

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044534**

(13) **B1**

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

- |                                       |               |                             |
|---------------------------------------|---------------|-----------------------------|
| (45) Дата публикации и выдачи патента | (51) Int. Cl. | <i>C07K 16/38</i> (2006.01) |
| <b>2023.08.31</b>                     |               | <i>C07K 1/16</i> (2006.01)  |
| (21) Номер заявки                     |               | <i>C07K 1/22</i> (2006.01)  |
| <b>202190825</b>                      |               | <i>C07K 1/34</i> (2006.01)  |
| (22) Дата подачи заявки               |               | <i>C07K 1/36</i> (2006.01)  |
| <b>2019.09.06</b>                     |               | <i>A61P 7/02</i> (2006.01)  |

---

(54) **ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ КОМПОЗИЦИЯ АНТИТЕЛА ПРОТИВ TFPI**

---

- |   |                         |
|---|-------------------------|
| (31) <b>10-2018-0113974</b>   | (56) KR-A-1020160103767 |
| (32) <b>2018.09.21</b>  | KR-A-1020150027807      |
| (33) <b>KR</b>  | US-A1-20080312425       |
| (43) <b>2021.06.17</b>  | US-A1-20120028901       |
| (86) <b>PCT/KR2019/011582</b>   | US-A1-20160115195       |
| (87) <b>WO 2020/060087 2020.03.26</b>   |                         |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br><b>ГРИН КРОСС КОРПОРЕЙШН (KR)</b>                                    |                         |
| (72) Изобретатель:<br><b>Ким Мин Дзунг, Йео Геун Хие, Сонг<br/>Хаенг Еун, Парк Дзи Йоон, Ким Юна<br/>(KR)</b> |                         |
| (74) Представитель:<br><b>Медведев В.Н. (RU)</b>  |                         |

- 
- (57) Настоящее изобретение относится к высокоэффективной фармацевтической композиции антитела против TFPI, включающей антитело против TFPI, для лечения гемофилии, где содержание НСР в лекарственном веществе составляет менее чем 10 нг/мг, а содержание LPA в лекарственном веществе или лекарственном продукте составляет менее чем 1 нг/мг. Согласно настоящему изобретению высокоэффективная композиция антитела против TFPI, имеющая очень низкое содержание НСР и LPA, может быть предоставлена путем обеспечения способа разделения/очистки, способного минимизировать образование полимера антитела против TFPI, и может быть эффективно использована для лечения пациентов с гемофилией, индуцированной антителами, и для предотвращения заболевания свертывания крови.

**B1**

**044534**

**044534  
B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к высокоэффективной композиции антитела против TFPI для лечения гемофилии.

### Уровень техники

Антитело против TFPI представляет собой рекомбинантное антитело против ингибитора пути тканевого фактора (далее именуемое как антитело против TFPI), которое представляет собой моноклональное человеческое антитело IgG4, имеющее высокую аффинность к ингибитору пути тканевого фактора (далее именуемому как TFPI).

Антитело против TFPI используется в качестве терапевтического агента при гемофилии, который коагулирует кровь путем ингибирования связывания между TFPI и активированным фактором X (FXa) и путем индуцирования активации нижестоящего фактора свертывания крови FX во внешнем пути коагуляции крови.

Антитело против TFPI представляет собой антитело типа IgG4, и когда его применяют в общепринятом способе получения антител, возникают проблемы, связанные с увеличением образования этого полимера во время осуществления способа, что приводит к снижению терапевтического эффекта продукта, и воспроизводимость способа варьировалась из-за высокой нестабильности антитела при низких значениях pH.

В частности, когда полимер присутствует в конечном концентрате антитела против TFPI на соответствующем уровне или выше, полимер оказывает неблагоприятное воздействие, так как он снижает аффинность связывания антитела против TFPI с антигеном TFPI, что приводит к снижению в эффективности антитела.

Следовательно, необходимо надлежащим образом поддерживать условия осуществления способа, чтобы предотвратить образование полимера в способе получения антитела против TFPI, и полимер, неизбежно образующийся в способе очистки антител, следует селективно удалять.

Таким образом, разработка способа очистки высокочистого антитела против TFPI обязательно необходима для разработки высокоэффективного терапевтического агента в виде антитела против TFPI.

Таким образом, чтобы получить высокоэффективную композицию антитела против TFPI, авторы настоящего изобретения провели исследования условий способа нейтрализации в способе аффинной хроматографии для адсорбции белковых примесей, способа минимизации образования полимера антитела против TFPI, и селективного удаления образовавшегося полимера в способе очистки хроматографией в смешанном режиме, а также способа максимизации выхода очистки антитела против TFPI в первом способе ультрафильтрации и диафильтрации, втором способе ультрафильтрации и диафильтрации и в способе конечного концентрирования, и было обнаружено, что может быть получено высокоэффективное антитело против TFPI, что завершает настоящее описание.

Документы предшествующего уровня техники.

Патентные документы.

Патентный документ 1. Патент Кореи № 10-1744899.

Патентный документ 2. Патент Кореи № 10-1804988.

Непатентные документы.

Непатентный документ 1. 1. Defining your product profile and maintaining control over it, part 2: challenges of monitoring host cell protein impurities. *BioProcess Int* 2005; 3:52-4, 6,8

Непатентный документ 2. 2. CHOPPI: A Web Tool for the Analysis of Immunogenicity Risk from Host Cell Proteins in CHO-Based Protein Production. *Biotechnol Bioeng.* 2014 Nov; 111(11): 2170-2182.

Непатентный документ 3. 3. Reducing risk, improving outcomes: bioengineering less immunogenic protein therapeutics. *Clin Immunol.* 2009 May; 131 (2): 189-201

Непатентный документ 4. 4. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol.* 2008 Apr 4; 4 (4): e1000048.

### Область техники, к которой относится изобретение

#### Техническая проблема

Целью настоящего раскрытия является обеспечение высокоэффективной композиции антитела против TFPI, имеющей очень низкое содержание НСР и LPA, путем (i) минимизации образования полимера путем введения способа нейтрализации после способа элюирования аффинной хроматографии с низким pH, с целью повышения стабильности антител в способе аффинной хроматографии, (ii) определения условий разделения полимеров путем выбора эффективной очищающей смолы для селективного удаления полимера, содержащегося в антителе против TFPI, в способе хроматографии в смешанном режиме, и (iii) максимизации увеличения выхода очищенного антитела против TFPI при минимизации образования полимера антитела против TFPI в способе конечного концентрирования для получения высокоэффективной композиции антитела против TFPI.

