная активность	60-150% активности относительно стандарта	105	105	110	100	101	105	106
	Положительно для ингибирования FXIIa	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит	Проходит
	≤ 25,00 ИФА ед./мл	< 2.50	NS	NS	NS	<2.50	NS	< 2.50
Эндотоксин	Микробный рост не обнаружен	Проходит	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: не запланировано; 1°: первичные пределы, актуальные в нулевое время; 2°: вторичные пределы, действующие после нулевого времени

Пример 6: Стабильность составов с высокой концентрацией в предварительно заполненных шприцах

Стабильность контрольного состава с высокой концентрацией лекарственного препарата (пример 4) в предварительно заполненных шприцах оценивают через 3, 6 и 12 месяцев с использованием методики, описанной выше, выдерживая состав при 5°C (±3°C) или 25°C (±2 °C). Результаты представлены в табл. 10-15.

Таблица 10.1. Стабильность контрольного состава лекарственного препарата в предварительно заполненных шприцах при 5°C ± 3°C

Лекарственный препарат в ФСБ, заполненность шприца 1,2 мл						
		+5°C				
Время (мин)		0	3	6	9	12
Визуальное описание		Желтый с небольшой опалесценцией, частицы не видны				
		1,2 мл	1,2 мл	1,2 мл	1,2 мл	1,2 мл
Концентрация белка (мг/мл)		172	171	170	173	174
pH		5.9	6.0	6.0	6.0	6.0
Эффективность		101	89	100	110	108
SE-HPLC (агрегаты, %)		1.1	2.1	2.4	2.4	2.6
CE-SDS (фрагменты,%) NR		1	1	2	2	2
Кислые варианты (IEX-HPLC)		8%	8%	8%	8	8
Основные варианты (IEX-HPLC)		6%	7%	7%	8	7
Частицы/мл	≥ 10 мкм	21	60	64	72	82
	≥ 25 мкм	1	11	2	5	2
Осмоляльность (мОсм/кг)		467	471	445	NS	NS

Таблица 10.2. Стабильность контрольного состава лекарственного препарата в предварительно заполненных шприцах при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

Лекарственный препарат в ФСБ, заполненность шприца 1,8 мл				
		+5°C		
Время (мин)		0	3	6
Визуальное описание		Желтый с небольшой опалесценцией, частицы не видны		
		1,8 мл	1,8 мл	1,8 мл
Концентрация белка (мг/мл)		173	171	170
pH		6	6	6
Эффективность		93	97	105
SE-HPLC (агрегаты, %)		1.1	2.0	2.4
CE-SDS (фрагменты,%) NR		1	2	2
Кислые варианты (IEX-HPLC)		8%	8%	8%
Основные варианты (IEX-HPLC)		6%	8%	7%
Частицы/мл	≥ 10 мкм	42	12	18
	≥ 25 мкм	2	0	1
Осмоляльность (мОсм/кг)		464	465	445

5 Таблица 11.1. Стабильность контрольного состава лекарственного препарата в предварительно заполненных шприцах при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Лекарственный препарат в ФСБ, заполненность шприца 1,2 мл						
		+25°C				
Время (мин)		0	3	6	9	12
Визуальное описание		Желтый с небольшой опалесценцией, частицы не видны				
		1,2 мл	1,2 мл	1,2 мл	1,2 мл	1,2 мл
Концентрация белка (мг/мл)		172	170	170	170	178
pH		5.9	6.0	6.0	6.0	6.0
Эффективность		101	91	104	103	105
SE-HPLC (агрегаты, %)		1.1	2.9	3.3	3.4	3.6
CE-SDS (фрагменты,%) NR		1	3	4	6	6
Кислые варианты (IEX-HPLC)		8%	8%	8%	9%	9%
Основные варианты (IEX-HPLC)		6%	7%	8%	9%	8%
Частицы/мл	≥ 10 мкм	21	69	358	540	1080
	≥ 25 мкм	1	3	18	25	49
Осмоляльность (мОсм/кг)		467	477	447	NS	NS