Технические проблемы согласно настоящему раскрытию не ограничиваются вышеупомянутыми техническими проблемами, и другие технические проблемы, которые не упомянуты, могут быть ясно поняты специалистами в данной области техники из следующего описания.

## Решение проблемы

Для достижения вышеуказанной цели в настоящем описании предлагается высокоэффективная фармацевтическая композиция антитела против TFPI, включающая антитело против TFPI для лечения гемофилии, в которой общее содержание НСР и LPA в лекарственном веществе составляет 10 нг/мг или менее.

НСР (белок клетки-хозяина) представляет собой уникальный белок, детектируемый в клетке СНО, которая используется в качестве хозяина при получении антитела против TFPI, а содержание НСР в культуре клеток чрезвычайно высоко, примерно до 500000 нг/мг. С другой стороны, LPA (выщелачиваемый протеин А) представляет собой примесь протеина А, диссоциированного от смолы в способе очистки, и его содержание может различаться между продуктами в зависимости от условий очистки, но обычно составляет примерно 10 нг/мг. Таким образом, содержание примеси НСР относительно выше, чем содержание примеси LPA, и очень важно понизить содержание НСР и LPA, чтобы композиция антитела против TFPI была эффективной.

Если содержание НСР в композиции антитела против TFPI поддерживается на уровне менее чем 10 нг/мг, а содержание LPA в композиции поддерживается на уровне менее чем 1 нг/мг, то когда композицию вводят в качестве терапевтического лекарственного средства в человеческий организм, она обладает превосходным свойством снижать иммуногенные побочные эффекты и, таким образом, может проявлять превосходный эффект в качестве композиции антитела против TFPI.

В одном варианте осуществления настоящего раскрытия общее содержание НСР и LPA может составлять 5 нг/мг или менее.

Если общее содержание НСР и LPA в композиции антитела против TFPI поддерживается на уровне 5 нг/мг или менее, то когда композиция вводится в качестве терапевтического лекарственного средства в организм человека, она обладает превосходным свойством снижения иммуногенных побочных эффектов и, таким образом, может проявлять превосходный эффект в качестве композиции антитела против TFPI.

В другом варианте осуществления настоящего раскрытия высокоэффективная композиция антитела против TFPI может быть получена посредством способа осветления культуры, содержащей антитело против TFPI, способа аффинной хроматографии, способа вирусной инактивации, способа первой ультрафильтрации и диафильтрации, хроматографии в смешанном режиме, способа нанофильтрации и способа конечного концентрирования.

Еще в одном варианте осуществления настоящего раскрытия второй способ ультрафильтрации и диафильтрации может быть дополнительно включен после способа хроматографии в смешанном режиме.

Еще в одном варианте осуществления настоящего раскрытия способ хроматографии в смешанном режиме может удалить 98% или более полимера антитела против TFPI путем выполнения двух или более из множества процессов хроматографии в смешанном режиме с использованием различных типов смолы для колонок.

Если 98% или более полимера удаляется, то когда композицию вводят в организм человека в качестве терапевтического лекарственного средства, она имеет преимущества в снижении иммуногенных побочных эффектов и увеличении аффинности связывания антитела против TFPI с TFPI, и, таким образом, может проявлять лучшую активность в качестве композиции антитела против TFPI.

Еще в одном варианте осуществления настоящего раскрытия способ аффинной хроматографии может включать в себя стадии: нейтрализации элюата, прошедшего через колонку для аффинной хроматографии, в диапазоне pH от 4 до 6; и выдержки нейтрализованного элюата при комнатной температуре (от 15 до 25°C) в течение 8-16 ч.

Еще в одном варианте осуществления настоящего раскрытия способ концентрирования может включать в себя способ циркуляции/извлечения промывочного раствора.

Еще в одном варианте осуществления настоящего раскрытия содержание полимера антитела против TFPI в лекарственном веществе может составлять менее чем 1%.

Еще в одном варианте осуществления настоящего раскрытия лекарственное вещество может иметь значение  $EC_{50}$  3,26 нг/мл или менее.

Когда значение  $EC_{50}$  лекарственного вещества составляет 3,26 нг/мл или менее, композиция имеет преимущества, заключающиеся в увеличении аффинности связывания антитела против TFPI с TFPI и улучшении способности антитела против TFPI нейтрализовать функцию TFPI, и, таким образом, может проявлять превосходный эффект в качестве композиции антитела против TFPI.

Еще в одном варианте осуществления настоящего раскрытия может быть получена композиция антитела против TFPI высокой степени чистоты, в которой содержание НСР в лекарственном веществе составляет менее чем 10 нг/мг, а содержание LPA в лекарственном веществе составляет менее чем 1 нг/мг, и в то же время содержание НСР на единицу содержания антитела против TFPI в лекарственном веществе, которое является конечным продуктом, по меньшей мере в 10000 раз ниже, чем содержание НСР на единицу содержания антитела против TFPI в осветленной культуре, которая является исходным материалом.

Если композиция антитела против TFPI сохраняется в виде композиции антитела против TFPI высокой степени чистоты, в которой содержание НСР в лекарственном веществе составляет менее чем 10 нг/мг, а содержание LPA в лекарственном веществе составляет менее чем 1 нг/мг, и в то же время со-

держание НСР на единицу содержания антитела против ТFPI в лекарственном веществе, подвергнутом процессу очистки, по меньшей мере в 50000 раз ниже, чем содержание НСР на единицу содержания антитела против ТFPI в осветленной культуре, то когда композицию антитела против ТFPI вводят в организм человека в качестве терапевтического лекарственного средства, оно имеет преимущество в снижении иммуногенных побочных эффектов и, таким образом, может проявлять лучшую активность в составе композиции антитела против ТFPI.

Еще в одном варианте осуществления согласно настоящему раскрытию содержание НСР в лекарственном веществе может составлять менее чем 10 нг/мг, а содержание LPA в лекарственном веществе может составлять менее чем 1 нг/мг, и в то же время значение  $EC_{50}$  связывающей активности лекарственного вещества может составлять 3,26 нг/мл или менее.

Если общее содержание НСР и LPA составляет 5 нг/мг или менее, а значение  $EC_{50}$  активности связывания составляет 3,26 нг/мл или менее, то когда композиция антител вводится в качестве терапевтического лекарственного средства в организм человека, она имеет преимущества в снижении иммуногенных побочных эффектов и повышении аффинности связывания антитела против ТFPI с ТFPI, и, таким образом, может проявлять лучшую активность в составе композиции антитела против ТFPI.

#### Полезные эффекты изобретения

Согласно настоящему раскрытию, высокоэффективная композиция антитела против ТFPI с очень низким содержанием НСР и LPA обеспечивается за счет минимизации образования полимера, эффективного удаления образовавшегося полимера и повторного использования промывочного раствора в способе концентрирования, увеличивая, таким образом, выход после очистки. Таким образом, высокоэффективная композиция антитела против ТFPI может эффективно использоваться для лечения пациентов с гемофилией, индуцированной антителами, и для предотвращения заболевания свертывания крови.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 схематично показана блок-схема всего способа получения высокоэффективной композиции антитела против ТFPI согласно настоящему раскрытию.

На фиг. 2A показаны результаты выполнения анализа SDS-PAGE для 150 кДа (что является внутренним размером композиции антитела против ТFPI) в невосстанавливающих условиях (слева) и для тяжелой цепи 50 кДа и легкой цепи 25 кДа в восстанавливающих условиях (справа) для подтверждения наличия антител в веществе в различных процессах, от сбора культур и способа осветления до способа вирусной инактивации, а также для подтверждения профиля удаления примесей. Дорожки образцов представленных гелей SDS-PAGE следующие: дорожки 1 и 9 - маркеры; дорожка 2 -осветленная культура; дорожка 3 - несвязанный раствор аффинной хроматографии (ACU); дорожка 4 - промывка аффинной хроматографии (ACW); дорожка 5 - промывка колонки аффинной хроматографии (ACCW); дорожка 6 - элюат аффинной хроматографии (ACE); дорожка 7 - нейтрализованный элюат аффинной хроматографии (ACEN); дорожка 8 -раствор, инактивированный вирусом (VI).

На фиг. 2B показаны результаты выполнения анализа SDS-PAGE для 150 кДа (что является внутренним размером композиции антитела против ТFPI) в невосстанавливающих условиях (слева) и для тяжелой цепи 50 кДа и легкой цепи 25 кДа в восстанавливающих условиях (справа) для подтверждения наличия антител в веществе в различных процессах, от первого способа ультрафильтрации и диалфильтрации до второго способа хроматографии в смешанном режиме, а также для подтверждения профиля удаления примесей. Дорожки для образцов показанных гелей для SDS-PAGE следующие: дорожки 1 и 10 - маркеры; дорожка 2 - ретентат первой UF; дорожка 3 - пермеат первой UF; полоса 4 - раствор фильтра первой хроматографии смешанного режима (1 MM FT); дорожка 5 - промывка колонки первой хроматографии в смешанном режиме (1 MM CW); дорожка 6 - раствор загрузки второй хроматографии в смешанном режиме (2 MM загрузка); дорожка 7 - несвязанный раствор второй хроматографии в смешанном режиме (2 MM несвязанный); дорожка 8 - элюат второй хроматографии в смешанном режиме (2 MM элюирование); дорожка 9 - промывка колонки второй хроматографии в смешанном режиме (2 MM CW).

На фиг. 2C показаны результаты выполнения анализа SDS-PAGE для 150 кДа (что является внутренним размером композиции антитела против ТFPI) в невосстанавливающих условиях (слева) и для тяжелой цепи 50 кДа и легкой цепи 25 кДа в восстанавливающих условиях (справа) для подтверждения наличия антител в веществе в различных процессах, от второй ультрафильтрации и диалфильтрации до способа приготовления лекарственного вещества, а также для подтверждения профиля удаления примесей. Дорожки для образцов представленных гелей для SDS-PAGE следующие: дорожки 1 и 8 - маркеры; дорожка 2 - ретентат второй UF (ретентат 2ой UF); дорожка 3 -пермеат второй UF (пермеат 2ой UF); дорожка 4 - нанофильтрат; дорожка 5 - конечный ретентат; дорожка 6 - пермеат конечного концентрирования; дорожка 7 - лекарственное вещество.

#### Способ осуществления изобретения

Высокоэффективная композиция антитела против ТFPI согласно настоящему раскрытию может быть получена оптимизированным способом, как описано ниже. Однако настоящее раскрытие не интерпретируется как ограниченное вариантами осуществления согласно настоящему раскрытию, и оптимальные условия могут изменяться с изменениями в условиях процесса.

### 1. Сбор культур и осветление.

Способ сбора и осветления культуры предназначен для удаления клеток и клеточного дебриса, содержащегося в культуре. Этот способ выполняли при температуре от 15 до 25°C.

Сначала держатель POD был оснащен фильтром POD надлежащим образом, а затем ручка держателя была повернута, чтобы предотвратить утечку жидкости к частям, отличным от входного и выходного отверстий, и фильтр был промыт водой для инъекций объемом от 200 до 300 л.

После этого пропускали буфер для осветления культур для промывки фильтра POD, установленного в держателе, и фильтра стерильной капсулы, присоединенного к выпускному отверстию. Клапан для сбора культур открывали для инициации осветления культуры, и давление в системе фильтра POD регулировали так, чтобы оно не превышало 29 фунтов на кв.дюйм (2 бар) во время осветления культуры.

После завершения осветления культуры, как описано выше, проводили дополнительную промывку буфером для осветления культур. После завершения дополнительной промывки контейнер, содержащий собранную осветленную культуру, взвешивали и использовали в следующем процессе. Параметры способа и QA/PA (характеристики качества/производительности) сбора культур и способа осветления показаны в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Типовой способ	Параметры способа	Рабочие диапазоны
Сбор и осветление культур	Входное давление (бар) во время осветления	$\leq 2$
	Рабочая температура (°C)	20±5
	QA/PA	Результаты
	Содержание белка (мг/мл)	0,585
	Содержание НСР (нг/мл)	559435,9
	Эффективность активности связывания Значение EC <sub>50</sub> (нг/мл)	3,91

### 2. Аффинная хроматография.

Способ аффинной хроматографии предназначен для адсорбции и извлечения композиции антитела против TFPI из культуры. Этот способ выполняли с использованием смолы Mabselect sure при температуре от 15 до 25°C, но не ограничиваясь этим, также можно использовать обычную смолу с протеином А.

Сначала проводили оценку набивки с использованием системы очистки АКТА для подтверждения пригодности. Кроме того, раствор СІР промывали в течение 15 мин, а затем выполняли очистку буфером для промывки колонки.

После выполнения уравнивания с уравнивающим буфером осветленная культура была присоединена и адсорбирована, и образец, пропущенный через колонку, собирали в виде несвязавшегося раствора. После завершения адсорбции проводили повторное уравнивание путем промывки уравнивающим буфером. В это время раствор для повторного уравнивания, который прошел через колонку, собирали вместе с несвязавшимся раствором. После завершения способа повторного уравнивания колонку промывали промывочным буфером и собирали промывочный раствор, прошедший через колонку.