Таблица 11.2. Стабильность контрольного состава лекарственного препарата в предварительно заполненных шприцах при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Лекарственный препарат в ФСБ, заполненность шприца 1,8 мл				
		+25°C		
Время (мин)		0	3	6
Визуальное описание		Желтый с небольшой опалесценцией, частицы не видны		
		1,8 мл	1,8 мл	1,8 мл
Концентрация белка (мг/мл)		173	170	169
pH		6	6	6
Эффективность		93	91	116
SE-HPLC (агрегаты, %)		1.1	2.9	3.3
CE-SDS (фрагменты, %) NR		1	3	4
Кислые варианты (IEX-HPLC) Основные варианты (IEX-HPLC)		8%	8%	8%
		6%	7%	8%
Частицы/мл	≥ 10 мкм	42	49	144
	≥ 25 мкм	2	0	5
Осмоляльность (мОсм/кг)		464	457	450

5 Таблица 12. Стабильность контрольного состава лекарственного препарата в предварительно заполненных шприцах в течение 12 месяцев при $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Лекарственное средство в ФСБ (2,2 мл) при +5 °C								
Время (мин)		0	3	6	9	12	18	24
Визуальное описание		Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц
Концентрация белка (мг/мл)		170	172	167	167	171	171	169
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Эффективность		95	95	105	103	97	108	99
SE-HPLC (агрегаты, %)		1.7	2.3	2.8	3.0	3.1	3.2	3.4
CE-SDS (фрагменты, %) NR		1	1	2	2	2	1	2
Кислые варианты (IEX-HPLC) Основные варианты (IEX-HPLC)		10	9	10	9	9	9	9
		7	8	8	8	8	8	9
Частицы в контейнере	≥ 10 мкм	581	380	208	331	227	364	966
	≥ 25 мкм	40	106	18	25	6	32	129
Осмоляльность (мОсм/кг)		453	NS	462	NS	458	NS	NS

Таблица 13. Стабильность контрольного состава лекарственного препарата в предварительно заполненных шприцах в течение 12 месяцев при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Лекарственное средство в ФСБ (2,2 мл) при +25 °С								
Время (мин)		0	3	6	9	12	18	24
Визуальное описание		Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц	1 - 2 видимых частиц	10 - 20 видимых частиц	>10 видимых частиц	>30 видимых частиц
Концентрация белка (мг/мл)		170	170	169	172	168	169	171
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	5.9	5.9
Эффективность		95	87	105	111	102	113	107
SE-HPLC (агрегаты, %)		1.7	3.2	4.0	4.3	4.5	4.8	5.3
CE-SDS (фрагменты,%) NR		1	3	4	5	7	9	12
Кислые варианты (IEX-HPLC)		10	9	9	10	11	12	13
Основные варианты (IEX-HPLC)		7	9	9	9	9	9	10
Частицы в контейнере	≥ 10 мкм	581	315	991	3585	1120	2682	2465
Частицы в контейнере	≥ 25 мкм	40	33	126	606	137	449	320
Осмоляльность (мОсм/кг)		453	NS	461	NS	426	NS	NS

Таблица 14. Стабильность контрольного состава лекарственного препарата в предварительно заполненных вручную шприцах в течение 12 месяцев при $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Лекарственное средство в ФСБ (2,2 мл) (ручное наполнение) при +5 °C						
Время (мин)		0	3	6	9	12
Визуальное описание		Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц
Концентрация белка (мг/мл)		170	172	167	169	171
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Эффективность		95	95	105	103	97
SE-HPLC (агрегаты, %)		1.7	2.3	2.8	3.0	3.1
CE-SDS (фрагменты,%) NR		1	1	2	2	2
Кислые варианты (IEX-HPLC)		10	9	10	9	9
Основные варианты (IEX-HPLC)		7	8	8	8	8
Частицы в контейнере	≥ 10 мкм	581	380	208	331	227
Частицы в контейнере	≥ 25 мкм	40	106	18	25	6
Осмоляльность (мОсм/кг)		453	NS	462	NS	458