В способе элюирования колонку промывали элюирующим буфером для аффинной хроматографии, и элюат собирали с момента времени, когда он достиг 0,8-кратного объема геля. Элюат, собранный, как описано выше, нейтрализовали, доводя pH до 4-6 с помощью раствора для регуляции pH, и нейтрализованный элюат хранили при 15-25°C до следующего процесса. После завершения способа проводили промывку колонки, в то время как смолу промывали буфером для промывки колонки. СІР колонки выполняли буфером СІР в течение 15 мин, и pH колонки стабилизировали с помощью уравнивающего буфера. После этого колонку заполняли путем промывания гелевым раствором для консервации, а затем отделяли от системы и хранили.

Параметры способа и QA/PA способа аффинной хроматографии показаны в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Типовой способ	Параметры способа	Рабочие условия
Аффинная хроматография	Загрузка образца (г/л смолы)	20±10
	Загрузка промывочного буфера (CV)	12±6

Буфер для элюирования (рН)	3,4±0,4	
Условия сбора элюата	Собирали с момента времени, когда достигается 0,8 CV объема геля.	
рН для нейтрализации элюата	5,0±1,0	
QA/PA	Результаты	
	Элюат	Нейтрализованный элюат
Выход (%)	103,8	102,8
Чистота (мономер%)	98,3	98,3
НСП (LRV)	2,2	0,3
Содержание НСП (нг/мг)	3601,3	1857,8
Содержание LPA (нг/мг)	3,7	2,5
Эндотоксин (EU /мг)	0,13	0,10

### 3. Вирусная инаktivация.

Способ вирусной инаktivации предназначен для инаktivации оболочечных вирусов при низком рН.

В этом эксперименте способ вирусной инаktivации проводили при температуре от 15 до 25°C. В чистой камере рН нейтрализованного элюата после аффинной хроматографии доводили до рН от 3 до 3,8 (контрольное рН 1), которое является эталонным рН, путем добавления раствора для регуляции рН (0,1 М HCl) при перемешивании элюата, и вирусную инаktivацию проводили при температуре от 18 до 24°C в течение от 45 до 105 мин.

После завершения вирусной инаktivации полученный раствор снова доводили до рН от 4,5 до 5,5 (контрольное рН 2) с помощью раствора для регуляции рН. После этого технологический раствор с установленным рН фильтровали с использованием стерильного капсульного фильтра в пакет для сбора фильтра. После завершения фильтрации раствор, инаktivированный вирусами, подвергали первому процессу ультрафильтрации и диафильтрации, который является следующим процессом. Параметры способа и QA/PA способа вирусной инаktivации показаны в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Типовой способ	Параметры способа	Рабочие условия
Вирусная инаktivация	Рабочая температура (°C)	20 ± 5
	Контрольное рН 1	3,4 ± 0,4
	Контрольное рН 2	5 ± 0,5
	Время инаktivации (мин)	75 ± 30
	QA/PA	Результаты
	Выход (%)	96,8
	Чистота (мономер%)	96,4
	Содержание НСП (нг/мг)	1043,9
Содержание LPA (нг/мг)	1,9	

### 4. Первая ультрафильтрация и диафильтрация.

Первый способ ультрафильтрации и диафильтрации предназначен для воздействия на инаktivированный вирусом раствор с помощью ультрафильтрации и диафильтрации в условиях загрузки первого способа хроматографии в смешанном режиме.

Фактический способ выполнялся следующим образом.

Держатель UF был снабжен мембраной и затягивался динамометрическим ключом до заданного давления, так что фиксирующая пластина прижималась. Собранный держатель UF получил название "UF система". Систему UF подвергали SIP путем циркуляции с раствором SIP для первого способа ультрафильтрации и диафильтрации и промывали водой для инъекций и буфером для первого способа ультрафильтрации и диафильтрации для стабилизации рН.

После этого давление TMP доводили до 1±0,5 бар, регулируя клапан пермеата и клапан ретентата. Инаktivированный вирусами раствор концентрировали до 10±5 мг/мл и подвергали диафильтрации с уравнивающим буфером (буфером для первого способа ультрафильтрации и диафильтрации), что в 5-15 раз превышало концентрированный объем, а затем проверяли соответствие рН и проводимости стандартам и диафильтрацию прекращали.

После этого к линии ретентата подсоединяли фильтр 0,22 мкм, и дополнительную промывку проводили одновременно с фильтрацией. Затем клапан пермеата закрывали, и буфер для диафильтрации, соответствующий примерно от 10 до 30 об.% от конечной массы ретентата, вводили в линию подачи для повышения давления застойной жидкости в концентраторе и линии подачи, и проводили первую дополнительную промывку без дренажа.

Буфер для диафильтрации, соответствующий 20-40 об.% от конечной массы ретентата, вводили в линию подачи, и он циркулировал в течение 1 мин, а затем выполняли вторую дополнительную промывку, пока промывочный раствор полностью не был удален, тем самым доводя концентрацию ретентата до конечной целевой концентрации (от 3 до 7 мг/мл). После этого отфильтрованный ретентат первой UF взвешивали и прикрепляли бумагу для самописца. Параметры способа и QA/PA первого способа ультрафильтрации и диафильтрации, выполняемого, как описано выше, показаны в табл. 4 ниже.

Таблица 4

Типовой способ	Параметры способа	Рабочие условия
Первая ультрафильтрация и диафильтрация	TMP (бар)	1±0,5
	Целевая концентрация белка (мг/мл) после ультрафильтрации	10±5
	pH после диафильтрации	4,6±0,5
	Объем диафильтрации (кратность)	10±5
	Конечная целевая концентрация белка (мг/мл)	5±2
	Объем дополнительной промывки	Первый: от 10 до 30% от конечной массы ретентата
		Второй: от 20 до 40% от конечной массы ретентата.
	QA/PA	Результаты
	Выход (%)	93,1
	Чистота (мономер%)	96,3
	Содержание НСР (нг/мг)	1054,5
	Содержание LPA (нг/мг)	1,9

#### 5. Первая хроматография в смешанном режиме.

Первый способ хроматографии в смешанном режиме предназначен для удаления примесей, таких как НСР и LPA, и для повышения чистоты.

Первый способ очистки хроматографией в смешанном режиме выполняли с использованием смолы смешанного режима PPA при температуре от 15 до 25°C. Сначала проводили оценку набивки с использованием системы очистки АКТА для подтверждения пригодности. После этого выполняли способ стерилизации путем промывки раствором СІР и пропускания промывочного буфера через колонку, а затем выполняли способ уравнивания промывкой уравнивающим буфером.