Таблица 15. Стабильность контрольного состава лекарственного препарата в предварительно заполненных вручную шприцах в течение 12 месяцев при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Лекарственное средство в ФСБ (2,2 мл) при $+25^{\circ}\text{C}$					
Время (мин)	0	3	6	9	12
Визуальное описание	Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц	Проходит, нет видимых частиц	1 - 2 видимых частиц	10 - 20 видимых частиц
Концентрация белка (мг/мл)	170	170	169	172	168
pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Эффективность	95	87	105	111	102
SE-HPLC (агрегаты, %)	1.7	3.2	4.0	4.3	4.5
CE-SDS (фрагменты, %) NR	1	3	4	5	7
Кислые варианты (IEX-HPLC)	10	9	9	10	11
Основные варианты (IEX-HPLC)	7	9	9	9	9
Частицы в контейнере ≥ 10 мкм	581	315	991	3585	1120
Частицы в контейнере ≥ 25 мкм	40	33	126	606	137
Осмоляльность (мОсм/кг)	453	NS	461	NS	426

5 Пример 7. Примеры составов

Два стабильных состава с высокой концентрацией, основанные на представленных здесь данных, показаны в табл. 16. Критерии приемлемости для этих составов показаны в табл. 17.

Таблица 16. Примеры высококонцентрированных составов

Экципиент	Количество или концентрация	Количество или концентрация
Анти-FXII антитело	100 мг/мл	170 мг/мл
L-гистидин	20 mM	20 mM
L-аргинин моногидрохлорид	150 mM	150 mM
L-пролин	140 mM	140 mM
Полисорбат 80	0,02% (масса/объем)	0,02% (масса/объем)
pH	6.1	6.1
Осмоляльность (мОсм/кг)	~430 мОсм/кг	~450 мОсм/кг
Вязкость	2.8 cP (@ 25°C); 3.3 cP (@ 20°C)	7.5 cP (@ 25°C); 8.9 cP (@ 20°C)

Таблица 17. Критерии приемлемости для примеров составов с высокой концентрацией

Параметр	Тест	Критерии приемлемости
Содержание белка	УФ спектрофотометрии (280 нм)	160-180 мг/мл
Чистота	Эксклюзионная ВЭЖХ (SE-HPLC)	$\leq 4,5\%$ HMWS $\geq 95,0\%$ мономер $\leq 20\%$ кислых типов $\geq 60\%$ основного пика
	Катион-обменная ВЭЖХ (CEX-HPLC)	$\leq 20\%$ основных типов
	CE-SDS (без восстановления)	$\geq 90\%$ основного пика $\leq 8\%$ LMWS
	CE-SDS (с восстановлением)	$\geq 95\%$ суммы HC+LC
Экципиенты	Полисорбат 80	0,010% - 0,030% (масса/объем)
	Гистидин	12-15 мМ
	Аргинин	100-160мМ
	Пролин	90-150 мМ
Чистота/безопасность	Стерильность	Нет роста микроорганизмов
	Эндотоксин	$\leq 25,00$ EU/мл
Качество	Видимые частицы	Отсутствуют
	Прозрачность	≤ 25 НЕМ
	Цвет	между BY2 и BY5
	Осмоляльность	430-530 мОсм/кг
	pH	5,8-6,4
	Невидимые частицы	≤ 6000 частиц размером ≥ 10 мкм на контейнер
		≤ 600 частиц размером ≥ 25 мкм на контейнер
	Экстрагируемый объем	$\geq 1,2$ мл

5 Пример 8. Фармакокинетическое исследование после введения однократной дозы составов с высокой концентрации после подкожного введения кроликам

Цель этого исследования заключается в оценке фармакокинетических (РК – pharmacokinetic) свойств двух составов с высокой концентрацией (100 и 170 мг/мл, как показано в примере 7) после однократного подкожного введения кроликам. Образцы крови новозеландских белых кроликов обрабатывают для получения плазмы и анализируют. Анализ образцов плазмы показывает сходное увеличение профиля концентрации лекарственного средства для обеих групп концентрации анти-FXII антител. Уровни антигена анти-FXII антитела в образцах плазмы кролика определяют с помощью разработанного анализа (ELISA). Максимальные концентрации в плазме ($C_{\max}$) анти-FXII антитела обычно наблюдают через 24 или 48 ч после введения дозы. $C_{\max}$ и площадь под кривой (AUC – area under the curve) для группы 1 и группы 2

увеличиваются примерно в одинаковой степени в 1-й день теста. Средний терминальный период полувыведения из плазмы $t_{1/2}$ анти-FXII антитела сопоставим для всех видов лечения. Ни по одному из фармакокинетических параметров не отмечают заслуживающих внимания гендерных различий. Предельные различия, отмеченные между различными видами лечения, протестированными для нескольких фармакокинетических параметров, считают находящимися в пределах нормальной вариабельности для этого размера выборки (три животных каждого пола и временная точка). Результаты фармакокинетической оценки CSL312 в кроличьей сыворотке суммируют в табл. 18.

Таблица 18. Фармакокинетический анализ лекарственного препарата (среднее $\pm$ стандартное отклонение)

Концентрация лекарственного препарата (мг/мл)	Доза*1 (мг/кг)	№ животного	C _{max} мкг/мл	t _{max} (ч)	t _{1/2} (ч)	K _{el} (1/ч)	AUC _{0-t last} (мкг•ч /мл)	AUC _{0-inf} (мкг•ч /мл)	AUC _{0-t last} /доза (г•ч/л)
Самцы									
100	20	1	67.53	48	84.35	0.0082	7953.38	11055.78	397.8
		2	52.26	24	117.05	0.0059	5550.47	9137.87	277.5
		3	70.59	48	49.47	0.0140	7012.31	7990.66	350.6
		Среднее	63.46 ±9.8	40.0 ±13.9	83.26 ±47.79	0.0094 ±0.0042	6839.72 ±1212.2	10096.83 ±1356.2	342.0 ±60.6
170	20	7	73.73	48	114.94	0.0060	9016.31	15057.97	450.8
		8	70.72	24	88.03	0.0079	8706.48	12400.41	435.3
		9	82.84	48	110.35	0.0063	9947.69	16155.04	497.4
		Среднее	75.76 ±6.3	40.0 ±13.9	104.44 ±14.40	0.0067 ±0.0010	9223.49 ±6646.0	14537.81 ±1930.6	461.2 ±32.3
Самки									
100	20	4	76.41	48	93.19	0.0074	9383.27	13722.02	469.2
		5	73.31	24	90.71	0.0076	8810.06	12656.57	440.5
		6	79.74	48	91.75	0.0076	9943.87	14478.75	497.2
		Среднее	76.49 ±3.2	40.0 ±13.9	91.88 ±1.25	0.0075 ±0.0001	9379.07 ±566.9	13619.11 ±915.4	469.0 ±28.4
170	20	10	103.47	24	137.39	0.0050	12433.46	22743.18	621.7
		11	73.74	48	116.38	0.0060	9411.46	15820.82	470.6
		12	63.31	48	66.03	0.0105	63.70.69	8125.82	318.5
		Среднее	80.17 ±20.8	40.0 ±13.9	106.60 ±36.67	0.0072 ±0.0029	9405.28 ±3031.39	15563.27 ±7312.1	470.3 ±151.6

^{#1} Значения, полученные из анализа сыворотки, все остальные значения рассчитаны с помощью фармакокинетического анализа.

В целом, оба препарата с высокой концентрацией показали схожий фармакокинетический профиль после подкожного введения.