После завершения уравнивания с помощью описанных выше процессов подсоединяли ретентат первой UF, а затем выполняли способ фильтрации. Для первой очистки хроматографией в смешанном режиме образец загружали в способ режима фильтрации, и сбор раствора элюата начинали с момента загрузки. После завершения загрузки образца вводили уравнивающий буфер и выполняли способ повторного уравнивания для полного извлечения раствора фильтрата, оставшегося в колонке.

После этого выполняли промывку колонки путем промывания колонки промывочным буфером, и СІР колонки выполняли с помощью СІР-буфера. После завершения СІР pH колонки стабилизировали промыванием уравнивающим буфером. В это время колонку заполняли гелевым раствором для консервации, а затем отделяли от системы и хранили отдельно.

Параметры способа и QA/PA первого способа хроматографии в смешанном режиме, выполняемого, как описано выше, показаны в табл. 5 ниже.

Таблица 5

Типовой способ	Параметры способа	Рабочие условия
Первая хроматография в смешанном режиме	Условия pH	pH 4,6±0,5
	Концентрация загрузки образца (мг/мл)	5±2
	Количество загруженного образца (г/л смолы)	40±20
	QA/PA	Результаты
	Выход (%)	99,5
	Чистота (мономер%)	97,5
	Содержание НСР (нг/мг)	87,4
	НСР (LRV)	1,1
	Содержание LPA (нг/мг)	0,5
	Эндотоксин (EU/мг)	0,13

#### 6. Вторая хроматография в смешанном режиме.

Этот способ предназначен для удаления полимерного антителя и оставшихся примесей, таких как НСР.

Второй способ очистки с помощью хроматографии в смешанном режиме проводили с использованием керамической гидроксипатитовой смолы СНТ при температуре от 15 до 25°C. Сначала проводили оценку набивки с использованием системы очистки АКТА для подтверждения пригодности.

После этого раствор элюата первой хроматографии в смешанном режиме разбавляли в соотношении 1:1 буфером для разбавления и проверяли, соответствует ли он стандартам рН и проводимости. Его использовали в качестве загрузочного раствора после стерилизации и фильтрации. Затем выполняли стерилизацию путем промывания раствором СІР 1 и пропускания промывочного буфера через колонку, и уравнивание выполняли промыванием уравнивающим буфером. После завершения уравнивания, как описано выше, подсоединяли загрузочный раствор для второй хроматографии в смешанном режиме и выполняли процесс адсорбции. После завершения адсорбции выполняли процесс повторного уравнивания путем промывки уравнивающим буфером.

После завершения повторного уравнивания колонку промывали буфером для элюирования и элюат собирали до тех пор, пока UF-пик не упал ниже 0,1 ОЕ. В это время, когда UF-пик не соответствовал стандарту, дополнительно загружали элюирующий буфер, соответствующий двукратному объему геля, чтобы UF-значение соответствовало стандарту.

После этого выполняли промывку колонки промывочным буфером. После завершения способа промывки колонки выполняли СІР колонки путем загрузки растворов в следующем порядке: СІР 2 → СІР 3 → СІР 2 → СІР 1. Кроме того, колонку заполняли путем промывки гелевым раствором для консервации, а затем отделяли от системы и сохраняли. Собранный элюат взвешивали, затем фильтровали и хранили при температуре от 15 до 25°C до использования в следующем процессе. Параметры способа и рабочие условия второго способа хроматографии в смешанном режиме показаны в табл. 6 ниже.

Таблица 6

Типовой способ	Параметры способа	Рабочие условия
Вторая хроматография в смешанном режиме	Количество загруженного образца (г/л смолы)	20-40
	рН загрузки образца	рН от 5,5 до 6,5
	Электропроводность при загрузке образца (мСм/см)	2,3±1,0
	Ионная концентрация элюирующего буфера (мМ)	100-160
	РН элюирующего буфера	рН 6,0±0,5
	Критерий прекращения сбора элюата (ЕОП)	<0,1
	QА/РА	Результаты
	Выход (%)	94,3
	Чистота (мономер%)	99,9
	Содержание НСР (нг/мг)	13,2
	НСР (LRV)	0,8
	Содержание LPA (нг/мг)	0,3

#### 7. Вторая ультрафильтрация и диафильтрация.

Второй способ ультрафильтрации и диафильтрации предназначен для концентрирования элюата второго ММ до целевой концентрации, а затем диафильтрации элюата с буфером для состава.

Систему ультрафильтрации подвергали СІР путем циркуляции со раствором СІР для второй ультрафильтрации и диафильтрации и промывали водой для инъекций и буфером для второй ультрафильтрации и диафильтрации для стабилизации рН. Кроме того, давление TMP доводили до 1±0,5 бар, регулируя клапан пермеата и клапан ретентата.

После этого элюат для второй хроматографии в смешанном режиме концентрировали до 20±5 мг/мл и подвергали диафильтрации с уравнивающим буфером (буферы для второй ультрафильтрации и диафильтрации), что в 5-15 раз превышало концентрированный объем. Измеряли их рН и проводимость, и когда они соответствовали стандартам, диафильтрацию прекращали.

Кроме того, клапан пермеата закрывали, второй буфер для ультрафильтрации и диафильтрации, соответствующий 10-30 об.% от конечной массы ретентата, вводили в линию подачи, и выполняли первую дополнительную промывку при переносе застойной жидкости в концентратор и линию подачи без удаления жидкости.

В это время буфер для второй ультрафильтрации и диафильтрации, соответствующий 10-30 об.% от конечной массы ретентата, вводился в линию подачи, и он циркулировал в течение 1 мин, а затем вы-



полняли вторую дополнительную промывку при полном удалении промывочного раствора, тем самым регулируя концентрация ретентата до целевой (от 10 до 20 мг/мл).

После этого набор фильтров А1НС (глубинный фильтр, предварительный фильтр) и фильтр Duga-roge 0,1 мкм подсоединяли к контейнеру для сбора ретентата второй ультрафильтрации и диафильтрации, и выполняли фильтрацию ретентата. После завершения фильтрации выполняли дополнительную промывку диафильтрационным буфером от 3 до 7 л, тем самым доводя конечную концентрацию ретентата для второй ультрафильтрации и диафильтрации до 5-15 мг/мл.

Ретентат второй ультрафильтрации и диафильтрации, отфильтрованный, как описано выше, взвешивали и хранили при температуре от 15 до 25°C до использования в следующем процессе. Параметры способа и QA/PA второго способа ультрафильтрации и диафильтрации показаны в табл. 7 ниже.

Таблица 7

Типовой способ	Параметры способа	Рабочие условия
Вторая ультрафильтрация и диафильтрация	TMP	1,0±0,5
	Целевая концентрация белка (мг/мл) после ультрафильтрации	20±5
	Объем диафильтрации (кратность)	10±5
	pH после диафильтрации	6±0,5
	Целевая концентрация белка ретентата (мг/мл)	15±5
	Объем дополнительной промывки	Дважды с 20±10% от конечной массы ретентата
	Объем дополнительной промывки фильтра (л)	5±2
	Конечная целевая концентрация белка (мг/мл)	10±5
	QA/PA	Результаты
	Выход (%)	96,7
	Чистота (мономер%)	99,9
	Содержание НСР (нг/мг)	5,3
	Содержание LPA (нг/мг)	0,4
	Эндотоксин (EU/мг)	0,04

Как видно из результатов вышеописанного анализа, содержание НСР в композиции антитела против TFPI, полученной посредством второго способа ультрафильтрации и диафильтрации, составляло 5,3 нг/мг, содержание LPA в композиции антитела против TFPI составляло 0,4 нг/мг, а общее содержание НСР и LPA - 5,7 нг/мг. Содержание НСР и LPA в композиции антитела было очень низким, как описано выше, и, таким образом, можно было видеть, что композиция антитела может демонстрировать превосходный эффект в качестве композиции антитела против TFPI.

#### 8. Наночистота.

Способ наночистоты предназначен для удаления вирусов с помощью наночистоты.

Способ наночистоты выполняли с использованием наночистоты (Viresolve Pro) при температуре от 15 до 25°C. Сначала наночистота промывали водой для инъекций, а затем промывали буфером для наночистоты. После этого давление регулятора давления было отрегулировано до 2±0,5 бар, и клапан давления был открыт для начала наночистоты.

После завершения наночистоты выполняли дополнительную промывку с использованием от 1 до 3 л буфера для наночистоты, а затем взвешивали наночистоту. Параметры способа и QA/PA способа наночистоты показаны в табл. 8 ниже.

Таблица 8

Типовой способ	Параметры способа	Рабочие условия
Нано-чистота	Давление (бар)	2,0±0,5
	Объем дополнительной промывки (л)	2±1
	QA/PA	Результаты
	Выход (%)	98
	Чистота (мономер%)	100
	Содержание НСР (нг/мг)	4,5
	Содержание LPA (нг/мг)	0,4

Как видно из приведенных выше результатов анализа, содержание НСР в композиции антитела против TFPI, полученной с помощью способа наночистоты, составляло 4,5 нг/мг, содержание LPA в композиции антител составляло 0,4 нг/мг, а содержание LPA в композиции антител составляло 0,4 нг/мг,

и общее содержание НСР и LPA составило 4,9 нг/мг. Содержание НСР и LPA было очень низким, как описано выше, и, таким образом, можно было видеть, что композиция антитела может проявлять превосходный эффект в качестве композиции антитела против TFPI.

#### 9. Конечное концентрирование.

Способ конечного концентрирования предназначен для концентрирования нанофильтрата до конечной целевой концентрации. Сначала открывали клапан пермеата, осуществляли СІР путем циркуляции с раствором СІР конечного концентрирования, а рН стабилизировали промывкой водой для инъекций и буфером для конечного концентрирования.

После этого давление TMP доводили до  $1 \pm 0,5$  бар, регулируя клапан пермеата и клапан ретентата, и нанофильтрат концентрировали до  $36 \pm 10$  мг/мл. После завершения концентрирования выполняли дополнительное концентрирование до 70% от конечной массы, а затем вводили буфер для конечного концентрирования, соответствующий 10 об.% от уменьшенных 30%, и выполняли первую дополнительную промывку при переносе жидкости, заполненной в линия консервации концентрата без утечки жидкости. Кроме того, вводили буфер конечного концентрирования, соответствующий оставшимся 20 об.%, и он циркулировал в течение 1 мин, и проводили вторую дополнительную промывку при полном удалении промывочного раствора. Получали конечный концентрат и его массу измеряли. Параметры способа и QA/PA способа конечного концентрирования показаны в табл. 9 ниже.

Таблица 9

Типовой способ	Параметры способа	Рабочие условия
Конечное концентрирование	TMP	$1,0 \pm 0,5$ бар ( $14,5 \pm 7,2$ фунта на кв. дюйм)
	Конечная целевая концентрация (мг/мл)	$36 \pm 10$
	Объем дополнительной промывки (л)	Первый: один раз с 10% от массы конечного концентрата; второй: один раз с 20% от массы конечного концентрата
	QA/PA	Результаты
	Выход (%)	96,2
	Чистота (% мономера)	100
	Содержание НСР (нг/мг)	3,9
	Содержание LPA (нг/мг)	0,5

Как видно из приведенного выше результата анализа, содержание НСР в композиции антитела против TFPI, полученной посредством способа конечного концентрирования, составляло 3,9 нг/мг, содержание LPA в композиции антитела составляло 0,5 нг/мг, а общее содержание НСР и LPA составляло 4,4 нг/мг. Содержание НСР и LPA в композиции антитела было очень низким, как описано выше, и, таким образом, можно было видеть, что композиция антитела может демонстрировать превосходный эффект в качестве композиции антитела против TFPI.

#### 10. Состав лекарственного вещества.

Способ приготовления состава лекарственного вещества предназначен для увеличения стабильности лекарственного вещества путем добавления вспомогательного вещества полисорбата 80 и для получения состава лекарственного вещества с целевой концентрацией.

Сначала к конечному ретентату добавляли вспомогательное вещество полисорбат 80 и перемешивали для достаточного перемешивания, и перемешанный раствор фильтровали через фильтр 0,2 мкм, тем самым получая лекарственное вещество.

Таблица 10

Типовой способ	Параметры способа	Рабочие условия
Состав лекарственного вещества	Конечный объем ретентата (л)	8-15
	Количество добавленного 5% полисорбата 80 (мл)	Конечное количество ретентата/500
	Время перемешивания (мин)	10±5
	Лекарственное вещество (кг)	5-20
	QA/PA	Результаты
	Выход (%)	95,7
	Чистота (% мономера)	100
	Содержание НСР (нг/мг)	4,1
	Содержание LPA (нг/мг)	0,4
	Потенциал активности связывания Значение EC <sub>50</sub> (нг/мл)	1,91

Как видно из приведенных выше результатов анализа, содержание НСР в композиции антитела против TFPI, полученной в способе приготовления лекарственного вещества, составляло 4,1 нг/мг, содержание LPA в композиции антител составляло 0,4 нг/мг, а содержание LPA в композиции антител составляло 0,4 нг/мг, и общее содержание НСР и LPA в композиции антител составляло 4,5 нг/мг. Содержание НСР и LPA в композиции антитела было очень низким, как описано выше, и, таким образом, можно было видеть, что композиция антитела может демонстрировать превосходный эффект в качестве композиции антитела против TFPI.