Пример 9. Местная переносимость к многократным дозам составов с высокой концентрацией после подкожного введения кроликам

5 Оценивают местную переносимость двух препаратов с высокой концентрацией (100 и 170 мг/мл, как показано в примере 7) после подкожного введения кроликам в два отдельных дня с интервалом в 1 неделю. Белых новозеландских кроликов исследуют макроскопически в связи с подкожными инъекциями под кожу спины через 1, 2, 6, 24, 48 и 72 ч после введения. После общего периода наблюдения (11 дней после первого
10 введения) всех животных умерщвляют, а места инъекций исследуют макро- и микроскопически.

 Ни у одного кролика в течение периода наблюдения не было признаков токсичности и влияния на массу тела. Ни одно животное не погибло преждевременно. Никакого местного раздражения в каком-либо месте нанесения не было заметно в
15 любое время в течение периода исследования после введения двух составов с высокой концентрацией. Вскрытие также не выявило никаких изменений. Гистопатологическое исследование кожи кролика, обработанной подкожно двумя составами, не выявило морфологических изменений, связанных с лекарственным средством, после
20 подкожного введения. Наблюдалось лишь небольшое количество морфологических изменений от легкой до умеренной степени для кожи, обработанной лекарственным средством, на правой стороне и отрицательного контроля, обработанного 0,9% раствором NaCl, на левой стороне. Все эти изменения считают процедурными, вызванными техническим применением, а не лекарственными препаратами.

 В целом подкожное введение двух высококонцентрированных составов в течение
25 двух дней хорошо переносится и не выявляет связанных с препаратом изменений в местах инъекций.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкий фармацевтический состав, содержащий по меньшей мере 100 мг/мл белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается или
5 специфически связывается с фактором XII и/или его активированной формой, буфер с органической кислотой, неионогенное поверхностно-активное вещество и аминокислотный стабилизатор, где состав имеет рН от 5,0 до 6,5 и вязкость менее примерно 30 мПа•с при 20°C.

10 2. Состав по п. 1, в котором белок содержится в составе в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл.

3. Состав по п.п. 1 или 2, в котором белок содержится в составе в концентрации от 160 мг/мл до 180 мг/мл.

15 4. Состав по любому из п.п. 1-3, в котором состав является водным составом.

5. Состав по любому из п.п. 1-4, в котором буфер с органической кислотой выбран из группы, состоящей из гистидинового буфера и глутаматного буфера.

20 6. Состав по любому из п.п. 1-5, в котором буфер с органической кислотой является гистидиновым буфером.

25 7. Состав по любому из п.п. 1-6, в котором неионное поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата 80, полисорбата 20 и полуксамера 188.

8. Состав по любому из п.п. 1-7, в котором неионное поверхностно-активное вещество является полисорбатом 80.

30 9. Состав по любому из п.п. 1-8, в котором аминокислотный стабилизатор выбран из группы, состоящей из пролина, аргинина, их солей и их комбинации.

10. Состав по любому из п.п. 1-9, в котором аминокислотный стабилизатор является пролином.

5 11. Состав по любому из п.п. 1-10, в котором состав дополнительно содержит полиол.

12. Состав по любому из п.п. 1-11, в котором состав содержит гистидиновый буфер, пролин и полисорбат 80.

10 13. Состав по любому из п.п. 1-12, в котором состав дополнительно содержит аргинин моногидрохлорид.

15 14. Фармацевтический состав, содержащий примерно от 100 мг/мл до 110 мг/мл белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает или специфически связывает фактор XII и/или его активированную форму, гистидиновый буфер, полисорбат 80, а также пролин и аргинин моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, причем состав имеет рН от 5,5 до 6,5 и вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C.

20 15. Фармацевтический состав, содержащий примерно от 100 мг/мл до 110 мг/мл белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает или специфически связывает фактор XII и/или его активированную форму, гистидиновый буфер, полисорбат 80, а также пролин и аргинин моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, причем состав имеет рН от 5,5 до 6,5 и вязкость менее примерно 10 мПа•с при 20°C.

25 16. Состав по любому из п.п. 1-15, в котором состав имеет рН от 5,8 до 6,4 и содержит от 12 мМ до 25 мМ L-гистидинового буфера, от 0,01 % до 0,03 % (мас./об.) полисорбата 80, от 90 мМ до 150 мМ L-пролина и от 100 до 160 мМ L-аргинина моногидрохлорида.

30 17. Состав по любому из п.п. 1-16, в котором состав имеет рН от 5,8 до 6,4 и содержит примерно 20 мМ L-гистидинового буфера, 0,02 % (мас./об.) полисорбата 80, 140 мМ L-пролина и 150 мМ L-аргинина моногидрохлорида.

18. Состав по любому из п.п. 1-17, в котором вязкость состава составляет менее примерно 9 мПа•с при 20°C.

5 19. Состав по любому из п.п. 1-18, в котором состав имеет плотность от примерно 1,00 до примерно 1,10 г/см³ при 20°C.

20. Состав по любому из п.п. 1-19, в котором состав содержит менее примерно 10% суммарных агрегатов белка.

10 21. Состав по любому из п.п. 1-20, в котором по меньшей мере 90% белка в составе представляет собой мономер.

15 22. Состав по любому из п.п. 1-21, в котором антигенсвязывающий домен связывает или специфически связывает фактор XII и/или его активированную форму и противодействует активности фактора XII и/или его активированной формы, и/или противодействует активация фактора XII и/или его активированной формы.

20 23. Состав по любому из п.п. 1-22, в котором белок содержит антигенсвязывающий домен антитела.

24. Состав по любому из п.п. 1-23, в котором белок выбран из группы, состоящей из:

(i) одноцепочечного фрагмента Fv (scFv);

(ii) димера scFv (di-scFv);

25 (iii) диатела;

(iv) триатела;

(v) тетратела;

(vi) Fab;

(vii) F(ab')₂;

30 (viii) Fv;

(ix) одного из (i)-(viii), связанного с константной областью антитела, Fc или константным доменом тяжелой цепи (CH) CH₂ и/или CH₃; или

(x) антитела.

25. Состав по любому из п.п. 1-24, в котором белок содержит:

(i) V_H , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2,

5 (ii) V_H , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; или

(iii) V_H , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность,
10 представленную в SEQ ID NO: 6.

26. Состав по любому из п.п. 1-24, в котором белок содержит:

(i) V_H содержащую:

(a) CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7;
15 CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; и CDR3
содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; или

(б) CDR1 содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7;
CDR2 содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; и CDR3
содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; или

20 (в) CDR1 содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7;
CDR2 содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; и CDR3
содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; или

(г) CDR1 содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7;
CDR2 содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16; и CDR3
25 содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и/или

(ii) V_L , включающую:

(a) CDR1 содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;
CDR2 содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; и CDR3
содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14; или

30 (б) CDR1 содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;
CDR2 содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; и CDR3
содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

27. Состав по п. 26, в котором белок содержит V_H , включающую CDR2, представленную в SEQ ID NO: 10, где X в положении 3 представляет собой D, X в положении 4 представляет собой I, X в положении 5 представляет собой P, X в положении 6 представляет собой T, X в положении 7 представляет собой K, и X в положении 8 представляет собой G.

28. Состав по любому из п.п. 1-27, в котором белок содержит константную область IgG₄.

29. Состав по п. 28, в котором константная область IgG₄ представляет собой стабилизированную константную область IgG₄.

30. Фармацевтический состав, содержащий от примерно 100 мг/мл до примерно 170 мг/мл белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает или специфически связывает фактор XII и/или его активированную форму, гистидиновый буфер, полисорбат 80, а также пролин и аргинин моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, где состав имеет pH от 5,5 до 6,5 и вязкость менее примерно 30 мПа•с при 20°C, где белок содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

31. Фармацевтический состав, содержащий от примерно 100 мг/мл до примерно 170 мг/мл белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает или специфически связывает фактор XII и/или его активированную форму, гистидиновый буфер, полисорбат 80 и пролин и аргинин моногидрохлорид в качестве стабилизаторов, причем состав имеет pH от 5,5 до 6,5 и вязкость менее примерно 30 мПа•с при 20°C и где белок содержит:

- (i) V_H , содержащую CDR1, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16; и CDR3, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и
- (ii) V_L , содержащую CDR1, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12; CDR2, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; и CDR3, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

32. Фармацевтический состав по любому из п.п. 1-31 для применения в целях противодействия активности и/или противодействия активации фактора XII и/или его активированной формы.