#### 11. Анализ SDS-PAGE.

Для подтверждения наличия антител в полученном лекарственном веществе и подтверждения характера удаления примесей анализ SDS-PAGE выполняли в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

В основных образцах, из которых композиция антитела против TFPI была очищена во время процесса, полосы 150 кДа (что является внутренним размером антитела) в невосстанавливающих условиях и тяжелая цепь 50 кДа и легкая цепь 25 кДа в восстанавливающих условиях (фиг. 2, 3 и 4) считались основными полосами. В результате не было ни неспецифических полос, ни примесей. Кроме того, во время способа были удалены примеси, или полосы антител не детектировались в виде основных полос в несвязавшемся растворе.

Таким образом, можно подтвердить, что способ очистки настоящего раскрытия является оптимальным способом для эффективного получения высокоэффективной композиции антитела против TFPI, которая не загрязнена примесями, микроорганизмами и вирусами из исходного материала культуры.

Далее будут описаны суммированные результаты, полученные при выполнении контрольных экспериментов для выявления эффекта согласно настоящему раскрытию.

#### А. Эксперимент по оптимизации способа для минимизации образования полимеров.

Настоящее изобретение характеризуется минимизацией образования полимера за счет введения способа нейтрализации элюата аффинной хроматографии.

Чтобы минимизировать образование полимера, сначала элюировали композицию антитела против TFPI, поддерживая pH способа элюирования с помощью аффинной хроматографии на уровне от 3,2 до 3,6. Затем вирусную инактивацию проводили при низком pH в течение от 1 ч до 1 ч 30 мин для обеспечения стабильности вируса, а затем следующий способ выполняли при повышенном pH. Чтобы подтвердить, можно ли минимизировать образование полимера путем введения способа нейтрализации, были выполнены три контрольных эксперимента, как показано ниже.

#### Экспериментальный пример 1.

Для обычного антитела вирусную инактивацию проводили сразу после способа элюирования аффинной хроматографией с низким pH, и в этом случае чистота элюата в способе элюирования снизилась с 96,0% до 85% после вирусной инактивации, и содержание в нем полимера увеличилось на 11%.

#### Экспериментальный пример 2.

После способа элюирования аффинной хроматографией при низком pH элюат выдерживали при комнатной температуре от 8 до 16 ч без регуляции pH, а затем подвергали процессу вирусной инактивации. В этом случае чистота 96% сразу после элюирования снижалась до 83% после вирусной инактивации после 8-16 ч выдержки, а содержание полимера увеличилось на 13%.

#### Экспериментальный пример 3.

После способа элюирования аффинной хроматографией с низким pH элюат нейтрализовали до pH от 4,8 до 5,2, выдерживали при комнатной температуре на 8-16 ч, а затем снова титровали до низкого pH и подвергали процессу вирусной инактивации. В этом случае чистота 96% сразу после элюирования снижалась до 91% после вирусной инактивации, а содержание полимера увеличилось на 5%.

Рассматривая эти экспериментальные примеры, можно подтвердить, что образование полимера ин-

гибрировалось примерно в два раза, путем стабилизации вещества посредством способа нейтрализации рН сразу после способа элюирования аффинной хроматографией и последующего выполнения способа вирусной инактивации.

Результаты приведенных выше экспериментальных примеров с 1 по 3 суммированы в табл. 11 ниже.

Таблица 11

	Экспериментальный пример 1	Экспериментальный пример 2	Экспериментальный пример 3
Способ аффинной хроматографии (концентрация полимера)	рН 3,8 7,447 мг/мл 96,02%	рН 3,8 7,447 мг/мл 96,02%	рН 3,8 7,447 мг/мл 96,02%
Способ нейтрализации	-	-	рН 5,02 7,123 мг/мл 96,88%
Способ выдержки	-	рН 3,8 7,447 мг/мл 98,44%	рН 5,02 7,094 мг/мл 96,87%
Способ вирусной инактивации (концентрация полимера)	рН 3,39 → 5,74 6,601 мг/мл 85,10%	рН 3,4 → 5,03 6,502 мг/мл 83,11%	рН 3,39 → 5,74 6,107 мг/мл 90,74%

### 13. Изучение корреляции между образованием полимера и эффектом антитела против TFPI.

Чтобы изучить корреляцию между образованием полимера и эффектом антитела против TFPI, антитела против TFPI, имеющие содержание мономеров 100%, 90% и 60%, соответственно, были сконструированы путем увеличения образования полимера, и были протестированы на их потенциал активности связывания.

Величина  $EC_{50}$  в тесте на потенциал активности связывания для антитела против TFPI, состоящего из 100% мономера, составила 1,91 нг/мл. Величина  $EC_{50}$  в тесте на потенциал активности связывания для антитела против TFPI, имеющего чистоту мономера 90% из-за повышенного содержания полимера на 10%, составила 2,53 нг/мл. Величина  $EC_{50}$  в тесте на потенциал активности связывания для антитела против TFPI, имеющего чистоту мономера 60% из-за повышенного содержания полимера на 40%, составила 3,26 нг/мл. Было подтверждено, что по мере увеличения содержания полимера активность связывания антитела снижалась, и что значение потенциала активности связывания антитела против TFPI, имеющего чистоту мономера 60%, уменьшалось на 40% или более по сравнению с контролем, имеющим чистоту мономера 100%. Результаты представлены в табл. 12 ниже.

Таблица 12

Образцы	$EC_{50}$ (нг/мл)	Относительная эффективность
Чистота мономера 100%	1,91	100
Чистота мономера 90%	2,53	75,5
Чистота мономера 60%	3,26	58,6

### В. Удаление полимера с помощью смолы СНТ.

Антитело против TFPI представляет собой антитело типа IgG4 и характеризуется более высокой степенью образования полимера, чем антитело типа IgG1. По мере образования полимера аффинность связывания антитела против TFPI с TFPI уменьшается, и, таким образом, эффект антитела уменьшается. Следовательно, необходимо должным образом поддерживать условия процесса, чтобы предотвратить образование полимера в способе получения. Тем не менее, высокоэффективное терапевтическое средство на основе антител может быть разработано только тогда, когда можно получить образец антитела высокой степени чистоты путем селективного удаления полимера, полученного в промежуточном процессе.