5 33. Способ противодействия активности и/или противодействия активации фактора XII и/или его активированной формы, включающий введение фармацевтического состава по любому из п.п. 1-31.

10 34. Применение фармацевтического состава по любому из п.п. 1-31 для получения лекарственного средства для противодействия активации фактора XII и/или его активированной формы у субъекта.

15 35. Фармацевтический состав по любому из п.п. 1-31 для применения при лечении или профилактике заболевания или состояния у субъекта.

36. Способ лечения или профилактики заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение фармацевтического состава по любому из п.п. 1-31.

20 37. Применение фармацевтического состава по любому из п.п. 1-31 для получения лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или состояния у субъекта.

25 38. Состав для применения по п. 35, способ по п. 36 или применение по п. 37, где заболевание или состояние представляет собой тромботическое расстройство, воспалительное расстройство и/или тромбовоспалительное расстройство.

30 39. Состав для применения, или способ, или применение по п. 38, где заболевание или состояние выбирают из группы, в которую входят образование венозных, артериальных или капиллярных тромбов (таких как инсульт, инфаркт миокарда, тромбоз глубоких вен (ТГВ), порталный тромбоз вен, тромбоз почечных вен, тромбоз яремной вены, тромбоз мозгового синуса, синдром Бадда-Киари, болезнь Педжета-Шреттера или неая ишемия головного мозга), тромбообразование в сердце, тромбоэмболия, тромбообразование во время и/или после контакта с кровью человека

или животного с искусственными поверхностями, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови (ДВС-синдром), фибрилляция предсердий, острые коронарные синдромы (ОКС), атеросклеротическое заболевание, ишемический инсульт с реперфузией, заболевание, связанное с ишемически-реперфузионным повреждением (ИРП, такое как травма, трансплантация органов), нейротравматическое расстройство (например, черепно-мозговая травма, повреждение спинного мозга), неврологическое воспалительное заболевание (например, рассеянный склероз), интерстициальное заболевание легких (такое как идиопатический легочный фиброз (ИЛФ)), пневмония, фибринолиз, заболевание, связанное с FXII/FXI la-индуцированным образованием кинина (например, наследственный ангионевротический отек (НАО)), сепсис, заболевание, связанное с FXII/FXIIa-опосредованной активацией комплемента, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), трансплантация органов и клеток, серповидно-клеточная анемия и состояние, связанное с повышенной проницаемостью сосудов.

40. Набор для применения для противодействия активности и/или противодействия активации фактора XII и/или его активированной формы у субъекта, содержащий:

- (а) по меньшей мере один фармацевтический состав по любому из п.п. 1-31;
- (б) инструкции по применению набора для противодействия активности и/или противодействия активации фактора XII и/или его активированной формы у субъекта; и
- (в) необязательно по меньшей мере одно дополнительное терапевтически активное соединение или лекарственное средство.

41. Набор для лечения или профилактики заболевания или состояния у субъекта, содержащий:

- (а) по меньшей мере один фармацевтический состав по любому из п.п. 1-31;
- (б) инструкции по применению набора для лечения или профилактики заболевания или состояния у субъекта; и
- (в) необязательно, по меньшей мере, еще одно терапевтически активное соединение или лекарственное средство.

42. Набор по любому из п.п. 40 или 41, в котором состав находится во флаконе, предварительно заполненном шприце или автоинжекторе.

5 43. Предварительно заполненный шприц, содержащий фармацевтический состав по любому из п.п. 1-31.

44. Автоинжектор, содержащий фармацевтический состав по любому из п.п. 1-31.