Чтобы во время способа селективного удалить полимер, содержащийся в антителе, авторы настоящего изобретения после скрининга выбрали смолу смешанного режима (которая является наиболее эффективной смолой керамического гидроксипатита СНТ для очистки) и установили оптимальные условия отделения полимера. В результате было подтверждено, что в способе очистки с использованием смолы СНТ было удалено 12-23% полимера, и, таким образом, была получена чистота, близкая к 100%.

Таблица 13

Способ очистки на колонке с использованием смолы СНТ	Чистота (%)		
	V7	V8	V9
Партия #			
Загруженный раствор	79,62	77,79	87,27
Элюат	100	100	99,97

### С. Концентрирование и способ циркуляции/извлечения буфера.

Степень извлечения способа ультрафильтрации и диафильтрации зависит от условий давления, свойств белка и концентрации белка.

Таким образом, было подтверждено, что степень извлечения может быть увеличена в соответствии с методом извлечения белка при тех же условиях. То есть было подтверждено, что выход можно увеличить даже за счет извлечения белка, адсорбированного на мембране, при циркуляции промывочного раствора.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против ингибитора пути тканевого фактора (TFPI) для лечения гемофилии, где общее содержание белка клетки-хозяина (HCP) и выселяемый протеин А (LPA) в этой фармацевтической композиции составляет менее чем 10 нг/мг, где эта фармацевтическая композиция получена за счет минимизации образования полимеров путем следующего процесса:

способом элюции аффинной хроматографии с рН от 3,0 до 3,8;

способом рН нейтрализации и выдержки;

способом вирусной инактивации.

2. Композиция по п.1, где общее содержание HCP и LPA составляет 5 нг/мг или менее.

3. Композиция по п.1 или 2, полученная посредством

способа осветления культуры, содержащей антитело против TFPI;

способа элюции аффинной хроматографии с рН от 3,0 до 3,8;

способа рН нейтрализации и выдержки;

способа вирусной инактивации;

способа ультрафильтрации и диафильтрации;

способа хроматографии в смешанном режиме;

способа нанофильтрации;

способа конечного концентрирования.

4. Композиция по п.3, где способ хроматографии в смешанном режиме включает удаление 98% или более полимера антитела против TFPI путем выполнения двух или более из множества способов хроматографии в смешанном режиме с использованием различных типов колоночных смол.

5. Композиция по п.3, где способ аффинной хроматографии включает стадии:

нейтрализация элюата, прошедшего через колонку для аффинной хроматографии, в диапазоне рН от 4 до 6;

выдержка нейтрализованного элюата при комнатной температуре (от 15 до 25°C) в течение 8-16 ч.

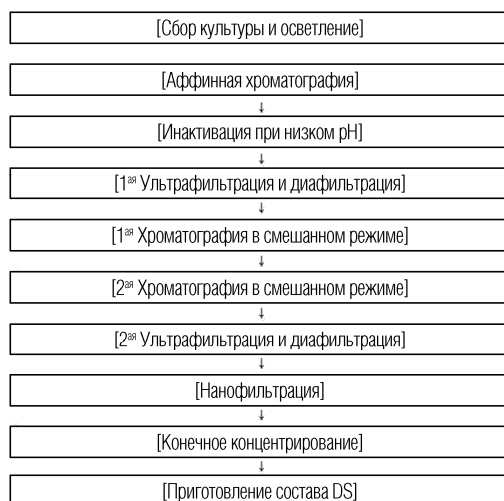
6. Композиция по п.3, где способ концентрирования включает способ циркуляции/извлечения промывочного раствора.

7. Композиция по п.1, где содержание полимера антитела против TFPI в композиции составляет менее чем 5%.

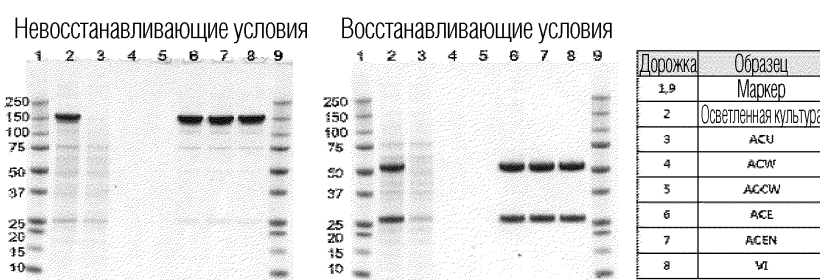
8. Композиция по п.1, где композиция имеет значение  $EC_{50}$  3,26 нг/мл или менее.

9. Композиция по п.1, где композиция имеет настолько высокую чистоту, что содержание HCP на единицу содержания антитела против TFPI в фармацевтической композиции, подвергнутой способу очистки, по меньшей мере в 50000 раз ниже, чем содержание HCP на единицу содержания антитела против TFPI в осветленной культуре.

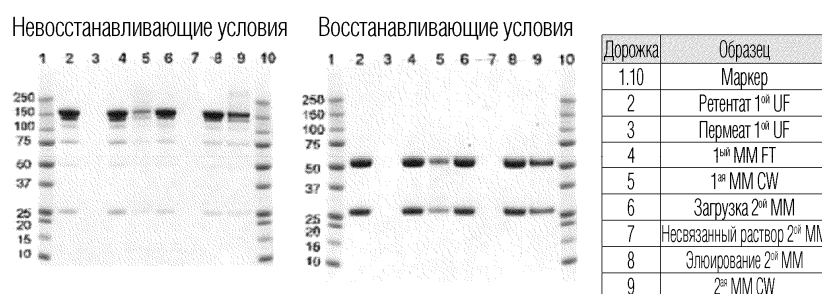
10. Композиция по п.1, где относительное значение активности композиции составляет 85% или выше по сравнению со 100% мономером.



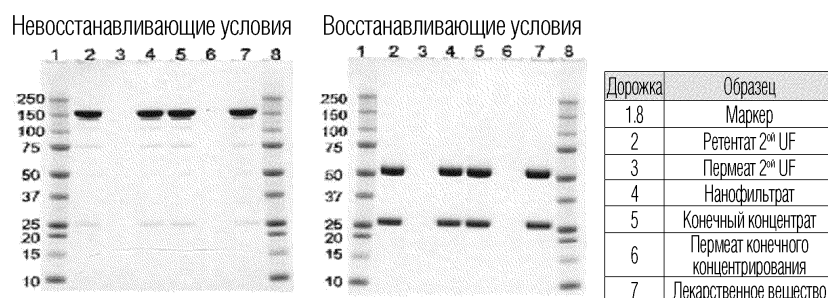
Фиг. 1



Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 2С

